



**Universidad Autónoma de Madrid**

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

***“Drosophila melanogaster como modelo de la  
pérdida sináptica temprana en la enfermedad de  
Alzheimer”***

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

**Begoña López Arias**

Madrid, Junio de 2012





**Universidad Autónoma de Madrid**

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

***“Drosophila melanogaster como modelo de la  
pérdida sináptica temprana en la enfermedad de  
Alzheimer”***

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

**Begoña López Arias**

Para la obtener el grado de Doctor en Ciencias  
por la Universidad Autónoma de Madrid

VºBº del Director de la tesis:

**Dra. Laura Torroja Fungairiño**

Madrid, Junio de 2012



## ABREVIATURAS

<b>ADAM</b>	Dominio de desintegrina y metaloproteasa ( <i>A Disintegrin And Metalloprotease Domain</i> )
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AICD</b>	Dominio intracelular de APP ( <i>APP Intracellular Domain</i> )
<b>AMPAR</b>	Receptor del ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico ( <i><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i> )
<b>APOE</b>	Apolipoproteína E ( <i>Apolipoprotein E</i> )
<b>APP</b>	Proteína precursora del péptido amiloide ( <i>Amyloid Precursor Protein</i> )
<b>APPL</b>	Proteína precursora del péptido amiloide de <i>Drosophila</i> ( <i>Amyloid Precursor Protein Like</i> )
<b>Arc</b>	Proteína regulada por actividad asociada al citoesqueleto ( <i>Activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i> )
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>A<math>\beta</math></b>	Péptido $\beta$ -amiloide
<b>BACE</b>	Enzima que corta en el sitio beta de APP ( <i>Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme</i> )
<b>BBT</b>	Tampón fosfato con albúmina de suero bovino y suero caprino y Tritón X-100 ( <i>Bobine serum Phosphate buffered with Triton X-100</i> )
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro ( <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> )
<b>CaM kII</b>	Proteín kinasa dependiente de calcio/calmodulina ( <i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase</i> )
<b>CISK</b>	Kinasa de supervivencia independiente de citokinas ( <i>Cytokine-Independent Survival Kinase</i> )
<b>CREB</b>	Proteína de unión de elementos en respuesta a AMPc ( <i>cAMP-Responsive Element Binding Protein</i> )
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EGTA</b>	Etilenglicol tetra-acetato ( <i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i> )
<b>EJCs</b>	Corrientes excitatorias de la unión ( <i>Excitatory Junction Currents</i> )
<b>ERK</b>	Kinasa regulada por señal extracelular ( <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> )
<b>FKHR</b>	Factor de transcripción relacionado con Forkhead ( <i>Forkhead-related transcription factor</i> )
<b>fMRI</b>	Imagen de resonancia magnética funcional ( <i>functional magnetic resonance imaging</i> )
<b>GPCRs</b>	Receptores unidos a proteína G ( <i>G protein-coupled receptors</i> )
<b>GSK-3</b>	Glucógeno sintasa kinasa 3 ( <i>Glycogen Synthase Kinase-3</i> )
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano ( <i>Horse radish peroxidase</i> )
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 ( <i>Insulin Growth Factor type-1</i> )
<b>LTD</b>	Depresión a largo plazo ( <i>Long Term Depression</i> )
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo ( <i>Long Term Potentiation</i> )
<b>MAPK</b>	Proteín kinasa activada por mitógen ( <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> )
<b>MARK</b>	Kinasa que regula la afinidad a microtúbulos ( <i>Microtubule-Affinity Regulating Kinase</i> )
<b>mTOR</b>	Diana para la rapamicina de mamífero ( <i>mamalian Target For Rapamycin</i> )
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear $\kappa$ B ( <i>Nuclear Factor <math>\kappa</math>B</i> )
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento neuronal ( <i>Neuronal Growth Factor</i> )

<b>NGS</b>	Suero caprino normal ( <i>Normal Goat Serum</i> )
<b>NMDAR</b>	Receptores ionotrópicos de glutamato de tipo Ácido N-metil D-aspártico ( <i>N-Methyl-D-Aspartic acid Receptor</i> )
<b>NMJ</b>	Unión neuromuscular ( <i>Neuromuscular Junction</i> )
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>PHOSPHATE BUFFERED SALINE</i> )
<b>PBT</b>	Tampón fosfato salino con 0.3 % Tritón ( <i>Phosphate buffered with Tritón</i> )
<b>PDK1/2</b>	Protein kinasas dependientes de fosfoinositol 1/2 ( <i>3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1/2</i> )
<b>PDS-95</b>	Proteína de la densidad postsináptica 95 ( <i>Postsynaptic Density 95</i> )
<b>PHF</b>	Filamentos helocoidales emparejados ( <i>Paired Helical Filaments</i> )
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol - 3 kinasa ( <i>Phosphoinositide-3-kinase</i> )
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( <i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> )
<b>PIP3</b>	Fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato ( <i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i> )
<b>PKA</b>	Proteín kinasa A ( <i>Protein Kinase A</i> )
<b>PKC</b>	Protein kinasa C ( <i>Protein Kinase C</i> )
<b>PSEN1</b>	Presenilina 1
<b>PSEN2</b>	Presenilina 2
<b>PTEN</b>	Proteína homóloga de la fosfatasa y tensina ( <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i> )
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>RTKs</b>	Receptores para tirosin kinasas ( <i>Receptors for Tyrosine Kinases</i> )
<b>SAP kinases</b>	Kinasas activadas por estres ( <i>Stress Activated Protein Kinases</i> )
<b>sAPP<math>\alpha</math></b>	Fragmento soluble de APP $\alpha$ ( <i>soluble APP alfa</i> )
<b>sAPP<math>\beta</math></b>	Fragmento soluble de APP $\beta$ ( <i>soluble APP beta</i> )
<b>SGK</b>	Kinasa inducible por suero y glucocorticoides ( <i>Serum And Glucocorticoid-Inducible Kinase</i> )
<b>TSC2</b>	Complejo de esclerosis tuberosa 2 ( <i>Tuberous Sclerosis Complex 2</i> )



## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo caracterizado por una pérdida sináptica temprana y una muerte neuronal posterior. Está asumido por la comunidad científica que el péptido amiloide ( $A\beta$ ) es la causa principal de la enfermedad, aunque los mecanismos específicos de sus efectos sinaptotóxicos y neurotóxicos todavía no se conocen con exactitud. Para intentar comprender mejor el papel que juegan los distintos tipos de  $A\beta$  en el desarrollo de la enfermedad, decidimos cuantificar las pérdidas sináptica y neuronal en adultos de *Drosophila* que expresaban las variantes humanas del péptido  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ , y la forma mutada  $A\beta_{42ARC}$ . Nuestros resultados confirman que la expresión panneuronal de las dos variantes de  $A\beta_{42}$ , pero no  $A\beta_{40}$ , causan neurodegeneración. La expresión en motoneuronas de los distintos péptidos disparó la pérdida sináptica en la unión neuromuscular (NMJ) ventral de la mosca, incluso la forma menos tóxica,  $A\beta_{40}$ . Curiosamente, la expresión de  $A\beta_{40}$ , pero no las variantes de  $A\beta_{42}$ , trastocó la oscilación edad-dependiente en el número de contactos sinápticos que se observa típicamente en la NMJ adulta. Actualmente las investigaciones están centradas en evitar el efecto tóxico del péptido y prevenir la pérdida sináptica. La activación de la ruta de PI3K parece un buen candidato para la recuperación sináptica debido a que recientemente se ha descubierto que posee efectos sinaptogénicos tanto en *Drosophila* como en ratones. Por tanto, sobrexpresamos la subunidad catalítica de PI3K en neuronas de *Drosophila*, para tratar de rescatar los fenotipos neuronales dependientes de  $A\beta$ . Nuestros resultados mostraron que mientras que la hiperactivación de PI3K induce un aumento de las sinapsis y recupera la pérdida sináptica, no es capaz de recuperar del todo el fenotipo neurodegenerativo. De nuevo, el grado y el tipo de estos efectos dependieron del péptido expresado.



## SUMMARY

Alzheimer's Disease is a neurodegenerative disorder characterized by early synaptic and late neuronal loss. It is generally accepted that the amyloid A $\beta$  peptide is the primary cause of the disease, although the specific mechanisms that underlie its synaptotoxic and neurotoxic effects are not well understood. To better understand the role of the different types of A $\beta$  in the development of the disease, we quantified synaptic and neuronal loss in adult *Drosophila* flies expressing human A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, or the mutant A $\beta$ 42ARC peptide. Our results confirm that panneural expression of the two A $\beta$ 42 variants, but not of A $\beta$ 40, causes neurodegeneration. Motoneuron expression of the peptides triggers synaptic loss in the adult abdominal neuromuscular junction (NMJ), even with the less toxic type, A $\beta$ 40. Interestingly, expression of A $\beta$ 40, but not of the two A $\beta$ 42 variants, disturbed the age-dependent oscillation of the number of synaptic contacts typically observed in the adult NMJ. Research is now focused on avoiding the toxic effect of the peptide and preventing the synaptic failure. Activation of the PI3K pathway is a good candidate for synaptic recuperation, because it has been shown to exert synaptogenic effects both in *Drosophila* and mouse. Therefore, we overexpressed the catalytic subunit of PI3K in *Drosophila* neurons, to try to rescue the the A $\beta$ -dependent neuronal phenotypes. Our results show that while hyperactivation of PI3K induces an increase of synapses and recovers synaptic loss, it fails to fully recover the neurodegeneration phenotype. Again, the extent and quality of these effects differ depending on the A $\beta$  peptide expressed.



<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
<b>1. Qué es la enfermedad de Alzheimer</b>	<b>8</b>
1.1. Características neuropatofisiológicas: las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares	9
1.1.1. El péptido $\beta$ amiloide se genera por procesamiento proteolítico de la proteína precursora del péptido amiloide (APP)	11
1.1.2. Relación entre el péptido amiloide y la proteína tau	15
1.2. Etiología de la enfermedad de Alzheimer	16
1.2.1. Factores genéticos	16
1.2.3. Factores ambientales	19
1.3. La pérdida sináptica es un proceso temprano en la EA	21
<b>2. Papel del péptido <math>A\beta</math> en la enfermedad de Alzheimer: la Hipótesis amiloide y la plasticidad sináptica</b>	<b>22</b>
2.1. La toxicidad del péptido amiloide y la neurodegeneración	25
2.2. Efectos sinaptotóxicos del péptido amiloide	27
2.3. ¿Tiene el péptido $A\beta$ una función fisiológica?	29
<b>3. La ruta de la PI3K y su influencia en la enfermedad de Alzheimer</b>	<b>31</b>
3.1. El papel de la vía PI3K en la función sináptica	32
3.2. El papel de la vía PI3K en la enfermedad de Alzheimer	34
<b>4. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo para el estudio DE LOS DEFECTOS SINÁPTICOS EN LA ENFERMEDAD DE Alzheimer</b>	<b>36</b>
4.1. <i>Drosophila</i> como modelo para el estudio del desarrollo y función sinápticos	37
4.2. <i>Drosophila</i> como modelo en LA enfermedad de Alzheimer. Estudios previos	37
<b>OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
<b>1. Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>49</b>
1.1. Obtención de estirpes de “uso directo”	51
1.2. Obtención de líneas de “uso no directo”	52
1.2.1. Líneas con los dos UAS en distinto cromosoma	52
1.2.2. Líneas recombinantes	53
<b>2. Condiciones de obtención y mantenimiento de las estirpes experimentales</b>	<b>55</b>
<b>3. Estudio de longevidad</b>	<b>55</b>
<b>4. Protocolos de disección e inmunodetección</b>	<b>55</b>
4.1. Unión neuromuscular larvaria	56
4.2. Unión neuromuscular de adulto	57
<b>5. Estudio de neurodegeneración</b>	<b>59</b>
<b>6. Captura de imágenes</b>	<b>61</b>
<b>7. Procesamiento de imágenes</b>	<b>61</b>
7.1. Cuantificación del número de sinapsis	62
7.2. Cuantificación del número de botones	63
7.3. Cuantificación del número de ramas	63
7.4. Cuantificación de la neurodegeneración	64
<b>8. Análisis estadístico</b>	<b>64</b>

<b>RESULTADOS</b>	<b>69</b>
<b>1. Caracterización de la dinámica de aparición de fenotipos amiloidogénicos generales: longevidad y neurodegeneración.</b>	<b>70</b>
1.1. Efecto del péptido amiloide sobre la longevidad	71
1.1.1. Efecto de la expresión en neuronas: <i>driver</i> D42-Gal4	71
1.1.2. Efecto de la expresión en músculo: <i>driver</i> 24B-Gal4	74
1.2. Efecto del péptido amiloide en neurodegeneración	76
1.2.1. Efecto de la expresión de A $\beta$ <sub>40</sub>	77
1.2.2. Efecto de la expresión de A $\beta$ <sub>42</sub>	79
1.2.3. Efecto de la expresión del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> ARC	79
<b>2. Aproximación a un modelo de enfermedad de Alzheimer en la terminación neuromuscular larvaria de <i>Drosophila</i>: la presencia del péptido amiloide no altera significativamente los parámetros anatómico-funcionales del terminal axónico.</b>	<b>82</b>
2.1. Efecto de la expresión presináptica del péptido A $\beta$ <sub>40</sub>	83
2.2. Efecto de la expresión presináptica del péptido A $\beta$ <sub>42</sub>	85
2.3. Efecto de la expresión presináptica del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> ARC	86
<b>3. Modelo de enfermedad de Alzheimer en individuos adultos de <i>Drosophila</i>: efectos sinaptotóxicos del péptido amiloide en la unión neuromuscular adulta</b>	<b>88</b>
3.1. Caracterización morfológica de la unión neuromuscular adulta	89
3.2. Efecto de la expresión del péptido amiloide en la motoneurona	93
3.2.1. Efecto de la expresión de A $\beta$ <sub>40</sub>	94
3.2.2. Efecto de la expresión de A $\beta$ <sub>42</sub>	96
3.2.3. Efecto de la expresión del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> ARC	98
3.2.4. Comparación del efecto de la expresión en motoneuronas de las tres formas del péptido amiloide	101
3.3. Efecto de la expresión del péptido amiloide en el músculo	103
3.3.1. Efecto de la expresión de A $\beta$ <sub>40</sub>	104
3.3.2. Efecto de la expresión de A $\beta$ <sub>42</sub>	106
3.3.3. Efecto de la expresión de A $\beta$ <sub>42</sub> ARC	108
3.3.4. Comparación del efecto de la expresión en músculo de las tres formas del péptido amiloide	110
<b>4. Activación de la fosfoinositol-3 Kinasa (PI3K) como posible terapia a la pérdida sinaptogénica en un modelo de enfermedad de Alzheimer en adultos de <i>Drosophila</i></b>	<b>112</b>
4.1. Efecto de la sobreexpresión presináptica de PI3K sobre la morfología de la terminación neuromuscular adulta	113
4.2. Efecto de la sobreexpresión presináptica de PI3K y el péptido amiloide: una posible estrategia de recuperación sináptica	115
4.2.1. Expresión de A $\beta$ <sub>40</sub> y sobreexpresión de PI3K en motoneuronas	117
4.2.2. Expresión de A $\beta$ <sub>42</sub> y sobreexpresión de PI3K en motoneuronas	119
4.2.3. Expresión de A $\beta$ <sub>42</sub> ARC y sobreexpresión de PI3K en motoneuronas	119
4.2.3. Comparación del efecto de la expresión en músculo de las tres formas del péptido amiloide	122
4.3. efecto de la sobre-expresión de PI3K sobre la neurodegeneración inducida por el péptido amiloide.	124
4.3.1. Expresión de A $\beta$ <sub>40</sub> y sobreexpresión de PI3K	125
4.3.2. Expresión de A $\beta$ <sub>42</sub> y sobreexpresión de PI3K	126
4.3.3. Expresión del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> ARC y sobreexpresión de PI3K	126
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>131</b>
<b>1. Neurotoxicidad debida a la expresión de las distintas formas del péptido amiloide: efectos sobre longevidad y supervivencia neuronal</b>	<b>132</b>

---

2. La expresión del péptido amiloide en la unión neuromuscular de <i>Drosophila</i> provoca pérdida sináptica temprana	135
3. Los efectos sinaptotóxicos del péptido amiloide dependen de que su expresión sea pre- o post-sináptica	138
4. La activación de la ruta de PI3K promueve la formación sináptica y es capaz de recuperar el fenotipo de pérdida sináptica provocado por A $\beta$	140
5. La activación de la ruta de PI3K es capaz de recuperar la pérdida sináptica pero no de eliminar por completo la degeneración del sistema nervioso inducida por A $\beta$	143
6. Las tres variantes del péptido amiloide, A $\beta_{40}$ , A $\beta_{42}$ y A $\beta_{42}$ ARC, presentan efectos sinaptotóxicos cualitativa y cuantitativamente distintos	144
7. ¿Podemos asignar una función fisiológica a A $\beta$ también en <i>Drosophila</i> ?	146
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>151</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>155</b>





# INTRODUCCIÓN

---





## INTRODUCCIÓN

### 1. QUÉ ES LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Entre las enfermedades neurodegenerativas que afectan al ser humano, la más devastadora a nivel socioeconómico es sin duda la enfermedad de Alzheimer. Se estima que en todo el mundo hay alrededor de 24 millones de personas afectadas por esta enfermedad, y que este dato aumentará hasta alcanzar la cifra de 81 millones en 2040. En España, la enfermedad afecta a unas 800.000 personas (200.000 sin diagnosticar), lo que supone un 1,36% de la población. Afecta al 6% de los mayores de 65 años y 4 de cada 10 mayores de 85 (fuente <http://www.alzheimers-support.com/es/index.html>).

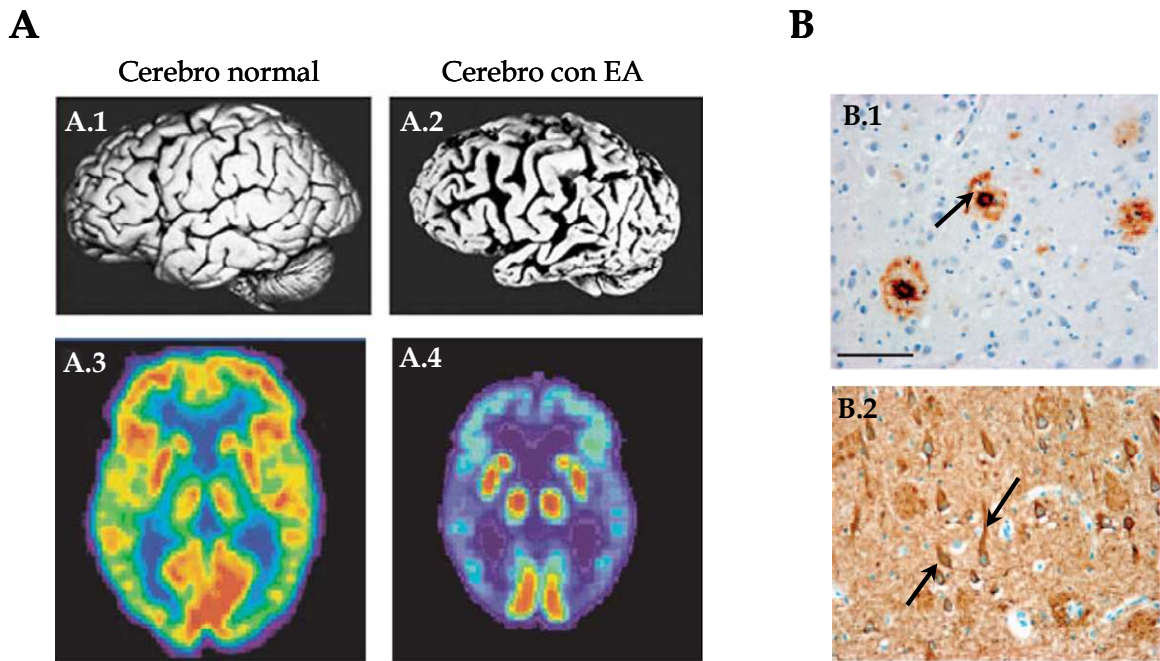
La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neuronal que conduce a una degeneración progresiva del tejido nervioso caracterizada por pérdida de sinapsis y muerte neuronal. Las regiones implicadas en los procesos de memoria y aprendizaje, incluidos los lóbulos frontales y temporales, son los que aparecen más degenerados (Mattson 2004). Por otra parte parece que la pérdida sináptica es la causa de los efectos cognitivos tempranos y no tanto la muerte neuronal. Dicha pérdida comienza principalmente en la corteza entorinal y en el hipocampo, pero termina extendiéndose de forma general al resto de la corteza causando una demencia progresiva (Scheff y Price 2006; Scheff y col. 2007). En muchos casos, es difícil distinguir su sintomatología de otros tipos de demencia, y sólo cuando se pueden observar preparaciones histológicas *post mortem* del paciente se obtiene una respuesta definitiva. Estudiando estas muestras se distinguen dos marcadores histológicos característicos que la definen: las denominadas placas amiloides o seniles, caracterizadas por depósitos extracelulares del péptido  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ), y los "ovillos" neurofibrilares, constituidos por agregados, predominantemente intracelulares, de formas hiperfosforiladas de la proteína tau. La caracterización molecular de los principales componentes de estas dos estructuras en la década de los 80 supuso el primer paso hacia la comprensión de las bases moleculares y celulares de esta enfermedad (Glennner y Wong 1984; Masters y col. 1985; Grundker-Iqbal y col. 1986; Brion y col. 1986). Sin embargo, aún hoy las incógnitas superan con creces a las preguntas para las que se dispone de respuestas claras.

La inmensa mayoría de los casos de EA se da en pacientes mayores de 65 y constituyen los llamados casos esporádicos. Aunque sus causas son desconocidas, es evidente que uno de los factores comunes implicados es el envejecimiento. Sin embargo, la tendencia actual es

a considerar los casos esporádicos de Alzheimer como un conjunto variado de desórdenes con una patología común, pero causados por multitud de mecanismos patogénicos complejos, aunque interrelacionados. En este sentido, los esfuerzos por entender las causas primarias de la enfermedad se han centrado en el estudio de formas hereditarias (o familiares) autosómicas dominantes de la misma, que se manifiestan de forma precoz en pacientes menores de 60 años, y que constituye menos del 1% de los casos de EA (Goedert y Spillantini 2006). La inmensa mayoría de las mutaciones identificadas hasta hoy en formas familiares de la EA alteran la formación, agregación, y/o degradación del péptido amiloide (Citron y col. 1992; Suzuki y col. 1994; Goedert y Spillantini 2006; Sahlin y col. 2007). Este dato ha sido decisivo para plantear la denominada hipótesis amiloide, según la cual el origen de la enfermedad reside en los efectos tóxicos de formas agregadas del péptido sobre la función neuronal (Hardy y Selkoe 2002). La hipótesis se sustenta también en la sintomatología típica de Alzheimer asociada al síndrome de Down, en el cual la sobreproducción del péptido A $\beta$  se explica porque éste deriva de una proteína, APP (Proteína precursora del péptido amiloide -*Amyloid precursor protein*-), codificada en el cromosoma trisómico 21 (Masters y col. 1985; Kang y col. 1987). Sin embargo, existen multitud de hipótesis alternativas para explicar la etiología de la enfermedad (<http://www.alzforum.org>), y dado que hoy por hoy no hay evidencias definitivas para ninguna de ellas, cualquier investigación que arroje nuevos datos sobre posibles mecanismos implicados en el progreso de la enfermedad contribuirá a entenderla y tratarla adecuadamente.

### **1.1. CARACTERÍSTICAS NEUROPATOFISIOLÓGICAS: LAS PLACAS AMILOIDES Y LOS OVILLOS NEUROFIBRILARES**

A nivel macroscópico, la EA se caracteriza por una pérdida de aproximadamente el 20 % de peso cerebral y atrofia cortical. Esto afecta principalmente a los lóbulos temporal y frontal y es debido a la pérdida sináptica y muerte neuronal (Selkoe 2002) (Figura 1A). A nivel microscópico, además de los dos componentes histológicos característicos, las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (Figura 1B), aparecen neuritas distróficas, neuronas en proceso de degeneración, y astrocitos y microglía activados, especialmente alrededor de las placas seniles.



**Figura 1: Características morfológicas de la EA.** A) Comparativa entre un cerebro normal (imágenes de la izquierda) y uno con EA (imágenes de la derecha). Como se puede observar, en un cerebro con EA hay pérdida de volumen cerebral (comparar A.1 y A.2). En A.3 y A.4 se observan imágenes de tomografía de emisión de positrones (PET), señalando el consumo de glucosa. En los pacientes con EA hay un gran descenso de metabolismo energético (Modificado de [Mattson 2004](#)). B) Imágenes que muestran las placas amiloides (B.1) y los ovillos neurofibrilares (B.2) (modificado de [Haass y Selkoe 2007](#)). (La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ ).

La composición de los depósitos amiloides fue descrita por primera vez por [Glennner y Wong en 1984](#), donde determinaron que dichas placas estaban compuestas por una proteína fibrilar que compartían las muestras de EA y Síndrome de Down. Un año después se purificó y caracterizó el componente principal de las placas seniles que se denominó péptido  $\beta$ -amiloide ([Masters y col. 1985](#)), y que procede del procesamiento de una proteína precursora, APP, codificada en el cromosoma 21, precisamente el cromosoma que se encuentra triplicado en el síndrome de Down ([Kang y col. 1987](#)). Aunque en el cerebro se encuentran principalmente dos variantes del péptido de 40 y 42 aminoácidos (nombrados  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  respectivamente) ([Näslund y col. 1994](#)), en condiciones normales es  $A\beta_{40}$  la variante más abundante, mientras que el péptido  $A\beta_{42}$  constituye el componente mayoritario de las placas amiloides. Justamente,  $A\beta_{42}$  es la forma más insoluble y agregante ([Jarret y col. 1993](#); [Younkin 1995](#)), y la de mayor toxicidad (ver a continuación). De hecho, el aumento en la relación  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  es uno de los parámetros más útiles para confirmar el diagnóstico de una probable EA.

Por otro lado, el componente de los “ovillos” neurofibrilares fue descubierto por dos grupos de forma independiente en 1986 ([Grundker-Iqbal y col. 1986](#); [Brion y col. 1986](#)), los

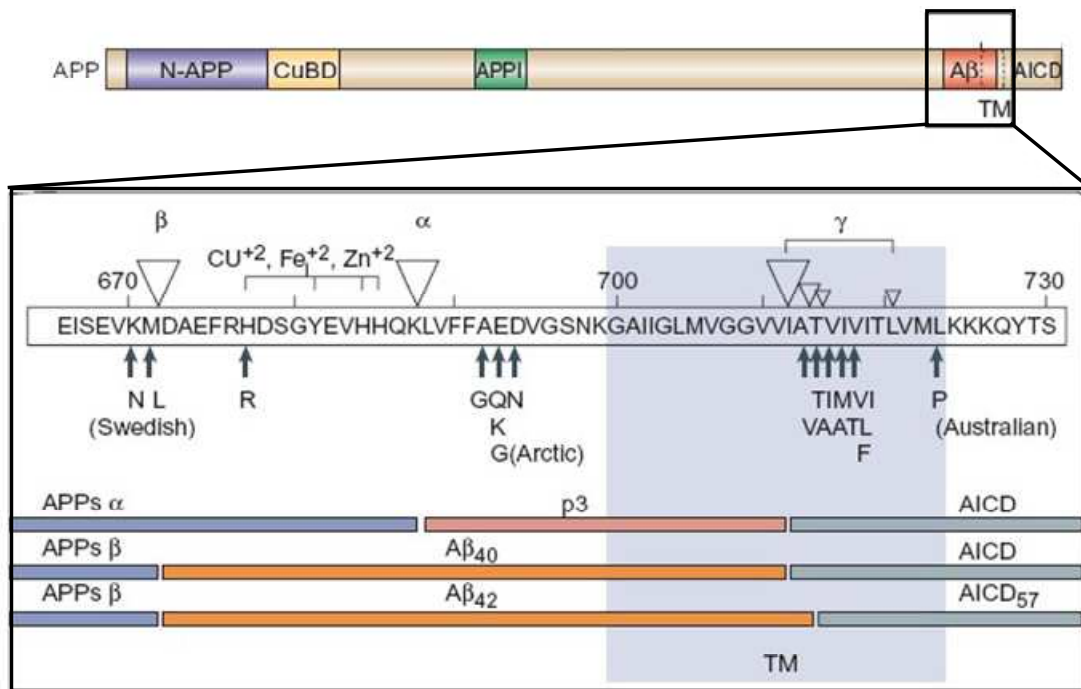
cuales identificaron a la proteína axonal de unión a microtúbulos tau ( $\tau$ ) como el principal integrante de dichos ovillos. La proteína  $\tau$  tiene como función normal acelerar el proceso de nucleación del microtúbulo y estabilizar al mismo gracias a la inhibición de la disociación de la tubulina en los extremos (Alberts y col. 2002). En la EA, la hiperfosforilación anómala de  $\tau$  induce un estado de plegamiento erróneo que promueve su agregación y fibrilación, dando lugar a los filamentos helicoidales emparejados (PHF *-paired helical filaments-*) y finalmente a los ovillos (Kuret y col. 2005). Puesto que la función de  $\tau$  depende de su estado de fosforilación, se ha propuesto que su fosforilación anómala en EA podría alterar la dinámica del citoesqueleto. En este sentido, varias kinasas y fosfatasa se han implicado en el desarrollo de la EA en relación con  $\tau$ . Estas incluyen la glicógeno sintasa-3 kinasa (GSK-3), la proteína kinasa activada por mitógenos (MAPK), la proteína kinasa dependiente de calcio/calmodulina II (CaMK II) y la kinasa Akt, entre otras, o las fosfatasa 2A y 2B (para una revisión ver Buee y col. 2000).

### **1.1.1. El péptido $\beta$ amiloide se genera por procesamiento proteolítico de la proteína precursora del péptido amiloide (APP)**

La proteína precursora del péptido amiloide APP pertenece a una extensa familia de proteínas, que incluye no sólo homólogos en otras especies, sino también en la misma especie (*amyloid precursor-like proteins* o APLPs). La secuencia humana se clonó en 1987 (Kang y col. 1987) y a partir de entonces se fueron encontrando homólogos en vertebrados (para una revisión ver Coulson y col. 2000). También se han encontrado homólogos o "APP-like" en *Drosophila* (*Appl*) (Rosen y col. 1989) y *C. elegans* (*apl-1*) (Daigle y Li 1993). Además, en mamíferos se han identificado dos genes adicionales que codifican APLPs, denominados APLP-1 (Paliga y col. 1997; Wasco y col. 1992) y APLP-2 (Sprecher y col. 1993; Wasco y col. 1992; Wasco y col. 1993; Yan y col. 1990). Dentro de la misma especie, estas proteínas conservan una elevada homología estructural y de secuencia, pero, curiosamente, el fragmento correspondiente al péptido A $\beta$  es muy divergente.

APP es una proteína integral de membrana con un gran extremo N-terminal glicosilado y un dominio C-terminal citoplasmático corto. La secuencia del péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) incluye parte de la región aminoterminal adyacente al dominio transmembrana, y parte de la región transmembrana (Figura 2). APP es producida en varias isoformas que varían en tamaño desde los 695 a 770 residuos aminoácidos (Kang J. y col 1987; Mattson M.P. 1997; Selkoe 2001).

El procesamiento proteolítico de APP es bien conocido y sigue principalmente dos vías que se dan de forma habitual en las células: la denominada ruta convencional (o “no amiloidogénica”), que es la que ocurre en el 90% de los casos, y la amiloidogénica, que tiene lugar en el 10% restante (Figuras 2 y 3). Condiciones (genéticas y/o ambientales) que causan un desajuste entre ambas rutas o el incremento de la ruta amiloidogénica, desembocan en la producción de un exceso de A $\beta$ , que está directamente relacionado con las condiciones patológicas de la EA (Cohen y Kelly 2003).



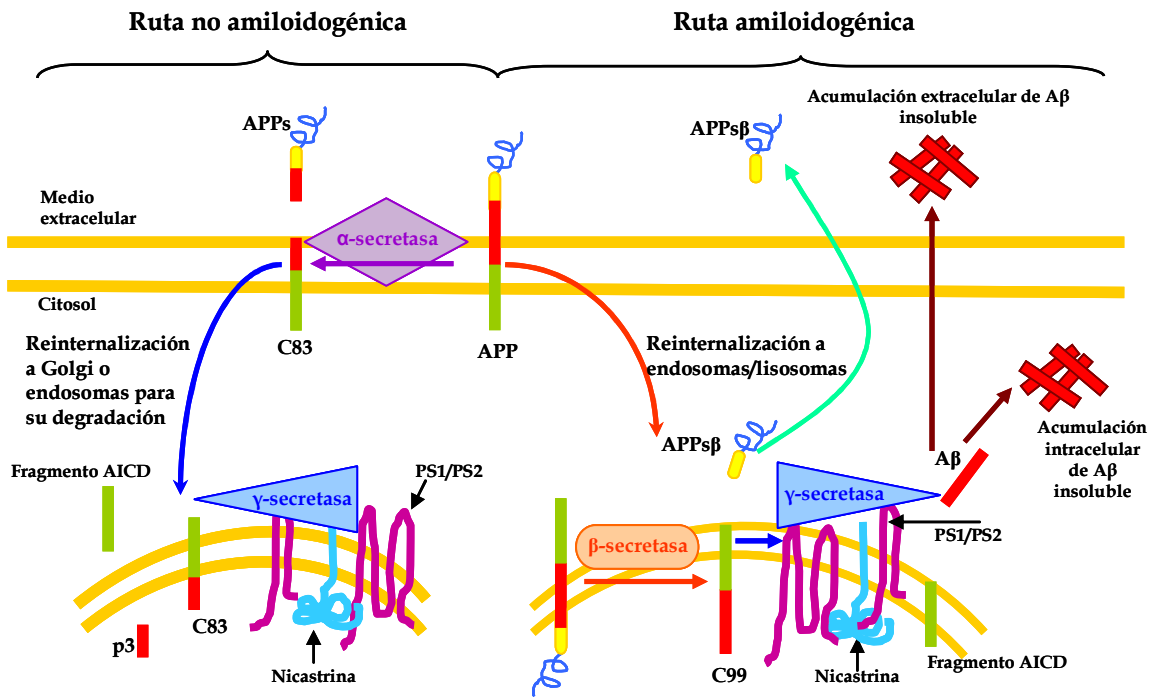
**Figura 2: Estructura de APP.** El esquema muestra los distintos dominios de unión de APP: N-APP, dominio trófico N-Terminal; CuBD, dominio de unión al cobre; APPI, dominio de inhibición de proteasas; A $\beta$ , secuencia del péptido amiloide; AICD, dominio intracelular de APP. En el recuadro se representa la secuencia del péptido amiloide y aminoácidos flanqueantes. En azul se señala el dominio transmembrana (TM). Los lugares de corte para las secretasas se representan con triángulos invertidos, y los aminoácidos donde mapean las mutaciones familiares EA se representan con flechas. Por último se muestran el procesamiento proteolítico que sufre APP y los distintos fragmentos que se generan (Modificado de Bossy-Wetzel y col. 2004).

La ruta no amiloidogénica o convencional (Figura 3) comienza con un corte enzimático en una región aminoterminal muy cercana al dominio transmembrana (Esch y col. 1990). Las enzimas proteolíticas implicadas, son las denominadas  $\alpha$ -secretasas, que pertenecen a una familia de desintegrinas y metaloproteasas denominadas ADAM. Estas enzimas cortan en mitad de la secuencia A $\beta$ , impidiendo así su formación, y liberando un péptido soluble (sAPP $\alpha$  -soluble APP alfa-) y un pequeño fragmento con el extremo carboxílico denominado

C83. Una peculiaridad del procesamiento de APP, que ahora se sabe que está extendido a muchas otras proteínas, es que sufre cortes enzimáticos en la región transmembrana. Este procesamiento es llevado a cabo por el complejo proteolítico denominado  $\gamma$ -secretasa, que está formado por las Presenilinas 1 y 2, Nicastrina, Aph-1 (homólogo en mamíferos del “*anterior pharynx-defective phenotype*,” en *C. elegans*) y Pen-2 (de *presenilin enhancer 2*) (Edbauer y col. 2002; Edbauer y col. 2003; De Strooper 2003). En la ruta no amiloidogénica la  $\gamma$ -secretasa actúa sobre el fragmento C83 predominantemente en el Golgi o en el lumen del Retículo Endoplásmico (Roßner 2004), liberando un fragmento citoplásmico denominado AICD (*Amyloid Intra Celular Domain*) y el fragmento aminoterminal P3. , los cuales se degradan posteriormente (Zhang y col. 2012).

En la ruta amiloidogénica (Figura 3), la enzima  $\beta$ -secretasa (BACE) produce un corte en el extremo N-terminal de la secuencia A $\beta$  (Vassar y col. 1999) que genera el fragmento soluble sAPP $\beta$  (de *soluble APP beta*) y un fragmento unido a membrana, denominado C99. Este fragmento contiene la secuencia A $\beta$  en su región aminoterminal, y va a ser el sustrato de la  $\gamma$ -secretasa en la ruta amiloidogénica. La  $\gamma$ -secretasa corta principalmente en dos posiciones alternativas del extremo C-terminal del péptido A $\beta$ , que resultan en las dos formas mayoritarias A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$ . Este procesamiento ha sido descrito en varios compartimentos subcelulares, que incluyen al retículo endoplásmico y a la red trans-Golgi, aunque el más común parece ser el compartimento endosomal-lisosomal (revisado en Small y Gandy 2006). De este modo se produce el péptido A $\beta$  y el fragmento citoplásmico AICD, que se ha descrito que puede translocarse al núcleo y regular expresión génica (Thinakaran y Koo 2008).





**Figura 3: Procesamiento de APP.** En la ruta no amiloidogénica se produce un corte por  $\alpha$ -secretasa en la región central del péptido amiloide, cerca de la membrana plasmática. Así se libera un fragmento N-terminal soluble (denominado sAPP $\alpha$ ) y un fragmento C-terminal (denominado C83) que se internaliza para ser procesado en el Golgi o Reticulo endoplasmático, por la  $\gamma$ -secretasa. En la ruta amiloidogénica, que ocurre principalmente en endosomas, primero actúa la  $\beta$ -secretasa, liberándose un fragmento N-terminal soluble (denominado sAPP $\beta$ ) y quedando el fragmento C99 que será sustrato de la  $\gamma$ -secretasa. Así, la  $\gamma$ -secretasa puede actuar a nivel de membrana liberando el fragmento A $\beta$  y el dominio intracelular de APP (AICD) que puede translocarse al núcleo.

A pesar de que las rutas de procesamiento proteolítico de APP son bien conocidas, poco se sabe de los mecanismos que hacen que se favorezca una u otra. Una de las formas de regular dicho procesamiento es mediante la actividad neuronal. Así, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la estimulación sináptica induce la secreción de A $\beta$  al espacio celular (Kamenetz y col. 2003; Cirrito y col. 2005; Cirrito y col. 2008). Esto parece relacionarse con el desplazamiento del procesamiento hacia la ruta no amiloidogénica inducido por la activación de actividad colinérgica (para una revisión ver Zhang 2004) y también por la activación de los receptores metabotrópicos o ionotrópicos de glutamato (Lee y col. 1995; Marcello y col. 2007). De hecho recientemente se ha demostrado que la actividad sináptica promueve el transporte de APP a las sinapsis y reduce la cantidad de A $\beta$  intraneuronal (Tampellini y col. 2009).



Por otro lado, se están encontrando cada vez más proteínas que son capaces de interactuar con APP, o con las secretasas, y que modulan dicho procesamiento, incrementando o disminuyendo la cantidad de A $\beta$  producido (Zhang y col. 2011; Vingtdeux y Marambaud 2012; Zhang y col. 2012). Así, se ha encontrado que los estrógenos y otras hormonas esteroideas pueden reducir los niveles de A $\beta$  por distintos mecanismos como estimulando la actividad  $\alpha$ -secretasa, o reduciendo los niveles de la actividad  $\gamma$ -secretasa (para una revisión ver Zhang y col. 2011). Por otro lado, la reducción de los niveles de colesterol, un componente esencial de las membranas celulares, aumentan la actividad  $\alpha$ -secretasa (Kojro y col. 2010).

Por otro lado, algunos receptores unidos a proteína G o GPCRs (*G protein-coupled receptors*), incluyendo receptores muscarínicos, metabotrópicos, serotoninérgicos y receptores de neuropéptidos como PACAP, modulan la proteólisis mediada por los distintos tipos de secretasas (para una revisión ver Thathiah y De Strooper 2011). Por otro lado se ha demostrado que diferentes factores de crecimiento así como la señalización mediada por insulina, son capaces de modular el procesamiento de APP (para una revisión ver Slack y Wurtman 2006).

### **1.1.2. Relación entre el péptido amiloide y la proteína tau**

El papel relevante del péptido A $\beta$  en la EA queda confirmado por la existencia de formas hereditarias que mapean, en todos los casos conocidos, en genes implicados en la producción del péptido. Sin embargo, no se ha identificado ningún defecto genético en el gen  $\tau$  asociado a la EA, aunque haplotipos del gen  $\tau$  que conllevan aumentos moderados en la expresión de tau aumentan el riesgo y/o adelantan la aparición de la enfermedad (Myers y col. 2005, Kauwe y col. 2008). Curiosamente, agregados de  $\tau$  aparecen en otros tipos de demencias (tauopatías) de forma individual, lo que indica que estas estructuras no son necesariamente dependientes del péptido amiloide, y apoya que su interacción con A $\beta$  pueda ser relevante en la patología específica de la EA. No es de extrañar, por tanto, que una de los problemas que más ha motivado a los investigadores es encontrar qué relación existe entre ambos. Sin embargo, aún hoy esta es una pregunta que no tiene una respuesta clara.

Los modelos animales de tauopatías muestran neurodegeneración clara, algo que raramente se observa en modelos de Alzheimer. Estos datos, y la mejor correlación espacio-temporal de los ovillos con el proceso neurodegenerativo de los cerebros de EA (Arriagada y col. 1992), han llevado a proponer que las anomalías derivadas de la hiperfosforilación de

tau son las responsables de la neurodegeneración también en la EA. Sin embargo, numerosos estudios *in vitro* han demostrado que A $\beta$  es capaz de inducir la hiperfosforilación de tau, aunque el mecanismo específico no está claro (Greenberg y col 1994; Busciglio y col. 1995; Zheng y col. 2002; Blurton-Jones y Laferla 2006; Huang y Jiang 2009). Además, estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que la co-expresión de A $\beta$  y tau aumenta de manera sinérgica la neurodegeneración, mientras que la reducción de tau previene los efectos neurotóxicos del péptido amiloide (Blurton-Jones y Laferla 2006; Lewis y col. 2001; Götz y col. 2004; Ribé y col. 2005; Roberson y col. 2007). Estos datos serían consistente con un modelo de cascada en el que A $\beta$  induciría las anomalías en tau, y esta a su vez aceleraría el proceso neurodegenerativo.

## 1.2. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Muchas son las teorías que han sido propuestas para explicar la diversidad de anormalidades bioquímicas y patológicas de la enfermedad. También muchos han tratado de dilucidar los factores comunes que hacen que haya una predisposición a padecer EA. Sin embargo, a pesar de todos los avances que se están realizando, y de que hay una serie de factores genéticos y ambientales clave, todavía quedan muchas incógnitas por resolver en el estudio de la EA, principalmente en los casos de EA esporádicos.

### 1.2.1 Factores genéticos

Como ya hemos comentado, la mayor parte de las evidencias en el estudio de la etiología de la EA derivan de los estudios genéticos, que tratan de asociar genes concretos a riesgos elevados de padecer la enfermedad. Estos incluyen los llamados factores de riesgo genéticos, de entre los cuales el más extendido y conocido es el alelo tipo 4 de la Apolipoproteína E (APOE), y los genes que causan formas hereditarias tempranas de EA, que incluyen tres genes implicados en la producción de A $\beta$ : APP y las Presenilinas PSEN1 y PSEN2.

La relación entre EA y APP quedó patente desde el momento en que se descubrió que el péptido A $\beta$  se genera a partir del procesamiento proteolítico de la proteína APP (Kang y col. 1987). Fueron Goate y col. en 1991 los primeros que, basándose en estudios genéticos, demostraron que, además, existían mutaciones en el gen APP que predisponían a los

individuos a padecer EA. Hasta la fecha, hay al menos 20 mutaciones en el gen de *APP*, que causan la enfermedad. Estas mutaciones se pueden dividir en dos grupos: las que están situadas dentro de la región del péptido amiloide, y las que se sitúan en las secuencias que flanquean a dicho péptido (revisado en [Goedert y Spillantini 2006](#)). Los diversos tipos de mutaciones tienen múltiples consecuencias como facilitar el corte por la  $\beta$  o la  $\gamma$ -secretasa o impedir el acceso a la  $\alpha$ -secretasa, y por tanto favorecer la ruta amiloidogénica, variar la proporción entre  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$ , dificultar la degradación del péptido o alterar su capacidad para agregarse ([Goate y col. 1991](#); [Citron y col. 1992](#); [Suzuki y col. 1994](#); [Goedert y Spillantini 2006](#); [Sahlin y col. 2007](#)).

A raíz del descubrimiento de que *APP* estaba implicado en la generación de la EA y que su procesamiento anómalo generaba el péptido amiloide, muchos investigadores se centraron en intentar ligar las moléculas implicadas en dicho procesamiento con formas familiares de la enfermedad. Así, en 1993, se describió por primera vez una de las enzimas implicadas, la  $\gamma$ -secretasa ([Haass y Selkoe 1993](#)). Sin embargo se observó que dicha secretasa estaba formada por un complejo proteico, del que no se conocieron todos sus componentes hasta años más tarde ([De Strooper 2003](#)).

Los primeros componentes descubiertos fueron las Presenilinas. Su hallazgo se consiguió en base a los estudios genéticos de las familias con formas hereditarias de EA. Así en 1995, se descubrieron dos genes nuevos implicados en el desarrollo de la EA familiar: el que codifica la Presenilina 1 (*PSEN1*), en el cromosoma 14 ([Sherrington y col. 1995](#)), y el que codifica la Presenilina 2 (*PSEN2*), en el cromosoma 1 ([Levy-Lahad y col. 1995](#)). Hasta la fecha, se conocen más de 160 mutaciones en *PSEN1* y 2 asociadas a formas familiares de EA; de hecho, mutaciones en *PSEN1* son la causa más común de los casos de Alzheimer familiar. En líneas generales, estas mutaciones aumentan la relación  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  ([Goedert y Spillantini 2006](#)).

Las mutaciones en los genes *PSEN1* ([Xia y col. 1998](#)) y 2 ([Walker y col. 2005](#)) se caracterizan porque alteran su actividad  $\gamma$ -secretasa y, en consecuencia, el procesamiento proteolítico de *APP*. Sin embargo, aunque la función principal de las Presenilinas consiste en proveer de subunidades catalíticas necesarias para la actividad  $\gamma$ -secretasa, que afecta a numerosas proteínas con proteólisis intramembrana, tales como *APP* y Notch ([De Strooper 2003](#)), a lo largo de los años se les han atribuido otras funciones como en tráfico proteico, homeostasis del calcio, o regulación de la señalización por  $\beta$ -catenina, entre otras (para una

revisión ver [De Strooper y col. 2012](#)). Un aspecto controvertido y hasta el momento sin resolver es si estas otras funciones están afectadas en la enfermedad, o si la alteración de la función de APP, causada no sólo por mutaciones en APP, sino también, de manera indirecta, en presenilinas, podría dar cuenta de la etiología de la EA. Esta última hipótesis se enfrenta a la dificultad en encontrar una función clara para APP. Varias son las acciones que se le han atribuido a esta proteína: se ha visto que puede funcionar como un receptor ligado a proteínas G; se le han atribuido funciones de molécula de adhesión a la matriz extracelular actuando como una “*integrin-like*”; además, en relación a su papel en adhesión, parece que posee propiedades tróficas y de migración celular; sus fragmentos intracelulares pueden difundir al núcleo y promover activación génica, y sus fragmentos solubles intervienen en la remodelización sináptica y crecimiento neurítico (para revisión ver [Mattson 1997](#); [Turner y col. 2003](#); [Thinakaran y Koo 2008](#); [Panegyres y Atkins 2011](#)).

Otro de los descubrimientos procedentes de los estudios genéticos a familias con formas tardías, pero genéticamente ligadas de EA, fue que el genotipo del gen *apolipoproteína E* (*APOE*) es un factor de riesgo importante. Así, la posesión del alelo  $\epsilon 4$  de *APOE* aumenta drásticamente el riesgo a padecer la enfermedad y adelanta la aparición de los síntomas de forma dependiente de la dosis de este alelo, aunque portar este alelo no es condición necesaria ni suficiente para que se desarrolle la enfermedad. El riesgo de padecer la enfermedad de portadores de este alelo aumenta no sólo en familias, sino también en individuos sin antecedentes familiares de demencia. Por el contrario, los alelos  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 3$  tendrían una relativa función protectora ([Corder y col. 1993](#); [Strittmatter y col. 1993](#)). Antes de estos descubrimientos, ya se había observado la presencia de *APOE* tanto en placas amiloides como en ovillos neurofibrilares ([Namba y col. 1991](#); [Wisniewski y Frangione 1992](#)).

La proteína *APOE* es conocida por su implicación en el transporte lipídico. Sirve como ligando de los receptores de lipoproteínas de baja densidad, participando así en el transporte de colesterol y otros lípidos ([Mahley 1988](#)), y por tanto interviene en la homeostasis de lípidos y colesterol. En el cerebro, se expresa principalmente en astrocitos y microglía ([Pitas y col. 1987](#); [Grehan y col. 2001](#)), y estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que podría jugar un papel en reparación neuronal, ya que sus niveles están aumentados en respuesta al daño celular (para una revisión ver [Holtzman y col. 2012](#)). A pesar de todo, los mecanismos que hacen que la forma *APOE* $\epsilon 4$  resulte neurotóxica todavía resultan elusivos. Sin embargo hay dos factores que claramente parecen verse afectados por su presencia (para una revisión ver [Kim y col. 2009](#); [Castellano y col. 2011](#)): la variante  $\epsilon 4$  afecta al grado de agregación del péptido

amiloide, fomentando su fibrilación, y presenta una menor capacidad de aclaramiento del A del parénquima cerebral.

### **1.2.3 Factores ambientales**

Debido a la relativa facilidad para estudiar y seguir las características genéticas de la EA en sus formas familiares o heredables, se tienen muchos datos sobre los genes primarios causantes de la enfermedad. Sin embargo, en el caso de la EA de tipo esporádico, poco se sabe sobre su etiología. Gracias a las nuevas tecnologías, en los últimos años se han realizado numerosos estudios genéticos, que han dado lugar a una larga lista de genes ligados a un aumento en la susceptibilidad a la EA, y por tanto potencialmente implicados en la etiopatogenia de la enfermedad (<http://www.alzforum.org>). Sin embargo, hasta el momento, *APOE* es el único que se repite de manera consistente. Para muchos otros genes existen incluso observaciones contradictorias. Estos datos indican que es una enfermedad compleja o multifactorial, causada por la interacción de los productos de varios genes con factores ambientales. A continuación expondremos brevemente algunos de los factores de riesgo ambientales que están más ampliamente estudiados, y aceptados por la comunidad científica.

El envejecimiento es sin duda el primer factor no genético, y hasta ahora el único conocido, que es común a todos los casos de la EA, y esencial para el desarrollo de la enfermedad. Pero, ¿qué factores determinan que el envejecimiento culmine o no en una demencia tipo EA? Y, ¿cuales explican que se desarrolle esta patología específicamente, y no otras tantas también relacionadas con el envejecimiento? Estas son cuestiones aún por resolver, y varias son las posibilidades que se barajan.

Según la teoría oxidativa del envejecimiento, el proceso de envejecer se asocia a una alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS -*Reactive Oxygen Species*-) y un descenso de las defensas contra las mismas, que provocaría toxicidad neuronal y, en casos extremos, neurodegeneración (Perry y col. 1998). En apoyo de esta teoría, la implicación de las ROS en la EA ha quedado sobradamente demostrada (para una revisión ver [Zuh y col. 2007](#); [Clark y col. 2010](#); [Cai y col. 2011](#)). Los cerebros de pacientes con EA muestran un incremento de marcadores de daño oxidativo incluso en etapas muy tempranas de la enfermedad, además de niveles elevados de enzimas antioxidantes en hipocampo y amígdala.

Se ha visto que las fuentes de ROS en los pacientes con la enfermedad son muy variadas, principalmente derivadas de anomalías en mitocondrias y en metales. Se sabe que en dichos pacientes existe una homeostasis alterada del hierro y el cobre, los cuales mediante reacciones químicas (de Haber-Weiss y Fenton) generan radicales (Zhu y col. 2004). Por otro lado, la disfunción mitocondrial juega un papel importante en la patogénesis de la EA, no solo por que modifica la cantidad de ROS de la célula, si no porque altera el metabolismo general. Además los defectos mitocondriales se han caracterizado como uno de los síntomas tempranos de la enfermedad (Zhu y col. 2006). Estos defectos incluyen, alteraciones en las enzimas de la ruta del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Bubber y col. 2005), enzimas del metabolismo oxidativo de la mitocondria (Manczak y col. 2004; Qin y col. 2009), así como una dinámica mitocondrial alterada (Wang y col. 2009; Su y col. 2010; Manczak y col. 2011; Sheng y col. 2012).

La caracterización de APOE como un factor de riesgo relevante en la EA ya sugería una relación entre el metabolismo lipídico y la enfermedad. Estudios epidemiológicos, y en modelos *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que el colesterol, junto con su transportador APOE, juega un papel principal en el riesgo de padecer la EA. Además, estudios epidemiológicos (Kivipelto y col. 2001; Kivipelto y col. 2002; Solomon y col. 2007; Anstey y col. 2008) han encontrado correlación entre los altos niveles de colesterol durante la vida adulta y el riesgo a padecer Alzheimer. Esta relación está apoyada por la asociación entre el riesgo a padecer a EA y algunos polimorfismos en genes que codifican para proteínas que regulan el metabolismo del colesterol (Vestergaard y col. 2010). Alteraciones en el metabolismo del colesterol podrían interferir en el procesamiento de APP, induciendo la vía amiloidogénica. Sin embargo, el mecanismo patológico del colesterol en la enfermedad es un aspecto controvertido, ya que existen hipótesis y datos contradictorios en cuanto a qué niveles de colesterol son dañinos y cuál es su verdadera influencia (revisado en Stefani y Liguri 2009; Harris y Milton 2010; Vestergaard y col. 2010). Esta confusión podría derivar del hecho de que otros lípidos íntimamente relacionados con el colesterol, como esfingolípidos o isoprenoides, también parecen importantes en la etiología de la enfermedad.

La página web *Alzheimer Disease Research Forum* ([www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)) proporciona una fuente excelente de información actualizada con bases de datos sobre variantes genéticas (*AlzGene*, Bertram y col. 2007) y factores de riesgo (*AlzRisk*, Weuve y col., 2012) asociadas a la EA. La lista de variantes genéticas asociadas a formas esporádicas de la enfermedad es muy extensa, y entre los factores ambientales que pueden influir en la aparición de la EA de tipo

esporádico se incluyen la diabetes, hipertensión, problemas de corazón, traumas en el cerebro, consumo elevado de alcohol, dieta no equilibrada, etc. Sin embargo, todavía falta mucho para conocer mejor este tipo de EA debido a que son pocos los datos que se disponen de las variantes esporádicas de la enfermedad.

### 1.3. LA PÉRDIDA SINÁPTICA ES UN PROCESO TEMPRANO EN LA EA

Análisis inmunocitoquímicos y bioquímicos de marcadores proteicos sinápticos, en biopsias y autopsias de pacientes con EA, muestran que la pérdida sináptica en el hipocampo y el neocortex es un evento temprano (Masliah y Terry 1993; Heinonen y col. 1995), y la característica patológica que mejor correlaciona con el deterioro de la función cognitiva (Terry y col. 1991; Selkoe 2002; Coleman y col. 2004). De especial relevancia fue un estudio morfométrico cuantitativo de biopsias corticales de los lóbulos temporal y frontal realizadas entre 2 y 4 años después del diagnóstico de EA. Este mostró que había un descenso del 25 al 35% en la densidad numérica de sinapsis, en el cortex, y de un 15 a un 35% en el número de sinapsis por neurona cortical (Davies y col. 1987). Esta reducción sináptica parece aún más acusada en el hipocampo, donde se ha estimado entre un 44 y un 55% de pérdida sináptica (Scheff y col 2007). Estos defectos en la integridad sináptica son eventos muy tempranos en el desarrollo de la enfermedad, ya que se detectan incluso en pacientes con EA pre-clínica o prodromal (Masliah y col. 2001; Scheff y col. 2006).

En modelos animales de EA, también se ha demostrado que la pérdida sináptica precede a la acumulación de las placas amiloides y de los ovillos neurofibrilares (Hsiao et al., 1996; Oddo y col. en 2003), lo cual confirma que el daño sináptico es un evento temprano. Curiosamente, el deterioro cognitivo en modelos murinos se vuelve evidente antes de la acumulación de las placas pero al mismo tiempo que las espinas y las neuritas se atrofian, rompen y/o reducen significativamente (Tsai y col. 2004; Grutzendler et al., 2007; Knafo y col. 2009).

En humanos con EA, el aumento de  $A\beta$  se asocia con trastornos complejos de actividad neural. Por ejemplo, existen regiones hipometabólicas en la corteza parietal que muestran incrementos anormales de actividad neuronal durante la codificación de memoria, e individuos con Alzheimer familiar precoz con actividad epiléptica. (revisado en Palop y Mucke 2010). De hecho, estudios recientes en los que se examinan a pacientes mediante imágenes de resonancia magnética funcional o fMRI (*functional magnetic*



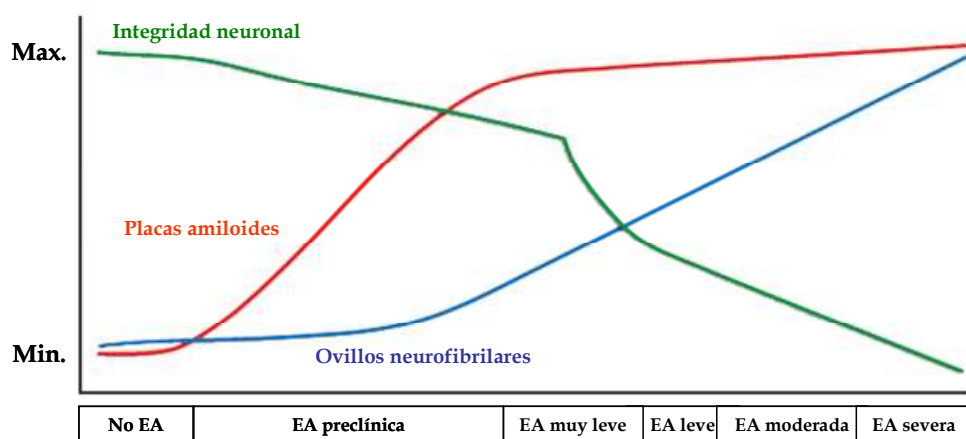
*resonance imaging*) han demostrado que los pacientes de EA presentan una conectividad regional reducida y una organización funcional cerebral trastornada con respecto a los controles normales (Wang y col. 2006; Sorg y col. 2007). Así, el péptido A $\beta$  podría jugar un papel central en la actividad neuronal de algunos tipos específicos de sinapsis, el control de la circuitería neuronal o ambas. Estos defectos en la función sináptica conducen a una falta de conectividad neuronal, lo que acaba provocando una desorganización funcional

## **2. PAPEL DEL PÉPTIDO A $\beta$ EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: LA HIPÓTESIS AMILOIDE Y LA PLASTICIDAD SINÁPTICA**

Los estudios que correlacionan las características histopatológicas con las diferentes fases clínicas de la EA indican que las alteraciones sinápticas son eventos muy tempranos y que, durante la fase pre-clínica de EA, las placas y, posteriormente, los ovillos, se acumulan durante aproximadamente 10-15 años antes de que esta pérdida sináptica y neuronal se manifieste como deterioro cognitivo (Figura 4) (Morris y Price 2001; Perrin y col. 2009). Este modelo encaja con datos bioquímicos y genéticos de modelos animales que demuestran que la agregación de A $\beta$  juega un papel necesario (Hardy y Selkoe 2002), sobre todo en la fase preclínica de la EA, y que la agregación de tau, que se produce en grandes cantidades después, correlaciona mejor con la neurodegeneración que comienza a observarse justo antes de y durante la fase clínica (Carter y Lippa 2001; Goedert y Spillantini 2006). Así pues, los datos sugieren que la acumulación del péptido amiloide estaría directamente implicada en iniciar la enfermedad, mientras que la agregación de tau sería determinante para su progresión (Figura 4).

El descubrimiento de que el procesamiento no habitual de APP por  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas liberaba A $\beta$ , el péptido mayoritario de las placas amiloides, y que las mutaciones en APP y en las presenilinas, componentes de la  $\gamma$ -secretasa, son un factor genético determinante para el desarrollo de la enfermedad, desencadenaron una nueva forma de explicar molecularmente la patogénesis de la EA basada en el péptido amiloide. Así, Hardy y Higgins en 1992 postularon por primera vez la denominada Hipótesis Amiloide. Según esta hipótesis, sería el péptido A $\beta$  la causa primaria de la enfermedad, el cual se acumularía en el sistema nervioso provocando, directa o indirectamente, la aparición de ovillos neurofibrilares, la muerte neuronal, y el deterioro cognitivo típicos de la enfermedad.



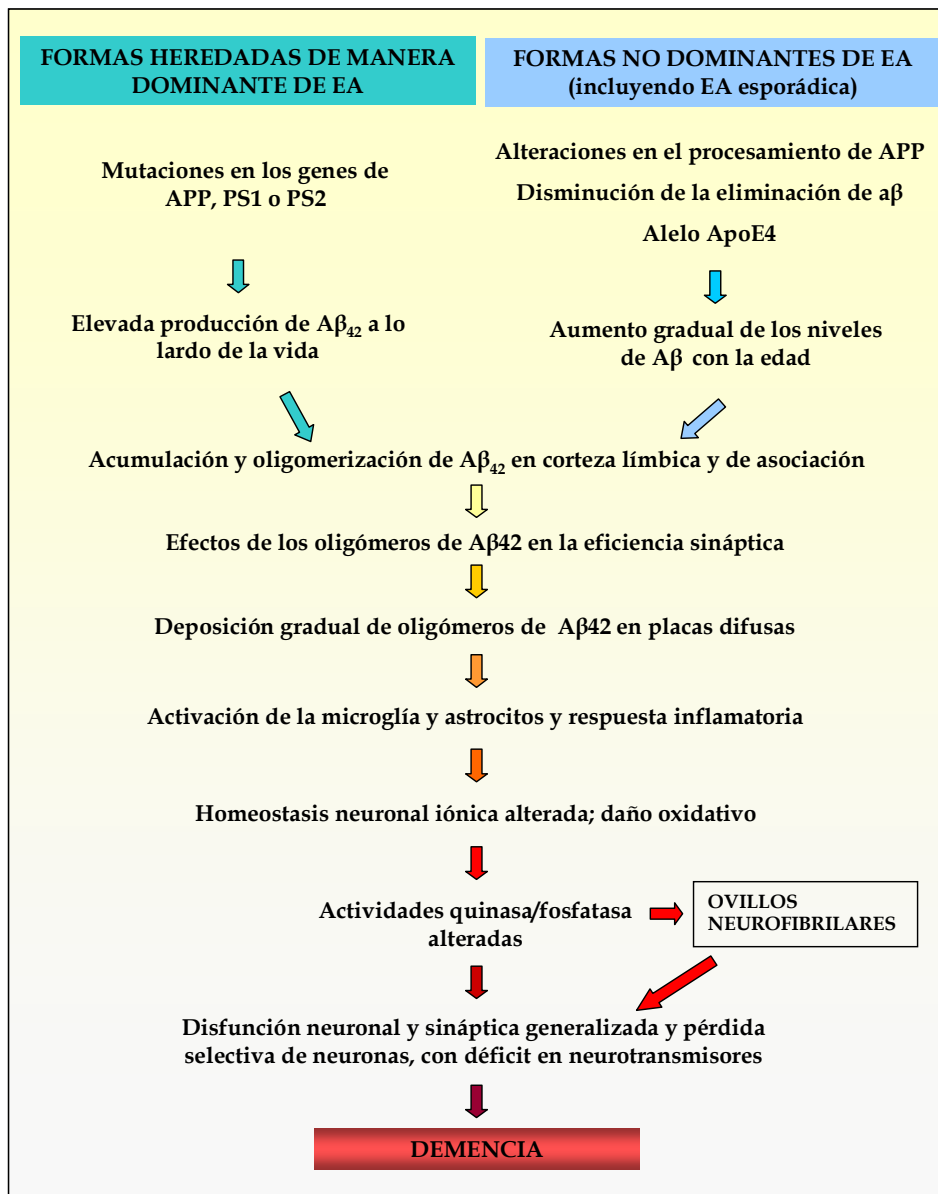


**Figura 4:** Secuencia de los cambios en marcadores histopatológicos a lo largo de los diferentes estados clínicos en la EA. Como se puede observar, la integridad neuronal, medida como pérdida sináptica y neuronal, comienza con la acumulación de las placas amiloides, pero la aparición de los ovillos neurofibrilares acelera dicho proceso y ocurre en los estados avanzados de la demencia (modificado de Perrin y col. 2009).

Años más tarde, la hipótesis amiloide continuó ganando adeptos a medida que aparecieron diversas observaciones que apoyaban dicha teoría. Esta hipótesis se apoya en datos que mostraban que la formación de ovillos neurofibrilares es posterior al daño provocado por  $A\beta$  y su acumulación; que el mal procesamiento de APP ocurre antes que las alteraciones de tau; que el daño está relacionado con el metabolismo del péptido, ya que en estudios con ratones mutantes para apoE la acumulación de  $A\beta$  se ve reducida; y por último que la variabilidad genética en el metabolismo y eliminación de  $A\beta$  son responsables de la aparición de la EA tardía (Hardy y Selkoe 2002). Así, la acumulación del péptido amiloide se considera el primer evento en el desarrollo de la enfermedad, que dispara otra serie de sucesos como la inflamación, el daño oxidativo, o actividades alteradas de las proteínas kinasas y fosfatasas, e interviene en la hiperfosforilación de tau, y provoca la muerte neuronal (Mattson 1997; Selkoe 2001).

Con el paso del tiempo, la mejora de las técnicas de investigación y la posibilidad de estudiar tanto modelos humanos como de animales de experimentación, la hipótesis ha ido modificándose para adaptarse a los nuevos descubrimientos. En la actualidad el modelo más aceptado afirma que la toxicidad no reside en las placas amiloides, que podrían ser incluso protectoras, sino en formas oligoméricas del péptido amiloide (revisado en Haass y Selkoe 2007; Cappai y Barnham 2008; Arendt 2009), y que el grado de toxicidad depende de su estado de agregación (Luheshi y col. 2007; Brorsson y col. 2010; Speretta y col. 2012). Por

tanto, la hipótesis amiloide actual no se centra en la acumulación de placas amiloides, sino que propone que la presencia del péptido desde estadios tempranos de la enfermedad y en sus diferentes formas solubles, es capaz de generar toxicidad neuronal y promover el deterioro cognitivo previo a la neurodegeneración (ver Figura 5, para un resumen de los eventos que se suceden en la EA según la hipótesis amiloide). Esta nueva versión de la hipótesis amiloide explicaría la falta de correlación entre la densidad de placas amiloides y el progreso de la enfermedad, y porque algunos tratamientos pueden mejorar los defectos cognitivos sin apenas afectar a las placas seniles. Sin embargo, no está claro qué formas oligoméricas concretas son las responsables de la neurotoxicidad del péptido, o si existen varias formas con efectos diferentes (ver revisión crítica en Hardy 2009; Benilova y col. 2012).



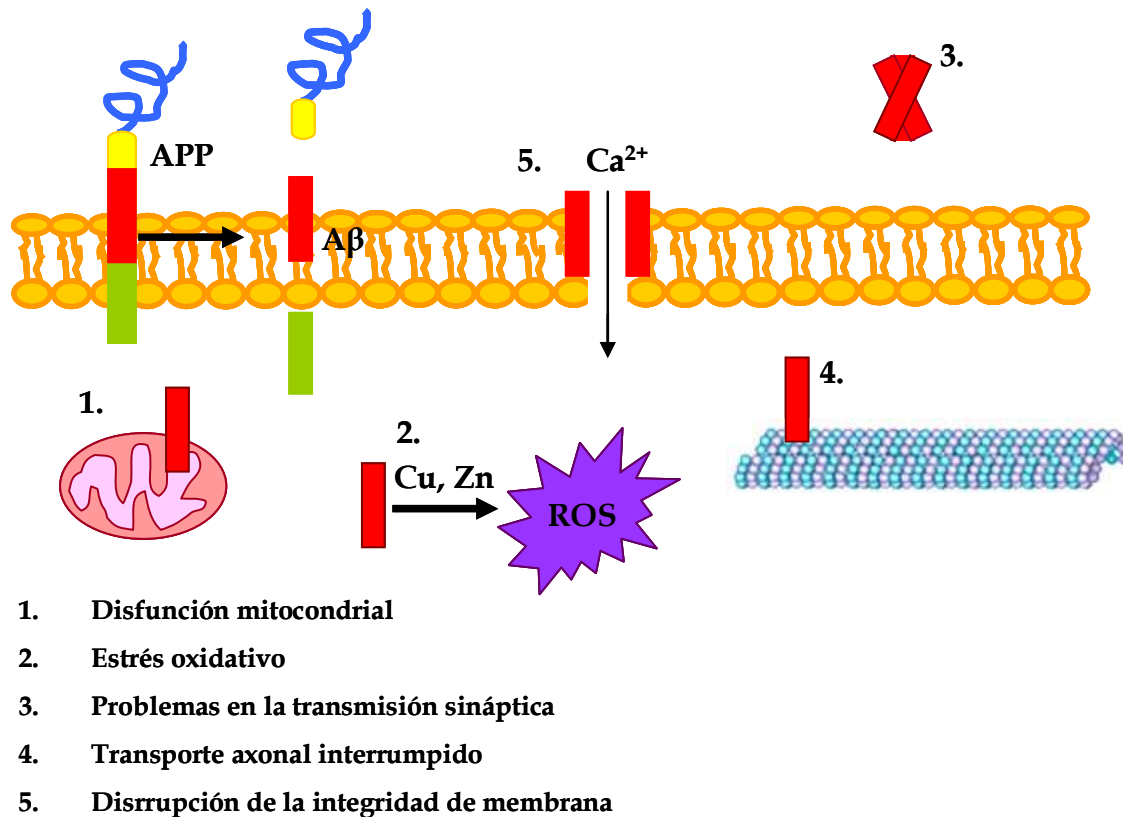
**Figura 5:** Secuencia de procesos que tienen lugar en las distintas formas de EA (Modificado de Selkoe 2002 y Simón y col. 2010).

## 2.1. LA TOXICIDAD DEL PÉPTIDO AMILOIDE Y LA NEURODEGENERACIÓN

Las regiones cerebrales en donde se aprecia la mayor pérdida sináptica y muerte neuronal en la EA son la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala, la corteza asociativa frontal, temporal, parietal y occipital, así como ciertos núcleos que proyectan hacia estas regiones (Selkoe 2002; Scheff y Pride 2006). Esa pérdida de volumen cerebral a causa de la muerte neuronal puede deberse tanto a procesos necróticos como apoptóticos. Algunos autores proponían que la neurodegeneración era debida principalmente a procesos necróticos provocados por la alta toxicidad del péptido amiloide (Behl y col. 1994). Más tarde se encontraron evidencias de que los procesos apoptóticos también existían, evidenciados por la presencia en cerebros con EA de ADN dañado, alteraciones en genes apoptóticos, y niveles elevados de caspasa-3 (Mattson 2000; Marx 2001). Otro tipo de muerte celular, la autofagia, también ha sido identificada en cerebros de pacientes con EA. Así, en muestras de enfermos de EA se han encontrado autofagosomas, cuerpos multivesiculares y vacuolas autofágicas, sobre todo cerca de las neuronas con patología neurofibrilar, en donde se observa además un descenso de mitocondrias y otros orgánulos (Nixon y col. 2005; Yu y col. 2005; Shacka y col. 2008). Así, parece que el péptido amiloide podría inducir diversos tipos de muerte celular, una muerte necrótica rápida provocada principalmente por daños agudos (estrés oxidativo) y una muerte más lenta en donde se desregularían las rutas de supervivencia y muerte celular, así como los mecanismos de autofagia para la eliminación de orgánulos defectuosos.

La muerte neuronal se puede disparar por distintos y múltiples tipos de señales, y la implicación del péptido amiloide en dichos procesos ha sido ampliamente estudiada. Los mecanismos descritos por los que el péptido ejerce este efecto neurotóxico son muy numerosos (para una revisión ver Crouch y col. 2008), como se muestra en la Figura 6. Entre otros, oligómeros de A $\beta$  bloquean el efecto de diversas neurotrofinas (NGF, BDNF, insulina o IGF-1), inhibiendo la señalización de supervivencia (Jiménez y col. 2011). La influencia de A $\beta$  en el estado oxidativo celular y su implicación en la muerte neuronal también ha sido ampliamente demostrada. La presencia de A $\beta$  puede inducir peroxidación de lípidos y proteínas (Butterfield y col. 2002; Hayashi y col. 2007), interferir con el normal funcionamiento y dinámica de las mitocondrias (Su y col 2010; Manczak y col. 2011), incluso induciendo poros en la membrana mitocondrial (Chen y Yan 2007; Reddy 2009). Por otro lado la activación de la glía mediada por el péptido amiloide provoca procesos inflamatorios, y juega un papel importante en la muerte neuronal (Cras y col. 1990). Algunos estudios

sugieren que A $\beta$  induce defectos en el transporte y degeneración axonal (para una revisión ver Götz J y col. 2006). Diversos estudios muestran que el péptido amiloide altera la homeostasis del calcio (para una revisión ver Small y col. 2009; Demuro y col. 2011; Fedrizzi y Carafoli 2011), dicha alteración podría mediar por la formación de los denominados “canales amiloides”, en los que A $\beta$  se integra en la membrana celular generando poros (para una revisión ver Kawahara 2010).



**Figura 6:** Mecanismos de neurodegeneración mediada por A $\beta$  en EA. El procesamiento amiloidogénico de APP produce A $\beta$ , el cual tiene el potencial de generar neurodegeneración inhibiendo la actividad mitocondrial, aumentando el estrés oxidativo, provocando problemas en la transmisión sináptica, interrumpiendo el transporte axonal y/o destruyendo la integridad de membrana (Modificado de Crouch y col. 2008).

Por otro lado, no podemos olvidar la interacción entre A $\beta$  y tau. Se ha demostrado, tanto en cultivos celulares como en modelos murinos o de *Drosophila*, que la presencia de A $\beta$  incrementa los niveles de GSK-3 y concomitantemente los de tau fosforilada (Wang y col. 2006; Sofola y col. 2010; y revisado en Muyllaert y col. 2008). En cultivos neuronales procedentes de ratones control o que expresan la proteína tau humana, se ha observado que la presencia de A $\beta$  hace que dichas células degeneren. Sin embargo los efectos neurotóxicos de A $\beta$  no se observan en ratones *knock-out* para tau. Esto apoya el papel de tau en los mecanismos que inducen neurodegeneración mediados por el péptido amiloide (Rapoport y

col. 2002). Algunos investigadores han demostrado, también en modelos murinos, que la presencia de A $\beta$  aceleraba la formación de los ovillos neurofibrilares y aumentaba la amiloidosis de tau, mientras que la presencia de tau no mostraba el mismo efecto sobre la patología provocada por A $\beta$  (Hurtado y col. 2010).

## 2.2. EFECTOS SINAPTOTÓXICOS DEL PÉPTIDO AMILOIDE

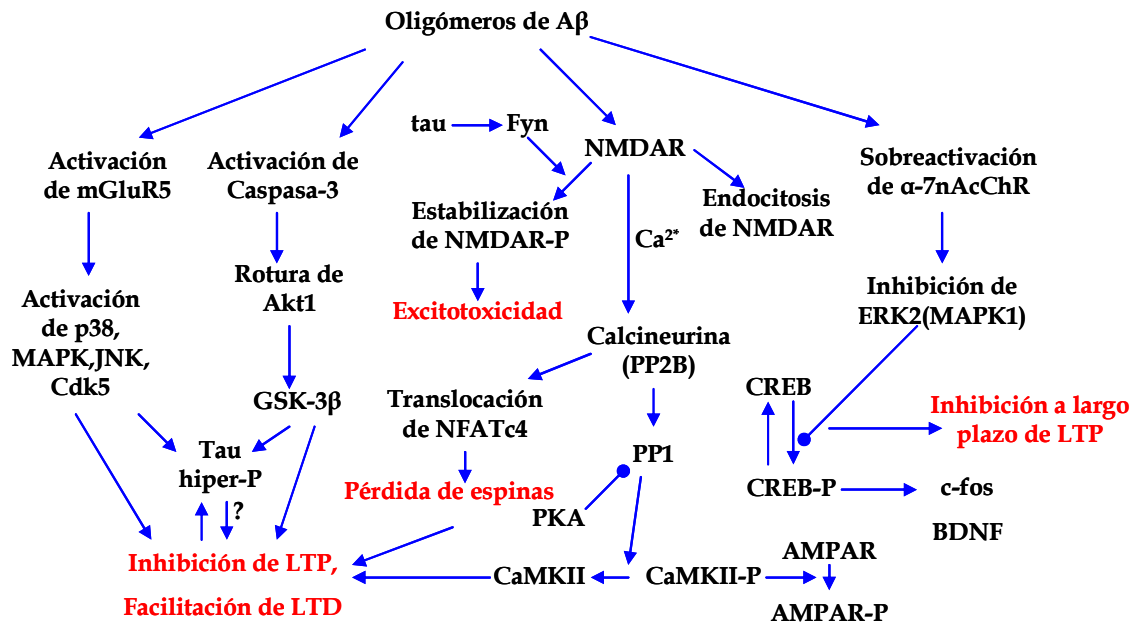
Para intentar explicar esta pérdida de sinapsis en el cerebro de los pacientes, en un primer momento, y tras la aparición de la hipótesis amiloide, muchos investigadores propusieron que los agregados de las placas amiloides eran los causantes de la patología sináptica (para una revisión ver Glabe 2001; Selkoe 2001). Para otros, la hipótesis debía modificarse, ya que había distintos modelos (tanto en cultivos celulares como en animales de experimentación) en los que el aumento en la concentración intraneuronal de la forma más tóxica del péptido amiloide (A $\beta$ 42), y no las placas, parecía la causa principal de esta pérdida sináptica (para una revisión ver Wirts y col. 2004). Con el desarrollo de nuevos anticuerpos para detectar las distintas formas del péptido, se observó que en los cerebros de pacientes con EA la concentración de las especies oligoméricas es 70 veces más elevada que en cerebros control (Gong y col. en 2003). Actualmente, parece que las especies solubles de A $\beta$  que se forman en los estados tempranos y que todavía no forman placas, las principales responsables del fallo en la transmisión sináptica, y no tanto las formas agregadas. Además, estas moléculas solubles con sus distintos estados de ensamblaje y agregación, podrían causar el daño sináptico en ausencia de una neurodegeneración acusada (Arendt 2009).

Numerosas investigaciones han demostrado que el péptido amiloide tiene efectos sinaptotóxicos a corto y largo plazo (revisado en Selkoe 2008; Ma y Klann 2012). Así, la inyección en el cerebro de ratas de oligómeros solubles de A $\beta$  o aplicación del péptido en cortes de hipocampo y cerebelo *in vitro*, es capaz de inhibir en pocos minutos la potenciación a largo plazo o LTP (*Long-term potentiation*) y facilitar la depresión a largo plazo o LTD (*Long term depression*). Además de estos efectos agudos, la presencia de A $\beta$  reduce el número de sinapsis y el crecimiento de neuritas tanto *in vivo* como *in vitro*.

Cómo actúa molecularmente el péptido y genera el daño sináptico, es todavía algo que sigue bajo investigación (ver Figura 7 para un resumen de los mecanismos propuestos). Sin embargo, se ha descrito que los oligómeros de A $\beta$ , se unen preferencialmente a las sinapsis

excitatorias (Lacor y col. 2007), un dato consistente con los defectos en la neurotransmisión excitatoria en los cerebros de enfermos de EA (para una revisión ver Ossowska 1993). Para intentar determinar cómo afecta el péptido a la memoria y el aprendizaje, se han realizado múltiples estudios para determinar los efectos de A $\beta$  en la potenciación a largo plazo o LTP (*Long term potentiation*), tanto *in vivo* como *in vitro* (para una revisión ver Ma y Klann 2012). Se ha encontrado que A $\beta$  es capaz de modificar el intercambio normal de los receptores NMDA y AMPA, promoviendo su internalización, y por tanto reduciendo su número en la superficie celular (Snyder et al. 2005; Chang y col. 2006; Hsiesh y col. 2006; Lacor y col. 2007; Ting y col. 2007). Así, parece que uno de los mecanismos por los que el péptido amiloide puede estar modificando los procesos de LTP y LTD, es la alteración de la señalización de glutamato al actuar sobre sus receptores (Shankar y col. 2007; Li y col. 2009). Otros estudios también han demostrado que la inhibición de la LTP puede deberse a la interacción del péptido con receptores metabotrópicos de glutamato y receptores colinérgicos (para una revisión ver Palop y Mucke 2010).

También se ha observado que los oligómeros provenientes de distintas fuentes (sintéticos, extraídos de cerebros con EA o de cultivos) son capaces de reducir el número de espinas y el número de sinapsis de las neuronas, como consecuencia de las alteraciones que produce el normal funcionamiento de la transmisión sináptica mediada por glutamato. Aunque los mecanismos no están claros, parece que podría alterar los niveles de glutamato modulando a los receptores NMDA, y esto se ha observado en modelos animales y en cultivos de neuronas piramidales de ratón (Shankar y col. 2007; Li y col. 2009). Además se ha descrito que los oligómeros pueden unirse y modificar las funciones de distintas proteínas sinápticas como PSD-95, la quinasa dependiente de calcio calmodulina II o CaM kinase II (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase), la proteína regulada por actividad asociada al citoesqueleto Arc (*Activity-regulated cytoskeleton-associated protein*), GSK3, cdk5, Akt/PKB, haciendo que la neurona se modifique y su funcionalidad se vea comprometida, perdiendo así, tanto espinas dendríticas como sinapsis (para una revisión ver Lacor y col. 2007; Shankar y col. 2007; Li y col. 2009; Wasling y col. 2009; Wilcox y col. 2011).



**Figura 7: Mecanismos moleculares de la sinaptotoxicidad inducida por A $\beta$  propuestos en la bibliografía.** A $\beta$  puede alterar las cascadas dependientes del receptor de glutamato directo o indirectamente. Una activación de la calcineurina y NFATc4 promueve distrofia de las neuritas, y la defosforilación de CaMKII inhibe la LTP mediada por AMPAR. Además A $\beta$  puede sobreactivar  $\alpha$ 7-nAcChR, inhibiendo la cascada ERK2 (MAPK1) lo que impide la transcripción dependiente de LTP a través de la fosforilación de CREB. Algunas proteínas quinasas median la fosforilación patológica de tau. La ruta mediada por Caspasa-3 puede tener algún papel en la inhibición de LTP mediada por A $\beta$  actuando por encima de GSK-3. mGluR5, receptor metabotrópico de glutamato 5; ERK2, quinasa regulada por señal extracelular 2; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno; JNK, quinasa N-terminal c.jun; Cdk5, quinasa dependiente de ciclina 5; GSK-3 $\beta$ , glucógeno sintasa 3 $\beta$ ; Akt1, proteína quinasa serina-treonina 1; NMDAR, receptor N-metil-D-aspartato; AMPAR, receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropionato; CaMKII, calmodulina quinasa II; PKA, proteína quinasa 1; PP1, proteína fosfatasa 1; NFATc4, factor nuclear de células T activadas;  $\alpha$ 7-nAcChR, receptor de acetilcolina nicotínico  $\alpha$ 7; BDNF, factor neurotrófico derivado de cerebro; CREB, proteína de unión al elemento regulador de cAMP (modificado de Benilova y col. 2012).

### 2.3. ¿TIENE EL PÉPTIDO A $\beta$ UNA FUNCIÓN FISIOLÓGICA?

De los numerosos datos que intentan explicar la implicación del péptido A $\beta$  en la etiología de la EA, los efectos sinaptotóxicos del péptido parecen claramente probados, mientras que su papel en el proceso neurodegenerativo no está claro, y los datos sugieren que estaría principalmente mediado por la patología asociada a tau. Así pues, se han propuesto hipótesis alternativas que intentan conciliar estos dos aspectos de la enfermedad, pero, como ya hemos dicho, las evidencias experimentales no arrojan resultados definitivos para ninguna de ellas. Uno de los mayores problemas a la hora de explicar la etiología de la EA es que no se conoce si el péptido amiloide tiene algún papel fisiológico, o cuál es la función específica de la proteína APP de la que deriva. Sin embargo, el hecho de que la maquinaria de procesamiento de APP esté filogenéticamente tan conservada, y de que el



metabolismo de APP esté regulado en múltiples pasos, sugiere que este es un proceso con relevancia fisiológica.

Debido a sus distintos dominios de unión, así como a sus derivados del procesamiento proteolítico, muchas son las funciones atribuidas a APP. Se ha descrito que puede funcionar como un receptor ligado a proteínas G; se le han atribuido funciones de molécula de adhesión a la matriz extracelular actuando como una “integrin-like”; además relacionado con su papel en la adhesión parece que posee propiedades tróficas y de migración celular; sus fragmentos intracelulares pueden difundir al núcleo y promover activación génica, y sus fragmentos solubles una remodelización sináptica, crecimiento neurítico y efectos neurotróficos (Para una revisión ver [Mattson 1997](#); [Turner y col. 2003](#); [Thinakaran y Koo 2008](#); [Panegyres y Atkins 2011](#)). Otra de las funciones descritas recientemente para A $\beta$  y APP, es su posible implicación en el proceso de plasticidad sináptica durante el desarrollo y en la vida adulta del animal. Varios estudios recientes han encontrado que APP promueve la actividad y formación sináptica, así como la formación de espinas dendríticas (revisado en [Hoe y col. 2012](#)). El hecho de que el procesamiento de APP esté regulado por actividad sináptica sugiere que A $\beta$  podría tener una función en el proceso de remodelación sináptica relacionado con la función de su precursor APP.

Wasling y col. han propuesto que el péptido amiloide estaría involucrado en el proceso de eliminación de sinapsis glutamérgicas dependientes de actividad durante las primeras etapas de remodelación sináptica en el periodo postnatal. Estos autores proponen que en la EA esta función del péptido amiloide estaría reactivada en el cerebro en proceso de envejecimiento, lo que explicaría la pérdida sináptica observada ([Wasling y col. 2009](#)). Sin embargo, existen pocos estudios que analicen una posible función fisiológica normal de este péptido *in vivo*.

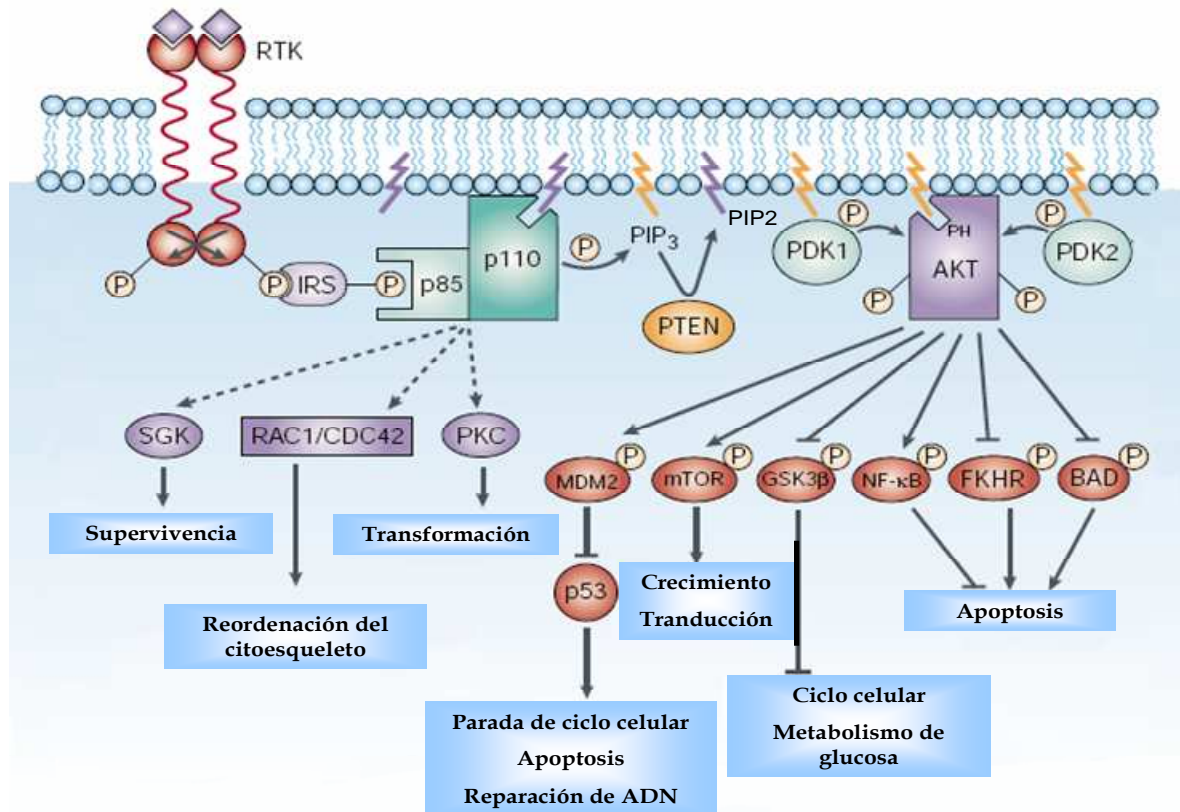
En vista de los datos obtenidos hasta la actualidad, la reversión de la pérdida sináptica parece una de las principales vías para intentar atajar la enfermedad. Como ya se ha dicho, esta pérdida es un evento temprano y produce los primeros síntomas de la enfermedad, por ello muchos son los investigadores que vuelcan sus esfuerzos en intentar detener el avance del daño sináptico producido por el péptido. Así, las nuevas terapias se basan en el bloqueo de A $\beta$  con anticuerpos para evitar su toxicidad ([Weiner y Frenkel 2006](#); [Tampellini y col. 2007](#)), y se está trabajando con modelos animales para intentar encontrar un modo de evitar la pérdida sináptica e incluso intentar restaurar las sinapsis perdidas.



### 3. LA RUTA DE LA PI3K Y SU INFLUENCIA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En mamíferos e invertebrados, la fosfoinositol-3 kinasa (PI3K) de clase IA es un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica denominada p110 y una subunidad adaptadora/reguladora denominada p85 (revisado en [Wymann y Pirola 1998](#); [Vanhaesebroeck y col. 2001](#)). La activación de PI3K se debe a los receptores tirosina-kinasas activados por ligando (RTKs -*Receptors of tyrosine kinases*-), como los receptores de factores de crecimiento. Estos se fosforilan y reclutan el heterodímero inactivo de PI3K a la membrana, provocando cambios conformacionales en la subunidad reguladora que hacen que se permita la fosforilación de la subunidad catalítica. Esta, una vez activada, transforma el fosfoinositol 4,5-bifosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) ([Vivanco y Sawyers 2002](#); [Wu y col. 2007](#)).

El PIP3 actúa como un segundo mensajero, activando varias rutas de señalización (para un resumen ver Figura 8). Su sustrato principal es la kinasa Akt: PIP3 recluta Akt a la membrana y facilita su activación mediante su fosforilación por la kinasa dependiente de fosfoinositol 1 (PDK1). Esta fosforilación estimula la actividad catalítica de Akt, que actúa sobre diferentes sustratos que afectan al ciclo celular, crecimiento y supervivencia celular (revisado en [Datta y col. 1999](#); [Cantley 2002](#)). Además, la kinasa PDK1 no solo fosforila a Akt, sino que también fosforila y activa a otras proteínas quinasas como la kinasa de supervivencia independiente de citocinas (CISK -*Cytokine-independent survival kinase*-) o la proteína quinasa C (PKC -*Protein kinase C*-) que contribuyen al crecimiento, supervivencia y transformación celular ([Cantley 2002](#)). PIP3 es también capaz de activar otras proteínas, como los factores de intercambio de guanosina difosfato (GDP)-GTP para Rac. La activación de Rac juega un papel principal en la remodelación del citoesqueleto de actina para favorecer la movilidad direccional en respuesta a agentes quimiotácticos ([Cantley 2002](#); [Vivanco y Sawyers 2002](#)).



**Figura 8: Ruta simplificada de la PI3K.** La activación de PI3K se produce mediante la estimulación de receptores tirosina-kinasas (RTKs -*receptors for tyrosine kinases*-) y el ensamblaje del complejo PI3K-receptor. Estos complejos se localizan en la membrana donde la subunidad p110 cataliza la conversión del PIP2 en PIP3. El PIP3 actúan como segundo mensajero, activando diversas proteínas, como Akt. Akt activado media la activación e inhibición de sus distintas dianas, produciendo crecimiento celular, supervivencia y proliferación celular por varios mecanismos. Adicionalmente, PI3K puede, independientemente de Akt, regular la actividad de otras dianas celulares como la quinasa inducible por suero y glucocorticoides (SGK -*serum and glucocorticoid-inducible kinase*-), las proteínas de unión a GTP RAC1 y CDC42 y la proteína quinasa C (PKC). GSK3, glucogéno sintasa-3; NFκB, factor nuclear κB; PDK1/2, protein kinasas dependientes de fosfoinositol 1/2. FKHR, factor de transcripción relacionado con Forkhead; mTOR, diana para la rampamicina de mamífero (modificado de [Vivanco y Sawyers 2002](#)).

### 3.1. EL PAPEL DE LA VÍA PI3K EN LA FUNCIÓN SINÁPTICA

La función de la vía PI3K en el sistema nervioso no se restringe a controlar la supervivencia neuronal ([Brunet y col. 2001](#)), sino que también está implicada en la morfogénesis dendrítica a través de la activación de la denominada diana para la rampamicina de mamífero o mTOR (*mamalian target for rapamycin*) ([Rugero y Sonenberg 2005](#); [Jaworski y Sheng 2006](#)). También se encarga de la especificación axón/dendrita y del crecimiento axonal ([Jiang y Rao 2005](#)). Además, está implicada en procesos de plasticidad

---

sináptica y formación de memoria a través de la activación de la ruta de las MAPK/ERK (Opazo y col. 2003; Chen y col. 2005).

Teniendo en cuenta que la ruta de PI3K está asociada a plasticidad sináptica y memoria, algunos investigadores creyeron factible que también podría estar implicada en procesos de sináptogénesis y espinogénesis. Así, se observó que la eliminación de PTEN en el cortex cerebral e hipocampo de ratón, promovía la hiperactivación de Akt, lo que provocaba hipertrofia dendrítica, aumento de la densidad de espinas y finalmente macrocefalia (Kwon y col. 2006). Además, sustratos finales de la ruta de PI3K, como mTOR y la kinasa S6, se localizan en las sinapsis, donde median procesos de plasticidad sináptica y elongación dendrítica desde invertebrados a vertebrados (Acebes y Ferrús 2001; Tang y col. 2002; Tsokas y col. 2005; Knox y col. 2007). Estudios recientes han demostrado que la activación de la vía PI3K tiene un potente efecto sinaptogénico tanto en *Drosophila* como en mamíferos (Martín-Peña y col. 2006; Cuesto y col. 2011).

En *Drosophila*, la sobre-activación de la ruta, mediante expresión de la subunidad catalítica de PI3K o de Akt, es capaz de provocar un aumento del número de sinapsis tanto en la unión neuromuscular larvaria como en interneuronas del circuito olfativo en adultos de *Drosophila* (Martín-Peña y col. 2006). Por el contrario, la expresión de GSK3, inhibido por Akt, inducía una disminución en el número de sinapsis. La creación de estas nuevas sinapsis puede inducirse en un sistema nervioso adulto, como se demostró utilizando un sistema inducible por temperatura. Además, comprobaron mediante electrofisiología, que las nuevas sinapsis formadas eran funcionalmente activas y capaces de modificar el comportamiento (Martín-Peña y col. 2006). Estudios posteriores demostraron que la activación presináptica de PI3K es suficiente para inducir cambios postsinápticos que conducen a la formación de sinapsis funcionales (Jordán-Álvarez y col. 2012).

En base a estos experimentos, y utilizando el péptido PTD4-PI3Ac, capaz de atravesar la membrana plasmática y activar a PI3K, Cuesto y col. demostraron un efecto sinaptogénico análogo en cultivos de células neuronales e *in vivo* en ratón (Cuesto y col. 2011). Añadiendo el péptido activador al cultivo de neuronas hipocámpales de ratón, o inyectándolo en la región CA1 del hipocampo en ratones *in vivo*, observaron que aumenta el número de sinapsis y espinas dendríticas. Ambas son activas y capaces de modificar el comportamiento de los ratones, facilitando el aprendizaje asociativo. Por tanto, la activación de la ruta es capaz de

crear nuevas sinapsis funcionales también en el cerebro de mamíferos adultos. Estos datos apuntan a la vía PI3K como una posible diana para el tratamiento de desórdenes sinápticos.

### 3.2. EL PAPEL DE LA VÍA PI3K EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Debido a que la EA es un proceso neurodegenerativo que comienza con pérdida sináptica, un mal funcionamiento celular y muerte neuronal, no es de extrañar que la ruta principal de supervivencia celular esté involucrada en el desarrollo de la enfermedad. Estudios *postmortem* de cerebros de pacientes con EA han revelado desregulación en varios componentes de la vía, incluyendo PTEN, Akt, S6K, y mTOR (An y col. 2003; Ferrando-Miguel y col. 2005; Griffin y col. 2005; Li y col. 2005).

Uno de los principales sustratos de la vía de PI3K y que tienen un papel fundamental en la EA es GSK3. Una primera pista de su papel en el desarrollo de la enfermedad apareció cuando se encontró que era la kinasa mayoritaria presente en los extractos purificados de microtúbulos de cerebros de pacientes con EA (Ishiguro y col 1993). Más tarde, se observó que la exposición de neuronas de hipocampo de rata a A $\beta$  inhibía a PI3K y activaba a GSK3 (Takashima y col. 1996). Por otra parte se corroboró tanto *in vitro* como en cultivos celulares, que GSK3 estaba implicada en la fosforilación de tau, cuyas formas hiperfosforiladas forman los ovillos neurofibrilares (Lovestone y Reynolds 1997). Posteriormente, gracias a estudios en cultivos celulares como en modelos murinos, se asoció a GSK3 con distintos eventos negativos ligados a la dinámica de microtúbulos, distrofia neurítica, plasticidad déficits cognitivos, neurodegeneración y potencial producción de A $\beta$  (para una revisión ver Bath y col. 2004). Estudios más recientes en cultivos neuronales y rodajas de hipocampo en cultivo, han demostrado que la inhibición de PI3K da lugar al aumento de tau fosforilada y a niveles elevados de GSK3 activa, lo que corrobora que la desregulación de la ruta de PI3K está implicada en el desarrollo de la EA (Li y col. 2006; Mercado-Gómez y col. 2008). En este sentido, se ha observado que algunas mutaciones de la PS1 pueden producir la desregulación de la actividad de Akt, lo que resulta en un aumento de la actividad de GSK3 y la muerte por apoptosis de las neuronas hipocampales en cultivo (Wheil y col. 1999).

Por otro lado, existe una proteína que regula de forma negativa la ruta, la proteína PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*). Esta proteína antagoniza la señalización por PI3K/Akt, transformando PIP3 a PIP2, y haciendo así desaparecer el sustrato que activa a Akt (Stambolic y col. 1998). En relación con la EA, se ha visto que los pacientes tienen niveles

alterados de PTEN, lo que da lugar a un aumento de la fosforilación de tau así como su agregación y posterior neurodegeneración (Griffin y col. 2005; Zheng y Koo 2006). Recientemente, estudiando tejidos *post mortem* de cerebros de pacientes con EA, se ha encontrado que PTEN se acumula en los ovillos neurofibrilares lo que hace que su distribución esté alterada. Dado que PTEN citoplásmico actúa como regulador negativo de la ruta de PI3K, mientras que en el núcleo juega un papel en la estabilidad celular, la reparación de ADN, y parada del ciclo, esta distribución alterada podría provocar la degeneración neuronal vía mecanismos de desregulación de los componentes de la vía PI3K (Sonoda y col. 2010).

Finalmente, diversos estudios han demostrado que la señalización por mTOR, uno de las dianas finales de la vía PI3K, está aumentada en cerebros de pacientes con EA (revisado en Pei y Hugon 2008). Las evidencias obtenidas en modelos animales invertebrados y vertebrados sugieren que esta hiperactivación está asociada a la fosforilación de tau y ovillos neurofibrilares. Sin embargo, el efecto de A $\beta$  sobre mTOR parece ser el contrario, esto es, disminuir su actividad. Por tanto, parece que la implicación de la vía mTOR en la EA es compleja, y esta complejidad podría derivar de efectos diferentes sobre la función sináptica, mediada por el péptido amiloide, y la supervivencia neuronal, dependiente de tau.

El descubrimiento de la capacidad sinaptogénica de la vía PI3K abre la posibilidad de una nueva estrategia a seguir para tratar de mejorar los síntomas de la EA. Así, mediante la activación de la ruta o la inhibición terapéutica de alguno de sus componentes (como GSK3), se podría intentar reducir la pérdida sináptica o incluso recuperar algunas de las sinapsis perdidas. De este modo el deterioro cognitivo que es provocado por la pérdida sináptica y que sucede en las primeras fases de la enfermedad, podría verse reducido gracias a la formación o mantenimiento de las sinapsis de las zonas dañadas en la enfermedad. En este trabajo proponemos estudiar esta posibilidad *in vivo* utilizando como modelo de experimentación la unión neuromuscular de *Drosophila melanogaster*.

#### **4. DROSOPHILA MELANOGASTER COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LOS DEFECTOS SINÁPTICOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

*Drosophila melanogaster* es uno de los organismos modelo de experimentación mejor conocido a nivel genético, y se lleva empleando en estudios biológicos desde hace más de un siglo (Castle 1906). El éxito de esta especie como modelo en la investigación animal se debe en parte a que su mantenimiento resulta relativamente barato, es de fácil manejo y su pequeño tamaño permite mantener grandes poblaciones en el laboratorio. Además, su ciclo vital es corto, dura aproximadamente 10 días (a 25°C) lo que permite obtener individuos de forma rápida.

A su vez, después de tanto tiempo experimentando con ella, se disponen de infinidad de herramientas genéticas que permiten obtener individuos transgénicos de forma rápida, así como distintos sistemas que permiten expresar cualquier secuencia genética o marcar determinadas proteínas (sistema lacZ, GFP, ARN de interferencia, sistema Gal4/UAS, etc) (Nichols 2006). Otra de sus ventajas es que su genoma está totalmente secuenciado y es conocido (Adams y col. 2000).

Por otra parte, a pesar de las diferencias en el tamaño de los genomas, se estima que aproximadamente un 60% de los genes humanos tienen ortólogos funcionales en *Drosophila*. Y no solo eso, sino que los procesos que llevan a cabo esos ortólogos como la polarización del eje, procesos metabólicos, organogénesis y desarrollo neural están tan conservados que la sustitución de los genes de la mosca por los humanos y viceversa, suelen funcionar de forma correcta (revisado en Nichols 2006).

Todas estas características han hecho que *Drosophila* sea un organismo modelo para estudios de genética de desarrollo pero también como modelo en neurociencia (Shulman y col. 2003; Botas 2007). Así, son múltiples las publicaciones en las que se expresan en *Drosophila* los genes asociados a formas familiares de enfermedades neurodegenerativas, y se encuentra que se desarrollan los mismos patrones claves que se dan en la enfermedad en humanos (Finelli y col. 2004; Iijima y col. 2004; Crowther y col. 2005; Iijima y col. 2008 y para una revisión ver Iijima-Ando e Iijima 2010).



#### **4.1. DROSOPHILA COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO Y FUNCIÓN SINÁPTICOS**

Los estudios de plasticidad sináptica son la base para entender la memoria y el aprendizaje. Estos se han realizado usando modelos de mamíferos e invertebrados, lo que ha demostrado que los mecanismos implicados están conservados evolutivamente (revisado en [Koh y col. 2000](#)).

La NMJ larvaria de *Drosophila* es un sistema particularmente ventajoso para el estudio del desarrollo y función sinápticos. Las características que la hacen tan interesante no sólo incluyen su facilidad en la manipulación genética, si no que posee una alta accesibilidad anatómica y electrofisiológica lo que la hace accesible diversas técnicas experimentales (inmunohistoquímica, microscopía electrónica, imagen por calcio o Ca<sup>2+</sup> Imaging, imagen in vivo). Por otro lado la NMJ de *Drosophila* es glutamatérgica. Como resultado de esto sus constituyentes moleculares, y probablemente los mecanismos del desarrollo, se asemejan a las sinapsis glutamatérgicas centrales de vertebrado. Cabe destacar también que los componentes de la unión neuromuscular están bien caracterizados y poseen un patrón estereotipado, lo que permite visualizar de forma fácil cualquier cambio de la terminación (para una revisión ver [Keshishian y col. 1996](#); [Collins y Diantonio 2007](#)).

Desde hace tiempo, también se está empleando la NMJ adulta para estudiar la plasticidad sináptica e intentar dilucidar cuales son los componentes esenciales para la formación de las sinapsis ([Rivlin y col. 2004](#); [Hebbar y col. 2006](#); [Beramendi y col. 2007](#)). Las ventajas de la NMJ adulta son muy similares a las del estadio larvario, añadiendo que en este caso se puede ver los cambios morfológicos a lo largo de la vida del individuo.

#### **4.2. DROSOPHILA COMO MODELO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. ESTUDIOS PREVIOS**

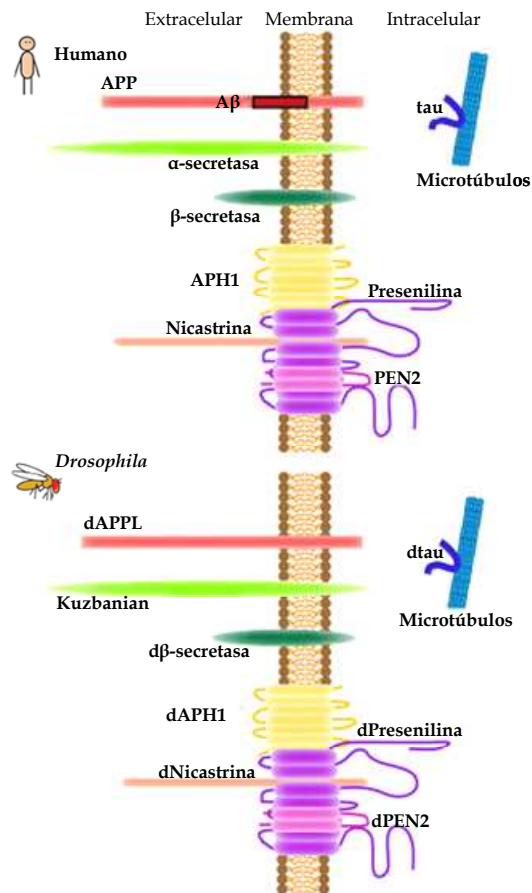
Como se ha comentado antes, el empleo de *Drosophila* como sistema experimental donde estudiar los mecanismos causantes de enfermedades neurodegenerativas humanas está plenamente establecido ([Shulman y col. 2003](#); [Nichols 2006](#); [Botas 2007](#)). De hecho, el análisis de su genoma ha revelado que aproximadamente el 70% de los genes humanos relacionados con enfermedades tienen homólogos en *Drosophila*, lo que la hace muy favorable para el

estudio de los patomecanismos y para identificar nuevos genes modificadores y terapias para las distintas enfermedades (Fortini y Bonini 2000; Reiter y col. 2001).

Algo que hace a *Drosophila* un objeto de experimentación adecuado para el estudio de la EA a parte de las características anteriormente descritas, es que presenta una única proteína homóloga a APP, la denominada APPL (*Amyloid precursor protein like*) (Rosen y col. 1989). Dicha homología proteica además va en consonancia con su habilidad para sustituirse funcionalmente, pues la inserción de un transgén con APPL o APP humana es capaz de rescatar los defectos comportamentales de moscas deficientes para *App1* (Luo y col. 1992). Esto parece indicar que la maquinaria celular implicada en las funciones de APP también se conserva en *Drosophila*. Además, todos los componentes conocidos implicados en el procesamiento de APP también tienen sus homólogos estructurales y funcionales en *Drosophila* (Figura 9, revisado en Iijima-Ando y Iijima 2010). Otra de las ventajas de este modelo de experimentación, es que permite analizar *in vivo* el efecto diferencial de las distintas variantes del péptido amiloide. Estas características hacen de la mosca de la fruta una buena candidata como modelo de experimentación para probar los efectos del péptido amiloide.

Los primeros estudios empleando *Drosophila* como modelo de EA, demostraron que la expresión de  $A\beta_{42}$  en fotorreceptores provocaba un fenotipo de desorganización que empeoraba con la edad y la acumulación progresiva del péptido, mientras que su expresión en el cerebro reducía la supervivencia de las moscas adultas (Finelli y col. 2004). Al mismo tiempo, se empleó para comprobar los efectos de las distintas variantes del péptido en el desarrollo de la enfermedad. Expresando las formas humanas  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  en el sistema nervioso de *Drosophila* se observó que el péptido en su variante más amiloidogénica ( $A\beta_{42}$ ) reproducía las características de la enfermedad: se acumulaba con la edad en depósitos similares a los de pacientes con EA, disminuía la supervivencia de los individuos, provocaba cambios comportamentales tales como problemas en la locomoción y en la memoria, y finalmente se observaba neurodegeneración. Sin embargo, la variante  $A\beta_{40}$  sólo producía algunos pequeños cambios comportamentales en la memoria (Iijima y col. 2004).





**Figura 9:** Representación esquemática de la APP humana y la dAPPL. Como se puede ver, en la figura se representan también, la  $\alpha$ -secretasa, la  $\beta$ -secretasa, los componentes del complejo de la  $\gamma$ -secretasa y tau en humanos y en *Drosophila* (Modificado de Iijima e Iijima-Ando 2010).

En *Drosophila* también se han hecho estudios con las distintas variantes mutadas del péptido amiloide como la denominada mutación Arctic. Esta mutación está situada en el codón 693 (E693G) y consiste en una sustitución de adenina por guanina, lo que da lugar a una glicina en lugar de ácido glutámico (Nilsberth y col. 2001). Así Crowther y col. en 2005 emplearon esta variante que forma más oligómeros, y descubrieron que presentaba un fenotipo más acusado que el péptido  $A\beta_{42}$ , reduciendo drásticamente la longevidad, provocando déficits en la locomoción y haciendo que aparezca mucho antes la neurodegeneración. Esto fue corroborado más tarde por otros grupos de investigadores que además observaron que el péptido con la mutación Arctic presentaba más depósitos y oligómeros y mostraba más neurodegeneración y déficit de memoria (Iijima y col. 2008; Iijima e Iijima-Ando 2008).

Otras aproximaciones al modelo de EA, consisten en ver como afecta la presencia de  $A\beta$  a la modulación sináptica y al desarrollo neuronal. El empleo de la unión neuromuscular larvaria de *Drosophila* permitió explorar la posibilidad de la modulación sináptica por el

péptido amiloide. Así, la expresión presináptica de  $A\beta_{42}$  (en motoneuronas) provoca una reducción de la liberación de neurotransmisores mientras que su expresión postsináptica (muscular) promueve su liberación. Además también se demostró que las distintas formas de agregación del péptido también pueden modular la transmisión sináptica, siendo los oligómeros los que inhiben la transmisión sináptica de forma más eficiente (Chiang y col. 2009). Más recientemente se observó que la expresión de  $A\beta_{42}$  presinápticamente en algunas motoneuronas implicadas en el vuelo, producía acumulación del péptido intracelularmente. Esta acumulación provocaba pérdida mitocondrial presináptica, disminución de las vesículas sinápticas, problemas en el comportamiento locomotor y longevidad disminuida. Estos efectos se veían acelerados si el péptido expresado tenía la mutación Arctic (Zhao y col. 2010).

Por otro lado, el uso de *Drosophila* como modelo de experimentación no solo se restringe a la observación del desarrollo y patología de la enfermedad, sino que también se estudia para nuevas terapias y drogas. Existen muchas similitudes entre los mecanismos de acción, los patrones de comportamiento y la respuesta génica en *Drosophila* y mamíferos, lo que combinado con las facilidades genéticas de la mosca, han hecho que se convierta en un sistema de estudio fundamental de los procesos neurofarmacológicos de las enfermedades humanas (revisado en Nichols 2006). Así, en el caso de la EA, *Drosophila* se ha empleado para probar nuevas terapias anti- $A\beta$  como el uso de anticuerpos contra el propio péptido o las secretasas que cortan APP, se han probado enzimas que se encargan de la degradación del péptido e incluso sustancias que evitan los distintos estados de agregación de  $A\beta$  (para una revisión ver Nichols 2006; Iijima-Ando e Iijima 2010). Otra aproximación al estudio de posibles terapias aprovecha el potencial genético de *Drosophila* para buscar genes que modifican, empeorando o mejorando, el fenotipo neurodegenerativo provocado por la presencia del péptido (revisado en Nichols 2006; Iijima-Ando e Iijima 2010). Todo esto además, nos aporta información sobre los posibles mecanismos que median el efecto del péptido.

Por tanto, *Drosophila* no solo presenta las ventajas de mantenimiento y cuidado de un organismo pequeño y de fácil manejo, si no que unido a su potencial genético, sus similitudes con el genoma humano y la reproducibilidad de las enfermedades neurodegenerativas humanas, han hecho que se extienda el uso de *Drosophila* como modelo de experimentación en la enfermedad de Alzheimer.

Por otro lado, el reciente hallazgo de que la modificación de la ruta de señalización de PI3K promueve la formación de nuevas sinapsis tanto en la unión neuromuscular de *Drosophila*, en interneuronas del cerebro adulto, (Martín-Peña y col. 2006), así como en modelos de mamíferos (Cuesto y col. 2011), abre la posibilidad de nuevas terapias de recuperación sináptica y mejora de los síntomas en la EA.

De este modo, se nos ocurrió emplear este modelo de experimentación de EA tan ampliamente aceptado por el mundo científico, para observar si en *Drosophila* la presencia de A $\beta$  provoca también, como en otros modelos animales, pérdida sináptica temprana. A su vez, también nos propusimos explorar los recién descubiertos efectos de la ruta de PI3K en la formación de nuevas sinapsis y si la sobreactivación de la ruta mostraba algún efecto diferencial con la expresión conjunta con el péptido amiloide.

Debido a que la pérdida sináptica es de difícil cuantificación, para llevar a cabo estos estudios nos centraremos en un pequeño conjunto de neuronas del sistema nervioso de *Drosophila* para facilitar los experimentos, como es la unión neuromuscular o NMJ (*Neuromuscular junction*). La NMJ larvaria de *Drosophila* es un sistema muy bien caracterizado y con algunas similitudes moleculares a las sinapsis centrales de los vertebrados (Koh y col. 2000). Así, emplearemos la unión neuromuscular larvaria, para una primera aproximación, y la NMJ abdominal adulta para observar los efectos acumulativos del péptido amiloide con la edad. Este último sistema, la NMJ adulta, está menos caracterizado que el larvario, aunque algunos autores ya han demostrado que es un buen modelo para estudiar plasticidad sináptica (Hebbar y col. 2006). Además, comprobaremos los efectos de A $\beta$  anteriormente observados por otros grupos de investigadores sobre la supervivencia y la neurodegeneración, para confirmar que nuestro modelo es equiparable.

Por último, intentaremos rescatar el posible fenotipo de pérdida sináptica producida por A $\beta$  mediante la sobreactivación de la ruta de PI3K. Puesto que Martín-Peña y col. definieron un aumento de sinapsis en la NMJ larvaria debido a la estimulación de PI3K, nosotros intentaremos demostrar si ese efecto se mantiene a lo largo del desarrollo de *Drosophila* y si puede recuperar sinapsis perdidas en la NMJ adulta.



# OBJETIVOS

---



## OBJETIVOS

La enfermedad de Alzheimer es una de las enfermedades neurodegenerativas de mayor impacto socio-económico, y es por eso que constituye el centro de numerosas investigaciones que intentan desentrañar como se produce y desarrolla esta enfermedad. Una de sus características principales es el deterioro cognitivo debido a una pérdida temprana de sinapsis en el sistema nervioso. A pesar de que los datos indican que el péptido amiloide, es el responsable de esta pérdida sináptica, todavía se desconocen, los mecanismos que subyacen a este proceso patológico. Parte de la complejidad de su estudio radica en la diversidad de las formas peptídicas de A $\beta$ , que se encuentra tanto en individuos normales como en enfermos de Alzheimer. Por otro lado, la reciente descripción de la función sinaptogénica de la vía PI3K ofrece un paradigma para evaluar la posibilidad de revertir la pérdida sináptica típica de la enfermedad de Alzheimer.

Así, el **objetivo general** de esta tesis es caracterizar y desarrollar un modelo para estudiar la pérdida sináptica debida a las distintas formas del péptido amiloide e intentar revertir dicha pérdida mediante la vía PI3K, utilizando la terminación neuromuscular adulta de *Drosophila melanogaster* como modelo.

Para alcanzar el objetivo general propuesto se plantean los siguientes objetivos concretos:

- \* Caracterizar las características morfo-funcionales de la terminación neuromuscular adulta a distintas edades.
- \* Cuantificar los efectos sinaptotóxicos de las variantes amiloides A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 y A $\beta$ 42ARC en la terminación neuromuscular adulta a distintas edades.
- \* Cuantificar el efecto sinaptogénico de la activación de la vía PI3K en la terminación neuromuscular adulta.
- \* Analizar in vivo si la activación de la vía PI3K es capaz de revertir los defectos sinápticos dependientes de A $\beta$ , así como sus efectos neurotóxicos.
- \* Comparar los efectos sinaptotóxicos de los distintos péptidos con los efectos neurotóxicos medidos como neurogeneración y longevidad disminuida.





# MATERIAL Y MÉTODOS

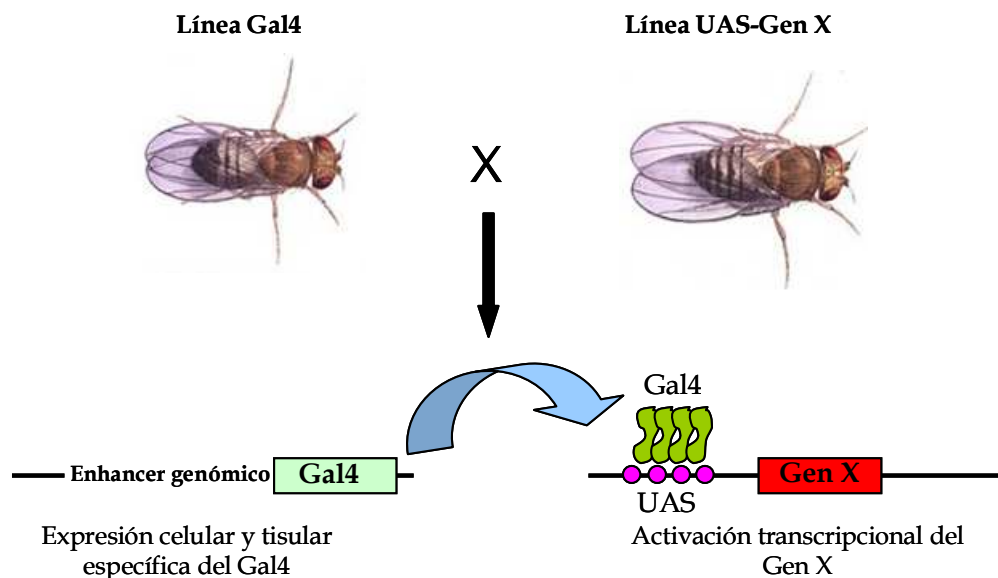
---



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. ESTIRPES DE *Drosophila melanogaster*

Una de las ventajas del empleo de *Drosophila melanogaster* es la de contar con una potente herramienta genética de expresión dirigida: el sistema Gal4-UAS. Dicha herramienta, desarrollada por Brand y Perrimon en 1993, permite expresar el producto codificado en la secuencia situada en posición 3' del *enhancer* UAS (*upstream activating sequence*), en aquellas células que expresan el activador transcripcional de levaduras Gal4. Para ello, se inserta en el genoma de la mosca el cDNA que codifica Gal4 utilizando como vehículo un trasposón del tipo elemento-P. La expresión de *Gal4* vendrá determinada por las secuencias reguladoras de la región en la que se haya insertado el trasposón (técnica *enhancer trap*) o por el promotor conocido, que se haya clonado 5' de *Gal4*. Luego se cruzan esas moscas con otras que posean la secuencia diana de activación de transcripción por Gal4, que consistirá en la secuencia UAS seguida del gen de interés que queramos expresar. Así en la descendencia obtendremos moscas que poseerán las dos secuencias y que por tanto expresarán el gen de nuestra elección (ver Figura 10).



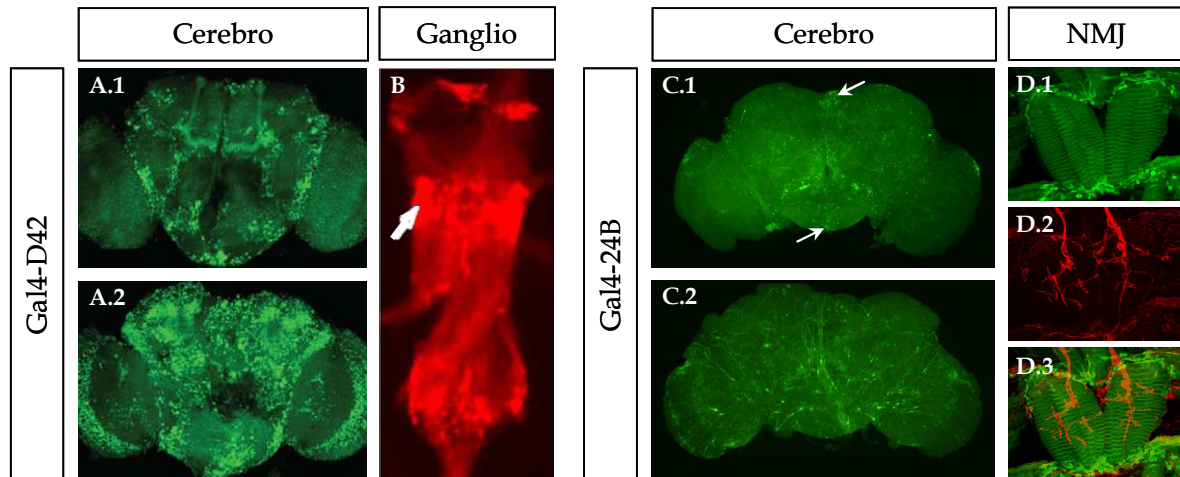
**Figura 10: Sistema Gal4/UAS.** Este sistema, desarrollado por Brand y Perrimon (1993), consiste en introducir en el genoma de *Drosophila* el activador transcripcional de levaduras Gal4 (línea *Gal4*). Esta mosca transgénica se cruza con otra en la que se ha insertado una secuencia *UAS* (línea *UAS-GenX*), a la que reconoce y se une Gal4. Este sistema permite expresar, de manera específica, el gen localizado en posición 3' a las secuencias *UAS* (*gen X*) en aquellos tejidos donde se expresa el activador transcripcional Gal4. (Modificado de Brand y Perrimon, 1993).

Teniendo en cuenta el sistema anteriormente explicado, las líneas utilizadas para el análisis del trabajo fueron las siguientes:

- *w*<sup>1118</sup>: línea silvestre con la mutación *white* (*w*), utilizada como control.
- *w*; *Gal4-D42*: Línea transgénica con el inserto en el cromosoma III. Consiste en un promotor de motoneuronas descrito por primera vez en estadio larvario III por Yeh y col. en 1995 y en estadio adulto por Parkes y col. en 1998. (Bloomington Stock Center <http://flystocks.bio.indiana.edu/>). Sin embargo, recientemente se ha encontrado que este promotor no sólo dirige a motoneuronas en el adulto, sino que muestra un amplio patrón de expresión cerebral (Legan y col. 2008; Wu y col. 2010) (ver Figura 11 A,B).
- *w*; *Gal4-24B*: Línea transgénica con el inserto en el cromosoma III. Promotor de músculo (Bloomington Stock Center: <http://flystocks.bio.indiana.edu/>) (Fyrberg y col. 1997). A pesar de ser descrita como línea de promotor muscular, algunos autores han observado que se expresa en algunos tejidos ectodérmicos, incluyendo células traqueales de la larva (Osterwalder y col. 2004), y en el órgano neurohemal larvario (Marques y col. 2003). En el adulto, en nuestro laboratorio se ha observado que en el sistema nervioso central se expresa en diversos grupos celulares no identificados y también en las tráqueas, pero no en motoneuronas (ver Figura 11 C,D).
- *w*; *elav-Gal4/TM3*: Línea transgénica con el inserto en el cromosoma III. Promotor panneural (Robinow y White 1988). (Cedida por el Dr. Stefan Thor, Linköping University, Department of Clinical and Experimental Medicine).
- *w*; *UAS-A $\beta$ <sub>40</sub>*: Línea transgénica con el inserto en el cromosoma III. Consistente en el ADNc que codifica para el péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub>, fusionado con un péptido señal para su secreción (Cedida por el Dr. Crowther, Cambridge University, Cambridge Institute for Medical Research) (Crowther y col. 2005). La denominaremos A $\beta$ <sub>40</sub>.
- *w*; *UAS-A $\beta$ <sub>42</sub>*: Línea transgénica con el inserto en el cromosoma II. Consiste en ADNc que codifica para el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> fusionado con un péptido señal para su secreción (Cedida por el Dr. Crowther, Cambridge University, Cambridge Institute for Medical Research) (Crowther y col. 2005). La denominaremos A $\beta$ <sub>42</sub>.
- *w*; *UAS- A $\beta$ <sub>42</sub>Arc2E*: Línea transgénica con el inserto en el cromosoma II. Consiste en ADNc que codifica para el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> con la mutación Arctic, fusionado a un péptido señal para su secreción. Esta mutación del codón 693 de APP humana (E693G) consiste en una sustitución de adenina por guanina que ocurre en el fragmento A $\beta$ , lo que da lugar a una glicina en lugar de ácido glutámico (Nilsberth y

col., 2001) (Cedida por el Dr. Crowther, Cambridge University, Cambridge Institute for Medical Research) (Crowther y col. 2005). La denominaremos  $A\beta_{42}ARC$ .

- *w; UAS-PI3K<sup>92E</sup>*: Línea transgénica con el inserto en el cromosoma II. Consiste en ADNc que codifica para la subunidad catalítica de la PI3K de *Drosophila* (Dp110) (cedido por el Dr. Alberto Ferrús, Instituto Cajal -CSIC-) (Leevers y col. 1996).



**Figura 11: Patrones de expresión de las líneas *Gal4-D42* y *Gal4-24B*.** Las fotografías muestran la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP -green fluorescent protein-) (en A, C y D.1) o la proteína rojo fluorescente (RFP - red fluorescent protein-) (B) con los promotores neuronal y muscular. Como se puede observar, el patrón de expresión del *Gal4-D42* en el cerebro de *Drosophila* es ubicuo, (A.1- tercio anterior- y A.2 -tercio posterior-) (modificado de Wu y col. 2010). En el ganglio torácico se expresa en diversas células no identificadas y en motoneuronas (flecha en B) (modificado de Legan y col. 2008). En cuanto al promotor muscular *Gal4-24B*, en el cerebro de adulto se encontró fluorescencia en varios grupos de células no identificadas (flechas en C.1) así como en las tráqueas (C.2). En la unión NMJ (D.1-D.3), la expresión se restringe a los músculos, no observándose fluorescencia en motoneuronas. En D.2 se empleó el marcador neuronal  $\alpha$ -HRP conjugado con Cy3. D.3 es un montaje de D.1 y D.2.

### 1.1. OBTENCIÓN DE ESTIRPES DE “USO DIRECTO”

Por “uso directo” se entiende que son líneas estándar que poseen los constructos *UAS* y *Gal4* y que simplemente mediante un cruce obtenemos los individuos a examinar.

Para conseguir los niveles de expresión equiparables y adecuados, así como la mayor homogeneidad en todos los experimentos, se emplearon como controles las líneas *Gal4* y *UAS* cruzadas por *w<sup>1118</sup>*. Así, por ejemplo, para la sobreexpresión del péptido amiloide en motoneuronas tendríamos los siguientes cruces:

➤ ♀  $w; Gal4-D42$  X ♂  $w^{1118}$

De aquí se seleccionaron los hijos ♂ que serán  $w/w^{1118}; Gal4-D42/+$  y que son los denominados Control Gal4.

➤ ♀  $w; UAS-A\beta_{42}$  X ♂  $w^{1118}$

De aquí se seleccionaron los hijos ♂ que serán  $w/w^{1118}; UAS-A\beta_{42}/+$  y que son los denominados Control UAS.

➤ ♀  $w; Gal4-D42$  X ♂  $w; UAS-A\beta_{42}$

De aquí se seleccionaron los hijos ♂ que serán  $w/w^{1118}; UAS-A\beta_{42}/+; Gal4-D42/+$  y que son los denominados Experimento.

De esta misma forma se procedió para la sobreexpresión muscular y pan-neural para todos los tipos de estudio (longevidad, neurodegeneración, etc). En el caso de las líneas con dos secuencias *UAS* en el mismo genoma, primero se procedió a la generación de dichas líneas (ver más adelante) para después llevar a cabo los mismos cruces con las líneas *Gal4* y  $w^{1118}$ .

## 1.2. OBTENCIÓN DE LÍNEAS DE “USO NO DIRECTO”

Por otro lado, para poder estudiar la interacción de la sobreexpresión de PI3K junto con la de  $A\beta$ , hubo que crear diversas líneas con varios constructos *UAS* para su posterior cruce con las líneas de *Gal4*. A continuación detallamos cuales son y cómo se generaron estas estirpes.

### 1.2.1. Líneas con los dos UAS en distinto cromosoma

Este es el caso de estirpes con las secuencias *UAS* en distinto cromosoma, como ocurre con la línea  $UAS-A\beta_{40}$ . Para esta línea se diseñaron los cruces que a continuación describimos:

- Cruce 1: obtención de cromosomas balanceados. Debido a que el  $UAS-PI3K$  se encuentra en el cromosoma II y el  $UAS-A\beta_{40}$  en el III, primero balanceamos dichos cromosomas para así obtener dos líneas con los insertos *UAS* y sus balanceadores correspondientes.

- Línea 1: balancear el cromosoma III

♀  $w; UAS-A\beta_{40}$  X ♂  $w; If/CyO; MKRS/TM6,B$

♀  $w; If/+; UAS-A\beta_{40}/TM6,B$  X ♂  $w; CyO/+; UAS-A\beta_{40}/TM6,B$

$\$ w; If/CyO; UAS-A\beta_{40}/TM6,B$

- Línea 2: balancear el cromosoma II

♀  $w; UAS-PI3K$  X ♂  $w; If/CyO; MKRS/TM6,B$

♀  $w; UAS-PI3K/CyO; +/MKRS$  X ♂  $w; CyO/UAS-PI3K; +/TM6,B$

$\$ w; If/CyO; UAS-PI3K/CyO$

- Cruce 2: obtención de la línea final con las dos inserciones *UAS*. Con las dos cepas generadas anteriormente se procedió al cruce de ambas para obtener la línea con los dos *UAS*:

♀  $w; If/CyO; UAS-A\beta_{40}/TM6,B$  X ♂  $w; If/CyO; UAS-PI3K/CyO$

$\$ w; UAS-PI3K/CyO; UAS-A\beta_{40}/TM6,B$

### 1.2.2. Líneas recombinantes

En el caso de las líneas con las inserciones *UAS* en el mismo cromosoma, como son las líneas *UAS-A $\beta_{42}$* , *UAS-arc2E*, y *UAS-PI3K*, se procedió a la generación de recombinantes que describimos mediante estos esquemas de cruces (sólo mostraremos los cruces para una de las líneas como ejemplo, puesto que para la otra se realizaron de la misma manera y de forma paralela):

- Cruce 1: para permitir la recombinación

(1) ♀ *w; UAS-Aβ<sub>42</sub>* X ♂ *w; UAS-PI3K*

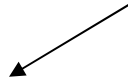


♀ *w; UAS-Aβ<sub>42</sub>/UAS-PI3K*

De este cruce seleccionamos las hembras que son en las que se produce el proceso de recombinación.

- Cruces 2 y 3: balancear los posibles cromosomas recombinantes

(2) ♀ *w; UAS-Aβ<sub>42</sub>/UAS-PI3K* X ♂ *w; If/CyO; MKRS/TM6,B*



(3) 1 ♂ *w; [UAS-Aβ<sub>42</sub>#UAS-PI3K]/CyO o If; MKRS/+* X ♀ *y w; Bc-Gla/CyO-GFP*



♀♂ *w; [UAS-Aβ<sub>42</sub>#UAS-PI3K]/CyO-GFP*

Del cruce 2 se seleccionaron los machos con color de ojos más oscuro, lo cual indicaba que se encontraban los dos UAS y por tanto que se había producido la recombinación. En el cruce 3 se utilizó un único macho en la obtención de las distintas líneas recombinantes para su posterior estudio.

De esta forma conseguimos varias líneas recombinantes y de buena supervivencia:

- Dos líneas recombinantes *UAS-Aβ<sub>42</sub> # UAS-PI3K*. Una denominada R.2 y otra denominada R.5. La que empleamos finalmente para el estudio fue la R.2.
- Dos líneas recombinantes *UAS-Aβ<sub>42</sub> # UAS-PI3K*. Las denominadas R.8 y R.11. Esta última fue la empleada finalmente para el estudio.



## **2. CONDICIONES DE OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS ESTIRPES EXPERIMENTALES**

Todas las estirpes se crecieron con un medio de cultivo o papilla compuesto por: levadura (84 g/l), azúcar (84 g/l), NaCl (3.3 g/l), agar (10 g/l), harina de trigo (42 g/l), zumo de fruta (167 ml/l), y ácido propiónico (5 ml/l) como agente antimicótico. Las moscas parentales se crecieron a 25 °C y 60% de humedad con un ciclo de 12h:12h de luz-oscuridad.

En los experimentos, para aumentar los niveles de actividad del Gal4, todos los individuos se crecieron a 26°C, 60% humedad y ciclo de 12h:12h de luz-oscuridad. Además, para que la descendencia creciera en las mejores condiciones ambientales y evitar la superpoblación, los cruces siempre se realizaban con ocho hembras vírgenes junto con cuatro machos en un tubo. Dicho tubo se cambiaba dos veces por semana y se mantenían a los padres un máximo de dos semanas para evitar el envejecimiento y la consiguiente pérdida de fertilidad, y obtener una puesta de embriones homogénea.

## **3. ESTUDIO DE LONGEVIDAD**

Para el estudio de longevidad se seleccionaron moscas recién eclosionadas (para que presentaran la misma edad o sólo unas horas de diferencia), se las separó por genotipo y sexo (en nuestro caso sólo utilizamos machos) y se pusieron 20 moscas por tubo a 26 °C. Cada dos días se cambiaron a tubos con papilla nueva y se contabilizaron y censaron el número de moscas muertas, así como las escapadas o pegadas en cada cambio, hasta que todos los individuos de cada tubo murieron.

## **4. PROTOCOLOS DE DISECCIÓN E INMUNODETECCIÓN**

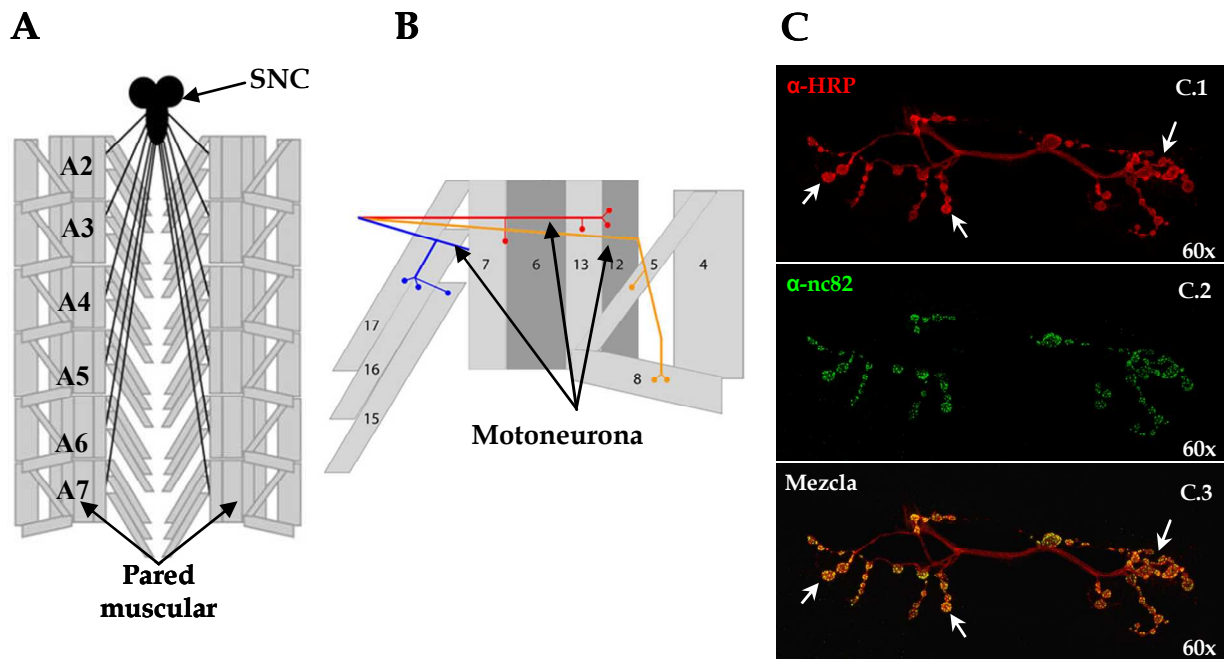
Para estudiar el efecto del péptido A $\beta$  sobre los diferentes parámetros morfológicos y funcionales de la unión neuromuscular, se llevaron a cabo disecciones para visualizar dicha unión, e inmunotinciones con anticuerpos que marcan la membrana neuronal ( $\infty$ HRP) y los sitios activos (nc82).

#### 4.1. UNIÓN NEUROMUSCULAS LARVARIA

Se tomaron larvas macho en estadio III avanzado, al que se denomina *wandering* (en el cual la larva deja el sustrato alimenticio y se prepara para pupar) y se sumergieron en una solución de tampón fosfato (*Phosphate buffered saline* - PBS) + 0,5mM EGTA (Etilenglicol tetra-acetato -*ethylene glycol tetraacetic acid*-). Con agujas entomológicas se fijaron a una placa con resina silgar (Silicona RTV-2, Rhône Poulenc) y con unas microtijeras se les hizo un corte dorsolongitudinal en la pared muscular desde la parte posterior hacia la anterior. De nuevo, con agujas entomológicas se sujetó en forma de libro la pared muscular a la resina. Después se eliminó la grasa y vísceras para dejar los músculos limpios y al descubierto (ver Figura 12A).

Las muestras fueron fijadas con una solución de tampón fosfato con formaldehído (Electrón Microscopy Sciences) al 4% durante 45 minutos. Posteriormente se lavó la preparación 6 x 5 minutos en tampón fosfato con 0.3 % Tritón x-100 (Calbiochem) (PBT) y se bloqueó con una solución de albúmina de suero bovino (Sigma) en PBS + 5% de suero caprino (*Normal goat serum*-NGS) (Vector) (BBT) durante 1 hora. Una vez fijados y bloqueados, las muestras se incubaron con el anticuerpo monoclonal primario nc82 (Developmental Studies Hybridoma Bank) toda la noche a 4°C. Este es un anticuerpo monoclonal contra la proteína *Bruchpilot*, que está presente en las zonas presinápticas activas y por tanto se emplea para poner de manifiesto los sitios activos de la neurona (Wagh y col., 2006). Después de lavar 6 x 5 minutos en PBT, se incubó 2 horas con el anticuerpo secundario  $\alpha$ -ratón Alexa-488 (Invitrogen) y con  $\alpha$ -HRP (*Horse radish peroxidase*) conjugado a Cy3 (Jackson Inmuno Research).  $\alpha$ -HRP se empleó como marcador neuronal (Wang y col., 1994; Sun y Salvaterra 1995). Por último se procedió a lavar 6 x 5 minutos en PBT y 2 x 5 en PBS para terminar montando la muestra en medio de montaje para fluorescencia ProLong® Gold (Invitrogen).

Una vez conseguidas las muestras se visualizaron al microscopio confocal, y se tomaron imágenes para su posterior análisis (para ver las características de toma de imágenes así como su procesamiento ver los apartados 6. Captura de imágenes y 7. Procesamiento de imágenes).

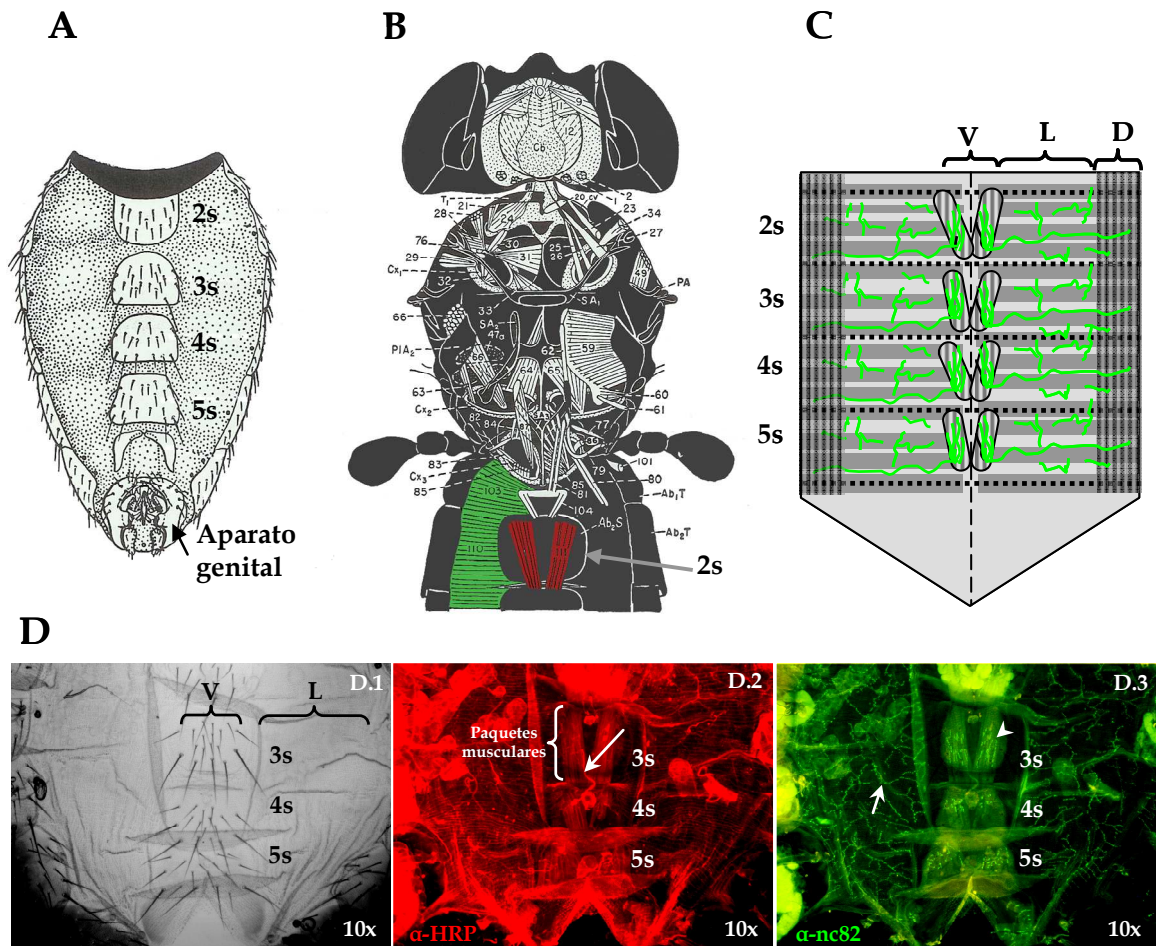


**Figura 12:** Unión neuromuscular larvaria de *Drosophila*. A) Esquema de una disección en libro de larva III donde se muestran los músculos. A2-A7: indican los segmentos abdominales 2 a 7. (SNC: sistema nervioso central) (modificado de Budnik y col. 1990). B) Esquema de la disposición de los músculos que componen un hemisegmento de la pared muscular. El estudio se realizó en la terminación que se encuentra entre los músculos 6 y 7 (resaltada en rojo) (modificado de Imlach y McCabe. 2009). C) Fotografías de fluorescencia de una terminación larvaria típica. C.1 muestra la motoneurona marcada con  $\alpha$ -HRP. Las flechas indican los botones; C.2 muestra los sitios activos marcados con nc82; C.3 es una superposición de las dos anteriores en donde se observa que los sitios activos se restringen a los botones de la terminal como se indica con las flechas.

#### 4.2. UNIÓN NEUROMUSCULAR DE ADULTO

Se tomaron machos adultos de edades determinadas: 3, 7, 15, 20 y 30 días (en los casos en que fuera posible). Se les cortaron las alas y patas y se sumergieron en PBS + 5mM EGTA en posición dorsal. Con agujas entomológicas se fijaron a una placa con silgar y con unas microtijeras se cortó la parte final del abdomen y se realizó un corte dorsolongitudinal desde la parte posterior hacia la anterior. De nuevo, con agujas entomológicas se abrió el abdomen en forma de libro. Después se eliminó la grasa y vísceras para dejar los músculos limpios y al descubierto (ver Figura 13).

Las muestras se fijaron en una solución de tampón fosfato con formaldehído (Electrón Microscopy Sciences) al 4% durante 50 min. El procesamiento posterior con los anticuerpos nc82 y  $\alpha$ -HRP se realizó siguiendo un protocolo idéntico al de la terminación neuromuscular larvaria.



**Figura 13: Unión neuromuscular adulta de *Drosophila*.** A) Morfología externa de la parte ventral del abdomen de un macho de *Drosophila* (Modificado de Demerec, 1994). B) Principales músculos del tórax y de la pared ventral del abdomen. En verde se resaltan los músculos de la zona lateral y en rojo los de la zona ventral. Los músculos de la zona dorsal no aparecen. (Modificado de Demerec, 1994). C) Esquema que muestra los componentes de la pared muscular ventral (en tonos de gris) y sus motoneuronas (resaltadas en verde). D) Fotografías de una preparación de unión muscular adulta. D.1: imagen de campo claro donde se puede observar la cutícula y las quetas en los esternitos de cada segmento. D.2: fotografía de fluorescencia que muestra los paquetes musculares y las motoneuronas teñidos con  $\alpha$ -HRP, entre otras cosas. D.3: fotografía de fluorescencia donde se muestran los sitios activos de la unión neuromuscular teñidos con nc82. Las flecha muestra los sitios activos de la zona lateral, y la cabeza de flecha las de la zona ventral (2s: 2º segmento; 3s: 3er segmento; 4s: 4º segmento; 5s: 5º segmento. V: zona ventral; L: zona lateral; D: zona dorsal).

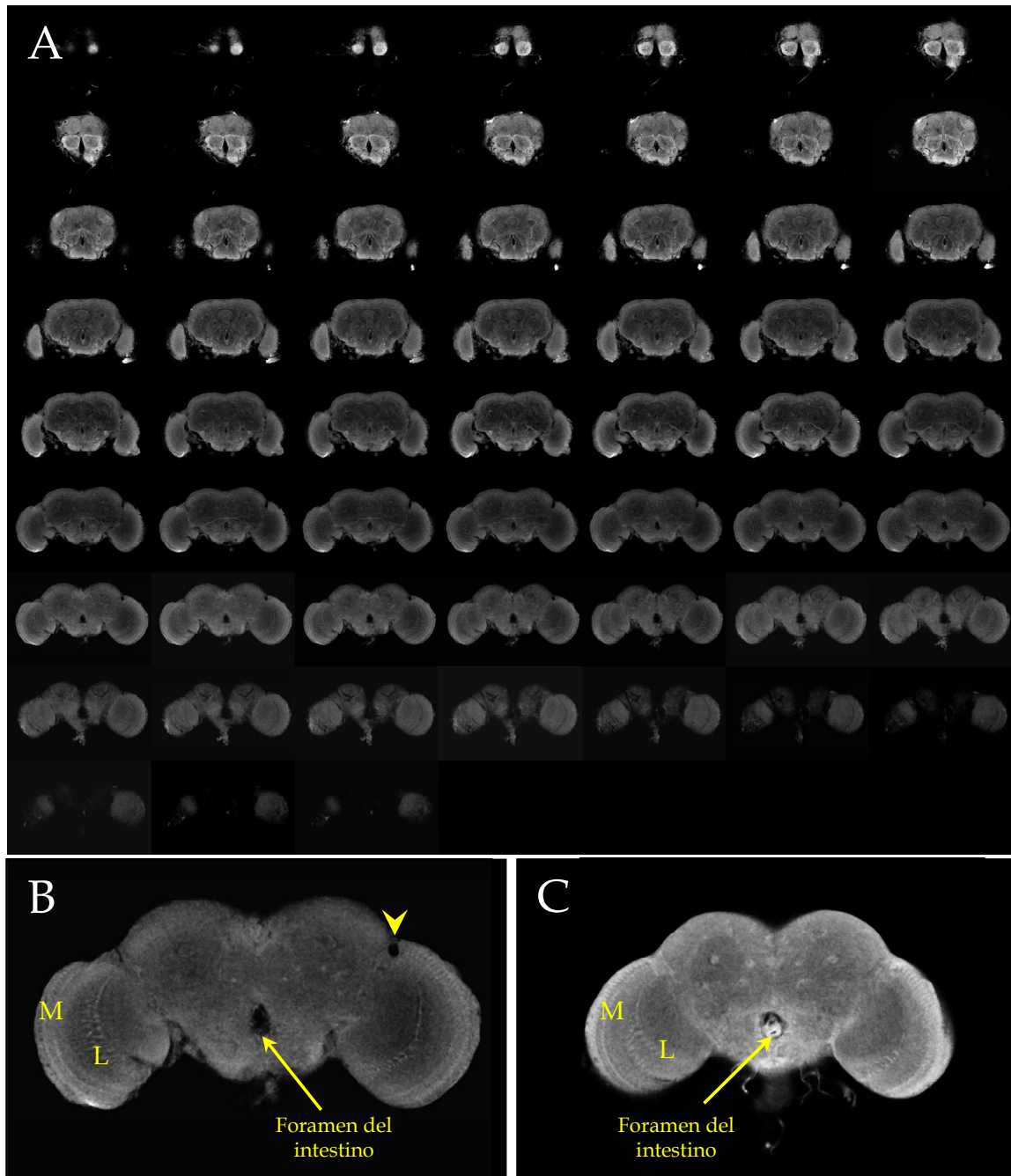
## 5. ESTUDIO DE NEURODEGENERACIÓN

El protocolo experimental consistió seleccionar los individuos y dejarlos envejecer hasta una edad de 15 o 20 días (siguiendo las mismas pautas que en la sección 3. Estudio de la longevidad). Estas edades fueron elegidas debido a que varios autores ([Iijima y col., 2004 y 2008](#)) han mostrado que la presencia de A $\beta$  produce neurodegeneración a partir de los 20 días, mientras que no se detecta a los 15 días de edad. Por otro lado fueron elegidas también para observar individuos jóvenes pero no recién nacidos, e individuos adultos pero no excesivamente senescentes.

Una vez alcanzada la edad requerida se procedió a tratar los cerebros según un protocolo de clarificación de tejidos modificado de [McGurk y col., 2007](#), que permite tomar fotografías del cerebro al completo con microscopía confocal. Dicho protocolo consistió en diseccionar los cerebros en una solución de PBS para posteriormente fijarlos en una solución de tampón fosfato con formaldehído (Electrón Microscopy Sciences) al 4% durante 30 minutos. Una vez fijados se lavaron 3 x 5 minutos con PBS y se permeabilizaron con Metanol frío (Panreac) durante 5 minutos. A continuación se eliminó el metanol y añadió una solución de clarificación compuesta por Bencilbenzoato/Bencilalcohol (Sigma Aldrich) en una proporción de 2:1 durante 5 minutos. Por último se montaron las muestras en portaobjetos excavados embebidas en esta misma solución de clarificación.

Una vez obtenidas las muestras se visualizaron al microscopio confocal para tomar series de imágenes hasta completar el cerebro al completo (para ver las características de cómo se tomaron dichas imágenes y su posterior procesamiento ver apartados 6. Captura de imágenes y 7. Procesamiento de imágenes). Un ejemplo de como se visualiza el tejido nervioso tratado con la técnica de clarificación se muestra en la Figura 14.





**Figura 14:** visualización del sistema nervioso central de *Drosophila* para determinar el porcentaje de neurodegeneración. A) Montaje de una serie de fotografías de microscopía confocal de cerebro tratado con el método de clarificación. B) Fotografía de una sección en donde se pueden apreciar un sistema nervioso con neurodegeneración (cabeza de flecha). C) Fotografía de una sección de un cerebro sin neurodegeneración. (M: medula; L: lobula)

## 6. CAPTURA DE IMÁGENES

La toma de imágenes se realizó en un microscopio confocal Olympus IX70 con software FLUOVIEW FV300 v.4.3. Para cada preparación se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones:

- Preparación larvaria: se localizó el tercer segmento y en éste los músculos 6 y 7 (ver Figura 12B) de cada hemisegmento, para identificar las motoneuronas que inervan dichos músculos y que son las que de forma habitual se escogen para estudios neuromusculares (Budnik y col., 1990; Imlach y McCabe, 2009). Se usó un objetivo de inmersión 60x. Los fluoróforos fueron excitados mediante los láseres de argón (488 nm) y helio-neón (543 nm). Las secciones ópticas se tomaron a una micra de espesor.
- Preparación de adulto: teniendo en cuenta los trabajos de unión neuromuscular adulta (Currie y Bate, 1991; Hebbar y col., 2006), se localizó el tercer segmento y en éste los paquetes musculares ventrales, para identificar las motoneuronas que inervan dichos músculos, y que fueron seleccionadas para nuestro estudio por su fácil localización y su homogeneidad morfológica (ver Figura 13). Se usó un objetivo de inmersión 60x. Los fluoróforos fueron excitados mediante los láseres de argón (488 nm) y helio-neón (543 nm). Las secciones ópticas se tomaron a una micra de espesor.
- Neurodegeneración: se utilizó un objetivo 20x. Se excitó el tejido con láser de argón (488 nm) para capturar la emisión de autofluorescencia del tejido nervioso. Las secciones ópticas se tomaron a dos micras de espesor hasta completar el volumen del cerebro al completo.

## 7. PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

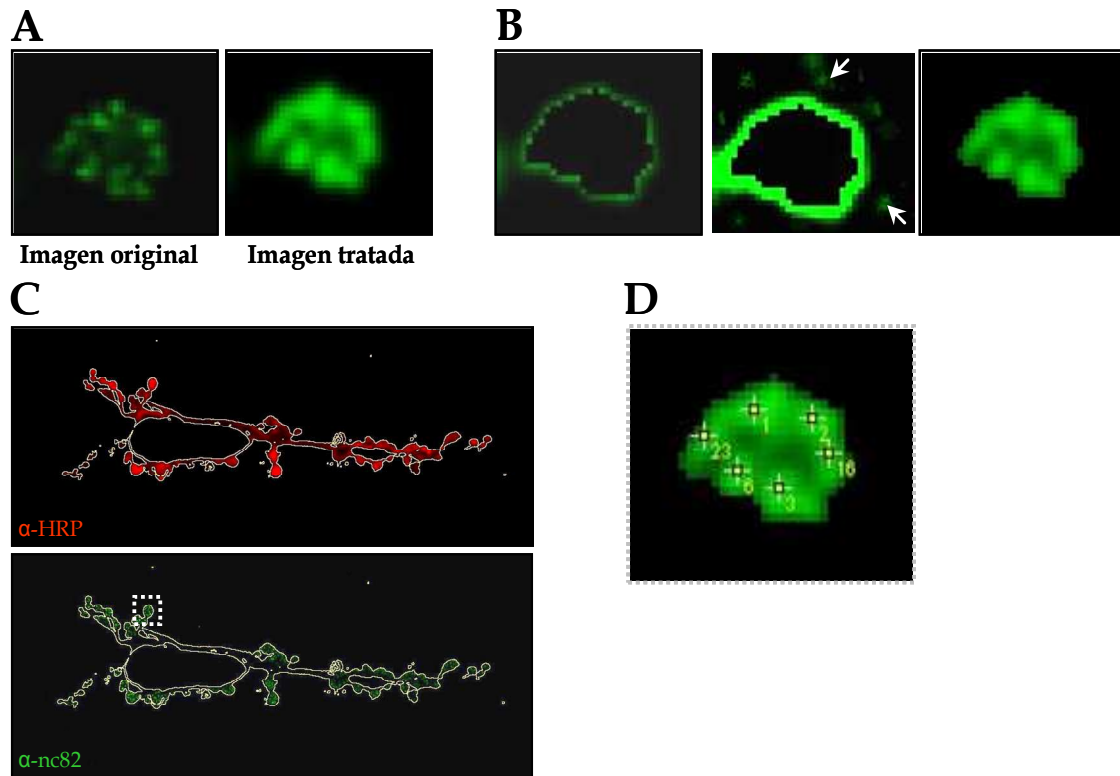
Los programas utilizados para el procesamiento fueron: ImageJ, Fiji-win32 y Adobe PhotoShop® 6.0. Las imágenes de las figuras fueron tratadas con Adobe PhotoShop® 6.0 o ImageJ para enfatizar los rasgos y características que se querían resaltar y explicar en el texto. El tratamiento, procesamiento y cuantificación de los distintos parámetros a partir de las imágenes fue diferente para cada tipo de examen, y a continuación se explica de forma detallada.

### 7.1. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE SINAPSIS

Dicho cálculo se realizó mediante una macro automatizada con ImageJ, ideada y creada por el profesor Ignacio Monedero. Dicha herramienta se utilizó tanto para la medición en unión neuromuscular larvaria como de adulto. La macro constaba de diversas partes:

- i. Primero aplica un contraste y un filtro Gausiano para mejorar y enfatizar los sitios activos de las imágenes tomadas (ver Figura 15A). Tanto el contraste como el filtro se aplican con un mismo valor numérico objetivo para todas las imágenes por igual. Así intentamos evitar tratamientos poco homogéneos o subjetivos de la imagen.
- ii. Después aplica una resta de imágenes consecutivas para eliminar fondo, evitar el conteo del mismo punto en imágenes contiguas y delimitar mejor la forma del punteado (ver Figura 15B).
- iii. Una vez hecho el tratamiento inicial de mejora de la imagen, procede a seleccionar el área de interés a medir, considerando dicha área como la delimitada por la señal  $\infty$ HRP de la motoneurona (ver Figura 15 C). Así, el programa sólo medirá puntos dentro del área adecuada y no fuera.
- iv. Por último se realiza un conteo automático del número de sitios activos en el interior de del área de interés en cada conjunto de imágenes, mediante la herramienta denominada "point picker" que marca los puntos de mayor brillo y guarda los datos acumulados en un archivo (ver Figura 15 D).





**Figura 15:** Ejemplo de cómo se realiza un conteo automático de sitios activos. En la figura se muestra un ejemplo resumido (en unión neuromuscular de larva) de cómo funciona la macro de ImageJ para el conteo de sitios activos. A) Tratamiento de imagen: aumento de contraste y aplicación de filtro gaussiano. B) Resta de imágenes: elimina fondo (indicado por flechas) y evita doble conteo. C) Selección del área de interés (delimitada por una línea amarilla) tomando como referencia el marcaje neuronal con HRP. D) Conteo de puntos mediante la herramienta “point picker”.

## 7.2. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE BOTONES

En este caso la cuantificación se llevó a cabo de forma manual utilizando el programa ImageJ y su herramienta “point picker”. Primero se separaron los canales (verde para sitios activos y rojo para membrana neuronal). Se utilizó la imagen de tinción con  $\alpha$ -HRP unido a Cy3 (que marca la motoneurona) y con la herramienta “point picker” del ImageJ se contaron los botones por terminación, tanto para la unión muscular larvaria como para la de adulto.

## 7.3. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE RAMAS

En el caso de la unión neuromuscular adulta (ver Figura 13), la motoneurona que inerva los músculos ventrales posee diversas arborizaciones en forma de ramas que se asocian a los distintos paquetes musculares. Para determinar el número de ramas de forma objetiva, se cuantificaron como el número de puntas que presentaba la arborización de la motoneurona

en cada hemisegmento. El recuento se realizó de forma similar a la cuantificación del número de botones, haciendo un contaje manual ayudándonos con la herramienta “point picker” del programa ImageJ.

#### **7.4. CUANTIFICACIÓN DE LA NEURODEGENERACIÓN**

En la cuantificación de la neurodegeneración el profesor Ignacio Monedero diseñó una macro con el programa Fiji-win32 que automatizó dicho proceso. Dicha macro constaba de diversas partes:

- i. Aplicación de un filtro de suavizado (mediana). Esto se utiliza para obtener una imagen más homogénea. Este filtro se aplicó de la misma forma para todas las imágenes.
- ii. Delimitar el área del tejido a estudiar. Mediante un umbral, se seleccionó el área del cerebro al completo en cada fotografía, para que luego se pudiera medir la neurodegeneración y obtener unos valores en función de dicho área.
- iii. Delimitar el área del tejido dañado o neurodegenerado. Este área se ajustó teniendo en cuenta la falta de tejido nervioso en función de la ausencia de “color” con relación al tejido sano (el tejido nervioso se presenta en tonos de gris y los huecos en negro), el grado de circularidad (puesto que el tejido dañado suele formar huecos redondeados) y por un tamaño de un rango adecuado para no tener en cuenta el foramen por donde pasa el esófago (Ver Figura 14B y C).
- iv. Análisis. Finalmente la macro, de forma automática, contabilizó el área de tejido dañado frente al área total del cerebro.

#### **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados fueron almacenados en hojas de cálculo Microsoft Excel. La mayoría de las gráficas fueron generadas en este mismo programa.

Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS 15.0.1 (SPSS Inc., USA).

Los estudios de longevidad se analizaron mediante pruebas de supervivencia, empleando tablas de mortalidad y regresión de Cox. Para los efectos sobre la longevidad de la expresión de A $\beta$  en motoneuronas el número de individuos osciló entre 133 y 180,

mientras que el efecto de la expresión muscular se contabilizó utilizando entre 102 y 166 individuos.

Para el resto de los análisis, en los casos en los que los datos presentaron una distribución normal y cumplían homocedasticidad, se analizaron mediante ANOVA (de uno ó dos factores), realizando los análisis *post hoc* de Bonferroni. Cuando los datos cumplían normalidad pero no eran homocedásticos, se realizaron pruebas *post hoc* de T2 de Tamhane y T3 de Dunnet. En los casos en los que el análisis de normalidad no se cumplió, la estadística se realizó utilizando los datos transformados a Logaritmo Neperiano que se ajustaban a una distribución normal. En los casos en los que los datos transformados no presentaron una distribución normal, se procedió realizando estadística no paramétrica, aplicando las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. En el caso de los análisis de la unión neuromuscular, tanto larvaria como adulta, en todos los estudios se emplearon 10 terminaciones para cada genotipo y edad. En cuanto al estudio de neurodegeneración, se midieron entre 6 y 10 cerebros por genotipo y edad.

Para el análisis de rectas de regresión se hicieron comparativas de las pendientes de dichas rectas según [Zar 2004](#).



# RESULTADOS

---



## RESULTADOS

La pérdida de sinapsis es una de las principales características de la enfermedad de Alzheimer y también la causa principal del déficit de memoria (Selkoe 2002; Mucke y Selkoe 2012). Con frecuencia, la pérdida sináptica y el deterioro cognitivo se producen con anterioridad a otros signos morfológicos característicos de la enfermedad, como la acumulación de ovillos fibrilares y placas amiloides, y en general precediendo a la neurodegeneración y muerte neuronal (Scheff y Price 2006). Las causas de dicha pérdida no están totalmente dilucidadas, pero parece que el péptido amiloide juega un papel decisivo en el funcionamiento neuronal y por ende en el de sus sinapsis. Por tanto, entender el desarrollo de esta enfermedad pasa por disponer de modelos animales que permitan abordar el estudio de los mecanismos que median los efectos sinápticos del péptido amiloide, y explorar formas de revertir dichos efectos. En este trabajo utilizaremos el modelo de experimentación *Drosophila melanogaster*, cuyo empleo está ampliamente reconocido para estudiar los mecanismos causantes de enfermedades humanas (Shulman y col. 2003; Botas 2007).

En esta sección describiremos de forma detallada los experimentos realizados para determinar cómo afecta la presencia del péptido amiloide y su acumulación a la formación y función sinápticos en *Drosophila*. Para ello nos centramos en la unión neuromuscular, un sistema bien caracterizado, de fácil acceso y con gran reproducibilidad (Koh y col. 2000; Hebbar y col. 2006). Así, expresamos el péptido en sus formas  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}ARC$ , para comparar el grado de severidad del fenotipo sináptico con la toxicidad descrita *in vitro* e *in vivo* de los distintos péptidos (Dahlgren y col. 2002; Crowther y col. 2005; Whalen y col. 2005; esta tesis). En este sistema, cuantificamos de forma detallada la pérdida sináptica, y caracterizamos en qué momento se producía. La versatilidad del sistema Gal4-UAS de *Drosophila* nos permitió comparar el efecto de la expresión presináptica (motoneurona) o postsináptica (músculo) sobre la sinapsis neuromuscular. Una vez demostrado el efecto sinapto-tóxico del péptido amiloide también en *Drosophila*, determinamos si es posible revertir el daño sináptico generado por el péptido a través de la activación de la vía de PI3K.

## 1. CARACTERIZACIÓN DE LA DINÁMICA DE APARICIÓN DE FENOTIPOS AMILOIDOGÉNICOS GENERALES: LONGEVIDAD Y NEURODEGENERACIÓN.

Uno de los métodos utilizados para modelar la enfermedad de Alzheimer en *Drosophila* es la expresión del péptido amiloide mediante el sistema Gal4-UAS. Estos modelos presentan varias de las características típicas de la enfermedad. Por ejemplo, está bien descrito en la bibliografía que el efecto perjudicial del péptido amiloide se debe en parte a su acumulación progresiva. Así, en individuos en la fase inicial de la enfermedad apenas presentan acumulaciones amiloides, mientras que en estadios avanzados la presencia de placas es abundante (Perrin y col. 2009). De igual modo, se ha descrito la acumulación del péptido en individuos adultos de *Drosophila* (Iijima y col 2004; Crowther y col., 2005; Iijima y col. 2008). Sin embargo, y de manera similar a lo descrito en mamíferos, sólo las formas derivadas de A $\beta$ <sub>42</sub> forman depósitos proteicos similares a placas amiloides en el tejido de *Drosophila*, y de igual manera sólo estos péptidos reducen la esperanza de vida y producen neurodegeneración progresiva (Iijima y col 2004; Crowther y col., 2005; esta tesis).

La severidad de los fenotipos debidos a la expresión de A $\beta$  en *Drosophila* depende no sólo del tipo de péptido expresado, sino también de la línea UAS transgénica específica usada, del *driver* Gal4 empleado, y de las condiciones experimentales concretas. Por estas razones, aunque para este trabajo utilizamos las líneas transgénicas ya publicadas (Crowther y col. 2005; Iijima y col. 2004 y 2008), era necesario describir la progresión de estos procesos en las condiciones experimentales utilizadas en nuestro laboratorio. Por ello comenzamos nuestro estudio caracterizando en detalle la dinámica de aparición de los fenotipos que ya estaban descritos en la literatura. En concreto, estudiamos el efecto de cada combinación péptido/*driver* sobre la longevidad, y determinamos la dinámica de neurodegeneración atribuible a cada tipo de péptido amiloide.

Para el estudio neurodegenerativo utilizamos el *driver* panneural *elav-Gal4*, que nos permitió maximizar la probabilidad de observar eventos neurodegenerativos tempranos. En los estudios de longevidad se utilizaron los *drivers* de motoneurona (*Gal4-D42*) y muscular (*Gal4-24B*), utilizados también en los experimentos que evalúan el efecto sobre la sinapsis en la terminación neuromuscular. De esta manera, caracterizamos por primera vez la dinámica de supervivencia cuando el péptido se expresa en estos tipos celulares.



## 1.1. EFECTO DEL PÉPTIDO AMILOIDE SOBRE LA LONGEVIDAD

La expresión pan-neural del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> (y derivados) reduce la esperanza de vida de *Drosophila* en un porcentaje variable dependiendo del estudio descrito. Teniendo en cuenta que desconocíamos el efecto a largo plazo de la expresión en motoneuronas y en músculo del péptido amiloide, una primera aproximación lógica fue un análisis de la supervivencia de moscas en las que la expresión del péptido se dirigía con los mismos *drivers* que utilizaríamos en el estudio en la unión neuromuscular. Dicho análisis nos mostraría cambios básicos de nuestros objetos de experimentación, pero además nos indicaría las edades idóneas que podríamos tomar para nuestro estudio de unión neuromuscular, así como nos pondría de manifiesto la supervivencia máxima y media, lo cual nos dividiría los rangos de edad en joven, adulto y anciano.

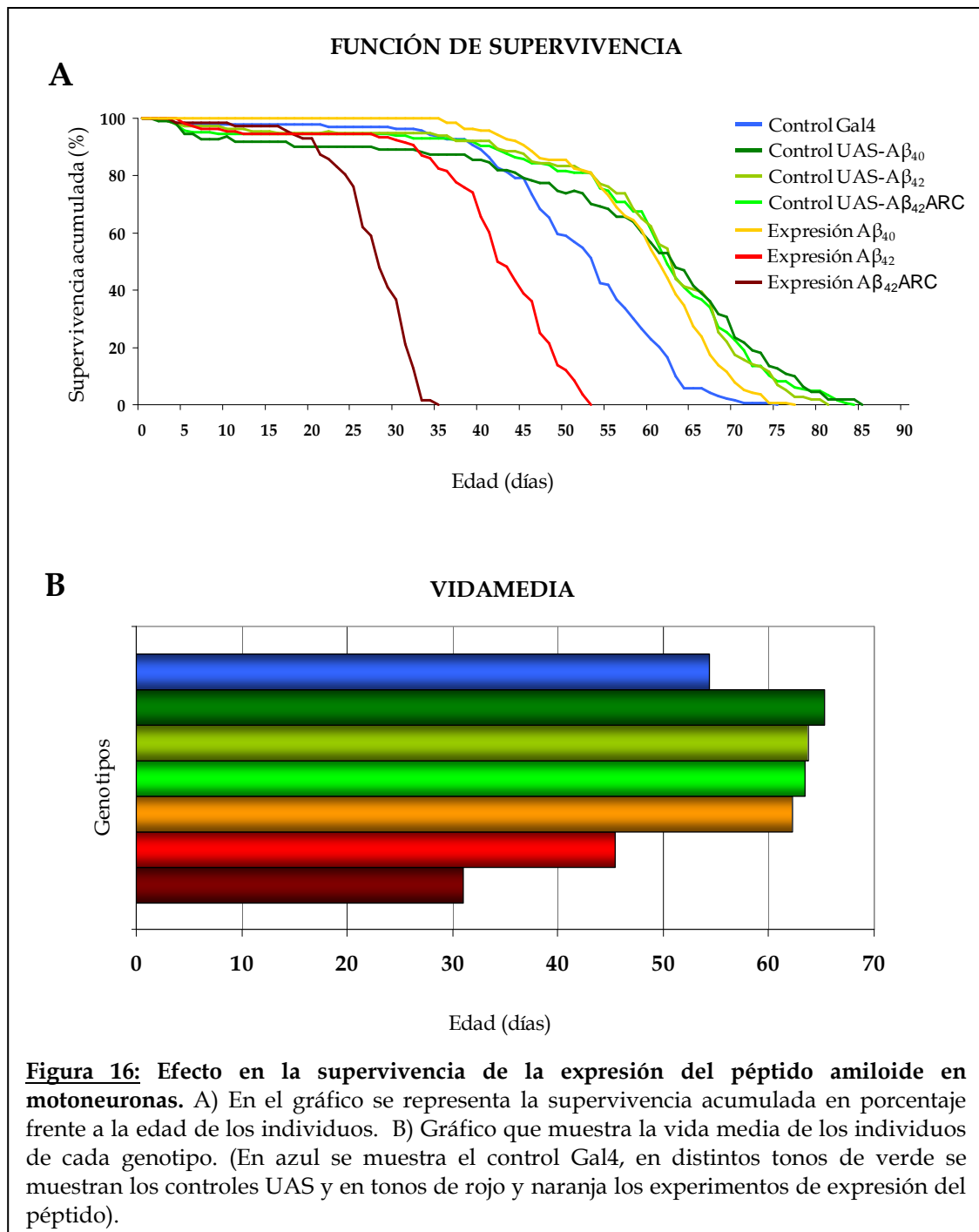
### 1.1.1. Efecto de la expresión en neuronas: driver D42-Gal4

En la Figura 16 se muestran las gráficas que comparan la supervivencia acumulada y vida media de las líneas control y de moscas que expresan los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub>, A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>ARC en el dominio neuronal dirigido por Gal4-D42. Este incluye todas las motoneuronas, además de otras poblaciones neuronales en el cerebro ([Legan y col. 2008](#); [Wu y col. 2010](#). Ver Figura 11 de Material y Métodos).

Mediante el test de supervivencia y a través de una regresión de Cox, observamos que el control Gal4 presentaba una supervivencia diferente al resto de los individuos ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, los tres controles UAS se podían agrupar, puesto que no presentaron diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ), aunque sí con el control Gal4. En *Drosophila* ocurre frecuentemente que los controles Gal4 dan valores alejados de los valores normales en numerosos ensayos, un efecto que ha sido descrito por [Rezával y col. 2007](#). Por tanto, estimamos que para considerar que la expresión de A $\beta$  tenía efecto sobre la supervivencia, debía ser distinto de los controles UAS.

Nuestros datos muestran que la expresión de A $\beta$ <sub>40</sub> en motoneuronas no muestra diferencias significativas con los controles UAS (ver Figura 16A). Sin embargo, al igual que los demás genotipos, sí que es significativamente distinto del control Gal4, que muestra una supervivencia media en torno a un 15% menor (Figura 16B). Por tanto, podemos concluir que, puesto que el control Gal4 es distinto al resto de los individuos experimentales, y la

expresión de  $A\beta_{40}$  presentó una longevidad igual que la de su control UAS, la expresión en motoneuronas del péptido  $A\beta_{40}$  no interfiere en la supervivencia de *Drosophila*.



La expresión de  $A\beta_{42}$ , por el contrario, influyó de forma drástica y negativa en la supervivencia (Figura 16). En este caso, el análisis estadístico mostró diferencias significativas con respecto a todos los grupos experimentales ( $p < 0.01$ ). Los individuos que expresan el péptido presentaron una supervivencia máxima de 53 días, en tanto que la del control Gal4 se situó en 75 y la del control UAS- $A\beta_{42}$  en 81, lo que significa una reducción de

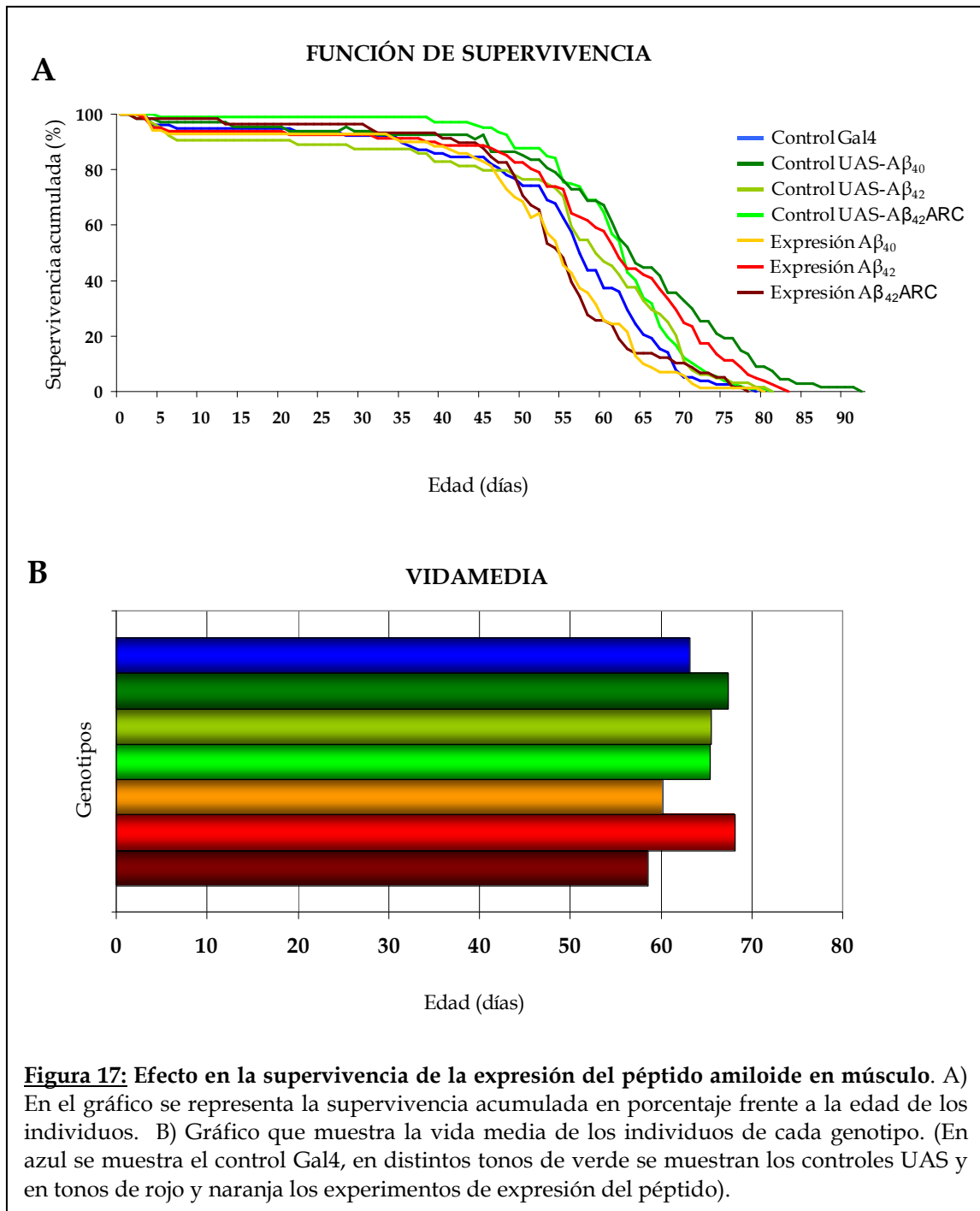
la esperanza de vida con respecto a sus controles de un 29,33% y 34,57 % respectivamente. Por otro lado, la vida media también se vio disminuida con respecto a los controles. Así, se observó una reducción en la supervivencia media de un 16,48 % con respecto al control Gal4 y de un 28,75 % en el caso del control UAS (ver Figura 16 B). Con estos datos, podemos deducir que la presencia de A $\beta$ <sub>42</sub> en el dominio de expresión de Gal4-D42 en *Drosophila*, produce efectos deletéreos en el individuo que provocan una reducción significativa de su esperanza de vida.

En el caso de la expresión del péptido A $\beta$ <sub>42</sub>ARC, nos encontramos con un fenotipo similar al de A $\beta$ <sub>42</sub>, aunque mucho más severo (Figura 16). La función de supervivencia de los individuos que expresaban el péptido mutado fue significativamente distinta tanto al control Gal4 como a los controles UAS y al resto de grupos experimentales. La resistencia máxima de los individuos experimentales fue de tan solo 35 días, un 58,33 % menos que la del control UAS y un 53,33% menos con respecto al control Gal4 (Figura 16A). Como cabía esperar, la vida media también se vio radicalmente reducida, presentando un acortamiento del 43,05% comparándolo con el control Gal4 y un 51,18 % al compararlo con el control UAS (Figura 16 B). Además, esta vida media se acercó de forma pronunciada a la esperanza de vida máxima, lo que nos indicó que la tasa de mortalidad aumenta exponencialmente y de forma radical una vez pasados los 28 días de edad. De esta forma, podemos concluir que la expresión neuronal del péptido mutado provoca un acusado aumento de la tasa de mortalidad y reducción de la vida media de los individuos.

Con todos los datos obtenidos referentes al estudio de supervivencia, podemos afirmar que, de manera similar a lo ya descrito con otros *drivers* neuronales (Crowther y col., 2005; Iijima y col. 2008), la expresión del péptido amiloide en motoneuronas tiene un efecto diferencial dependiendo del tipo del mismo. Así, el péptido en su variante A $\beta$ <sub>40</sub> no afecta a la longevidad de los individuos, mientras que las variantes A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>ARC son deletéreas para la supervivencia del organismo, mermando drásticamente su vida máxima.

### 1.1.2. Efecto de la expresión en músculo: *driver 24B-Gal4*

En la Figura 17 se muestran las gráficas de supervivencia acumulada y de vida media de las líneas control y de moscas que expresan los péptidos  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}ARC$  en músculo.



En este caso, nos encontramos con que el análisis de la supervivencia resultó un poco más complejo de interpretar que en el caso de la expresión del péptido en neuronas, debido a que las diferencias no fueron tan claras. Del mismo modo que en el caso anterior, los controles UAS se podían agrupar, puesto que no presentaron diferencias significativas entre ellos. Por su parte, el control Gal4 mostró diferencias con los controles UAS-A $\beta_{42}$ ARC y UAS-A $\beta_{40}$  ( $p < 0.05$  en ambos casos) pero no con el UAS-A $\beta_{42}$ .

Al centrarnos en las condiciones experimentales, la expresión del péptido A $\beta_{40}$  presentó una longevidad igual a la del control Gal4 pero distinta a la de su control UAS ( $p < 0.01$ ). Así, los individuos que expresan esta variante del péptido muestran una supervivencia máxima reducida en casi un 11% con respecto a su control UAS, pero prácticamente igual al control Gal4 (81 días para la expresión y 79 días para el control Gal4) (Figura 17A,B). En cuanto a las vidas medias, ocurrió algo similar. El control Gal4 y la expresión sólo mostraron diferencias de 3 días, mientras que el control UAS presentó una vida media entre 4 y 7 días mayor que la expresión y el control Gal4 respectivamente (un 10,8 y 6,75% más). Debido a que la expresión de A $\beta_{40}$  presenta una longevidad reducida con respecto a uno de sus controles pero similar al otro, no podemos afirmar, pues, que la expresión muscular del péptido influya de forma negativa en la supervivencia de los individuos.

Por su parte, la expresión muscular de la variante A $\beta_{42}$  no parece influir en la supervivencia máxima, ya que no existen diferencias significativas con ninguno de sus controles (Gal4 o UAS). En el caso de su vida media, la expresión tuvo un ligero incremento (del 3,82%) con respecto a sus controles, aunque el análisis estadístico concluyó que, en su conjunto, la longevidad era similar para los tres individuos experimentales. Así, aunque su expresión en neuronas afecta negativamente, podemos deducir que la expresión muscular del péptido A $\beta_{42}$  no perjudica a la longevidad de *Drosophila*.

Por último, la expresión de la variante A $\beta_{42}$ ARC manifestó una función de supervivencia muy similar a la observada en el caso de la forma A $\beta_{40}$ . De este modo, la expresión del péptido no se diferenció estadísticamente del control Gal4. Así, presentó una longevidad máxima prácticamente igual a dicho control (79 días para el control y 78 para la expresión). Sin embargo, aunque mostró una reducción de la vida media en un 7,3% (unos 5 días) con dicho control, este dato no resultó de influencia para diferenciar su función de supervivencia. Por otro lado, tanto el control Gal4 como la expresión del péptido poseen diferencias significativas con el control UAS ( $p < 0.01$  en ambos casos). Estas diferencias, se

manifiestan en que el control UAS vivió un 6,33 % más que el control Gal4 y un 7,14% más que la expresión, y en que el control UAS mostró una vida media incrementada (un 3,57% más que el control Gal4 y un 10,5% que la expresión del péptido mutado). Con estos, datos al igual que ocurría en los casos anteriores, no podemos afirmar que la expresión muscular del péptido con la mutación Arctic influya de manera negativa en la función de supervivencia de los individuos.

A pesar de las diferencias encontradas entre la expresión de A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>ARC y sus controles UAS, no podemos afirmar con seguridad que dichas diferencias se deban sólo a la expresión del péptido, puesto que no se diferencian del control Gal4. Por otro lado, la expresión de A $\beta$ <sub>42</sub> no muestra una tendencia distinta a ninguno de sus controles, no afectando por tanto su presencia a la supervivencia del individuo. Nuestros datos sugieren que la expresión muscular del péptido amiloide, en cualquiera de sus tres variantes, no interfiere de forma significativa en la supervivencia de *Drosophila*, o tiene un efecto mínimo

## 1.2. EFECTO DEL PÉPTIDO AMILOIDE EN NEURODEGENERACIÓN

Otro acercamiento necesario a nuestro modelo de expresión del péptido amiloide fue un estudio de neurodegeneración. Está descrito en la bibliografía ([Iijima y col 2004](#); [Crowther y col., 2005](#); [Iijima y col. 2008](#)) que la presencia del péptido produce una pérdida neuronal progresiva en individuos adultos de *Drosophila*. Así, se decidió comprobar dicha pérdida en nuestros objetos de estudio, para estar seguros de que nuestro modelo era comparable y adecuado al del resto de laboratorios.

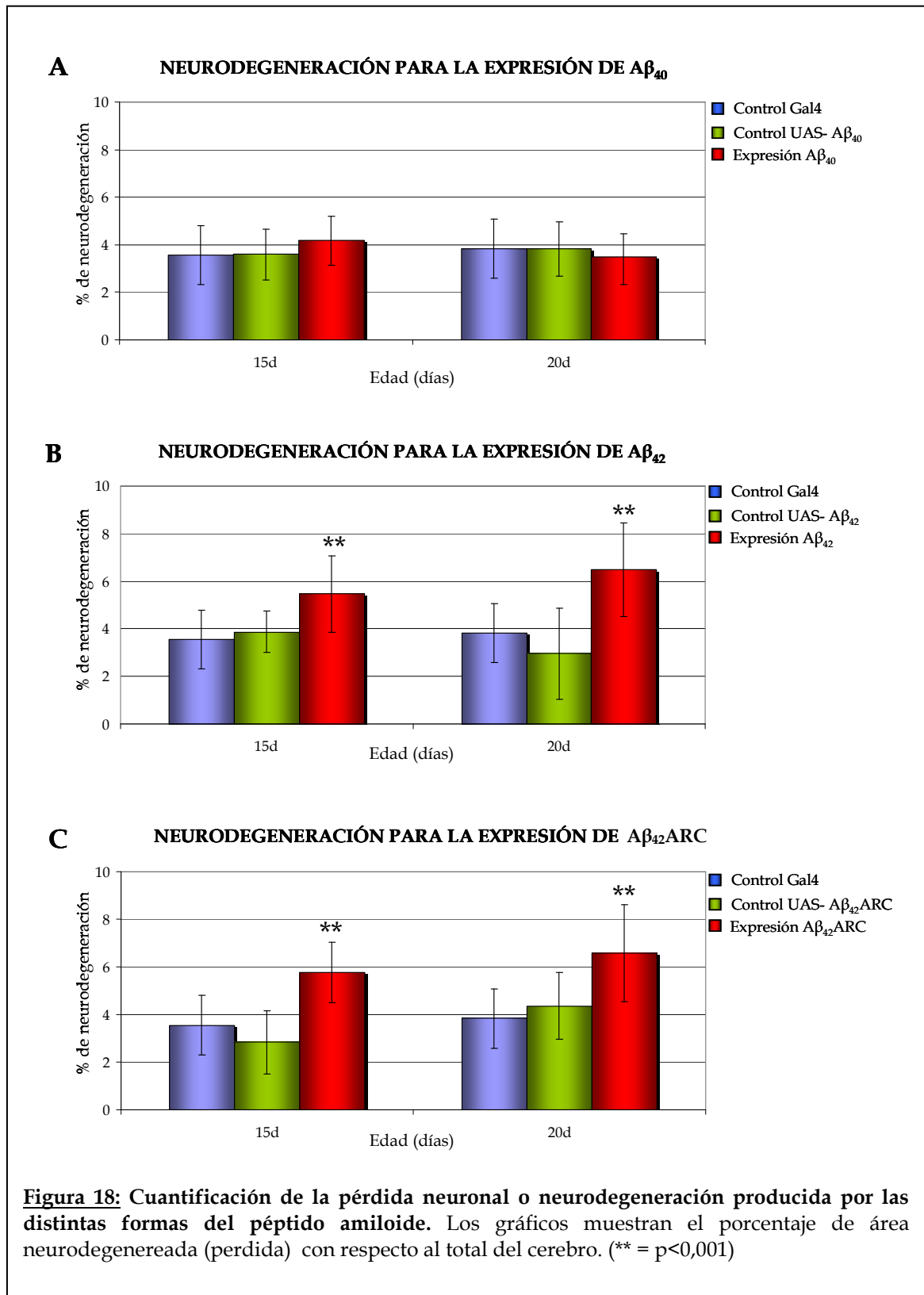
En nuestro caso, el análisis de neurodegeneración se realizó mediante una técnica novedosa de clarificación de tejido (ver Material y Métodos) para visualizar el sistema nervioso completo con microscopia confocal. En nuestro laboratorio se modificó y puso a punto dicha técnica para optimizar el anterior sistema de análisis, en el que se medía la neurodegeneración en cortes secuenciales de parafina del sistema nervioso central. Con esta técnica no solo reducimos el tiempo en la preparación del material, sino que obtuvimos una forma objetiva, estandarizada y sin artefactos de cuantificación (para más detalles ver Material y Métodos). Además, esta técnica nos permitió obtener una medición de la neurodegeneración total del cerebro, y evitar así artefactos debidos a una posible distribución espacial no-aleatoria de las áreas neurodegeneradas.

Este método detecta de manera automática zonas de neurodegeneración en función de un grado de circularidad y un rango de tamaño de área mínimo dados (ver apartado 7.4 de Material y Métodos). Por ello, teniendo en cuenta que la neurodegeneración es un proceso gradual y aparentemente estocástico, decidimos utilizar en este experimento un *driver* panneural (elav-Gal4), que es el comúnmente empleado en los estudios de pérdida neuronal. De esta forma, al maximizar el número de neuronas que expresan el péptido, maximizamos la probabilidad de obtener núcleos de neurodegeneración suficientemente grandes para ser detectados en etapas tempranas del proceso neurodegenerativo, y así poder determinar de manera fiable a qué edad se empieza a observar este fenómeno.

El grupo de Iijima ya había estudiado la neurodegeneración provocada por la expresión panneural de  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{40}$ . Así, mientras que con  $A\beta_{40}$  no se apreciaba neurodegeneración hasta los 45 días de edad, con la variante  $A\beta_{42}$  la pérdida neuronal comenzaba a aparecer entre los 25 ó 30 días (Iijima y col. 2004 y 2008). Otro grupo diferente (Crowther y col. 2005) describió fenotipos neurodegenerativos con  $A\beta_{42}$  a partir de los 15 días y con  $A\beta_{42}$ ARC a los 9 días, aunque sus experimentos fueron realizados a una temperatura de 29°C, que aumenta los niveles de expresión del sistema Gal4-UAS. Teniendo en cuenta que los datos ya publicados situaban el comienzo de la neurodegeneración alrededor de los 25 días (en algunos casos antes), y en base a nuestros estudios de longevidad, en donde algunos de los individuos no sobrevivían más de 30 días (en el caso de la expresión en motoneuronas de  $A\beta_{42}$ ARC), decidimos emplear para nuestros análisis de neurodegeneración individuos de 15 y 20 días de edad. Así, podríamos determinar la edad aproximada de comienzo del fenotipo de neurodegeneración.

### **1.2.1. Efecto de la expresión de $A\beta_{40}$**

Como se puede observar en la Figura 18A, la expresión del péptido amiloide  $A\beta_{40}$  no parece tener un efecto significativo en el daño neuronal, medido como neurodegeneración, puesto que presenta valores similares a los de sus controles. De hecho, los análisis estadísticos mostraron que ni la edad, ni el genotipo, ni su interacción, presentaban una influencia significativa sobre la neurodegeneración (Tabla 1). Por tanto, podemos afirmar que la presencia de  $A\beta_{40}$  no afecta de forma negativa a la supervivencia neuronal, un dato consistente con lo previamente descrito (Iijima y col. 2004; Crowther y col. en 2005; Iijima y col. 2008).





		Estadístico
Genotipo	A $\beta$ <sub>40</sub>	F <sub>2-51</sub> =0,087, p=0,917
	A $\beta$ <sub>42</sub>	F <sub>2-50</sub> =16,379, p<0,001
	A $\beta$ 42ARC	F <sub>2-48</sub> =13,601, p<0,001
Edad	A $\beta$ <sub>40</sub>	F <sub>1-51</sub> =0,056, p=0,815
	A $\beta$ <sub>42</sub>	F <sub>1-50</sub> =0,069, p=0,801
	A $\beta$ 42ARC	F <sub>1-48</sub> =3,694, p=0,061
Interacción	A $\beta$ <sub>40</sub>	F <sub>2-51</sub> =1,135, p=0,330
	A $\beta$ <sub>42</sub>	F <sub>2-50</sub> =1,897, p=0,162
	A $\beta$ 42ARC	F <sub>2-48</sub> =0,641, p=0,531

**Tabla 1:** Tabla resumen con los estadísticos resultantes del análisis con ANOVA de dos factores, genotipo y edad, y su interacción, sobre la neurodegeneración. En color se resaltan los estadísticos en los que se encontraron diferencias significativas.

### 1.2.2. Efecto de la expresión de A $\beta$ 42

En el caso de la expresión del péptido en su variante A $\beta$ <sub>42</sub>, como se observa en la Figura 18 B, la presencia del péptido produce un efecto deletéreo, provocando un incremento en la neurodegeneración a las dos edades estudiadas. Esta pérdida neuronal fue significativamente elevada (p<0,001) con respecto a ambos controles. El ANOVA de dos factores (ver Tabla 1) mostró que sólo el genotipo, es decir, la presencia o no del péptido, influyó sobre la variable neurodegeneración, mientras que la edad no fue un factor influyente. Estos datos indican que la neurodegeneración inducida por A $\beta$ <sub>42</sub> es patente ya a los 15 días de edad, y no varía entre los 15 y 20 días de edad.

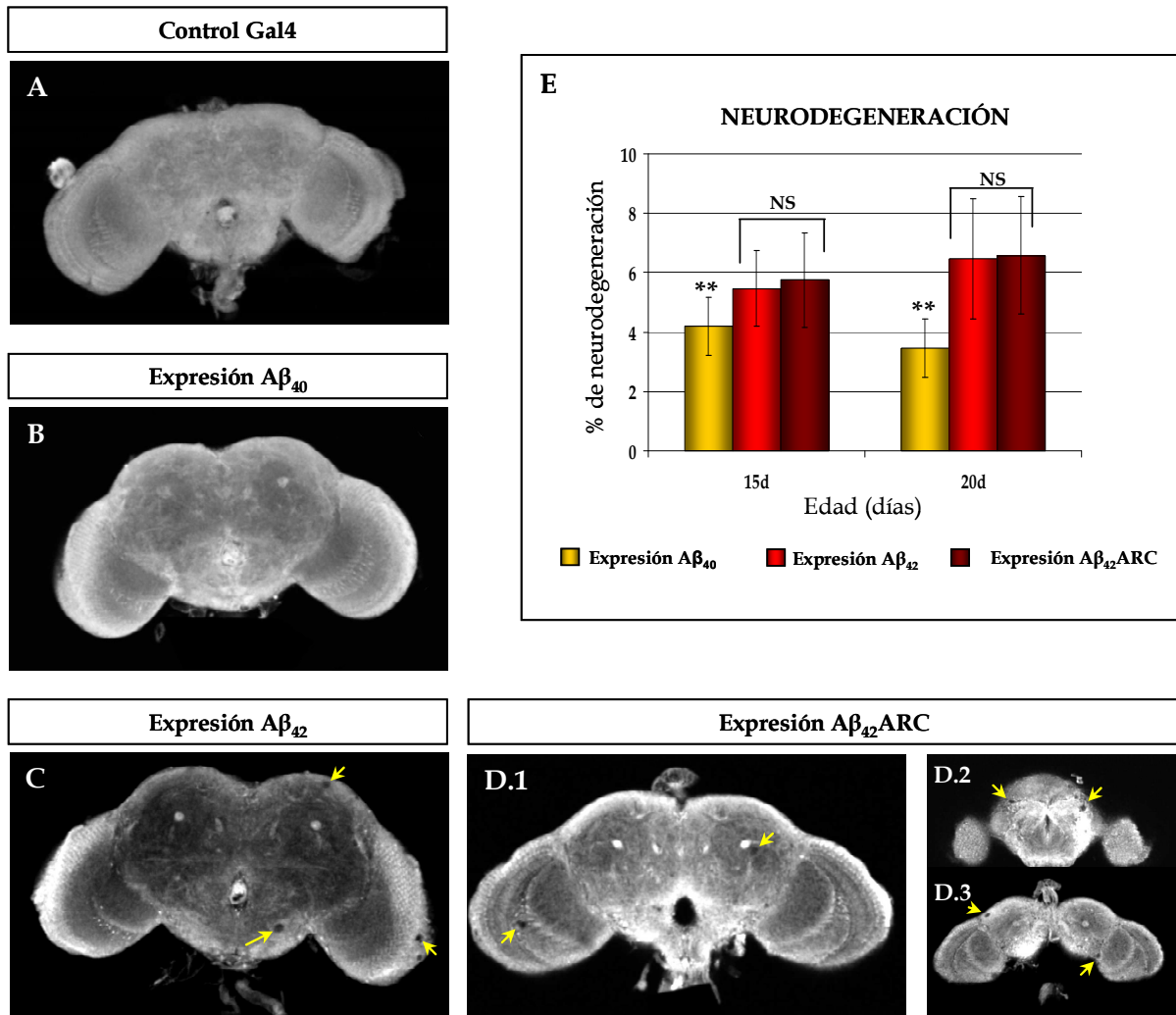
### 1.2.3. Efecto de la expresión del péptido A $\beta$ 42ARC

Del mismo modo que en el caso anterior, y tal y como se muestra en la Figura 18 C, la pérdida de masa nerviosa en el caso de la expresión del péptido mutante fue significativamente más alta (p<0,001) que la observada en sus controles (ver Tabla 1). El factor edad tampoco mostró poseer una influencia significativa en el porcentaje de neurodegeneración medida. Por tanto, de manera similar a A $\beta$ <sub>42</sub>, la neurodegeneración inducida por A $\beta$ <sub>42</sub>ARC es patente ya a los 15 días de edad, y no varía entre los 15 y 20 días de edad.

De esta forma, podemos afirmar que la presencia de  $A\beta_{40}$  no resulta perniciosa para la supervivencia de las células neuronales del sistema nervioso central de *Drosophila*. Por el contrario, tanto la expresión panneuronal de  $A\beta_{42}$  como la de la variante del péptido mutado, Arctic, interfieren en el normal funcionamiento neuronal y comprometen de forma negativa la supervivencia de dichas células. Todo ello se corresponde con los datos anteriormente publicados por otros laboratorios (Crowther y col. 2005; Iijima y col. 2004 y 2008).

Estudios previos han descrito que el efecto neurotóxico de  $A\beta_{42}$ ARC en el cerebro de *Drosophila* es mucho más acusado que el de  $A\beta_{42}$  (Crowther y col. 2005; Iijima y col. y 2008). Por tanto, nos preguntamos si la neurodegeneración provocada por  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}$ ARC era similar o presentaba diferencias en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo. Las imágenes de cerebros de moscas adultas (Figura 19) mostraban un grado de neurodegeneración similar entre el péptido amiloide y el péptido con la mutación Arctic (ver Figura 19 C,D). Así pues, se realizó un análisis estadístico comparando el porcentaje de neurodegeneración entre las expresiones de las tres variantes del péptido amiloide. Este análisis evidenció que no existían diferencias significativas entre ambas expresiones, pero sí con  $A\beta_{40}$ , que mostraba un porcentaje neurodegenerativo muy inferior (Figura 19 E).

Estos resultados contrastan con lo descrito en la bibliografía, donde observan que la presencia de la variante  $A\beta_{42}$ ARC hace que la neurodegeneración sea más acusada (Crowther y col. 2005; Iijima y col. y 2008). Estas diferencias pueden en parte explicarse por diferencias en las condiciones experimentales (temperatura y edad) y en la metodología de análisis, ya que la metodología empleada en este trabajo registra neurodegeneración total en el cerebro, y no en secciones específicas.

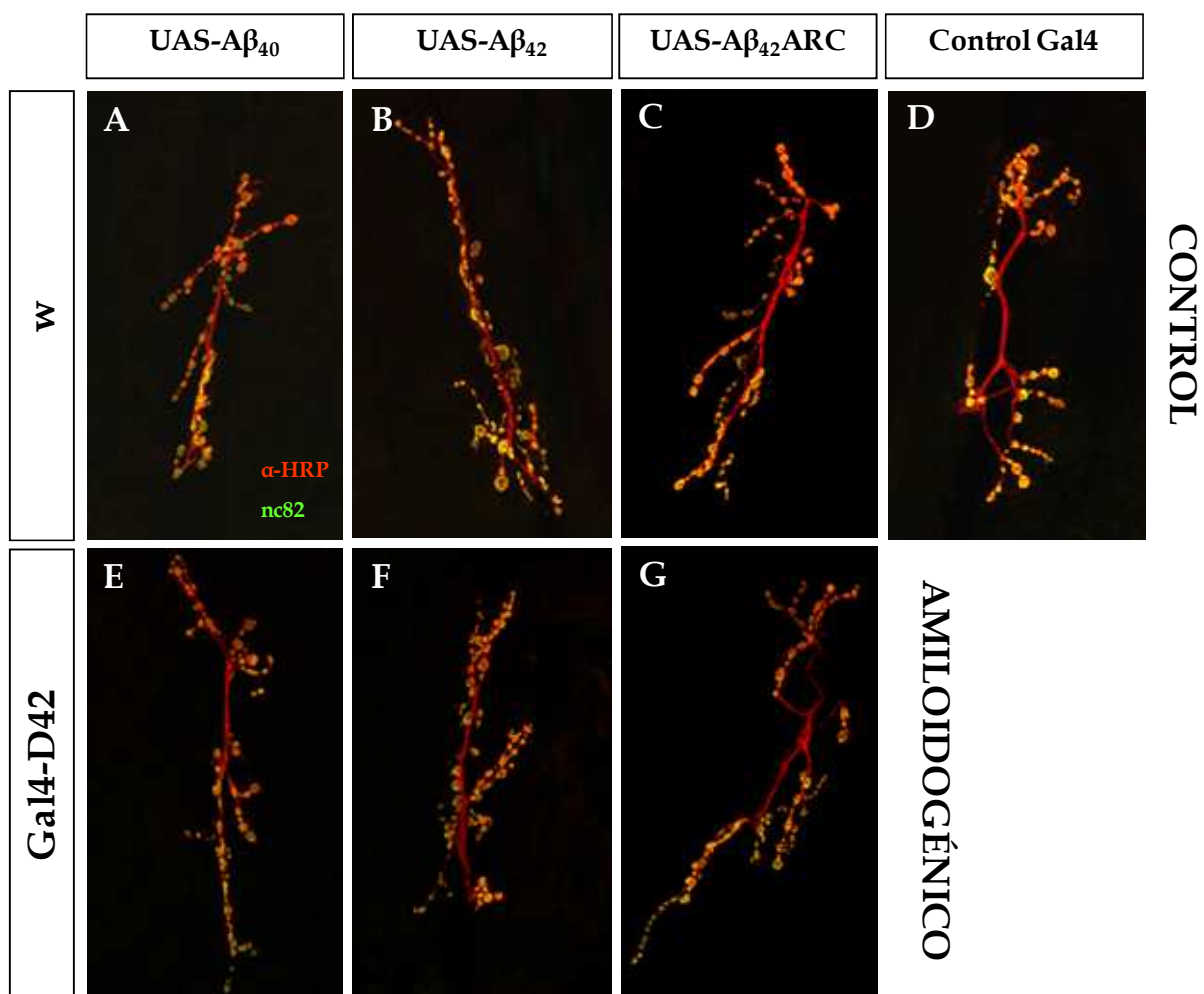


**Figura 19:** Comparación del patrón neurodegenerativo asociado a la expresión de los distintos péptidos. Las imágenes muestran ejemplos representativos de cada genotipo estudiado a los 20 días de edad. Cada imagen se ha obtenido de la proyección de tres o cuatro planos en donde se apreciaban áreas neurodegeneradas. A) *Gal4-D42/+*. B) *Gal4-D42/UAS-A $\beta_{40}$* . C) *Gal4-D42/UAS-A $\beta_{42}$* . D (1-3) *Gal4-D42/UAS-A $\beta_{42}$ ARC*. Las flechas indican las zonas de pérdida neuronal. E) En la gráfica se muestran los % de neurodegeneración de las tres variantes del péptido amiloide. (\*\*=  $p < 0,001$ ). (NS= no presentan diferencias estadísticas entre ambos).

## **2. APROXIMACIÓN A UN MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN LA TERMINACIÓN NEUROMUSCULAR LARVARIA DE *Drosophila*: la presencia del péptido amiloide no altera significativamente los parámetros anatómico-funcionales del terminal axónico.**

Debido a que la unión neuromuscular larvaria de *Drosophila* está bien caracterizada y lleva empleándose para el estudio del desarrollo y función sinápticos desde hace mucho tiempo (Koh y col. 2000), decidimos comenzar nuestro análisis en este sistema. Una primera aproximación consistió en expresar el péptido amiloide mediante el sistema Gal4-UAS en motoneuronas. Así, pondríamos estudiar como afectaba la expresión presináptica de A $\beta$  a la unión neuromuscular. En principio esta expresión presináptica afectaría exclusivamente a las neuronas dirigidas pero, debido a que presenta una señal de secreción, también podría actuar postsinápticamente de manera directa en el músculo.

Para caracterizar el efecto de la expresión del péptido amiloide sobre el terminal de la motoneurona realizamos una medición del número de sinapsis (definidos como sitios activos, reconocidos por el anticuerpo nc82) y de botones sinápticos en la unión neuromuscular, y calculamos el *ratio* (número de sitios activos/botón), lo que permitió tener una caracterización morfológica completa. En la Figura 20 se muestran imágenes representativas de la unión neuromuscular larvaria de *Drosophila*. Como se puede observar a simple vista, no parece haber grandes diferencias morfológicas entre las condiciones experimentales (Figura 1F-G) y sus controles (Figura 1A-E). Por tanto se procedió a un análisis de las imágenes de forma estandarizada, homogeneizada y objetiva (ver sección Material y Métodos), para intentar dilucidar y exponer de forma numérica las posibles diferencias entre grupos.



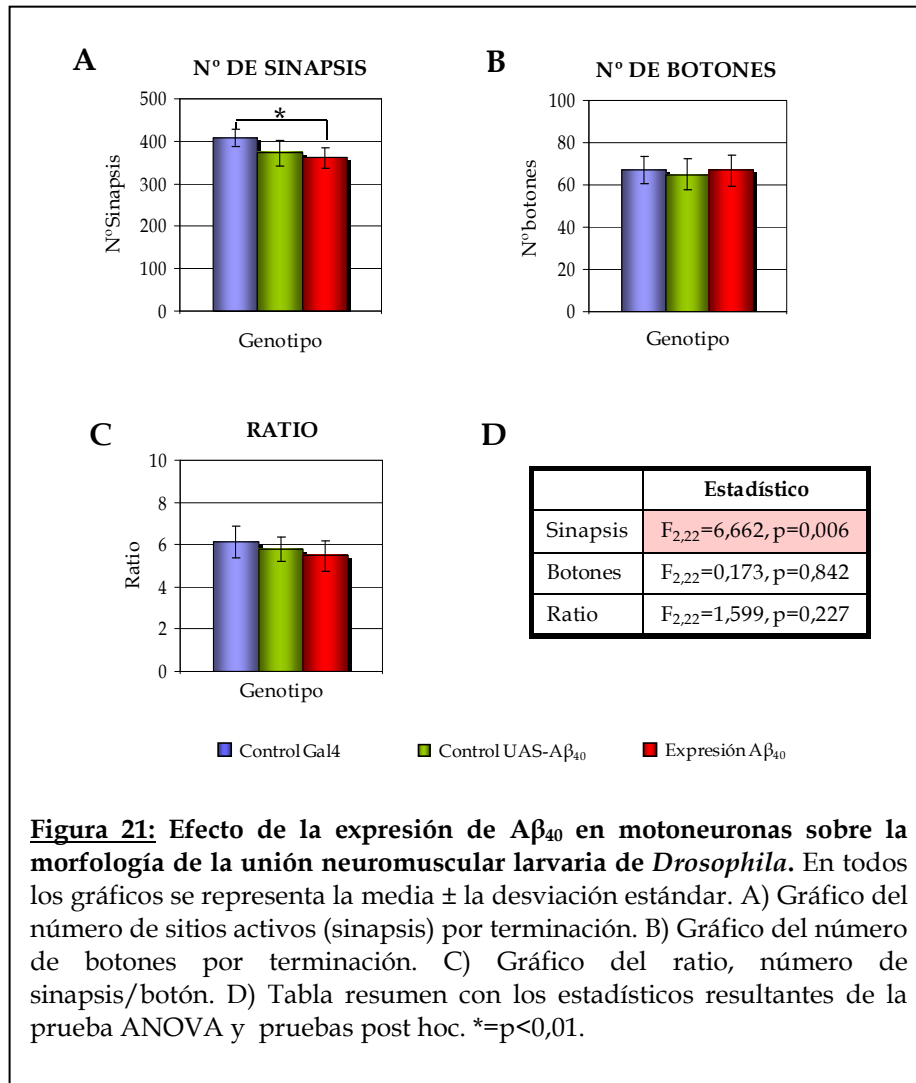
**Figura 20:** La expresión de las distintas formas del péptido amiloide en motoneuronas de larva III de *Drosophila* no produce alteraciones visibles en la morfología de la terminación neuromuscular. Ejemplos representativos de las terminaciones de cada uno de los genotipos experimentales teñidas con los anticuerpos  $\alpha$ -HRP (rojo, marca la membrana de las motoneurnas) y nc82 (verde, marca sitios activos). Las larvas control fueron A) UAS-A $\beta_{40}/+$ , B) UAS-A $\beta_{42}/+$ , C) A $\beta_{42}$ ARC/ $+$ , y D) Gal4-D42/ $+$ . Las larvas con expresión del péptido A $\beta$  (AMILOIDOGÉNICO) fueron E) Gal4-D42/UAS-A $\beta_{40}$ , F) Gal4-D42/UAS-A $\beta_{42}$ , y G) Gal4-D42/UAS-A $\beta_{42}$ ARC.

## 2.1. EFECTO DE LA EXPRESIÓN PRESINÁPTICA DEL PÉPTIDO A $\beta_{40}$

En la Figura 21 A se muestran los datos de la cuantificación de sitios activos en la unión neuromuscular de larvas que expresan A $\beta_{40}$  en motoneuronas.

Sólo se hallaron diferencias significativas entre la expresión del péptido y uno de los dos controles, el control Gal4 ( $p < 0.01$ ). Estos datos sugieren que este efecto podría deberse no a la acción del péptido, sino a disparidades en el fondo genético. En cuanto al recuento de botones y al *ratio* medidos en el terminal, ninguna de las dos variables parece verse afectada por la presencia de A $\beta_{40}$  (ver Figura 21 B,C).

Por tanto, podemos afirmar que la presencia del péptido amiloide en su forma  $A\beta_{40}$ , no presenta un efecto relevante en la unión neuromuscular larvaria de *Drosophila*. Esto se puede asumir teniendo en cuenta que el número de sinapsis activas sólo presentó diferencias significativas en uno de los parámetros medidos, y tan solo con uno de los controles, y que tampoco se encontraron diferencias morfológicas, medidas como número de botones, entre ninguno de los genotipos estudiados.

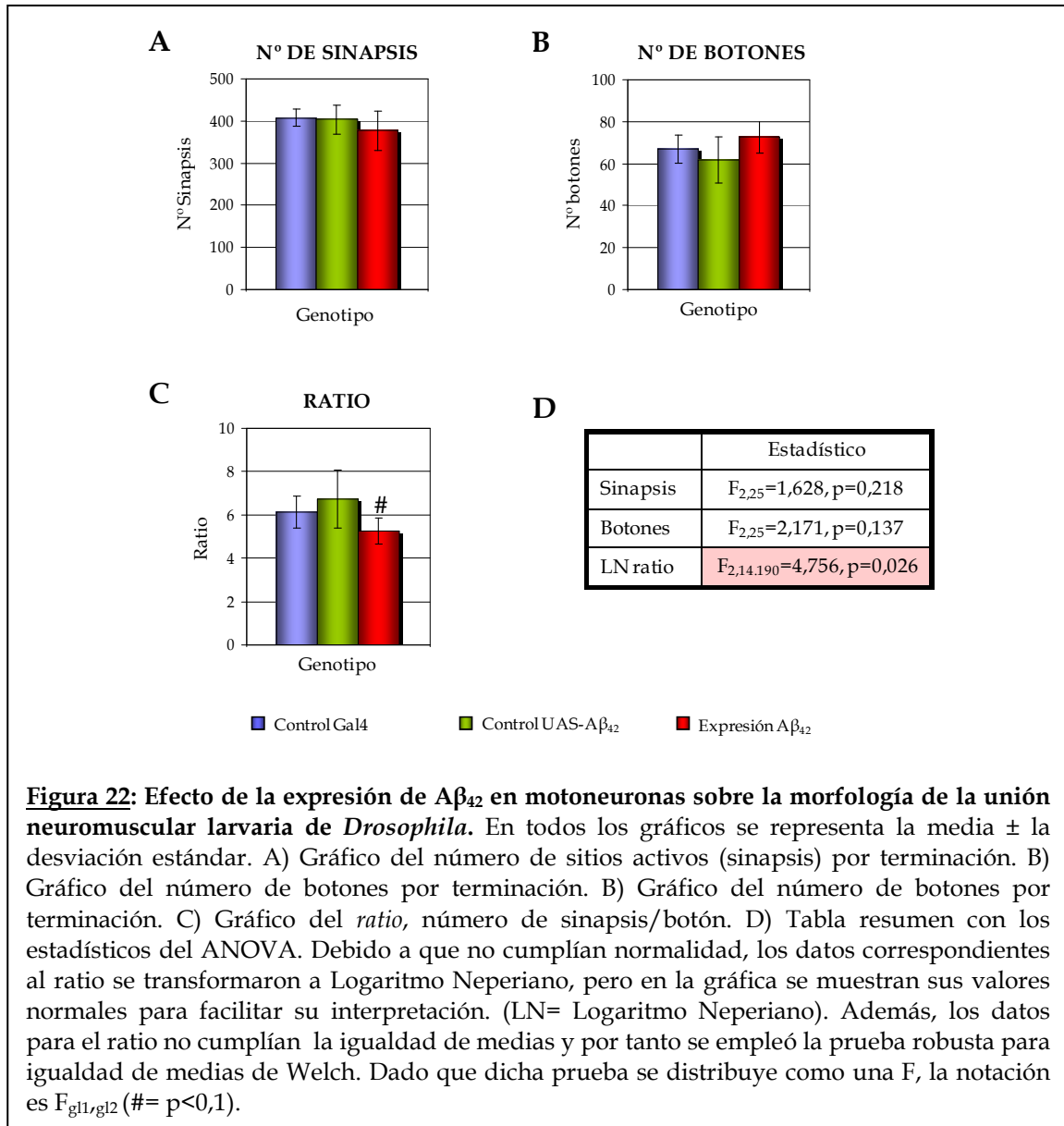


## 2.2. EFECTO DE LA EXPRESIÓN PRESINÁPTICA DEL PÉPTIDO A $\beta$ <sub>42</sub>

La Figura 22 muestra las gráficas correspondientes a los datos obtenidos con la expresión en motoneuronas de A $\beta$ <sub>42</sub>. El análisis estadístico para el número de sinapsis activas por terminación nos indicó que la presencia del péptido amiloide no influía en el componente sináptico de la unión neuromuscular larvaria (Figura 22 A.) En el caso de los datos obtenidos para el análisis del recuento del número de botones, el genotipo tampoco influyó en la variable estudiada (Figura 22 B).

Los datos resultantes para el *ratio* no mostraron una distribución normal ni homocedástica, por tanto se transformaron a Logaritmo Neperiano y se usaron pruebas robustas para igualdad de medias para su análisis. Dichas pruebas nos indicaron que tomando todos los datos estudiados en conjunto, existían diferencias significativas (ver Figura 22 D). Sin embargo en el análisis *post hoc*, donde se estudian los genotipos dos a dos, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales, al menos no al nivel de significación mínimo que propusimos ( $p < 0,05$ ) (Figura 22 C).

De esta manera, a pesar de que en algunos casos los datos muestren diferencias, estas no son concluyentes. Por tanto, nuestros datos indican que la presencia del péptido amiloide en su forma A $\beta$ <sub>42</sub> no afecta a la morfología de la unión neuromuscular larvaria de *Drosophila*, caracterizada por el número de botones, ni a la estructura sináptica, cuantificada como número total de sinapsis.

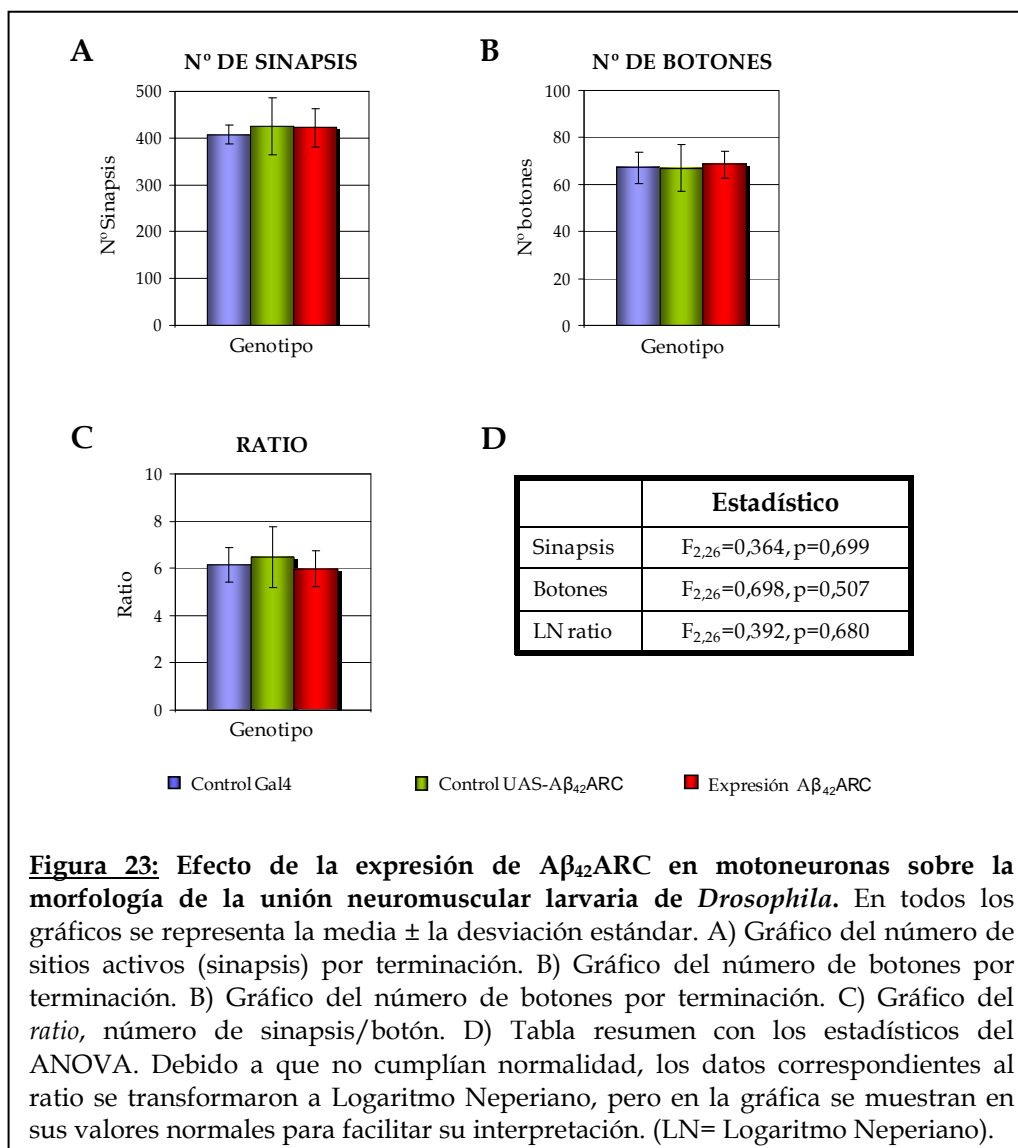


### 2.3. EFECTO DE LA EXPRESIÓN PRESINÁPTICA DEL PÉPTIDO A $\beta_{42}$ ARC

Por último, caracterizamos el efecto en motoneuronas de la expresión del péptido amiloide en su variante más “agresiva” en la progresión de la enfermedad, la denominada mutación Arctic (Figura 23). En el análisis de los datos, se encontró que en ninguno de los parámetros medidos (número de sinapsis activas, número de botones y *ratio*) existieron diferencias significativas entre la expresión del péptido mutado y sus controles (Figura 23). Por tanto, una vez más, y al igual que sucedió con la expresión de las otras dos formas



peptídicas, podemos concluir que la expresión en motoneuronas del péptido amiloide, en su forma  $A\beta_{42}ARC$ , no originó cambios significativos en la unión neuromuscular larvaria.



Con todos los datos descritos anteriormente, podemos afirmar que la expresión de distintas formas del péptido amiloide ( $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}ARC$ ) en la motoneurona no parece generar cambios drásticos en la unión neuromuscular larvaria de *Drosophila melanogaster*. Morfológicamente no se encuentran diferencias ni en la estructura general de la terminación (Figura 20), ni en el número total de botones. Además, el número de sitios activos no se ve alterado de forma sustancial, lo que nos podría indicar que tampoco parecen tener una funcionalidad mermada, aunque esto se debería corroborar con un análisis electrofisiológico y comportamental.

### 3. MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN INDIVIDUOS ADULTOS DE *Drosophila*: efectos sinapto-tóxicos del péptido amiloide en la unión neuromuscular adulta

En vista de los resultados obtenidos en la unión neuromuscular larvaria, en donde no encontramos efectos destacables del péptido amiloide, decidimos examinar que sucedía en el organismo adulto de *Drosophila*. De hecho, un modelo de enfermedad de Alzheimer con mayor similitud a lo que sucede en humanos debería mostrar efectos progresivamente más severos en el individuo. Siguiendo la misma lógica utilizada en larva, mantuvimos como nuestro objeto principal de estudio la unión neuromuscular adulta de *Drosophila*, que permite analizar cuantitativamente el fenotipo en terminaciones individualizadas. Además, puesto que el péptido amiloide puede secretarse, analizamos por separado el efecto de la expresión presináptica en motoneuronas (mediante Gal4-D42) y la expresión postsináptica en músculo (con Gal4-24B). De esta forma pretendíamos diferenciar entre efectos debido al péptido secretado, que deberían ser similares utilizando ambos *drivers*, o efectos autónomos celulares.

Así como el sistema larvario está bien descrito y su empleo en diversos estudios está muy extendido, la unión neuromuscular adulta se ha empleado básicamente en un número reducido de estudios morfológicos y de desarrollo. En la literatura podemos encontrar algunos trabajos que se centran en el desarrollo muscular ([Broadie y Bate 1991](#); [Currie y Bate M. 1991](#)), otros han estudiado la remodelación de las motoneuronas durante la metamorfosis ([Consoulas y col. 2004](#)) y la mayoría se centra en el crecimiento, morfología y organización molecular de dicha unión ([Rivlin y col. 2004](#); [Hebbar y col. 2006](#); [Beramendi y col. 2007](#)). Sin embargo, nuestro estudio pretendía un análisis morfológico de la unión neuromuscular adulta a lo largo de la vida del individuo y, además, ver el posible efecto de la presencia del péptido amiloide en dicha unión, y no partíamos con datos previos en la bibliografía al respecto.

Diversos autores han empleado distintos grupos musculares de *Drosophila*. Algunos se han servido de los músculos torácicos ([Rivlin y col. 2004](#)). Otros se han basado en los músculos abdominales, bien en los de la región dorsal ([Beramendi y col. 2007](#)) bien en los de la zona ventral ([Hebbar y col. 2006](#)). Así, contábamos con distintas zonas de experimentación pero, debíamos escoger una adecuada para el estudio que se iba a realizar. La disección de la unión neuromuscular torácica es compleja debido a la multitud de placas

cuticulares y a que los músculos se agrupan en numerosos paquetes, lo que hace que la obtención de los datos sea más compleja. Sin embargo, la musculatura abdominal está estructurada en zonas con paquetes musculares más grandes y bien definidos, lo que nos hizo decantarnos por ella.

En el abdomen de *Drosophila* podemos diferenciar dos partes bien delimitadas: la dorsal y la ventral. En nuestro caso, descartamos el empleo de la musculatura dorsal debido a la mayor pigmentación de la cutícula, lo que podría interferir en su visualización microscópica, y a que la unión neuromuscular era de un tamaño y área elevados, lo que hacía casi imposible una toma de imagen sin cortes o superposiciones, y por tanto mayor dificultad y fiabilidad a la hora de su caracterización. Así, nos decidimos por el empleo de la musculatura abdominal ventral, de muy fácil disección y clara distinción entre segmentos (ver Figura 13 de Material y Métodos).

### 3.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA UNIÓN NEUROMUSCULAR ADULTA

En la región abdominal ventral, entre los distintos paquetes musculares (descritos por [Broadie y col. 1991](#)) podemos distinguir tres zonas bien definidas: la ventral (en la zona central, donde los paquetes musculares son más pequeños), la lateral pleural (con unos paquetes musculares grandes y muchas y muy complejas terminaciones) y la dorso-longitudinal (en la unión entre la parte dorsal y ventral del individuo) (ver Figura 13 C de Material y Métodos). Los paquetes musculares que analizamos en nuestro estudio fueron los ventrales. Su elección se basó en que su disección era asequible y reproducible. Además, en estos paquetes musculares hay un único punto de entrada del nervio a partir del cual los axones se ramifican en fibras individuales, lo que lo hace de una morfología más sencilla para su análisis morfológico.

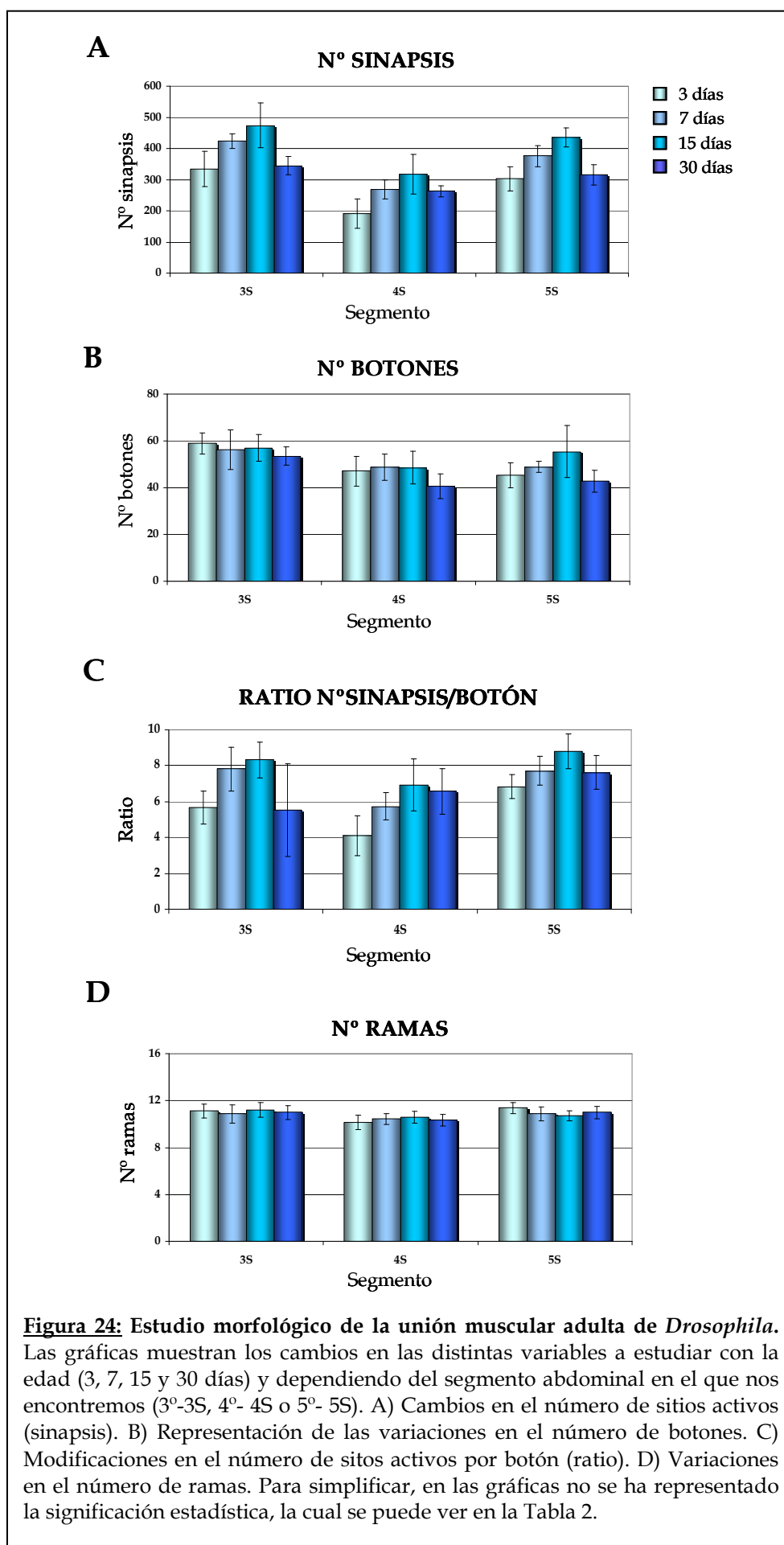
Por otro lado, nuestra idea era estudiar las modificaciones en la unión neuromuscular causadas por el péptido amiloide y su posible deterioro con la edad. Sin embargo, en la bibliografía no se encontró ningún estudio detallado de los posibles cambios en las sinapsis activas de la unión neuromuscular adulta ventral a lo largo de la vida de *Drosophila*. Además, la musculatura ventral se divide en distintos paquetes musculares según el segmento en el que nos encontremos (ver Figura 13 de Material y Métodos), y por tanto la morfología neuronal también parecía variar entre segmentos.

Por tanto, debido a la escasez de información sobre las diferencias segmentales y edad-dependientes en la morfología de la terminación neuromuscular abdominal ventral, decidimos hacer un estudio detallado de estos aspectos en la mosca adulta normal. Las variables morfológicas escogidas para el estudio fueron: número de sinapsis activas, número de botones, *ratio* sitios activos/botón y número de ramas. De este modo, evaluamos los eventuales cambios en un adulto control cualquiera. En nuestro caso empleamos la línea Gal4-D42. Elegimos los tres segmentos más centrales (tercero, cuarto y quinto) porque eran los que más fácilmente se reconocían y que no se veían afectados por el método de disección, además de que lo poco encontrado en la bibliografía, se basaba en dichos segmentos (Hebbar y col. 2006). Los distintos parámetros morfológicos se analizaron en cada uno de estos segmentos en moscas de 3, 7, 15, y 30 días de edad.

Como se muestra en la Figura 24, a simple vista se puede observar que cada segmento presenta algunas diferencias con el resto, pero la tendencia es similar en todos. Analizando cada variable por separado, el ANOVA de dos factores (edad y segmento) nos indicó que ambos factores influían en la variable “número de sinapsis” (Tabla 2). De este modo, se encontró que los segmentos estudiados fueron distintos entre sí, y por tanto el número de sinapsis variaba según el segmento que observáramos (Figura 24 A).

	Estadísticos		
	Segmento	Edad	Interacción
Sinapsis	$F_{2,88}=68,106, p<0,001$	$F_{3,88}=33,548, p<0,001$	$F_{6,88}=1,178, p<0,327$
Botones	$F_{2,88}=20,726, p<0,001$	$F_{3,88}=5,904, p=0,001$	$F_{6,88}=1,329, p=0,255$
Ratio	$F_{2,88}=18,146, p<0,001$	$F_{3,88}=13,220, p<0,001$	$F_{6,88}=1,735, p=0,124$
Ramas	$H_2=15,526, p<0,001$	$H_3=10,572, p=0,903$	—————

**Tabla 2:** Estadísticos del análisis de la influencia de los factores segmento, edad y su interacción para las variables estudiadas. Número de sinapsis, botones y el ratio se analizaron con pruebas paramétricas, mientras que el número de ramas requirió un análisis no paramétrico.



Respecto a la edad, también se observó un efecto diferencial. Así, los sitios activos empiezan a incrementar en número desde los 3 días, hasta llegar a un máximo a los 15 días, para después volver a disminuir (Figura 24 A). De hecho, el incremento que se dio en 7 y 15 días era significativamente distinto entre dichas edades y el resto. Por otro lado, a los 30 días de edad se mantiene un número de sinapsis similar a las de un individuo de 3 días. Este efecto a diferentes edades se produjo de igual forma en los tres segmentos estudiados (Figura 24 A).

En cuanto al número de botones, hallamos que la tendencia es similar: tanto el factor edad como el segmento en el que nos encontramos, influyen para determinar el número de botones. Aquí, nos encontramos en que la distribución del número de botones en los segmentos tercero y quinto era la misma (no existiendo diferencias estadísticas,  $p < 0,866$ ) mientras que el cuarto segmento se diferenciaba de los otros dos ( $p < 0,01$ ). Respecto a la edad, parece que el número de botones se mantiene desde los 3 días hasta los 15, para luego descender ligeramente a los 30 días (sólo la edad de 30 días mostró diferencias significativas con el resto,  $p < 0,01$ ) (Figura 24 B).

El *ratio* mostró que, de nuevo, tanto el factor edad como el factor segmento eran importantes para explicar esta variable. La tendencia del *ratio* resultó ser similar a la del número de sinapsis, siendo igual para los segmentos tercero y quinto ( $p = 0,431$ ) y diferente para el cuarto ( $p < 0,01$ ), donde se ve reducido (Figura 24 C). En cuanto a la edad, la única que se distinguió del resto fue la de 3 días ( $p < 0,01$ ), ya que la edades posteriores mantuvieron el *ratio* de forma no significativamente distinta.

Para el estudio de las ramas, puesto que estas no presentaban una distribución normal, se procedió a un análisis no paramétrico. Dicho análisis identificó que no había diferencias teniendo en cuenta el factor edad, mientras que sí era distinto en función del segmento en el que nos encontremos (Figura 24 D). Así, el cuarto segmento era de nuevo distinto a los otros dos ( $p < 0,01$ ).

Estos resultados demuestran que existen diferencias segmentales en la unión neuromuscular ventro-abdominal del adulto de *Drosophila*, puesto que los segmentos tercero y quinto comparten valores de sitios activos, botones, *ratio* y ramas similares, mientras que el cuarto segmento es estructuralmente distinto a los otros dos en todas estas variables. Además, al menos entre los días 3 y 30 de vida de *Drosophila*, su unión neuromuscular sufre

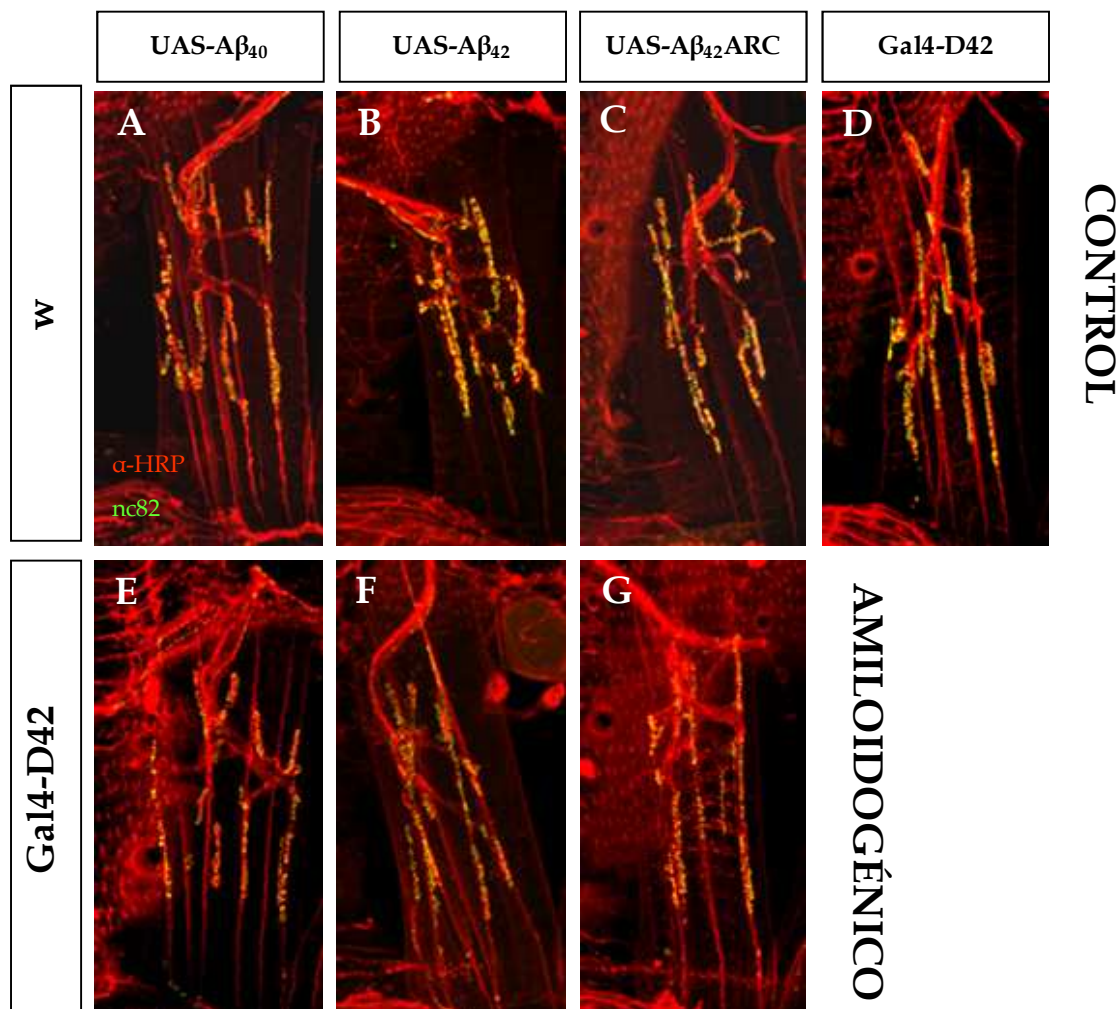
cambios estructurales dependientes de la edad. El número de sinapsis se va incrementando durante el periodo que podríamos denominar juvenil (3 y 7 días), para alcanzar valores máximos en torno a los 15 días, edad a partir de la cual se observa una disminución progresiva. Algo similar parece ocurrir con el *ratio*, lo cual no es de extrañar, puesto que éste depende directamente del número de sinapsis. Sin embargo los botones no parecieron verse muy afectados por la edad, y son más o menos constantes, presentando sólo una variación en su número a los 30 días. Del mismo modo, el número de ramas se mantuvo constante a lo largo de la vida de los individuos.

En base a la tendencia observada en la unión neuromuscular adulta, y junto con los resultados obtenidos en el estudio de longevidad, nos planteamos el modelo experimental a seguir. Puesto que el número de sinapsis aumentaba desde los 3 días hasta un máximo de 15 para luego descender progresivamente, y conociendo la vida media y máxima de los individuos, elegimos 4 edades para realizar los experimentos de expresión del péptido amiloide. Así, seleccionamos individuos de 3 y 7 días como jóvenes, de 15 días como adultos, e introducimos además, una edad entre 15 y 30 días para ver mejor la progresión del efecto amiloidogénico. Así, tomamos 20 y 30 días como edades avanzadas. Los experimentos se realizaron expresando las tres formas del péptido amiloide,  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}ARC$ , y los *drivers* Gal4-D42 (motoneurona) y Gal-24B (músculo).

### 3.2. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO AMILOIDE EN LA MOTONEURONA

La expresión presináptica del péptido amiloide se consiguió utilizando el *driver* de motoneuronas Gal4-D42. En la Figura 25 se muestran imágenes representativas de la unión neuromuscular adulta de *Drosophila*, con la expresión en motoneuronas de las distintas variantes del péptido amiloide. Como se puede observar a simple vista, no parece haber grandes diferencias morfológicas entre las condiciones experimentales y sus controles. Por tanto se procedió a un análisis de las imágenes de forma estandarizada, homogeneizada y objetiva (ver sección Material y Métodos), para intentar dilucidar y evidenciar de forma numérica y estadística, las posibles diferencias entre grupos.





**Figura 25:** Efecto de la expresión de las distintas formas del péptido amiloide en motoneuronas sobre la morfología de la terminación neuromuscular adulta de *Drosophila*. Ejemplos representativos de las terminaciones del segmento 3S de adultos de 15 días para cada uno de los genotipos experimentales, teñidas con los anticuerpos  $\alpha$ -HRP (rojo, marca la membrana de las motoneuronas) y nc82 (verde, marca sitios activos). Para poder visualizar toda la terminación, cada imagen se obtuvo por la proyección en un único plano de la serie de imágenes tomadas de la terminación al completo. Las moscas control fueron A) UAS-A $\beta_{40}/+$ , B) UAS-A $\beta_{42}/+$ , C) UAS-A $\beta_{42}$ ARC/+, y D) Gal4-D42/+. Las moscas con expresión del péptido A $\beta$  (AMILOIDOGÉNICO) fueron E) Gal4-D42/UAS-A $\beta_{40}$ , F) Gal4-D42/UAS-A $\beta_{42}$ , y G) Gal4-D42/UAS-A $\beta_{42}$ ARC.

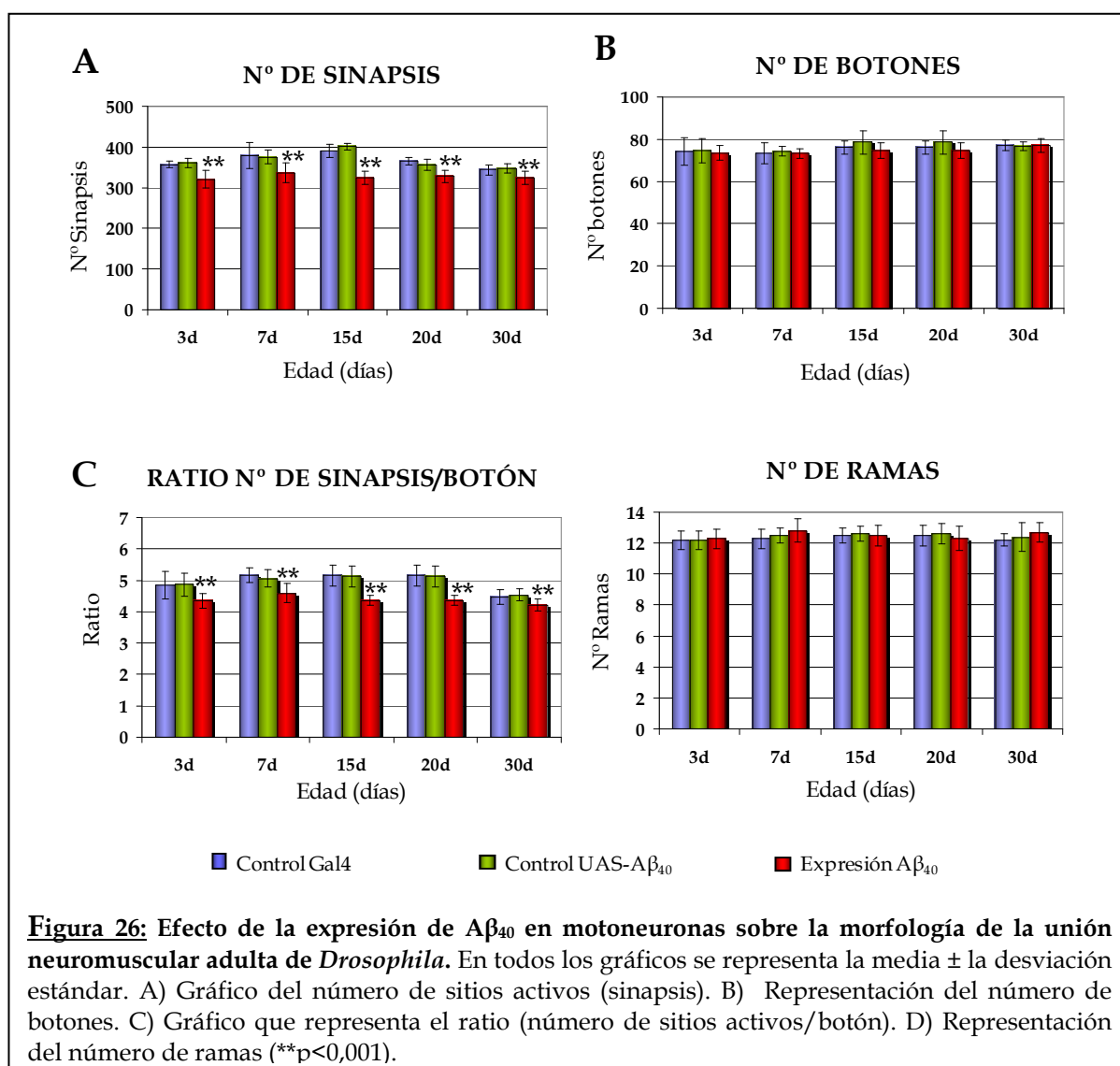
### 3.2.1. Efecto de la expresión de A $\beta_{40}$

En la Figura 26 se puede observar como la expresión del péptido A $\beta_{40}$  en motoneuronas afecta a los distintos parámetros medidos en la unión neuromuscular adulta. El análisis estadístico detallado de como influye cada factor (genotipo y edad) se muestra en la Tabla 3.

La presencia del péptido en motoneuronas produjo una reducción significativa en el número de sinapsis con respecto a sus controles ( $p < 0,001$ ), los cuales mostraron valores



iguales entre si (Figura 26 A). El análisis estadístico mostró que la interacción entre genotipo y edad tiene un efecto significativo sobre el número de sinapsis (Tabla 3), lo que indica que las oscilaciones dependientes de edad en este parámetro son distintas cuando se expresa presinápticamente  $A\beta_{40}$  que en condiciones control. De hecho, nuestros datos muestran que las terminaciones en las que se expresa el péptido mantienen en número de sinapsis constante al menos durante los 30 primeros días de edad, mientras que en los controles se observa el patrón descrito anteriormente, esto es, un aumento hasta día 15, y disminución progresiva a partir de esta edad (ver más adelante).



En cuanto al número de botones y de ramas (Figura 26 B, D), se puede observar que la expresión del péptido no provoca ninguna alteración significativa en ninguna de las edades estudiadas (Tabla 3). Sin embargo, el *ratio* (Figura 26 C) sí mostró diferencias significativas atribuibles a la presencia de  $A\beta_{40}$ . Puesto que el *ratio* es una variable totalmente dependiente

del número de sinapsis y de botones, y teniendo en cuenta que el número de botones es igual para los tres genotipos estudiados, no es de extrañar que presentara una distribución similar a lo observado en las sinapsis. De esta manera, mientras que los controles eran iguales entre sí ( $p=1$ ), la expresión de  $A\beta_{40}$  producía una disminución significativa en el *ratio* con respecto a ambos controles ( $p<0,001$ ) en todas las edades analizadas.

	Estadísticos		
	Genotipo	Edad	Interacción
Sinapsis	$F_{2,149}=91,682, p<0,001$	$F_{4,149}=18,492, p<0,001$	$F_{8,149}=4,064, p<0,001$
Botones	$F_{2,149}=1,0803, p<0,169$	$F_{4,149}=4,548, p=0,002$	$F_{8,149}=0,623, p=0,757$
Ratio	$F_{2,149}=45,333, p<0,001$	$F_{4,149}=18,149, p<0,001$	$F_{8,149}=1,814, p=0,080$
Ramas	$H_2=1,996, p=0,369$	$H_4=4,028, p=0,402$	—————

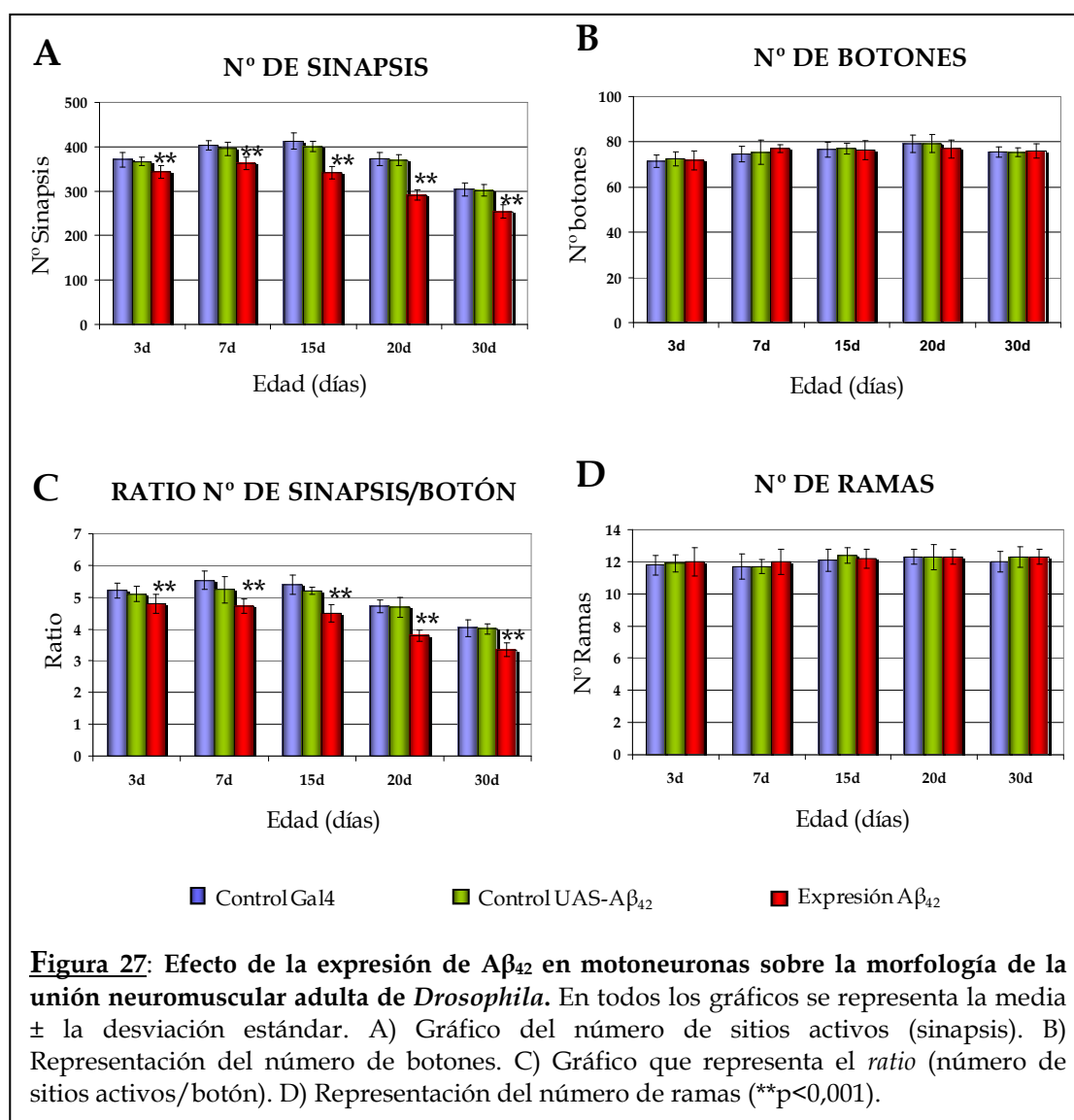
**Tabla 3: Resumen de los análisis estadísticos sobre el efecto de la expresión presináptica de  $A\beta_{40}$  sobre la morfología de la terminación neuromuscular adulta.** La tabla muestra los estadísticos del análisis de la influencia de los factores genotipo (dos controles y expresión del péptido), edad, y su interacción sobre las variables estudiadas. El número de sinapsis, botones y el ratio se analizaron con pruebas paramétricas, mientras que el número de ramas requirió un análisis no paramétrico, ya que los datos no presentaban una distribución normal.

Si analizamos todos los datos en conjunto, podemos afirmar que la expresión en motoneuronas del péptido amiloide en su variante  $A\beta_{40}$ , no afecta a la estructura morfológica general de la motoneurona, medida como número de botones y ramas, pero si presenta un descenso significativo en el componente sináptico, pudiendo así alterar la funcionalidad de la motoneurona. Es de resaltar que, además, la expresión presináptica del péptido  $A\beta_{40}$  impide, directa o indirectamente, los cambios edad-dependientes en el número de sitios activos que se observan en terminaciones control.

### **3.2.2. Efecto de la expresión de $A\beta_{42}$**

En la Figura 27A se representan los datos correspondientes a los cambios en las distintas variables de la terminación neuromuscular adulta debidas a la expresión en motoneuronas de  $A\beta_{42}$ . El detalle del análisis estadístico se muestra en la Tabla 4.

El análisis en profundidad nos confirmó lo que, *de visu*, ya se observaba en las gráficas (Figura 27): la existencia de diferencias significativas sólo en las variables que dependen del número de sinapsis (Figura 27 A, C). Concretamente, advertimos que mientras que el número de sinapsis era igual entre ambos controles ( $p>0,05$ ), la presencia del péptido amiloide  $A\beta_{42}$  producía una merma significativa en el número de sinapsis activas ( $p<0,001$ ). Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre con  $A\beta_{40}$ , el patrón de oscilación en el número de sitios activos con la edad no fue diferente en ninguno de los tres genotipos, ya que la interacción genotipo-edad no tuvo un efecto significativo (Tabla 4).



Respecto a la influencia del péptido en el número de botones y ramas, la presencia de  $A\beta_{42}$  no pareció tener una actuación significativa, puesto que los valores obtenidos fueron iguales a los de sus controles (Figura 27 B, D y Tabla 4).

Debido a que la expresión de  $A\beta_{42}$  produce un descenso en el número de sinapsis activas pero parece no influir en el de botones, la variable *ratio*, reveló un descenso equiparable al observado en el número de sinapsis en los individuos que expresaban el péptido (ver Figura 27 C).

	Estadísticos		
	Genotipo	Edad	Interacción
Sinapsis	$F_{2,149}=204,390, p<0,001$	$F_{4,149}=229,312, p<0,001$	$F_{8,149}=7,539, p<0,001$
Botones	$F_{2,149}=0,189, p=0,828$	$F_{4,149}=13,006, p<0,001$	$F_{8,149}=0,622, p=0,758$
Ratio	$F_{2,149}=102,813, p<0,001$	$F_{4,149}=130,240, p<0,001$	$F_{8,149}=2,153, p=0,035$
Ramas	$H_2=2,229, p=0,3628$	$H_4=12,520, p=0,014$	—————

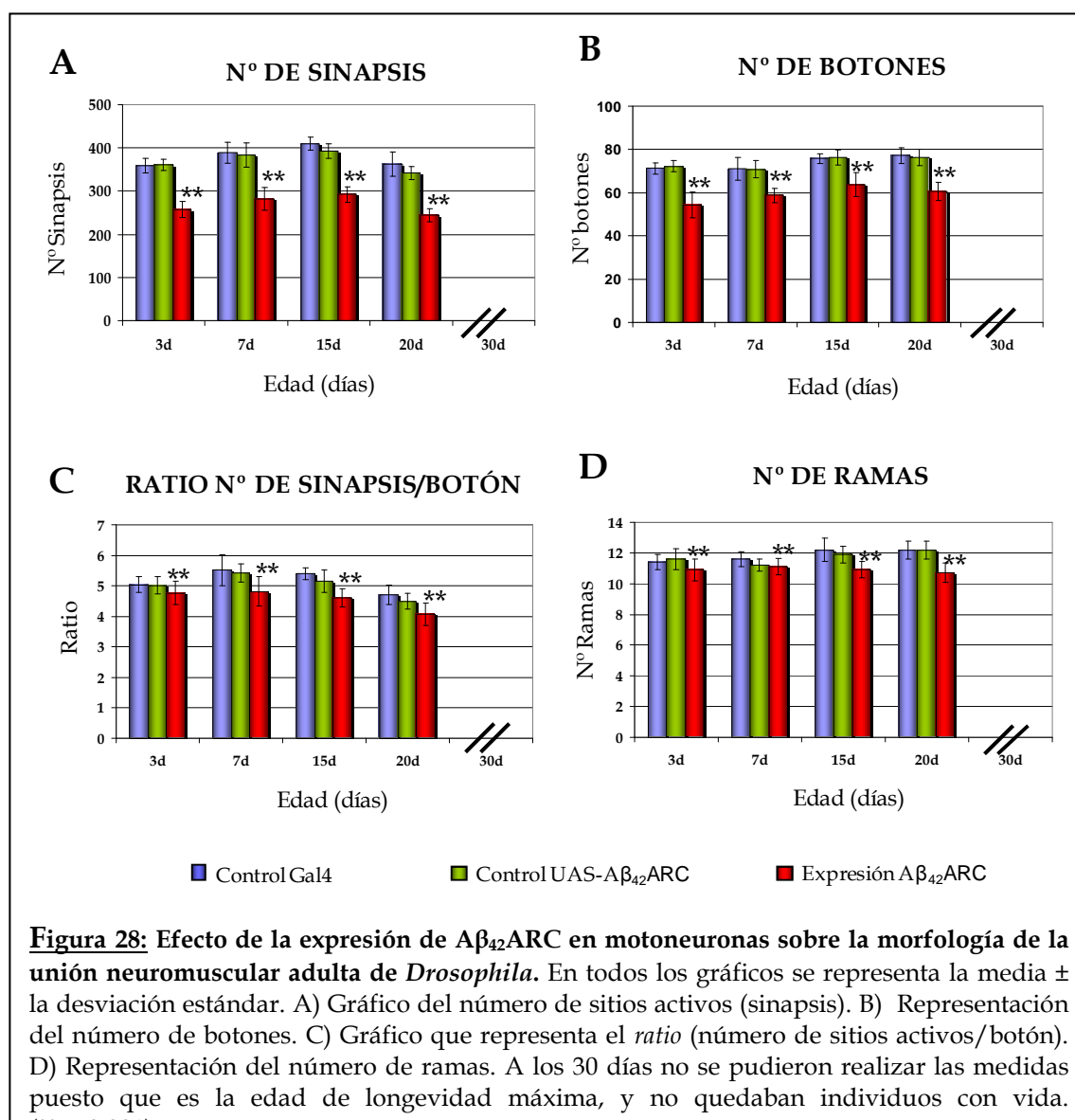
**Tabla 4:** Resumen de los análisis estadísticos sobre el efecto de la expresión presináptica de  $A\beta_{42}$  sobre la morfología de la terminación neuromuscular adulta. La tabla muestra los estadísticos del análisis de la influencia de los factores genotipo (dos controles y expresión del péptido), edad, y su interacción sobre las variables estudiadas. El número de sinapsis, botones y el ratio se analizaron con pruebas paramétricas, mientras que el número de ramas requirió un análisis no paramétrico, ya que los datos no presentaban una distribución normal.

Así, en una visión global de los datos, podemos sostener que la expresión en motoneuronas del péptido amiloide en su variante  $A\beta_{42}$ , afecta de forma negativa al número de sitios activos, puesto que reduce su número, pero que no interfiere en la estructura grosera de la terminación, puesto que no ocasiona modificaciones ni en el número de ramas ni de botones. A diferencia de  $A\beta_{40}$ , la presencia del péptido  $A\beta_{42}$  no altera el patrón de modificación del número de sinapsis dependiente de la edad.

### **3.2.3. Efecto de la expresión del péptido $A\beta_{42}$ ARC**

La presencia del péptido amiloide con la mutación Arctic en motoneuronas tiene unos efectos drásticos en la estructura de la unión neuromuscular (ver Figura 28 y Tabla 5). Cabe destacar que no se muestran datos a 30 días de ninguna de las variables, porque dicha edad es la longevidad máxima de los individuos con la expresión en motoneuronas del péptido mutado. Después de los efectos observados en la longevidad (donde reduce la supervivencia radicalmente) y en la neurodegeneración (haciendo que la pérdida neuronal se vea

incrementada), lo observado en la unión neuromuscular están en consonancia con lo obtenido anteriormente.



De hecho, en la Figura 28 A se puede observar como la expresión en motoneuronas del péptido provoca una disminución severa en el número de sitios activos. El análisis estadístico nos mostró que el genotipo afectaba de forma activa a la variable (Tabla 5), y, de forma más concreta, que la expresión de A $\beta_{42}$ ARC disminuía significativamente las sinapsis con respecto a ambos controles ( $p < 0,001$ ). Pero en este caso también se mantuvo inalterado la oscilación sináptica dependiente de la edad.

Al contrario que en los casos anteriores, en donde la presencia del péptido no alteraba la morfología grosera, el péptido mutado mostró efectos significativos también sobre el número

de botones y ramas. El análisis de los datos referente a los botones (Figura 28 B) evidenció que el factor genético afectaba a dicha variable. Más específicamente, que la presencia del péptido redujo el número de botones con respecto a los controles ( $p < 0,001$ ). Si nos fijamos en la otra variable morfológica, el número de ramas, podemos percibir el mismo efecto. El análisis exhaustivo evidenció que el péptido con la mutación arctic, expresado en motoneuronas, influye negativamente sobre el número de ramas, disminuyéndolo (ver Figura 28 D).

Finalmente, como se observa en la Figura 28 C, la variable *ratio* también se vio afectada por la presencia del péptido ( $p < 0,001$ ). Esto es consistente con la mayor reducción relativa en el número de sinapsis que en el número de botones.

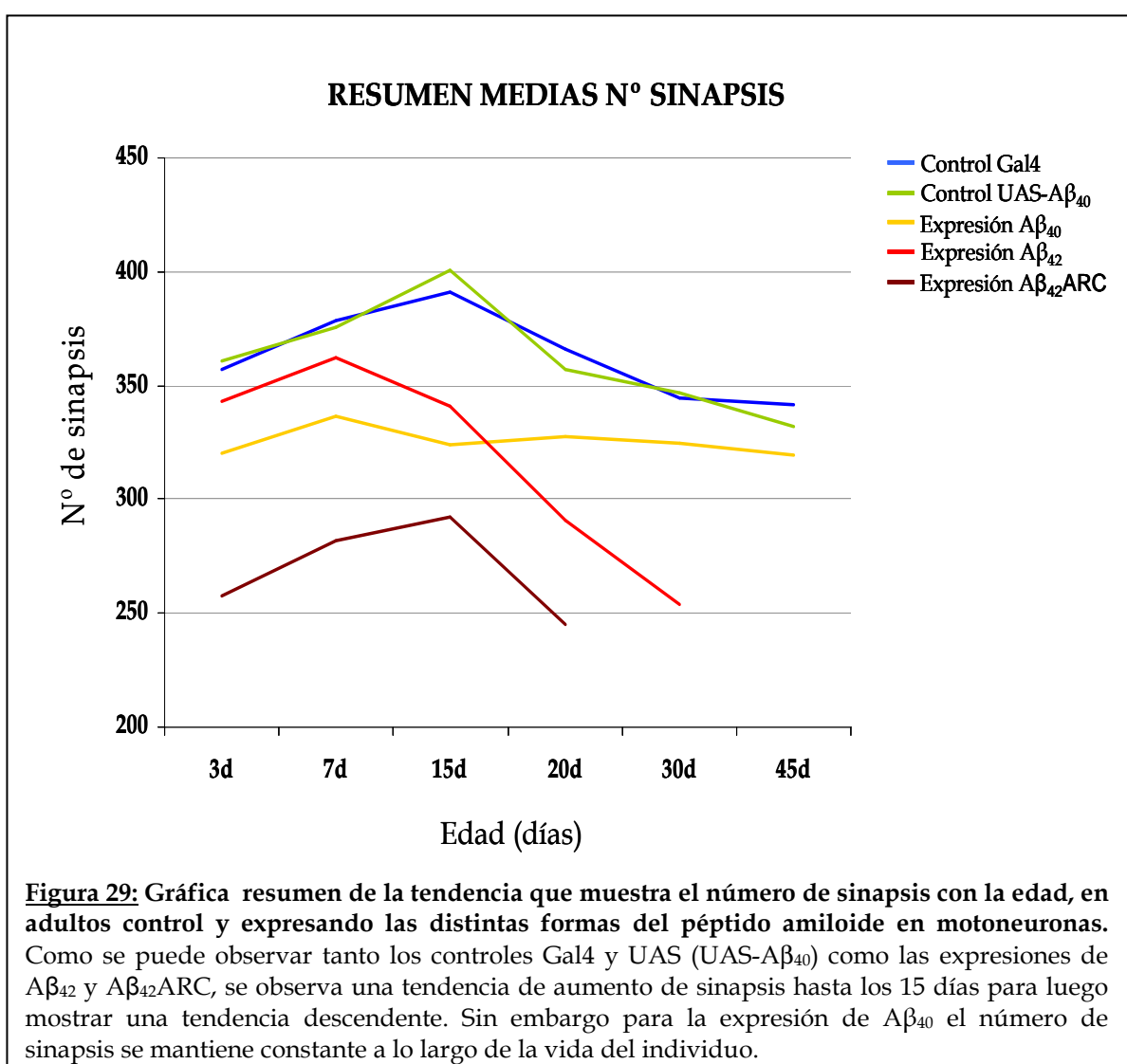
	Estadísticos		
	Genotipo	Edad	Interacción
Sinapsis	$F_{2,119}=307,091, p < 0,001$	$F_{3,119}=38,284, p < 0,001$	$F_{6,119}=0,748, p = 0,612$
Botones	$F_{2,119}=154,941, p < 0,001$	$F_{3,119}=15,211, p < 0,001$	$F_{6,119}=1,382, p = 0,228$
Ratio	$F_{2,119}=29,727, p < 0,001$	$F_{3,119}=28,456, p < 0,001$	$F_{6,119}=1,138, p = 0,345$
Ramas	$H_2=36,066, p < 0,001$	$H_3=5,357, p = 0,147$	—————

**Tabla 5: Resumen de los análisis estadísticos sobre el efecto de la expresión presináptica de  $A\beta_{42}ARC$  sobre la morfología de la terminación neuromuscular adulta.** La tabla muestra los estadísticos del análisis de la influencia de los factores genotipo (dos controles y expresión del péptido), edad, y su interacción sobre las variables estudiadas. El número de sinapsis, botones y el *ratio* se analizaron con pruebas paramétricas, mientras que el número de ramas requirió un análisis no paramétrico, ya que los datos no presentaban una distribución normal.

Evaluando el conjunto de los resultados anteriores podemos afirmar que la expresión en motoneuronas del péptido  $A\beta_{42}ARC$  resulta perjudicial para la estructura, y probablemente la función, de la unión neuromuscular adulta de *Drosophila*. Este efecto pernicioso se puede observar tanto en la morfología del terminal, cuantificada por el número de botones y ramas que presenta, como por el descenso acusado de sitios activos.

### 3.2.4. Comparación del efecto de la expresión en motoneuronas de las tres formas del péptido amiloide

De forma más general, parece que la expresión en motoneuronas del péptido amiloide (en cualquiera de las tres variantes aquí estudiadas) afecta negativamente al número de sinapsis. Sin embargo, se observan tanto diferencias cuantitativas como cualitativas respecto al efecto de cada una de las formas amiloides. En la Figura 29, se muestra una gráfica resumen en donde se comparan las medias del número de sinapsis en función de la edad. Puesto que los análisis estadísticos mostraron que todos los controles UAS eran iguales al control Gal4, común para todos los experimentos, en la gráfica y posterior análisis estadístico sólo se incluyeron el control Gal4 y uno de los controles UAS. Además, se incluyeron datos de 45 días de edad para los controles y la expresión de  $A\beta_{40}$  (que no fueron utilizados en los análisis anteriores por tener un  $n$  significativamente menor que para las demás edades).



En la gráfica se puede observar claramente el patrón temporal de oscilación normal en el número de sitios activos (ver líneas azul y verde, correspondientes al control Gal4 y a un control UAS, de la Figura 28): incremento de número de sinapsis entre los 3 y 15 días, y posterior descenso entre los 15 y 20-30 días, manteniéndose más o menos constante hasta los 45 días de edad. Curiosamente, la comparación pone de manifiesto que el patrón temporal global y la magnitud en el descenso de sinapsis en cada edad varía en función del péptido expresado.

El efecto cuantitativamente más severo sobre el número de sitios activos lo muestra el péptido A $\beta_{42}$ ARC, lo cual es consistente con su mayor toxicidad observada en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Dahlgren y col. 2002; Crowther y col. 2005; Whalen y col. 2005). Sin embargo, la oscilación dependiente de edad en esta condición es similar a la mostrada por el control. Así, la comparación de rectas de regresión mostró que en el tramo de 3 a 15 días de ambas rectas poseía la misma pendiente ( $\beta_1=2,82$ ,  $\beta_2= 2,692$ ,  $t=0,151$ ,  $p=0,879$ ). Sin embargo, en el tramo siguiente, entre 15 y 20-30 días, las pendientes fueron ambas negativas, pero distintas ( $\beta_1=-5,135$ ,  $\beta_2= -9,5$ ,  $t=2,391$ ,  $p=0,018$ ), siendo mayor para A $\beta_{42}$ ARC. Estos datos sugieren que el efecto negativo de A $\beta_{42}$ ARC sobre el número de sinapsis es mayor a edades más avanzadas.

En cuanto a la expresión presináptica de A $\beta_{42}$ , hay varias observaciones sorprendentes. A edades tempranas, entre 3 y 15 días, el efecto negativo del péptido sobre el número de sinapsis es menos potente que el de A $\beta_{40}$ . Sin embargo, a edades más avanzadas (20 y 30 días) su efecto es mucho más acusado que el de A $\beta_{40}$ , se acerca al de A $\beta_{42}$ ARC, y presenta una pendiente muy similar en este tramo, lo que sugiere un aumento progresivo con la edad del efecto sinaptotóxico de A $\beta_{42}$ . Además, el análisis del patrón de oscilación temporal mostró diferencias con el control en el tramo de 3 a 15 días, en tanto que de 15 a 30 las rectas mostraban la misma pendiente ( $\beta_1=2,82$ ,  $\beta_2= -0,521$ ,  $t=3,925$ ,  $p<0,001$ ). En este caso, estas diferencias parecen explicarse por un adelanto del pico máximo de sitios activos de los 15 a los 7 días.

A pesar de las diferencias observadas, los dos genotipos con expresión de formas derivadas de A $\beta_{42}$  siguen mostrando un periodo de subida y posterior descenso de sitios activos. Por el contrario, la expresión de A $\beta_{40}$  produjo un curioso efecto, consistente en que se mantuvo el número de sinapsis constante a lo largo de las edades estudiadas. De hecho, esta tendencia se observó hasta los 45 días (ver Figura 29). Así, al comparar la pendiente de la



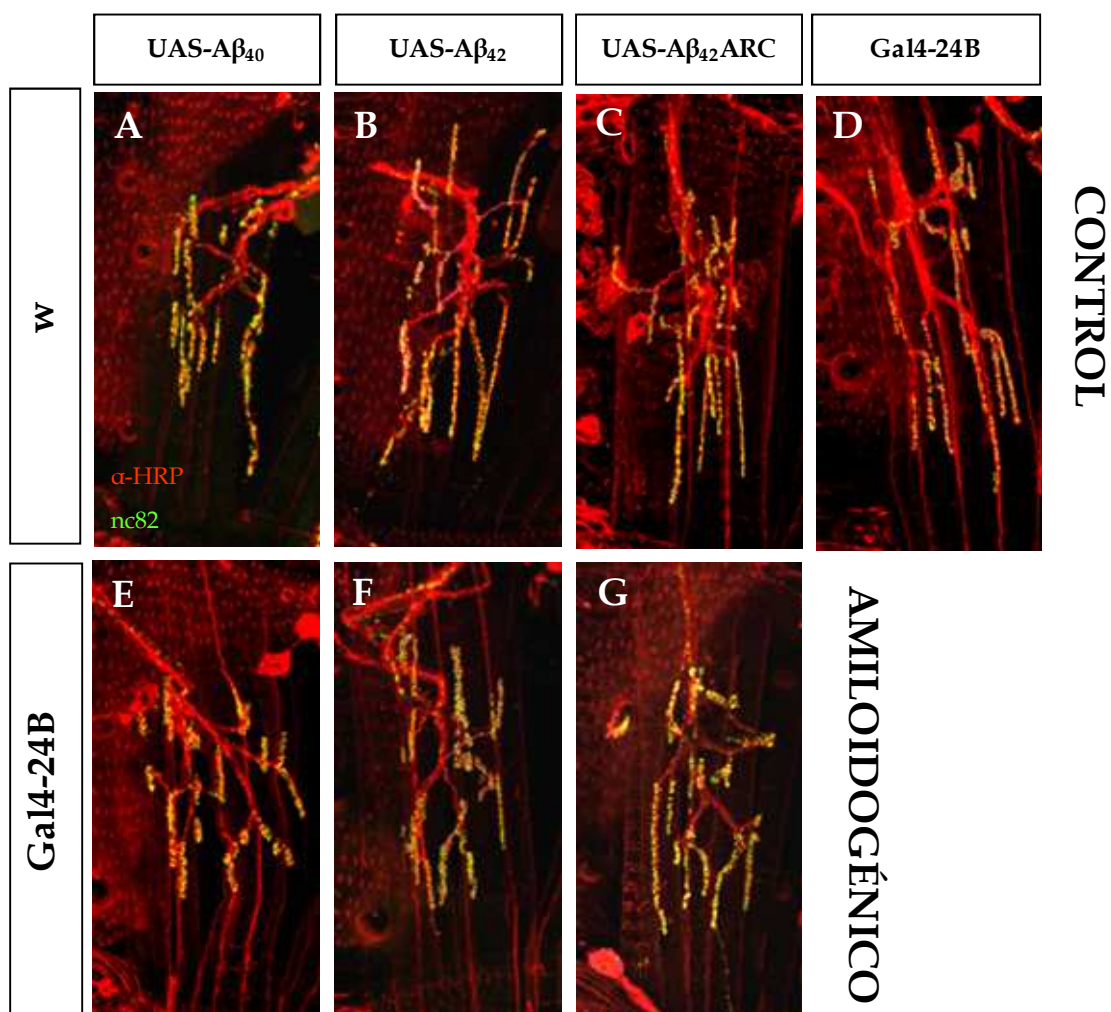
expresión de  $A\beta_{40}$  con el control, se vio que las rectas de regresión eran significativamente distintas ( $\beta_1=-5,135$ ,  $\beta_2= -0,111$ ,  $t=-7,450$ ,  $p<0,001$ ), y que, de hecho, la expresión del péptido  $A\beta_{40}$  mostraba una pendiente no significativamente distinta de 0 ( $\beta=0,477$ ,  $t=-0,233$ ,  $p=0,817$ ). Estos datos sugieren un efecto diferente, y específico, de  $A\beta_{40}$  sobre las sinapsis adultas.

Por último, cabe resaltar que sólo el péptido con la mutación Arctic muestra un efecto significativo sobre la morfología grosera de la unión neuromuscular, provocando cambios estructurales importantes, tanto en el número de botones como en el de ramas.

### 3.3. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO AMILOIDE EN EL MÚSCULO

Nuestros datos han mostrado efectos sinaptotóxicos claros, pero cualitativa y cuantitativamente diferentes, debidos a la expresión presináptica de las tres variantes del péptido amiloide. Puesto que las tres formas peptídicas llevan un péptido señal que permite que sean secretadas a la hendidura sináptica, nos planteamos intentar determinar si los efectos observados eran atribuibles a la presencia del péptido en la motoneurona, o podían explicarse por efectos directos del péptido secretado sobre la célula postsináptica, en este caso, el músculo. Para ello, analizamos los distintos parámetros en terminaciones neuromusculares adultas que expresaban cada una de las formas amiloides en los músculos de la mosca.

En la Figura 30 se presentan imágenes características de la unión neuromuscular adulta de *Drosophila*, con la expresión en músculo (mediante el Gal4-24B) del péptido amiloide. A simple vista, no se observaron grandes diferencias morfológicas entre las condiciones experimentales y sus controles. Por tanto se procedió a un análisis detallado de las imágenes (ver sección Material y Métodos), para poner de manifiesto si existían diferencias entre grupos.



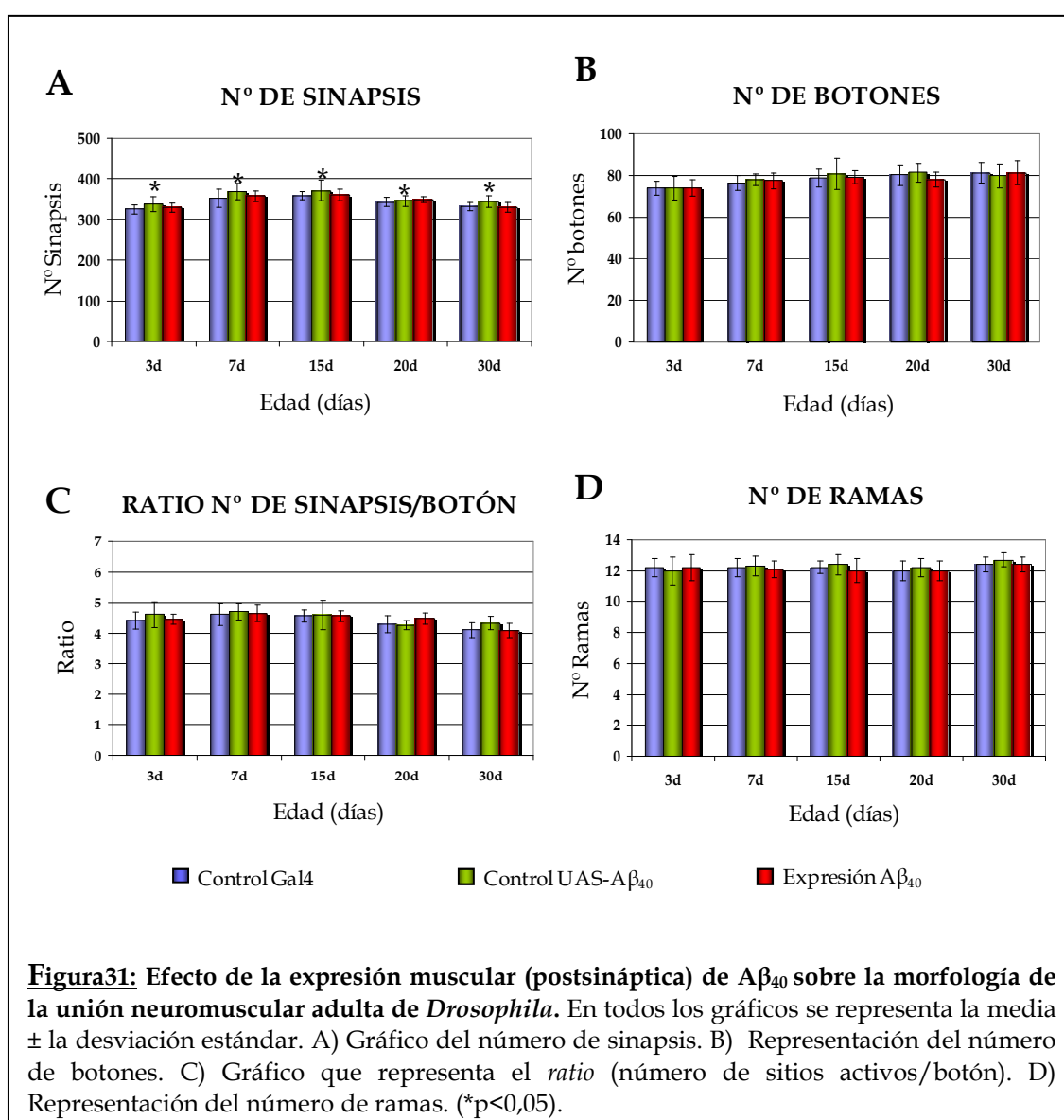
**Figura 30:** Efecto de la expresión en músculo de las distintas formas del péptido amiloide, sobre la morfología de la terminación neuromuscular adulta de *Drosophila*. Ejemplos representativos de las terminaciones del segmento 3S de adultos de 15 días para cada uno de los genotipos experimentales, teñidas con los anticuerpos  $\alpha$ -HRP (rojo, marca la membrana de las motoneurnas) y nc82 (verde, marca sitios activos). Para poder visualizar toda la terminación, cada imagen se obtuvo por la proyección en un único plano de la serie de imágenes tomadas de la terminación al completo. Las moscas control fueron A) UAS- $A\beta_{40}/+$ , B) UAS- $A\beta_{42}/+$ , C) UAS-  $A\beta_{42}ARC/+$ , y D) Gal4-24B/+. Las moscas con expresión del péptido  $A\beta$  (AMILOIDOGENICO) fueron E) Gal4-24B/UAS- $A\beta_{40}$ , F) Gal4-24B/UAS- $A\beta_{42}$ , y G) Gal4-24B/UAS-  $A\beta_{42}ARC$ .

### 3.3.1. Efecto de la expresión de $A\beta_{40}$

En el estudio de la expresión muscular del péptido  $A\beta_{40}$ , nos encontramos con que los datos obtenidos eran diferentes de los obtenidos con la expresión en motoneurona. Como se puede observar en la Figura 31 y en la Tabla 6, las gráficas nos muestran que no existen diferencias atribuibles a la expresión del péptido para ninguna de las variables analizadas, y que las variaciones dependientes de edad se mantenían iguales en todos los genotipos. De

hecho, aunque el ANOVA mostró que el genotipo afecta al número de sinapsis (Tabla 6), el examen post hoc indicó que sólo existían diferencias significativas en el caso del control UAS ( $p < 0,05$ , Figura 15A), y que el control Gal4 y la expresión del péptido eran iguales.

Por tanto, puesto que la expresión de  $A\beta_{40}$  sólo se diferencia de uno de los controles, y estos no son semejantes entre sí, tampoco podemos afirmar que la presencia del péptido en el músculo tenga un efecto significativo en el componente sináptico de la unión neuromuscular. De este modo, podemos concluir que la expresión muscular del péptido en su variante  $A\beta_{40}$ , no parece afectar ni a la morfología básica de la terminación neuromuscular, ni a su componente sináptico.



	Estadísticos		
	Genotipo	Edad	Interacción
Sinapsis	$F_{2,149}=6,657, p=0,002$	$F_{4,149}=25,160, p<0,001$	$F_{8,149}=0,548, p=0,818$
Botones	$F_{2,149}=0,416, p=0,662$	$F_{4,149}=9,390, p<0,001$	$F_{8,149}=0,463, p=0,881$
Ratio	$F_{2,149}=1,532, p=0,220$	$F_{4,149}=13,446, p<0,001$	$F_{8,149}=0,977, p=0,457$
Ramas	$H_2=2,953, p=0,228$	$H_4=7,661, p=0,105$	—————

**Tabla 6:** Resumen de los análisis estadísticos sobre el efecto de la expresión muscular (postsináptica) de  $A\beta_{40}$  en la morfología de la terminación neuromuscular adulta. La tabla muestra los estadísticos del análisis de la influencia de los factores genotipo (dos controles y expresión del péptido), edad, y su interacción sobre las variables estudiadas. El número de sinapsis, botones y el *ratio* se analizaron con pruebas paramétricas, mientras que el número de ramas requirió un análisis no paramétrico.

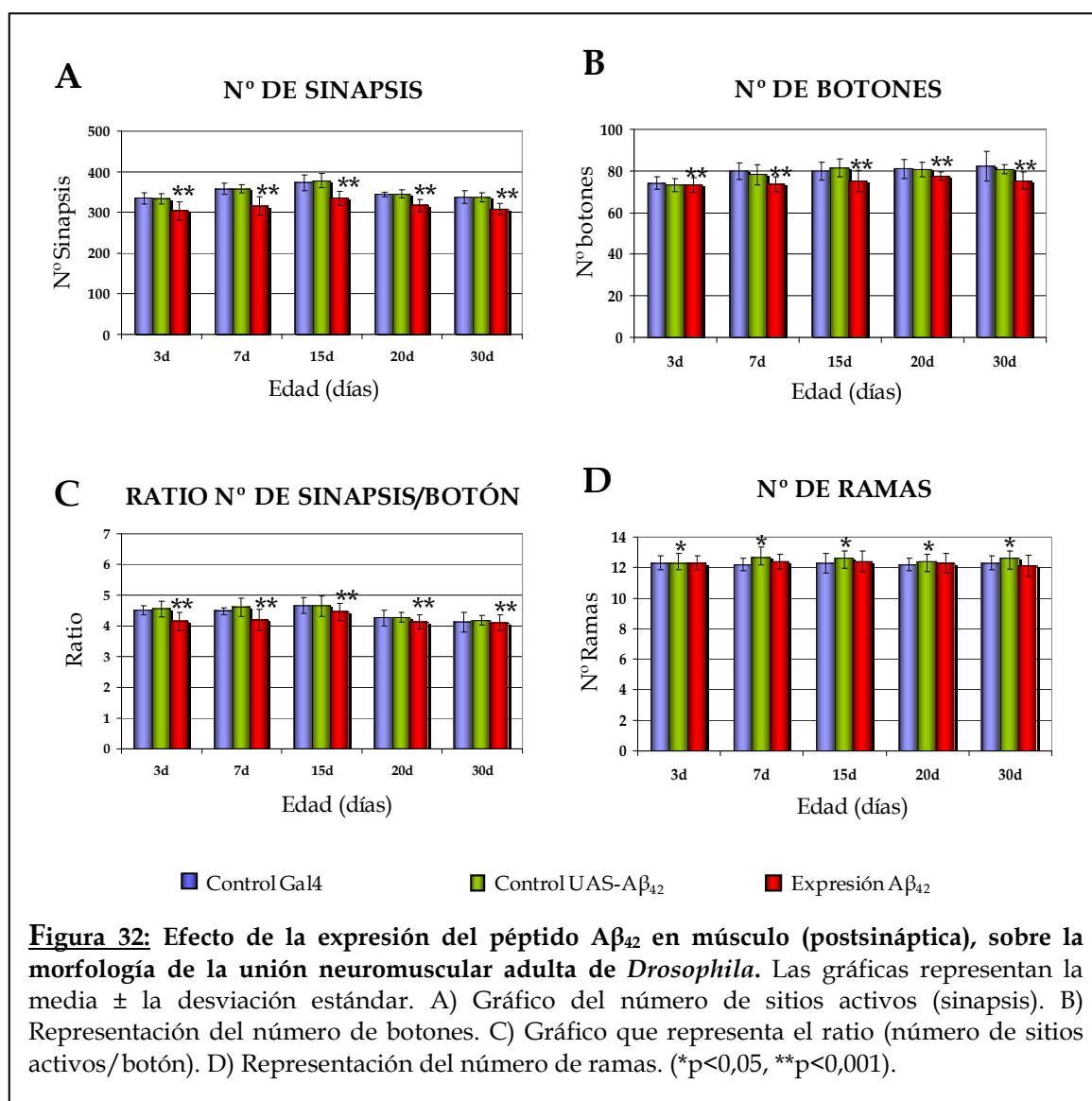
### 3.3.2. Efecto de la expresión de $A\beta_{42}$

El estudio del efecto de la expresión muscular del péptido en su variante  $A\beta_{42}$  se representa en la Figura 32 y en la Tabla 7.

	Estadísticos		
	Genotipo	Edad	Interacción
Sinapsis	$F_{2,149}=71,015, p<0,001$	$F_{4,149}=25,608, p<0,001$	$F_{8,149}=0,761, p=0,2638$
Botones	$F_{2,149}=13,543, p<0,001$	$F_{4,149}=11,054, p<0,001$	$F_{8,149}=1,293, p=0,252$
Ratio	$F_{2,149}=13,031, p<0,001$	$F_{4,149}=13,530, p<0,001$	$F_{8,149}=0,942, p=0,484$
Ramas	$H_2=6,372, p=0,041$	$H_4=1,267, p=0,867$	—————

**Tabla 7:** Resumen de los análisis estadísticos sobre el efecto de la expresión muscular (postsináptica) de  $A\beta_{42}$  en la morfología de la terminación neuromuscular adulta. La tabla muestra los estadísticos del análisis de la influencia de los factores genotipo (dos controles y expresión del péptido), edad, y su interacción sobre las variables estudiadas. El número de sinapsis, botones y el *ratio* se analizaron con pruebas paramétricas, mientras que el número de ramas requirió un análisis no paramétrico.

En la gráfica A de la Figura 32, se puede apreciar que la presencia del péptido A $\beta_{42}$  resultó influenciar negativamente el número de sitios activos, reduciendo su número de forma significativa con respecto a ambos controles ( $p < 0,001$ ), aunque no afectó a las variaciones dependientes de edad (efecto de la interacción genotipo-edad no significativo, Tabla 7).



En la Figura 32 B, se puede advertir que, en cuanto al número de botones, sucede algo semejante a lo que ocurría en el número de sinapsis. El estudio estadístico (Tabla 7) nos confirmó que esta variable se veía influenciada por el genotipo, y que la presencia del péptido hizo decrecer significativamente el número de botones con respecto a los controles ( $p < 0,001$ ), aunque, aquí también, las oscilaciones dependientes de edad permanecieron. Debido, una vez más, a que el *ratio* se ve afectado por el número de sinapsis y de botones, y puesto que la expresión del péptido A $\beta_{42}$  tiene un mayor efecto sobre la sinapsis que sobre

los botones, en los individuos que expresaban el péptido esta variable también presentó un patrón de descenso con respecto a los controles (Figura 32 C y Tabla 7).

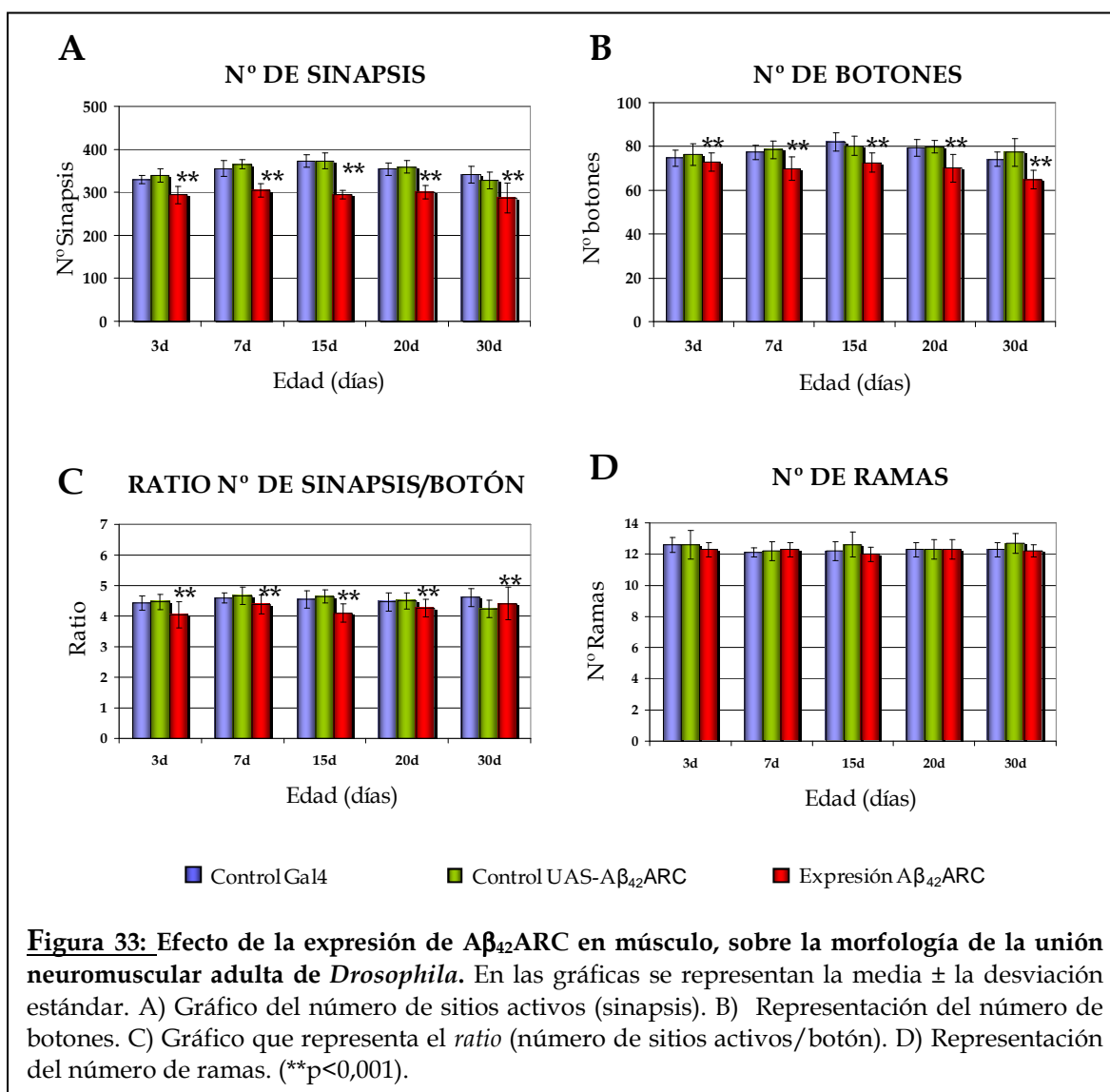
Por último, si nos fijamos en la gráfica D de la Figura 32, en el caso del número de ramas, se detectó también influencia del genotipo, aunque los análisis no paramétricos nos indicaron que las diferencias entre los genotipos estaban en el límite de significación (Tabla 7). Al hacer las pruebas comparativas entre los genotipos, sólo se encontró que existía diferencia estadística entre el control Gal4 y el control UAS ( $U=949,00$ ,  $N_1=50$ ,  $N_2=50$ ,  $p=0,016$ ), pero no entre el control UAS o el Gal4 con la expresión de  $A\beta_{42}$ . Por tanto, no podemos afirmar que la expresión muscular del péptido en su variante  $A\beta_{42}$  tenga un efecto significativo en el número de ramas.

De esta forma, y teniendo en cuenta todos los resultados, parece que la expresión postsináptica (muscular) de  $A\beta_{42}$  produce un efecto negativo en el componente sináptico y en una parte del morfológico. Así, su presencia reduce tanto el número de sinapsis como de botones pero, no afecta al número de ramas.

### **3.3.3. Efecto de la expresión de $A\beta_{42}ARC$**

El examen del efecto de la expresión muscular del péptido mutado nos generó el conjunto de datos representado en la Figura 33 y en la Tabla 8. En general, el análisis mostró unos resultados muy similares a los obtenidos con la expresión muscular de  $A\beta_{42}$ .

En el estudio del número de sinapsis, se puso de manifiesto que el factor genotípico representaba una influencia a tener en cuenta, ya que la expresión muscular de  $A\beta_{42}ARC$  provocó un descenso significativo en el número de sinapsis con respecto a los controles ( $p<0,001$ ) (Figura 33 A). Sin embargo, y a diferencia de lo observado para  $A\beta_{42}$ , el análisis estadístico demostró que la interacción genotipo-edad tenía un efecto significativo sobre la variable sinapsis, lo que indica que las variaciones edad-dependientes en el número de sitios activos son diferentes en los individuos que expresan el péptido mutado postsinápticamente.



Del mismo modo, al caracterizar el número de botones nos encontramos con evidencias estadísticas que apuntaban a una fuerte influencia del genotipo en esta variable. De nuevo, la expresión muscular del péptido en su variante arctic produjo un fenotipo significativamente distinto a lo observado en los controles ( $p < 0,001$ ), ocasionando una disminución del número de botones en la motoneurona.

Fijándonos en el *ratio*, se vuelven a poner de manifiesto que el genotipo sigue siendo un factor determinante. Debido al mayor descenso relativo en el número de sinapsis que en el de botones, la expresión en músculo del péptido Aβ<sub>42</sub>ARC también redujo el valor del *ratio* de forma relevante respecto a los controles ( $p < 0,001$ ).

Por último, en el análisis del número de ramas, nos encontramos que la presencia o no del péptido mutado no exhibía ningún efecto sobre las ramas, presentando la misma distribución que ambos controles.

	Estadísticos		
	Genotipo	Edad	Interacción
Sinapsis	$F_{2,149}=146,165, p<0,001$	$F_{4,149}=14,411, p<0,001$	$F_{8,149}=2,397, p=0,019$
Botones	$F_{2,149}=48,105, p<0,001$	$F_{4,149}=7,247, p<0,001$	$F_{8,149}=1,932, p=0,60$
Ratio	$F_{2,149}=12,006, p<0,001$	$F_{4,149}=1,914, p=0,112$	$F_{8,149}=2,015, p=0,049$
Ramas	$H_2=3,658, p=0,161$	$H_4=5,161, p=0,271$	—————

**Tabla 8:** Resumen de los análisis estadísticos sobre el efecto de la expresión muscular (postsináptica) de A $\beta$ <sub>42</sub>ARC en la morfología de la terminación neuromuscular adulta. La tabla muestra los estadísticos del análisis de la influencia de los factores genotipo (dos controles y expresión del péptido), edad, y su interacción sobre las variables estudiadas. El número de sinapsis, botones y el ratio se analizaron con pruebas paramétricas, mientras que el número de ramas requirió un análisis no paramétrico.

A la vista de los resultados anteriores, podemos concluir que la expresión muscular del péptido con la mutación Arctic afecta de forma negativa a la unión neuromuscular adulta de *Drosophila*. Dicho efecto se manifiesta en una disminución tanto del número de sinapsis como de botones en la motoneurona. Sin embargo, el número de ramas del terminal no se ve afectada por la presencia del péptido.

### **3.3.4. Comparación del efecto de la expresión en músculo de las tres formas del péptido amiloide**

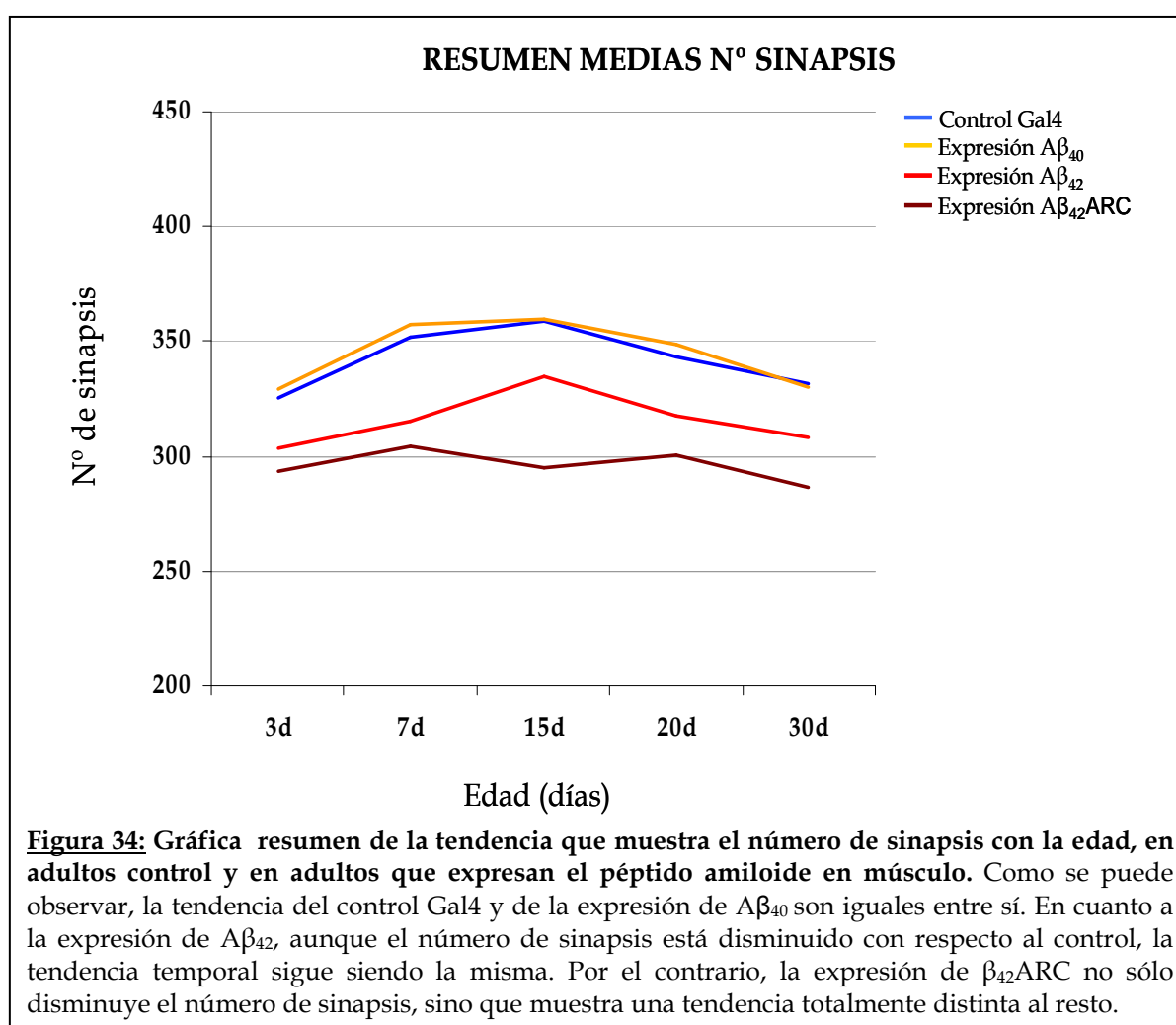
En resumen, estudiando todos los datos resultantes de la expresión muscular del péptido amiloide, nos encontramos que en función del tipo de péptido, el efecto es sustancialmente diferente. Además, los efectos de la expresión muscular de cada péptido son diferentes a los observados cuando el péptido se expresa en la motoneurona (Figura 34).

A diferencia de lo observado en motoneuronas, la expresión postsináptica del péptido A $\beta$ <sub>40</sub> no parece producir ningún efecto deletéreo en la unión neuromuscular adulta, ni en el componente sináptico, ni en el morfológico. Por el contrario, el péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, interfiere de forma negativa en la estructura de la unión. Esto se manifestó en una disminución



significativa tanto en el número de sitios activos como en el de botones del terminal axónico. Pero en esta condición, la disminución relativa en el número de sinapsis fue similar en cada edad, de manera que el patrón de oscilación edad-dependiente no fue diferente del control, como demuestra la comparación entre rectas de regresión por tramos (de 3 a 15 días:  $\beta_1=2,975$ ,  $\beta_2=2,569$ ,  $t=0,520$ ,  $p=0,603$ ; y de 15 a 30:  $\beta_1=-1,912$ ,  $\beta_2=-1,64$ ,  $t=-0,506$ ,  $p=0,61$ ).

Finalmente, la expresión muscular de  $A\beta_{42}ARC$  también afectó al número de sinapsis y de botones, y de nuevo la magnitud del efecto de este péptido fue máxima. Sin embargo, no mostró diferencias tan acusadas respecto de  $A\beta_{42}$  como las observadas con la expresión presináptica, ni un efecto claramente más pronunciado a edades más avanzadas. Además, y de nuevo a diferencia de la expresión en motoneuronas, la expresión de  $A\beta_{42}ARC$  produjo una tendencia diferente entre los periodos estudiados. Así, mientras que de 3 a 15 días la pendiente no se podía diferenciar significativamente de 0 ( $\beta=0,626$ ,  $t=0,150$ ,  $p=0,88$  para el tramo de 3 a 15 días), en el tramo de 15 a 30 días presentó una pendiente distinta de 0 ( $\beta=0,067$ ,  $t=160,04$ ,  $p<0,001$  para el tramo de 15 a 30 días).



#### 4. ACTIVACIÓN DE LA FOSFOINOSITOL-3 KINASA (PI3K) COMO POSIBLE TERAPIA A LA PÉRDIDA SINAPTOGÉNICA EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN ADULTOS DE *Drosophila*

Que la fosfoinositol-3 kinasa es una enzima clave en las rutas celulares que intervienen en la supervivencia celular, está ampliamente demostrado (Cantley 2002; Vivanco y Sawyers 2002). En el sistema nervioso participa, además, en procesos tan importantes como la morfogénesis dendrítica, la especificación axonal, la potenciación sináptica, la supervivencia neuronal, y procesos de memoria y aprendizaje, entre otros muchos (Brunet y col. 2001; Chen y col. 2005; Jiang y Rao 2005; Rugero y Sonenberg 2005; Jaworski y Sheng 2006; van der Heide y col. 2006).

Recientemente se encontró que, tanto en *Drosophila* como en roedores, la PI3K jugaba un papel fundamental en la sinaptogénesis (Martín-Peña y col. 2006, Cuesto y col. 2011). Por tanto, teniendo en cuenta que, la pérdida sináptica es uno de los primeros síntomas de la enfermedad de Alzheimer y que la activación de PI3K parece intervenir en los procesos sinaptogénicos, decidimos estudiar qué ocurriría en nuestro modelo de enfermedad de Alzheimer en la unión neuromuscular, al expresar conjuntamente el péptido amiloide y PI3K. De este modo, podríamos intentar desentrañar si la pérdida sináptica debida a la presencia del péptido amiloide es irreversible o se puede mejorar gracias a la activación de PI3K.

Sin embargo, primero debíamos confirmar que el efecto sinaptogénico observado en la unión neuromuscular larvaria de *Drosophila* (Martín-Peña y col., 2006), se reproducía también en la terminación de individuos adultos. Por tanto, el primer análisis realizado consistió en estudiar que sucedía con la sobreactivación de PI3K en la terminación neuromuscular adulta de *Drosophila*. Para ello, sobre-expresamos mediante el sistema Gal4-UAS, la subunidad catalítica de PI3K (*PI3K92E*).

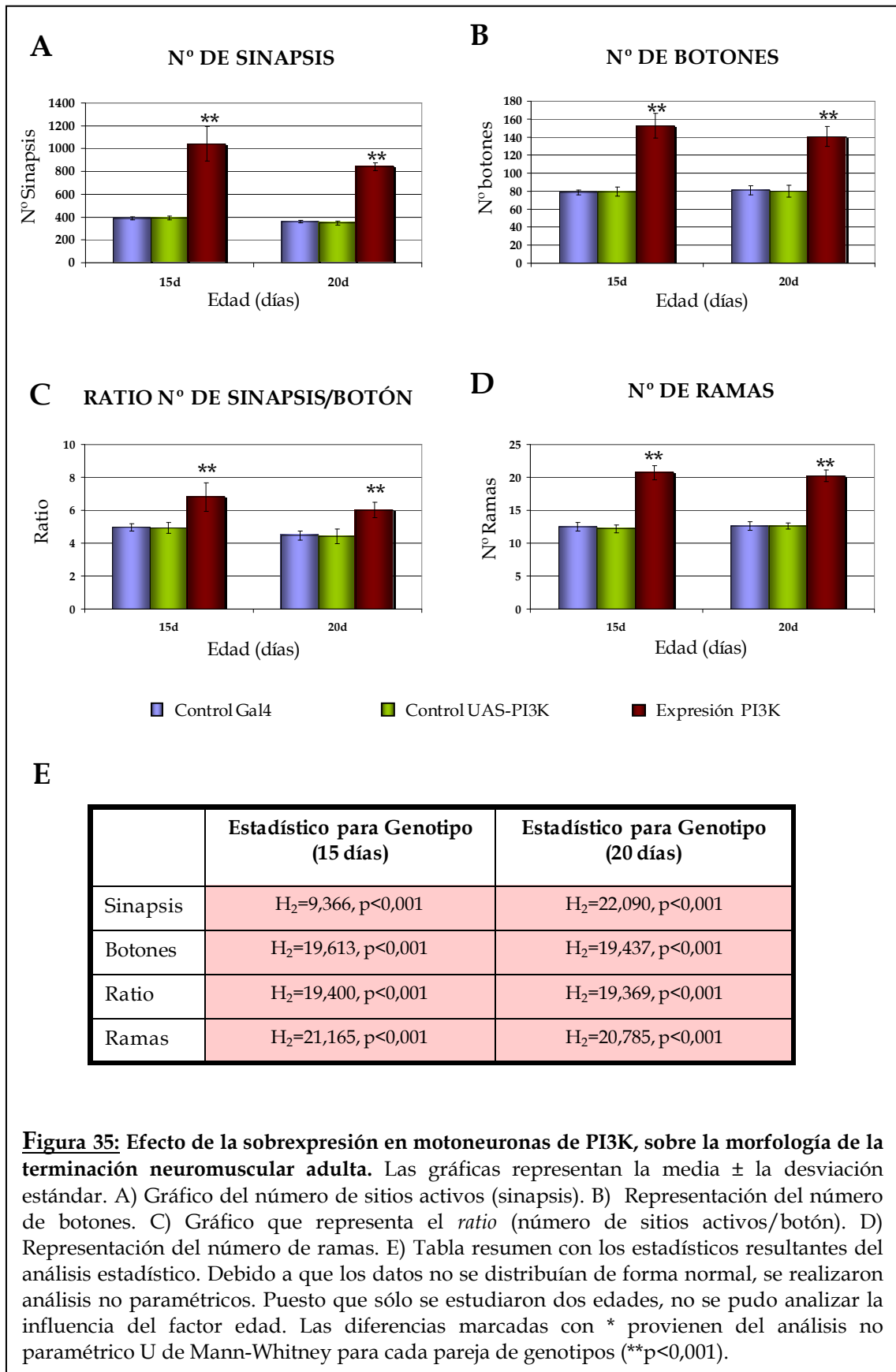
Aunque inicialmente pretendíamos estudiar el efecto pre- y post-sináptico de la activación de PI3K, nuestros estudios demostraron que la sobre-expresión de PI3K mediante el *driver* Gal4-24B producía letalidad temprana, de manera que ningún individuo conseguía superar el tercer estadio larvario. La letalidad temprana ocurrió de manera similar en individuos que co-expresaban el péptido amiloide y PI3K mediante Gal4-24B. Por tanto, sólo pudimos realizar los experimentos para determinar el efecto de la activación presináptica de la vía PI3K.

#### 4.1. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN PRESINÁPTICA DE PI3K SOBRE LA MORFOLOGÍA DEL LA TERMINACIÓN NEUROMUSCULAR ADULTA

Martín-Peña y colaboradores ya demostraron en el 2006 que la sobre-expresión en *Drosophila* de PI3K o Akt era capaz de incrementar el número de sinapsis tanto en la unión neuromuscular larvaria, medido por el número de puntos individuales inmunoreactivos para nc82, como en el cerebro adulto, estimado por cuantificación del volumen de marcaje sináptico. Estos datos sugieren que la sobre-activación de la vía también origina un aumento de sinapsis en la terminación neuromuscular adulta, pero no existen cuantificaciones precisas en este sistema (Martín-Peña y col. 2006). Por tanto, en base a los resultados obtenidos en nuestro modelo adulto de enfermedad de Alzheimer en *Drosophila*, en donde se apreciaron diferencias significativas debidas a la presencia del péptido amiloide en la unión neuromuscular adulta, y puesto que ya había estudios previos del efecto de la sobreexpresión de PI3K tanto en larva como en adulto de *Drosophila*, decidimos comprobar si en la unión neuromuscular adulta, la PI3K era capaz de inducir cambios similares a los descritos anteriormente.

Para simplificar el estudio decidimos analizar sólo las edades de 15 días, cuando se encuentra el número máximo de sinapsis, y 20 días, cuando el número empieza a decrecer y la expresión del péptido con la mutación arctic todavía permite la supervivencia de algunos individuos. En todos los casos, la sobre-expresión de PI3K se dirigió con el *driver* de motoneuronas Gal4-D42.

Como se puede observar en las gráficas de la Figura 35, la sobreexpresión de PI3K produjo un efecto radical en la morfología y en el componente sináptico de la terminación neuromuscular adulta. Como se observa en la Figura 36 F, donde se presentan imágenes representativas de la unión neuromuscular adulta, estos cambios tan dramáticos eran perceptibles a simple vista. Los nervios abdominales aparecieron como un amasijo de ramas que recubrían el músculo, encontrándose más de una ramificación neuronal por paquete muscular, cuando lo normal es que haya una sola por paquete.



El análisis cuantitativo demostró que la sobreexpresión de PI3K no solo alteró el número de sitios activos en la terminación, incrementándolos en más de un 167%, sino que cambió por completo la morfología de la terminación. La sobreactivación presináptica de PI3K provocó un aumento de casi el 95% del número botones y de más del 64% del número de ramas. Es de resaltar que aunque el análisis estadístico no permitió evaluar la influencia de la edad sobre las diferentes variables analizadas, se comprobó la tendencia de los datos de la sobreactivación de PI3K mediante una recta de regresión. Así, dichos datos mostraron que existía una pendiente negativa ( $\beta_1 = 9,725$   $t = -3,992$   $p < 0,001$ ). Esto indica existe un patrón de oscilación dependiente de edad también cuando se sobre-expresa PI3K, de manera que disminuye el número de sinapsis activas de 15 a 20 días de manera similar a lo observado en los controles, y en los estudios con la expresión del péptido amiloide (ver Figura 40). Estos datos sugieren que los mecanismos que regulan los procesos de sinaptogénesis en función de la edad actúan también cuando la vía PI3K está sobreactivada.

Así, podemos afirmar que la sobreactivación de PI3K en motoneuronas produce un efecto notable sobre la unión neuromuscular adulta de *Drosophila*. Dicho efecto es comparable al que se da en el estadio larvario (Martín-Peña y col., 2006).

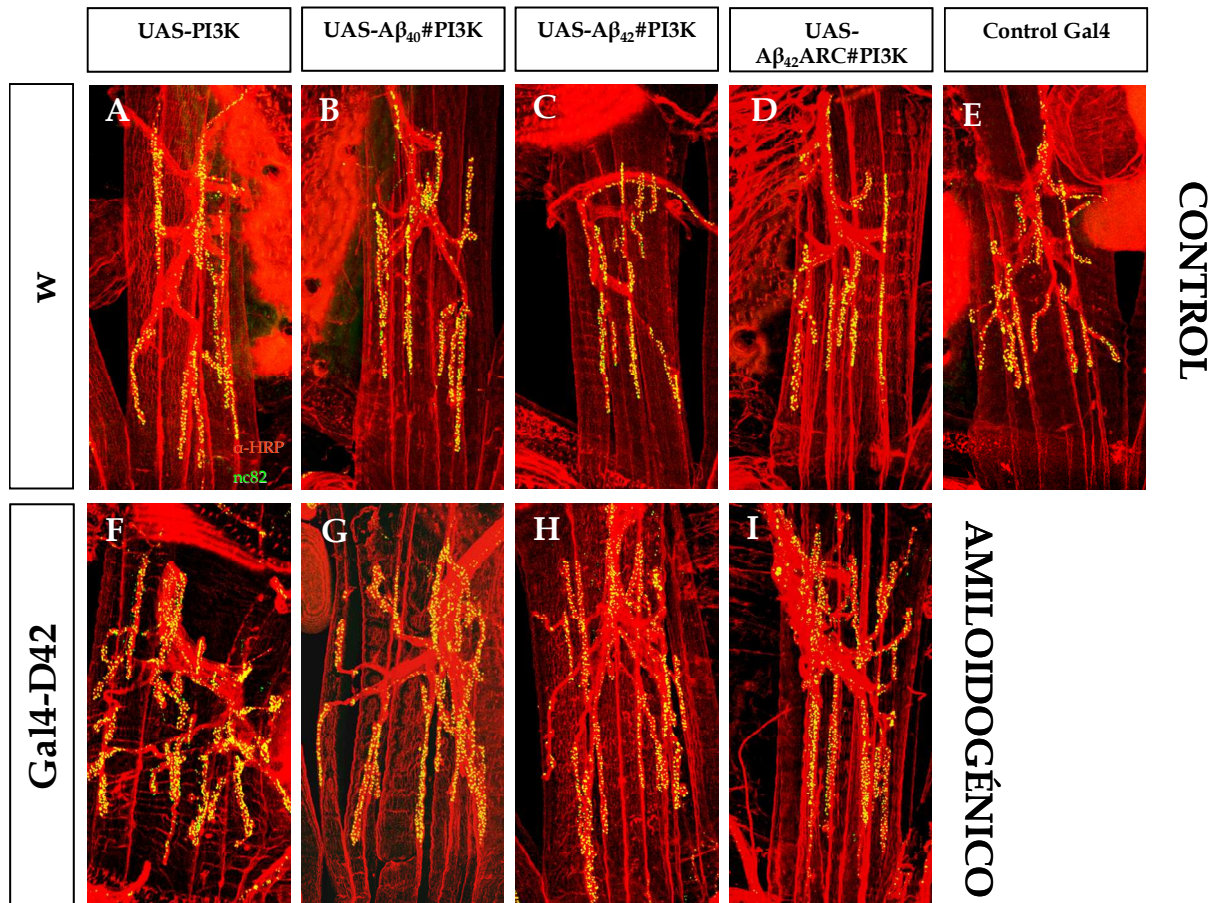
#### **4.2. EFECTO DE LA SOBREPRESIÓN PRESINÁPTICA DE PI3K Y EL PÉPTIDO AMILOIDE: UNA POSIBLE ESTRATEGIA DE RECUPERACIÓN SINÁPTICA**

En nuestros estudios del efecto del péptido amiloide sobre la unión neuromuscular adulta, hemos observado que, en general, la presencia del péptido es perjudicial para la formación de sinapsis. Así, la expresión de cualquiera de las tres variantes del péptido ( $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  y artic) en motoneuronas, reduce el número de sitios activos en el terminal. Sin embargo, la expresión muscular sólo genera este efecto deletéreo con las variantes derivadas de  $A\beta_{42}$ .

Uno de los grandes objetivos de las investigaciones relacionadas con la enfermedad de Alzheimer consiste en revertir la pérdida cognitiva, mejorar las funciones celulares y retrasar los síntomas de la enfermedad. Una forma de llevar a cabo esto, podría ser aplazar la pérdida sináptica o incluso recuperar las sinapsis perdidas.

Debido al potencial que ha demostrado la activación de PI3K en la formación de nuevas sinapsis (Martín-Peña y col. 2006, Cuesto y col. 2011), y después de haber confirmado que la

sobreexpresión de PI3K en la unión neuromuscular adulta de *Drosophila* mantenía un patrón de aumento sináptico similar al descrito en larva, decidimos examinar si la recuperación sináptica en el modelo adulto de enfermedad de Alzheimer era posible. Para ello, como ya se ha explicado anteriormente (ver sección Material y Métodos), generamos individuos recombinantes que llevaran los transgenes codificantes del péptido amiloide y de PI3K, para después expresarlos en las motoneuronas que inervan la unión neuromuscular abdominal adulta.



**Figura 36:** Efecto de la sobre-expresión presináptica de PI3K sobre la morfología de la terminación neuromuscular adulta en presencia del péptido amiloide. Ejemplos representativos de las terminaciones del segmento 3S de adultos de 15 días para cada uno de los genotipos experimentales, teñidas con los anticuerpos  $\alpha$ -HRP (rojo, marca la membrana de las motoneuronas) y nc82 (verde, marca sitios activos). Para poder visualizar toda la terminación, cada imagen se obtuvo por la proyección en un único plano de la serie de imágenes tomadas de la terminación al completo. Las moscas control fueron A) UAS-PI3K/+, B) UAS-A $\beta_{40}$ #PI3K/+, C) UAS-A $\beta_{42}$ #PI3K/+, D) UAS-A $\beta_{42}$ ARC#PI3K/+, y E) Gal4-D42/+. Las moscas con sobre-expresión de PI3K fueron F) Gal4-D42/UAS-PI3K, y aquellas que sobre-expresaron conjuntamente PI3K y el péptido A $\beta$  (AMILOIDOGÉNICO) fueron G) Gal4-D42/UAS-A $\beta_{40}$ #PI3K, H) Gal4-D42/UAS-A $\beta_{42}$ #PI3K, e I) Gal4-D42/UAS-A $\beta_{42}$ ARC#PI3K.



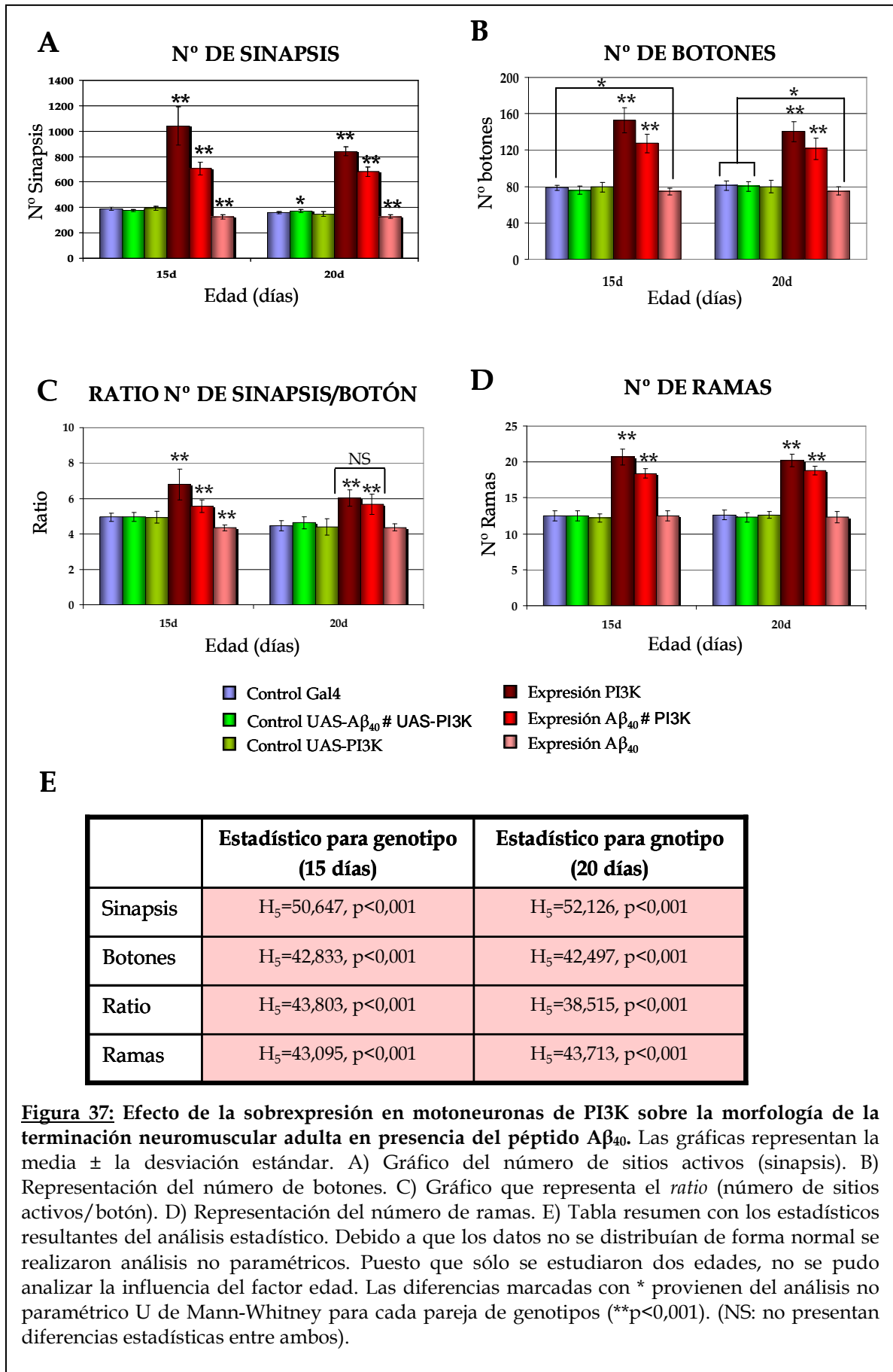
Los cambios producidos debido a la expresión conjunta de las distintas formas del péptido amiloide y PI3K se pueden visualizar en la Figura 36. En la composición de dicha figura se han incluido imágenes representativas sólo de algunos de los genotipos, excluyendo imágenes de varios controles, para no hacer excesivamente compleja su comprensión. Se puede percibir claramente el efecto de la sobreexpresión de PI3K en la motoneurona en los paneles F a I. Aquí, a simple vista, y comparadas con sus respectivos controles, las terminaciones presentan mayor número de ramificaciones y de sinapsis. A continuación pasamos a detallar los efectos con las distintas formas del péptido.

#### **4.2.1. Expresión de A $\beta$ <sub>40</sub> y sobreexpresión de PI3K en motoneuronas**

Las observaciones *de visu* se ven confirmadas cuando estudiamos las gráficas con los datos experimentales de la Figura 37.

La sobreexpresión de PI3K es capaz no solo de revertir la pérdida sináptica atribuible a la acción de A $\beta$ <sub>40</sub>, sino de generar más de las que existen normalmente incluso en presencia de A $\beta$ <sub>40</sub> (Figura 37A). Sin embargo, los individuos con ambos transgenes no llegan a los valores que se dan cuando se sobre-expresa PI3K a solas, lo que indica que el efecto sinapto-tóxico de A $\beta$ <sub>40</sub> ocurre también en condiciones en las que se sobreactiva la vía PI3K. Una observación especialmente interesante es, de nuevo, la influencia del péptido A $\beta$ <sub>40</sub> sobre las variaciones sinápticas dependientes de edad, que ocurre incluso cuando se sobre-expresa PI3K. De nuevo, la presencia de A $\beta$ <sub>40</sub> hace que las oscilaciones edad-dependientes desaparezcan, al menos entre los 15 y 20 días de edad, y este efecto es independiente de la actividad de la vía PI3K (ver Figura 40 y apartado 4.2.4).

En cuanto al resto de las variables estudiadas, los resultados son sorprendentes. Mientras que la expresión presináptica de A $\beta$ <sub>40</sub> no tiene efectos significativos sobre el número de botones y de ramas en condiciones normales, nuestros datos demuestran que la presencia del péptido es capaz de mitigar la influencia de PI3K sobre estos dos parámetros. Es decir, como se observa en las gráficas Figura 37 B y D, el aumento en el número de botones y ramas resultante de la sobre-expresión en motoneuronas de PI3K es menor cuando además estas neuronas expresan A $\beta$ <sub>40</sub>. Los efectos complejos sobre el número de sitios activos y botones resultan en una influencia significativa del factor genotipo también en la variable *ratio* (Figura 37 C y E), aunque con patrones diferentes dependiendo de la edad.



**Figura 37:** Efecto de la sobrepresión en motoneuronas de PI3K sobre la morfología de la terminación neuromuscular adulta en presencia del péptido  $A\beta_{40}$ . Las gráficas representan la media  $\pm$  la desviación estándar. A) Gráfico del número de sitios activos (sinapsis). B) Representación del número de botones. C) Gráfico que representa el ratio (número de sitios activos/botón). D) Representación del número de ramas. E) Tabla resumen con los estadísticos resultantes del análisis estadístico. Debido a que los datos no se distribuían de forma normal se realizaron análisis no paramétricos. Puesto que sólo se estudiaron dos edades, no se pudo analizar la influencia del factor edad. Las diferencias marcadas con \* provienen del análisis no paramétrico U de Mann-Whitney para cada pareja de genotipos (\*\* $p<0,001$ ). (NS: no presentan diferencias estadísticas entre ambos).



Así, podemos sostener que la sobreactivación de PI3K es capaz de revertir las posibles pérdidas sinápticas provocadas por la presencia del péptido  $A\beta_{40}$ . Además, nuestros datos apuntan hacia un efecto negativo de  $A\beta_{40}$  sobre la vía PI3K, ya que la presencia del péptido disminuye el efecto de PI3K sobre número de sinapsis, botones, y ramas. Por último, cabe resaltar la influencia negativa de  $A\beta_{40}$  sobre los mecanismos que modulan el número de sinapsis en función de la edad, independientemente de PI3K.

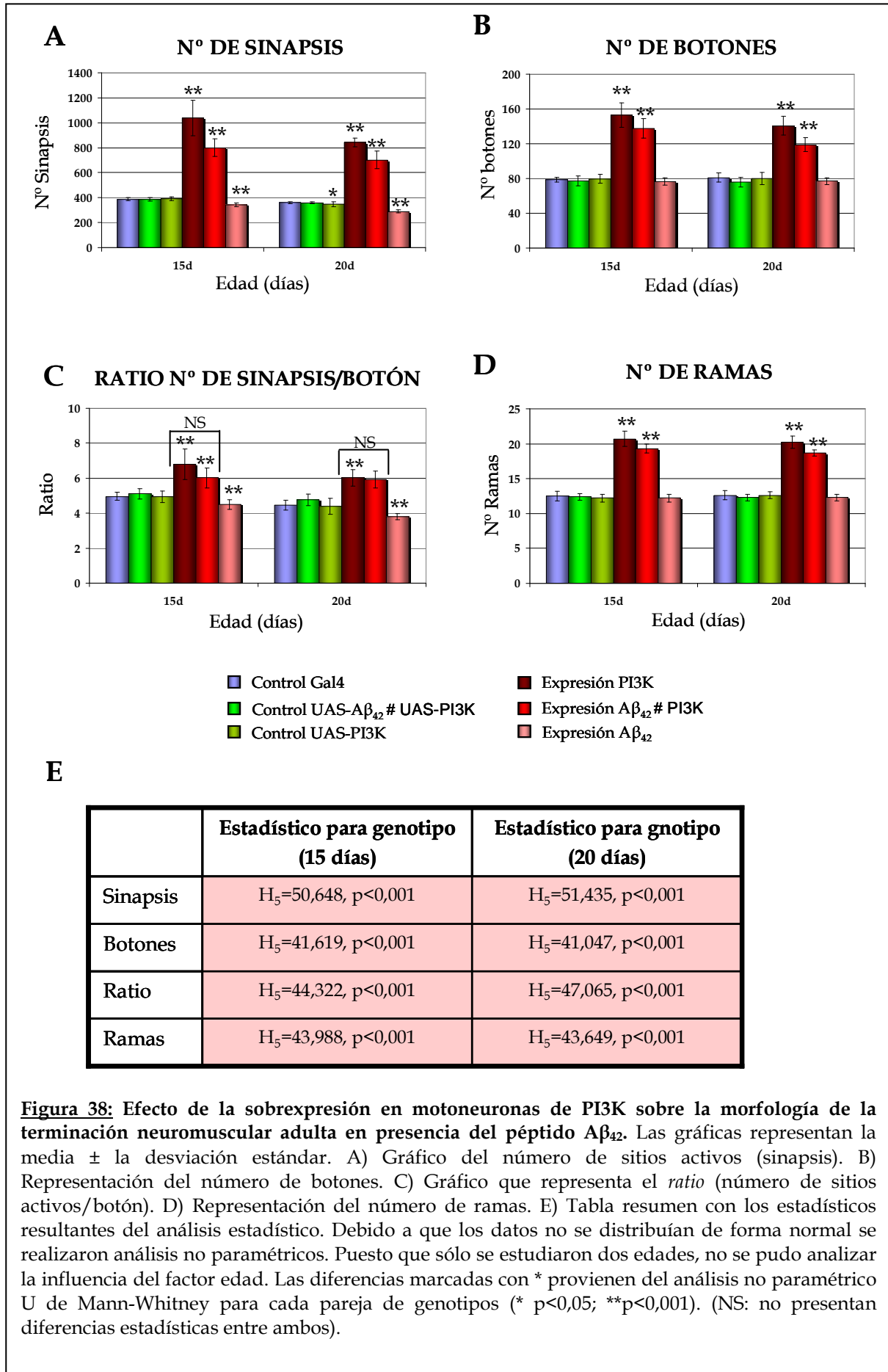
#### **4.2.2. Expresión de $A\beta_{42}$ y sobreexpresión de PI3K en motoneuronas**

Con la variante del péptido amiloide  $A\beta_{42}$  se observan resultados similares a los obtenidos con  $A\beta_{40}$  (Figura 38). La expresión PI3K revierte el fenotipo de pérdida sináptica debido a la expresión del péptido. De nuevo, la sobre-expresión de PI3K es capaz de aumentar el número de sinapsis por encima de los valores normales incluso en presencia de  $A\beta_{42}$ , aunque, de manera similar a lo visto con  $A\beta_{40}$ , a niveles inferiores a los observados en ausencia del péptido (Figura 38 A). Sin embargo, la expresión de  $A\beta_{42}$  no parece afectar a la oscilación temporal en los sitios activos (ver Figura 40 y apartado 4.2.4).

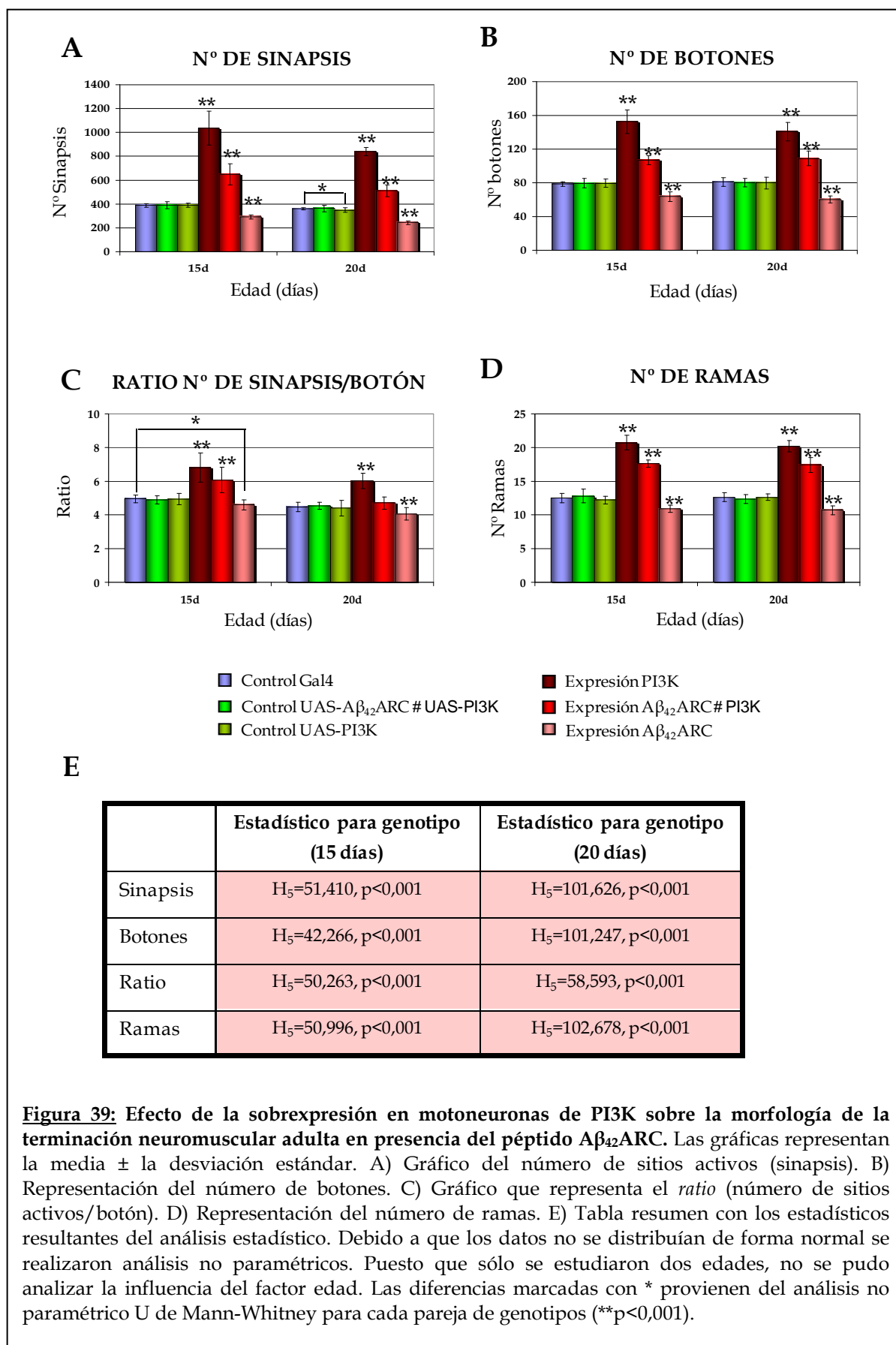
En cuanto al resto de las variables analizadas, los datos muestran que este péptido también es capaz de mitigar la influencia de PI3K sobre el número de botones y de ramas, a pesar de que no presenta efectos significativos sobre estos caracteres en condiciones en las que la vía PI3K no está alterada (Figura 38 B y D).

#### **4.2.3. Expresión de $A\beta_{42}$ ARC y sobreexpresión de PI3K en motoneuronas**

Por último, el estudio de la expresión conjunta del péptido con la mutación Arctic y de PI3K demostró que el efecto de la sobre-expresión de la enzima era suficiente para restituir la merma de sitios activos que provocó la variante más agresiva del péptido. Pero a pesar del efecto negativo más acusado de  $A\beta_{42}$ ARC, en los individuos recombinantes que además sobre-expresaban PI3K se repitió un patrón muy similar al que se observó para el caso de las otras dos variantes del péptido (Figura 39). Es decir, los efectos de la sobre-activación de PI3K sobre la morfología de la terminación neuromuscular adulta fueron menos severos cuando además se expresaba el péptido  $A\beta_{42}$ ARC, tanto para el número de sinapsis, como de botones y de ramas. Por último, al igual que con  $A\beta_{42}$ , y a diferencia de  $A\beta_{40}$ , la expresión de este péptido con la sobre-expresión de PI3K, no alteró las fluctuaciones sinápticas dependientes de edad (ver Figura 39 y apartado 4.2.4).

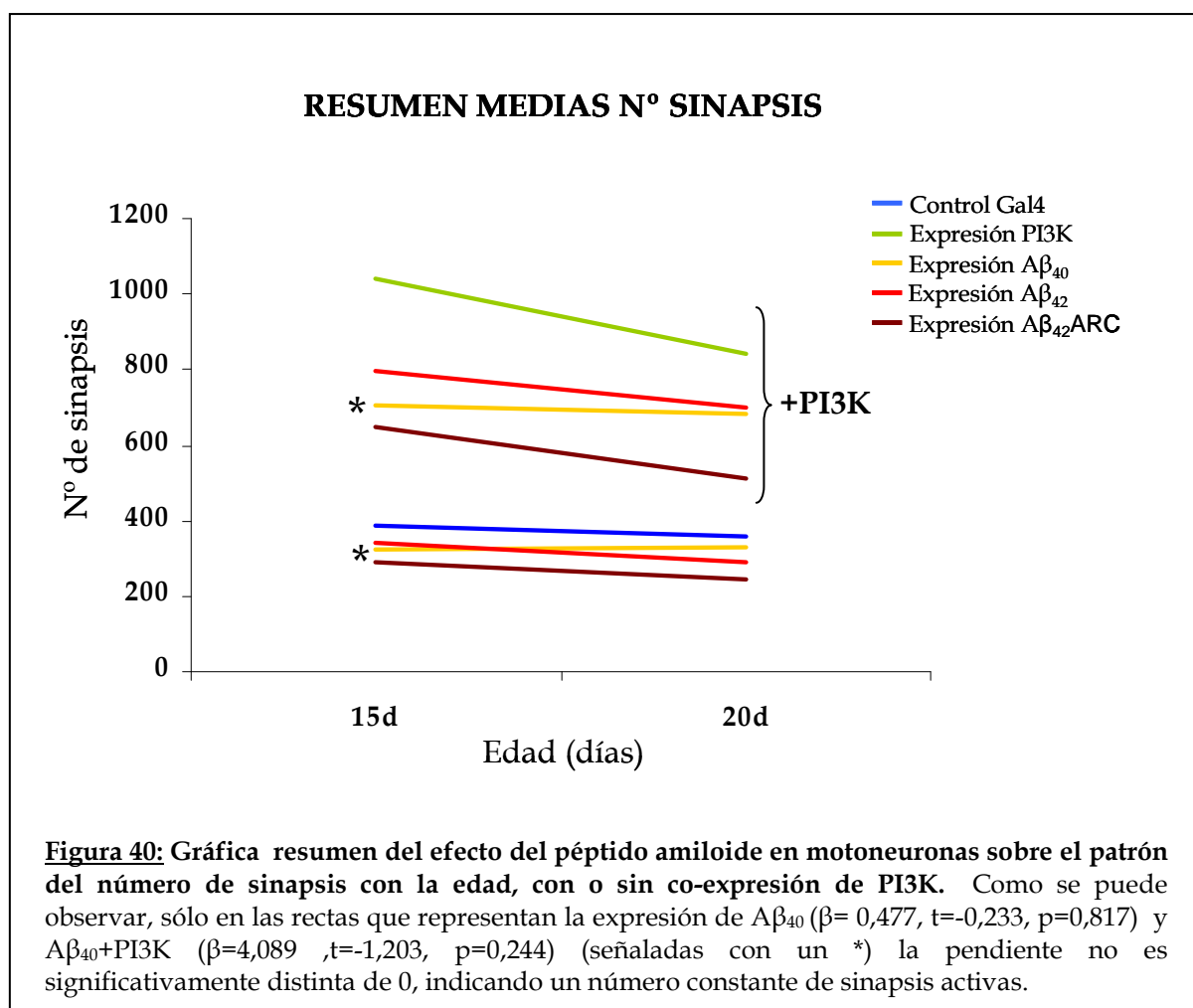


**Figura 38:** Efecto de la sobrexpresión en motoneuronas de PI3K sobre la morfología de la terminación neuromuscular adulta en presencia del péptido  $A\beta_{42}$ . Las gráficas representan la media  $\pm$  la desviación estándar. A) Gráfico del número de sitios activos (sinapsis). B) Representación del número de botones. C) Gráfico que representa el *ratio* (número de sitios activos/botón). D) Representación del número de ramas. E) Tabla resumen con los estadísticos resultantes del análisis estadístico. Debido a que los datos no se distribuían de forma normal se realizaron análisis no paramétricos. Puesto que sólo se estudiaron dos edades, no se pudo analizar la influencia del factor edad. Las diferencias marcadas con \* provienen del análisis no paramétrico U de Mann-Whitney para cada pareja de genotipos (\*  $p<0,05$ ; \*\* $p<0,001$ ). (NS: no presentan diferencias estadísticas entre ambos).



### 4.2.3. Comparación del efecto de la expresión en músculo de las tres formas del péptido amiloide

La Figura 40 muestra una gráfica resumen comparando el efecto de la expresión conjunta de PI3K y cada una de las tres formas del péptido amiloide. Con estos resultados podemos afirmar que los efectos sobre la terminación nerviosa producidos por la presencia del péptido amiloide (en cualquiera de las variantes estudiadas) pueden verse revertidos por un aumento en los niveles de PI3K. Además, puesto que la sobre-activación de PI3K consigue mejorar el fenotipo generado por  $A\beta$ , pero los niveles de las variables observadas no alcanzan los valores conseguidos con la expresión de PI3K a solas, nuestros datos sugieren que existe una compleja interacción entre el péptido amiloide y la ruta de PI3K que afecta a la morfología del terminal. Curiosamente, también en estas condiciones se observan diferencias cuantitativas y cualitativas respecto al efecto de cada una de las formas amiloides, independientes del nivel de actividad de la vía PI3K. Estos efectos se refieren a la potencia del efecto sinaptotóxico de cada péptido, y, muy especialmente, a su efecto sobre la oscilaciones del número de sinapsis dependientes de edad.

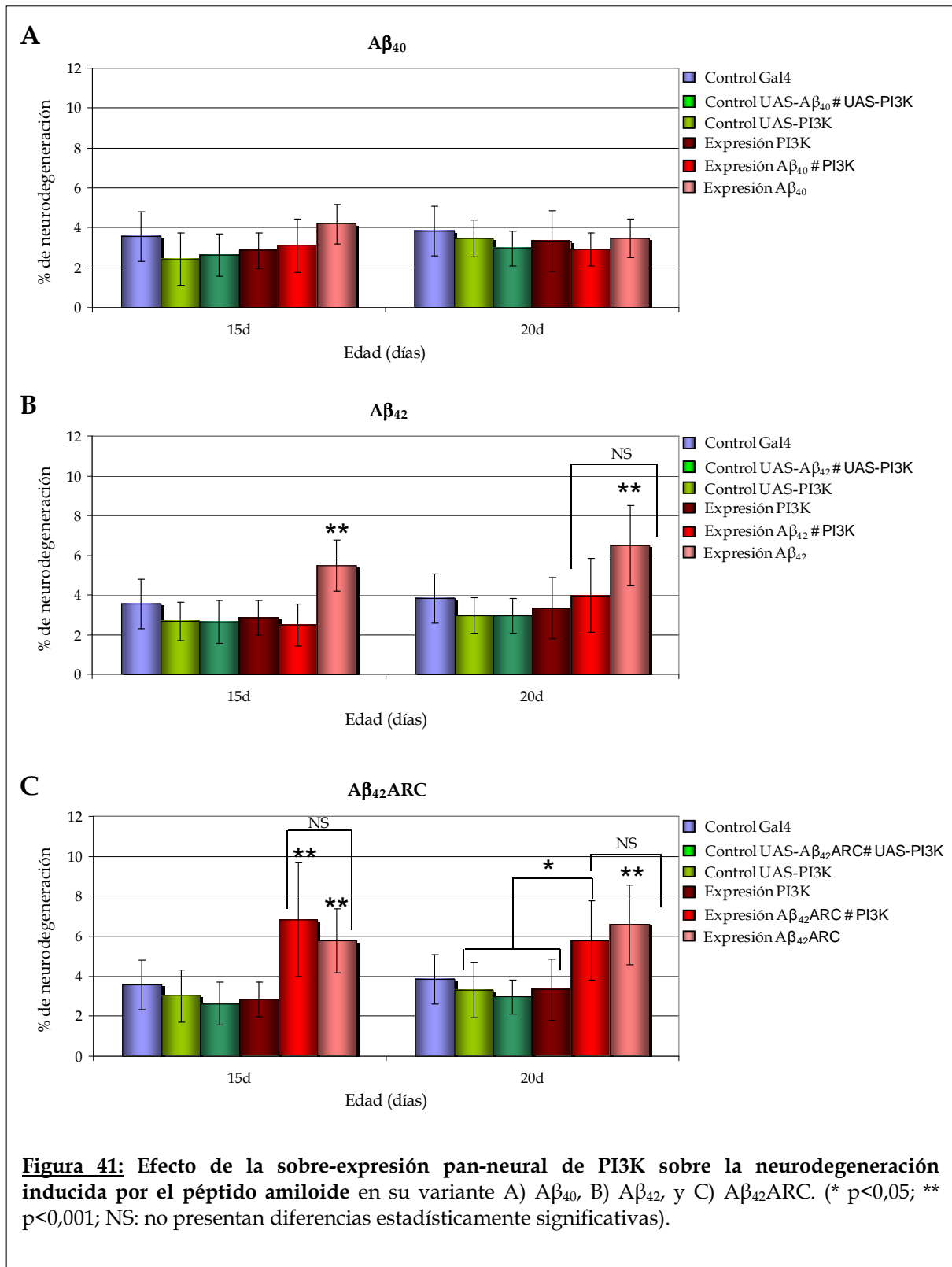


Independientemente de que la vía PI3K esté o no hiperactiva, el efecto cuantitativamente más severo sobre el número de sitios activos lo muestra siempre el péptido  $A\beta_{42}$ ARC (Figura 40). Curiosamente, tanto con la sobre-expresión de la vía PI3K como en condiciones normales, el efecto negativo del péptido  $A\beta_{42}$  sobre el número de sinapsis es menos potente que el de  $A\beta_{40}$  a edades tempranas (15 días), y sólo lo iguala o supera a edades más avanzadas (a partir de 20 días).

En ausencia de péptido, el número de sitios activos sigue un patrón temporal característico, en el que se detecta una disminución en el número de sinapsis en el paso de 15 a 20 días de edad tanto en condiciones control como con la sobreactivación de la vía PI3K (Figura 40). Por el contrario, la presencia de  $A\beta_{40}$  hace que estas variaciones edad-dependientes desaparezcan, independientemente de la actividad de la vía PI3K, de manera que con la expresión conjunta de  $A\beta_{40}$  y PI3K, el número de sinapsis también se mantiene constante en las dos edades estudiadas. De hecho, el análisis de la recta de regresión volvió a evidenciar que con la expresión de este péptido la pendiente no era significativamente distinta de 0 ( $\beta = 4,085$ ,  $t = -1,203$ ,  $p = 0,244$ ). Esto se traduce en que la expresión conjunta de  $A\beta_{40}$  y PI3K reduce el número de sitios activos respecto a la expresión de PI3K sola en un 32% a los 15 días, pero sólo en un 19% a los 20 días de edad. Sin embargo, a diferencia de  $A\beta_{40}$ , la expresión conjunta de PI3K y  $A\beta_{42}$  no modificó el patrón sináptico dependiente de edad, encontrándose de nuevo la reducción del número de sinapsis entre 15 y 20 días. En el estudio de la recta de regresión esto se manifestó encontrándose una pendiente tanto con o sin sobre-expresión de PI3K ( $\beta = 6,975$ ,  $T = -2,765$ ,  $p > 0,05$ ) (ver Figura 40). Por último, al igual que con  $A\beta_{42}$ , y a diferencia de  $A\beta_{40}$ , la expresión de  $A\beta_{42}$ ARC con la sobre-expresión de PI3K, tampoco afectó a las fluctuaciones sinápticas dependientes de edad. De nuevo, se observó un descenso del número de sinapsis entre los 15 y los 20 días, y la recta de regresión volvió a evidenciar ese hecho con su pendiente ( $\beta = 6,843$ ,  $t = -4,029$ ,  $p > 0,05$ ).

Por tanto, podemos concluir que la expresión presináptica de  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}$ ARC reduce el número de sinapsis, sin alterar su patrón de fluctuación con la edad. Sin embargo, la expresión de  $A\beta_{40}$  anula dichas fluctuaciones edad dependientes en el número de sinapsis de forma independiente de PI3K.

**4.3. EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE PI3K SOBRE LA NEURODEGENERACIÓN INDUCIDA POR EL PÉPTIDO AMILOIDE.**



Como describimos en el apartado 1.2, la expresión pan-neural del péptido amiloide en sus variantes  $A\beta_{42}$  y con la mutación arctic, provocó un aumento en el porcentaje de masa cerebral neurodegenerada. Por su parte,  $A\beta_{40}$  no demostró ejercer ningún efecto negativo, pues los individuos que lo expresaban tenían los mismos niveles de pérdida cerebral que los controles. Puesto que con la sobreexpresión de PI3K encontramos unos efectos tan llamativos y favorecedores para la recuperación sináptica, decidimos estudiar si este efecto podía extenderse al fenotipo neurodegenerado, evitando la muerte neuronal inducida por el péptido amiloide. Para este estudio, utilizamos la línea pan neural *elav-Gal4* y analizamos la neurodegeneración a los 15 y 20 días de edad.

Recombinante $A\beta_{40}$ #PI3K0	Estadístico	
Genotipo	$F_{5-113}=2,835$ , $p=0,019$	
Edad	$F_{1-113}=0,933$ , $p=0,336$	
Interacción	$F_{5-113}=1,307$ , $p=0,267$	
	Estadístico para genotipo (15 días)	Estadístico para genotipo (20 días)
Recombinante $A\beta_{42}$ #PI3K	$H_5=23,655$ , $p<0,001$	$H_5=16,474$ , $p<0,001$
Recombinante arc2E#PI3K	$H_5=23,401$ , $p<0,001$	$H_5=24,443$ , $p<0,001$

**Tabla 9: Estadísticos del análisis de la expresión conjunta del péptido amiloide y PI3K en neuronas.** En el caso de  $A\beta_{40}$ , los datos presentaron una distribución normal y se realizó ANOVA de dos factores. En el caso de las otras dos variantes del péptido, los datos no siguieron una distribución normal y se realizaron análisis no paramétricos.

#### **4.3.1. Expresión de $A\beta_{40}$ y sobreexpresión de PI3K**

El estudio de los niveles de neurodegeneración para los recombinantes que co-expresan el péptido  $A\beta_{40}$  y PI3K se resume en la Figura 41A y en la Tabla 9. A pesar de que el análisis estadístico de los datos en conjunto indicó que el factor genotipo tenía un efecto significativo sobre el nivel de neurodegeneración, el análisis *post hoc* demostró que no había diferencias entre la expresión del péptido, a solas o junto con PI3K, con el resto de los genotipos o entre ellos mismos, tanto a 15 como 20 días. Así, todos los genotipos estudiados presentaron unos niveles similares de neurodegeneración, y no se diferenciaron de sus controles.

Por tanto, como ya se observó previamente, no parece existir ninguna influencia del péptido A $\beta$ <sub>40</sub> en la pérdida neuronal. Además, también observamos que la sobreexpresión de PI3K, bien sola o co-expresándola con el péptido amiloide, tampoco altera el patrón neurodegenerativo normal que sufren los individuos a lo largo de su vida.

#### **4.3.2. Expresión de A $\beta$ <sub>42</sub> y sobreexpresión de PI3K**

Como ya se ha descrito previamente, la expresión de A $\beta$ <sub>42</sub> produce una pérdida significativa de masa celular nerviosa observable incluso a 15 días de edad, y que se mantiene a los 20 días (Figura 41 B y Tabla 9). Cuando analizamos si este patrón de neurodegeneración varía cuando se sobre-expresa PI3K, los análisis estadísticos arrojan resultados notables. A 15 días, la sobre-activación de PI3K provoca que los niveles de neurodegeneración inducidos por A $\beta$ <sub>42</sub> se reduzcan a niveles equiparables a los controles, revirtiendo por completo el efecto deletéreo del péptido. A los 20 días, sin embargo, el efecto de PI3K resultó ser menos definitorio. Los individuos que expresaban el péptido junto con PI3K presentaron unos niveles de neurodegeneración que no se diferenciaban de los controles, pero estaban en el límite de significación con respecto a los individuos que sólo expresaban el péptido (p=0,06). Estos datos sugieren que a 20 días de edad, la sobre-activación de la ruta PI3K es aún capaz de revertir el efecto del péptido, pero su acción es menos potente, posiblemente debido al efecto acumulativo de A $\beta$ .

#### **4.3.3. Expresión del péptido A $\beta$ <sub>42</sub>ARC y sobreexpresión de PI3K**

Por último, en la Figura 41 C y Tabla 9, se recogen los datos referentes a la expresión del péptido mutado y sobre-activación de PI3K. Anteriormente habíamos descrito que la presencia de dicho péptido originaba un aumento en la neurodegeneración, al igual que ocurría con A $\beta$ <sub>42</sub>. Pero sorprendentemente, los efectos que esta variante más lesiva ocasiona no se ven aliviados por el aumento de PI3K a ninguna de las edades estudiadas.

A los 15 días de edad, los individuos con el péptido A $\beta$ <sub>42</sub>ARC, independientemente de que tengan sobreactivada PI3K o no, mostraron unos niveles de neurodegeneración por encima de los controles. Los datos a 20 días fueron más difíciles de interpretar: los recombinantes con el péptido y PI3K contaban con unos niveles de neurodegeneración que estaban por encima del resto de controles UAS, y no eran estadísticamente distintos a los que presentaron los individuos con la expresión del péptido, pero tampoco a individuos control Gal4. En resumen, podemos concluir que la sobre-expresión de PI3K no es suficiente para



---

evitar la muerte celular provocada por la acumulación del péptido  $A\beta_{42}$ ARC en el sistema nervioso.

Después del estudio de neurodegeneración realizado, nuestros datos indican que la sobreexpresión de PI3K es suficiente para frenar los daños tempranos provocados por el péptido amiloide  $A\beta_{42}$  a las células nerviosas, pero no los derivados de la expresión de  $A\beta_{42}$ ARC, y probablemente tampoco daños más tardíos. Sin embargo, sería necesario un estudio más exhaustivo para corroborar estos datos.



# DISCUSIÓN

---



## DISCUSIÓN

Desde la descripción de la EA por primera vez por el psiquiatra y neurólogo alemán Alois Alzheimer en 1907 (Alzheimer 1907), muchos investigadores han intentado desentrañar como se produce y desarrolla esta enfermedad neurodegenerativa. Una de sus características principales es el deterioro cognitivo debido a una pérdida temprana de sinapsis en el sistema nervioso (Selkoe 2002). En la actualidad, se está trabajando para intentar paliar los síntomas y el avance de la enfermedad, así como desarrollar modelos experimentales para esclarecer cuales son los procesos biológicos que se encuentran alterados.

En nuestro estudio, hemos empleado el modelo de experimentación animal *Drosophila melanogaster* para comprobar si, al igual que en otros modelos animales y en pacientes, la pérdida sináptica realmente es un efecto temprano y precede a la pérdida neuronal también en este modelo. Además, el diseño experimental, que permite dirigir la expresión del péptido amiloide a tipos celulares definidos, ha posibilitado discernir si existen efectos específicos dependientes del tipo de péptido amiloide, o del componente sináptico en el que se expresa (pre- vs. post-sináptico). Finalmente, hemos investigado la posibilidad de modular la actividad de la vía PI3K, recientemente implicada en procesos sinaptogénicos, como terapia para revertir los daños sinápticos inducidos por A $\beta$ . Nuestros estudios constatan que, de nuevo, *Drosophila* es un animal de experimentación adecuado y sencillo para el estudio de la de la EA, y, más concretamente, que su unión neuromuscular adulta es un excelente modelo para el estudio de los mecanismos de pérdida sináptica asociados a la enfermedad.

Junto con trabajos de otros grupos también en modelos de *Drosophila*, nuestro estudio muestra interesantes similitudes entre las alteraciones observadas en la mosca y las patologías descritas en modelos murinos de EA y cerebros de pacientes de Alzheimer. Primero, hemos confirmado que, como ya estaba descrito, la expresión del péptido amiloide en neuronas de *Drosophila* conlleva pérdida neuronal progresiva y longevidad reducida. La neurodegeneración es característica de los pacientes de EA, pero se observa rara vez en los modelos murinos. Segundo, hemos demostrado que la expresión en motoneuronas de las tres variantes del péptido amiloide (A $\beta$ <sub>40</sub>, A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>ARC) provoca una pérdida temprana de sinapsis. Así, hemos observado que dicha pérdida sináptica comienza en estadios tempranos de la vida adulta de *Drosophila*, aunque no se observa en larva, y que es mayor en edades avanzadas, lo que nos indica que el proceso sinaptotóxico es comparable al de otros

modelos de experimentación. De este modo, probamos en *Drosophila* lo que ya se había demostrado anteriormente tanto en pacientes como modelos celulares o transgénicos murinos (Masliah y Terry 1993; Heinonen y col. 1995; Selkoe 2002; Oddo y col. en 2003; Coleman y col. 2004), que la presencia del péptido amiloide promueve degeneración sináptica en estadios tempranos de la enfermedad, que este defecto es sólo observable en estadios adultos, y que empeora con el envejecimiento.

Finalmente, utilizando de nuevo *Drosophila* como modelo, hemos propuesto un paradigma de recuperación sináptica mediante la sobreactivación de PI3K. Esto lo hemos hecho teniendo en cuenta que PI3K presenta funciones de supervivencia neuronal (Brunet y col. 2001) y a su reciente implicación en procesos de sinaptogénesis tanto en *Drosophila* como en mamíferos (Martín-Peña y col. 2006; Cuesto y col. 2011). Así, hemos confirmado que la sobre-activación de PI3K es capaz de revertir la pérdida sináptica inducida por A $\beta$  en la unión neuromuscular adulta, y de mejorar en algunos casos el fenotipo neurodegenerativo.

Todos estos descubrimientos abren nuevas vías de estudio en la EA. Por un lado, proponemos un nuevo modelo en el que se pueden estudiar los mecanismos moleculares de la pérdida sináptica de forma sencilla, usando la terminación neuromuscular adulta de *Drosophila*. Por otro, iniciamos otra posible estrategia en el intento de recuperación y tratamiento de los síntomas tempranos de la EA, mediante el estudio de la interacción del péptido amiloide y la ruta de PI3K.

### **1. NEUROTÓXICIDAD DEBIDA A LA EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS FORMAS DEL PÉPTIDO AMILOIDE: EFECTOS SOBRE LONGEVIDAD Y SUPERVIVENCIA NEURONAL**

Los efectos neurotóxicos *in vivo* se han evidenciado tradicionalmente cuantificando la pérdida neuronal y reducción en la esperanza de vida. Uno de los fenotipos más característicos y bien documentados del péptido amiloide es la aparición de neurodegeneración en el sistema nervioso de *Drosophila*, y la reducción en la longevidad de las moscas adultas (Crowther y col 2005; Finelli y col. 2004; Iijima y col. 2004; Iijima y Iijima-Ando 2008; Luheshi y col. 2007). En general, la presencia de A $\beta$ <sub>40</sub> no produce pérdida neuronal ni reduce la esperanza de vida media y máxima, mientras que las variantes A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>ARC provocan neurodegeneración progresiva y longevidad reducida, siendo la variante A $\beta$ <sub>42</sub>ARC la que presenta fenotipos más severos. A pesar de que nuestros resultados son

consistentes y confirman lo observado por otros grupos investigadores, advertimos algunas diferencias en cuanto a la progresión temporal de los fenotipos. Puesto que la magnitud y desarrollo de los fenotipos dependientes de A $\beta$  descritos en la literatura es muy variable, y depende no sólo de las líneas transgénicas utilizadas, sino también de las condiciones experimentales, las diferencias observadas entre nuestros datos y los ya publicados es probablemente atribuible a diferencias técnicas.

Para cuantificar la toxicidad neuronal asociada a las distintas formas amiloides, expresamos tres variantes del péptido amiloide (de menor a mayor toxicidad, A $\beta_{40}$ <A $\beta_{42}$ <A $\beta_{42}$ ARC) con el promotor panneural *elav-Gal4*. Estas mismas líneas transgénicas (Crowther y col. 2005) y condiciones experimentales muy similares (Iijima y col. 2004; Iijima y col. 2008) han sido utilizadas previamente para estudiar el efecto neurotóxico del péptido amiloide. Consistente con estos trabajos previos, nosotros observamos que la acumulación de A $\beta_{40}$  no produce neurodegeneración ni afecta a la longevidad, mientras que la expresión de A $\beta_{42}$  o A $\beta_{42}$ ARC produjo un fenotipo neurodegenerativo y una reducción considerable de la longevidad. Que la neurodegeneración se detecta ya a los 15 días de edad demuestra que el daño neuronal provocado por la acumulación de estos péptidos es relativamente temprano. Sin embargo, nuestros datos de edad de aparición de los primeros signos de neurodegeneración y de vida media y esperanza de vida máxima difieren de los descritos por otros autores (Crowther y col. 2005; Iijima y col. 2004; Iijima y col. 2008). Estas discrepancias pueden explicarse por diferencias en los niveles de expresión de los péptidos debidos al *driver*, líneas transgénicas UAS, o temperatura de cultivo (puesto que Gal4 tiene actividad transcripcional máxima a temperaturas cercanas a 30°C, Brand y Perrimon 1993). Pero además, estas las diferencias relativas a neurodegeneración pueden deberse a que nuestro método de evaluación de pérdida neuronal se ha mejorado y automatizado, de forma que se pueden detectar desde pequeñas a grandes vacuolizaciones en todo el cerebro de la mosca. Así pues, bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, la neurodegeneración causada por la expresión de las formas derivadas de A $\beta_{42}$  se observa ya a 15 días de edad, y por lo tanto será necesario medir este efecto en edades más tempranas para determinar en qué punto se empieza a hacer evidente la pérdida neuronal.

A pesar de que nuestros resultados confirman lo observado por otros grupos investigadores, en nuestro caso aparecen dos diferencias fundamentales. Por un lado, aunque se observa una mayor degeneración a 20 que a 15 días de edad, esta diferencia no es significativa (Figura 18). Esto podría deberse a que son edades muy cercanas, y a la elevada

variabilidad en los datos. Por otro lado, varios trabajos han descrito que la presencia del péptido amiloide con la mutación Arctic produce un fenotipo neurodegenerativo más severo que la expresión del péptido salvaje (Crowther y col. 2005; Iijima y col. 2008). La mutación Arctic parece aumentar la tendencia de agregación del péptido, formando especies oligoméricas más rápidamente y con mayor propensión a formar protofibrillas (Nilsberth y col. 2001; Johansson y col. 2006), lo que explicaría su mayor efecto neurotóxico. De hecho, se ha demostrado la correlación entre la toxicidad de los distintos péptidos amiloides, predicha por algoritmos computacionales que calculan la propensión a agregación del péptido, y su efecto negativo sobre la longevidad *in vivo* cuando se expresan en neuronas de *Drosophila* (Luheshi y col. 2007). Sin embargo, nuestros datos muestran que el grado de neurodegeneración inducido por los dos péptidos es igual tanto a los 15 como a los 20 días de edad. Aparte de las ya mencionadas diferencias experimentales, esta disparidad podría deberse a lo temprano de nuestras observaciones. Esta hipótesis está apoyada por los estudios de longevidad, que muestran un rápido descenso en la supervivencia asociado a la expresión del péptido mutado, de manera que los valores de vida media y esperanza de vida máxima en las moscas que expresan A $\beta$ <sub>42</sub>ARC están muy próximos. Así, proponemos que el potente poder neurotóxico ejercido por la variante más amiloidogénica A $\beta$ <sub>42</sub>ARC requiere un tiempo para desarrollarse, y formar los agregados tóxicos, que una vez formados conducirán a una rápida muerte neuronal y neurotoxicidad. Esta hipótesis predice que a partir de una edad posterior a 20 días, el curso temporal de la neurodegeneración de A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>ARC debería ser distinto, más progresivo para el primero y más abrupto para el segundo. Por tanto, un análisis de neurodegeneración a edades posteriores nos permitiría comprobar si esta predicción se cumple.

Para los análisis de longevidad, decidimos comprobar el efecto de la expresión del péptido amiloide dirigida por los promotores empleados para el estudio en la unión neuromuscular de *Drosophila* (el de motoneurona y el muscular). La expresión muscular de los distintos tipos de péptidos no produjo ningún efecto significativo sobre la supervivencia de los individuos. Por el contrario, la expresión en motoneuronas de los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub>, A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>ARC, dio lugar a unos resultados muy similares a los descritos anteriormente en la bibliografía con los promotores panneurales (Iijima y col. 2004; Crowther y col. 2005; Iijima y col. 2008), ya que A $\beta$ <sub>40</sub> no produjo ningún efecto significativo, mientras que A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>ARC generaron una drástica reducción en la longevidad máxima de los individuos, sobre todo con el péptido que tenía la mutación Arctic. El efecto tan divergente obtenido con los *drivers* muscular y de motoneuronas sugiere que la letalidad inducida por A $\beta$  se debe a su efecto



tóxico en neuronas, y no en otros tejidos tales como músculos y tráqueas. El que los efectos sean similares con expresión panneural y con expresión dirigida por Gal4-D42 no es sorprendente, ya que, aunque este promotor ha sido descrito como único de motoneuronas (Parkes y col. 1998), recientemente se ha demostrado que se expresa en numerosas células del sistema nervioso sin identificar (ver Figura 11, Legan y col. 2008; Wu y col. 2010), además de en el cardias y en glándulas salivares.

## **2. LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO AMILOIDE EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE *Drosophila* PROVOCA PÉRDIDA SINÁPTICA TEMPRANA**

La pérdida sináptica es un evento temprano que se correlaciona con el declive cognitivo en los pacientes con EA y que ha sido ampliamente descrito en humanos y modelos murinos (Terry y col. 1991; Selkoe 2002; Coleman y col. 2004). En *Drosophila*, los datos sobre el efecto sinaptotóxico del péptido amiloide se restringen a estudios comportamentales y electrofisiológicos. En general, la expresión neuronal de A $\beta$  induce defectos comportamentales tempranos, detectados antes de que la neurodegeneración sea evidente, y se agravan con la edad (Crowther y col. 2005; Iijima y col. 2008, Zhao y col. 2010). Estudios electrofisiológicos y ultraestructurales del efecto de la expresión de A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>ARC en el circuito adulto de la Fibra Gigante, que controla los músculos del vuelo, también muestra defectos fisiológicos tempranos, y una reducción progresiva en el número de mitocondrias en el terminal presináptico a nivel de la unión neuromuscular (Zhao y col. 2010). Por tanto, estos datos sugieren que, también en *Drosophila*, los defectos sinápticos asociados a la presencia del péptido son tempranos, pero hasta ahora no existía una evidencia cuantitativa de la magnitud y progresión de la pérdida sináptica. Por tanto, nuestro trabajo representa la primera demostración de que el péptido amiloide induce un descenso en el número de sinapsis en el adulto desde edades muy tempranas, y de que este descenso se hace más acusado a edades cada vez más avanzadas. Además, nuestro trabajo desvela peculiaridades muy interesantes atribuibles a cada tipo de péptido, y, en definitiva, establece un modelo en el que analizar los mecanismos que explican estas observaciones.

Nuestra primera aproximación al estudio del efecto de A $\beta$  en la NMJ de *Drosophila* lo realizamos en el estadio larvario. Dicho análisis mostró que la presencia del péptido amiloide, en cualquiera de sus variantes, en la NMJ larvaria no produjo ningún efecto observable sobre el número de sinapsis activas ni de botones en la terminal. Sin embargo, el

que la presencia del péptido no modifique la estructura ni la cantidad de sinapsis de la terminación, no quiere decir que no pueda estar influyendo en la función de ambas. De hecho, recientemente se ha demostrado mediante estudios electrofisiológicos en la NMJ larvaria de *Drosophila*, que la expresión neuronal de  $A\beta_{42}$  (pero no de  $A\beta_{40}$ ), disminuye la transmisión sináptica (medida como EJC, corrientes excitatorias de la unión *-excitatory junction currents-*) y la tasa de exocitosis de la vesículas sinápticas (Chiang y col. 2009). Esto es consistente con diversos estudios en hipocampo en los que demuestran un efecto agudo del péptido amiloide, que se registra como una disminución en el LTP inmediatamente después de administrar el péptido (Kim y col. 2001; Li y col. 2011). Así, aunque los efectos de la acumulación del péptido amiloide no comprometan el número de sinapsis, o de botones y ramas, si puede alterar su normal funcionamiento.

En vista de los resultados en larva, nos centramos en la terminación neuromuscular adulta. Este modelo se aproxima más a los datos relacionados con la EA, que demuestran que los defectos sinápticos ocurren en edad adulta, avanzada. Nuestros datos demuestran que la expresión presináptica de las 3 variantes peptídicas induce una disminución temprana en el número de sitios activos, que comenzaba a hacerse notar ya a los 3 días de edad. Puesto que en el sistema larvario no encontramos diferencias significativas entre la presencia o ausencia del péptido amiloide (en ninguna de sus tres variantes), la pérdida sináptica hallada en el sistema adulto podría estar relacionada con la acumulación del péptido en la motoneurona a lo largo del desarrollo y la vida del individuo. De hecho, aunque durante la metamorfosis se crean nuevas terminaciones neuromusculares, la mayoría, sino todas las motoneuronas que inervan los músculos abdominales adultos son motoneuronas larvarias que se remodelan durante la metamorfosis, pero que nacen en periodo embrionario (Tissot y Stocker 2000). Aunque nosotros no hemos comprobado si se produce acumulación amiloide en las terminales de la unión neuromuscular, otros investigadores han documentado este evento en el cerebro y retina de *Drosophila* a partir de los 10 días de edad (Iijima y col. 2004; Crowther y col. 2005; Iijima y col. 2008), así como la formación de fibrillas en larvas con expresión muscular de  $A\beta$  (Chiang y col. 2009). Así pues, las especies tóxicas amiloides irían acumulándose en la motoneurona desde el periodo embrionario. Esto podría explicar el hecho de detectar pérdida sináptica ya a los 3 días después de la eclosión del imago.

A pesar de que se ha demostrado que la variante  $A\beta_{40}$  es la forma mayoritaria y menos agregante, y por tanto siempre se ha creído que menos tóxica que  $A\beta_{42}$  y sus derivados

mutantes (Jarrett y col. 1993; Younkin 1995), varios estudios han demostrado que inhibe LTP *in vivo*, aunque con un efecto menos potente que  $A\beta_{42}$  (Cullen y col. 1997), y provoca daño sináptico reduciendo la proteína de la densidad postsináptica 95 (PSD-95) en cultivos celulares (Roselli y col. 2005) (para una revisión detallada de los variados efectos de cada péptido ver Peña y col. 2006). Además, la expresión panneural de  $A\beta_{40}$  en *Drosophila* origina defectos tempranos de memoria a corto plazo (Iijima y col. 2004 y 2008). Nuestros datos confirman que la variante menos amiloidogénica del péptido amiloide es perjudicial para el componente sináptico también en *Drosophila*, y proporcionan la primera demostración de el efecto sinaptotóxico de  $A\beta_{40}$  que explicaría las alteraciones tempranas en memoria observadas. Sin embargo, aunque la presencia de  $A\beta_{40}$  muestra un descenso en el número de sinapsis, el patrón de fluctuación con la edad es muy diferente al mostrado en la terminación normal o con las variantes  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}ARC$ , que demuestran un efecto específico y diferencial de este péptido, y sugiere un posible papel fisiológico (ver más adelante). Además, la demostración de que  $A\beta_{40}$  produce defectos sinápticos, pero no neurodegeneración o letalidad temprana, sugiere que los defectos sinaptotóxicos y neurotóxicos son independientes. Un estudio reciente en *Drosophila* ha mostrado que  $A\beta_{42}$  produce niveles de agregados oligoméricos solubles mucho mayores que  $A\beta_{40}$ , aunque ambos forman depósitos insolubles a velocidades comparables, y que esta propiedad correlaciona con mayor degeneración neuronal y menor longevidad (Speretta y col. 2012). Por tanto, es posible que los efectos sinaptotóxicos y neurotóxicos residan en formas de agregación del péptido diferentes.

El análisis del progreso temporal de los defectos sinápticos inducidos por  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}ARC$  pone de manifiesto dos aspectos adicionales importantes. Primero, la magnitud de la disminución sináptica es mucho mayor en moscas que expresan  $A\beta_{42}ARC$  que en las que expresan  $A\beta_{42}$ . Esto es consistente con numerosos estudios en mamíferos y en *Drosophila*, que demuestran la mayor toxicidad de la forma mutada (Chen y col. 2004; Lord y col. 2006; y revisado en Iijima-Ando e Iijima 2010). Segundo, la pérdida sináptica es más acusada a edades más avanzadas, como revela la mayor pendiente de la progresión temporal de pérdida sináptica a partir de los 15 días de edad para las terminaciones que expresan  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}ARC$  con respecto a las terminaciones control (Figura 29). De nuevo este dato es consistente con el progreso de la EA, y con datos *in vitro* e *in vivo* sobre el curso temporal de los defectos sinápticos dependientes de  $A\beta$  tanto en mamíferos como en *Drosophila* (revisado en Iijima-Ando e Iijima 2010, Wasling y col. 2009, y Wilcox y col. 2011). En resumen, nuestros resultados son consistentes con los conocimientos sobre el modo de acción del péptido

amiloide sobre la función sináptica, y establecen la terminación neuromuscular adulta como un modelo ideal en el que estudiar los mecanismos subyacentes.

### **3. LOS EFECTOS SINAPTOTÓXICOS DEL PÉPTIDO AMILOIDE DEPENDEN DE QUE SU EXPRESIÓN SEA PRE- O POST-SINÁPTICA**

Varios estudios han descrito que el péptido amiloide se pueda unir a componentes presinápticos, como la sinapsina (Evans y col. 2008), o a componentes postsinápticos, como PSD-95 (Lacor y col. 2004), lo que refleja la posibilidad de que  $A\beta$  muestre distintos mecanismos de actuación dependiendo de si se expresa pre o postsinápticamente. Además, las formas del péptido expresado son secretables, y por tanto podrían actuar intracelularmente, o extracelularmente en el componente pre y/o postsináptico. Nosotros hemos abordado esta cuestión comparando los defectos sinápticos promovidos por la expresión del péptido  $A\beta$  en la motoneurona (presináptico) o en el músculo (postsináptico), y hemos detectado diferencias claras. Varios investigadores han estudiado si el péptido con la secuencia de secreción se acumula intracelularmente o es secretado al expresarlo en *Drosophila*. Algunos afirman que el péptido se secreta de forma normal, ya que han encontrado que el péptido aparece en los componentes de la vía secretora y además en células gliales, lo que indica que las neuronas que lo expresan lo secretan y es captado por la glia (Iijima y col. 2008). Sin embargo, otros investigadores al expresar el péptido en motoneuronas ven que se acumula preferentemente de forma intracelular y que muy poca cantidad es secretada (Zhao y col. 2010). En cultivos de células S2 de *Drosophila* que expresan  $A\beta_{42}$  observan que la presencia del péptido es mayoritariamente intracelular y muy poco se secreta, mientras que en las que expresan  $A\beta_{42}$ ARC no encuentran péptido secretado (Crowther y col. 2005). De este modo, según los estudios anteriormente descritos, parece que el péptido se acumula en el interior celular preferentemente, pero en nuestro caso no sabemos cual es su localización lo que requeriría un análisis más exhaustivo.

Si bien las tres variantes peptídicas indujeron una reducción en el número de sinapsis cuando su expresión se dirigió a motoneuronas, la expresión postsináptica de  $A\beta_{40}$  no provocó ningún cambio en la unión neuromuscular, mientras que las expresiones de  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}$ ARC de nuevo redujeron el número de sinapsis. Así, a pesar de que la toxicidad de  $A\beta_{40}$  ha sido demostrada (Roselli y col. 2005; y esta tesis), el hecho de que su expresión muscular no genere ningún efecto sináptico es consistente con lo observado por Chiang, donde la

expresión muscular de  $A\beta_{40}$  no alteraba el normal funcionamiento de NMJ larvaria, medido como tasa de exocitosis o la transmisión sináptica (Chiang y col. 2009). En dicho trabajo, argumentan que este efecto se debe a que la especie menos agregante ( $A\beta_{40}$ ) no tiene efectos tóxicos, como se ha demostrado en estudios de neurodegeneración y longevidad, (Iijima y col. 2004; Crowther y col. 2005; Iijima y col. 2008). Esto sería así, si la expresión en motoneuronas no hubiera tenido efectos deletéreos. Cual es la causa de este efecto diferencial, nos resulta desconocida. En la bibliografía no hay estudios de expresión postsináptica de  $A\beta_{40}$ , sólo se describe su efecto en cultivos neuronales expuestos a oligómeros solubles (Roselli y col. 2005). De esta manera, podría suceder que en nuestro modelo, el péptido, a pesar de tener una señal que hace que se secrete, no lo haga y se acumule en el músculo no generando daño. O que si es secretado, en el exterior celular se acumule en forma de fibrillas o agregados mayores, haciéndose inocuo para la sinápsis, como postulan Chiang y col. en 2009.

Estudiando las variables estructurales de la terminación, definidas por el número de botones y de ramas, la expresión presináptica de  $A\beta_{40}$  o  $A\beta_{42}$  no modificó ni el número botones ni el de ramas. No sucedió así con la expresión de  $A\beta_{42}$ ARC, en donde su presencia redujo tanto los botones como las ramas (ver Figura 28 de Resultados). La expresión muscular de  $A\beta_{40}$ , al igual que se observó en el número de sinapsis, tampoco promovió ningún cambio morfológico significativo. Sin embargo, tanto la presencia de  $A\beta_{42}$  como la de  $A\beta_{42}$ ARC en el músculo, redujeron el número de botones pero no alteraron el de ramas.

Así, parece que la presencia de  $A\beta_{40}$  no tiene ningún efecto sobre la formación de botones y ramas, independientemente del componente de la NMJ desde el que se exprese. Lo que una vez más, confirma que la toxicidad de dicho péptido es diferente de las variantes de  $A\beta_{42}$ . El efecto diferencial mostrado por la expresión pre o postsináptica de  $A\beta_{42}$ , es algo más complejo de explicar. Parece que la expresión en motoneuronas del péptido no resulta dañina para los componentes estructurales, mientras que si se expresa en músculo hay un efecto negativo, al menos en cuanto al número de botones se refiere. Esta disparidad puede deberse a que los procesos de secreción sean distintos, o que la unión del péptido a los componentes sinápticos sea distinta, lo que produce que actúe de forma diferencial al modular las funciones sinápticas y estructurales como proponen Chiang y col. (Chian y col. 2009) y Evans y col. (Evans y col. 2008).

Alternativamente, o paralelamente, el efecto del péptido amiloide sobre el componente postsináptico podría tener mayor repercusión sobre el des-ensamblaje de la terminación neuromuscular, ya que varios estudios sugieren un papel instructivo de la parte postsináptica en el proceso de desmantelamiento de la terminación (Liu y col. 2010). De esta forma, la expresión presináptica del péptido amiloide no tendría consecuencias en la remodelización de la estructura de la terminación y los botones, mientras que la expresión postsináptica alteraría el normal funcionamiento de elementos postsinápticos tales como Dlg y GluR, conduciendo a la eliminación de botones de forma no controlada. Por otra parte, en *Drosophila* se ha visto que el crecimiento de los botones en la NMJ larvaria requiere una expresión aumentada de la subunidad DGluR-IIA del receptor de glutamato postsináptico (Reiff y col. 2002; Sigrist y col. 2002). Esto indica que este receptor media las señales de transmisión de la NMJ involucradas en la regulación del desarrollo morfológico de la terminación larvaria. Puesto que se sabe que la presencia del péptido amiloide es capaz de disminuir la cantidad de estos receptores así como su funcionalidad (Shankar y col. 2007; Li y col. 2009), una explicación para la reducción del número de botones observada en nuestro estudio, sería que el péptido está interfiriendo con el receptor de glutamato postsináptico y por tanto en el normal desarrollo de los botones del terminal sináptico.

Por último, A $\beta$ <sub>42</sub>ARC también mostró un efecto diferencial en cuanto a botones y ramas se refiere, puesto que su expresión en motoneuronas afectó negativamente a ambos componentes estructurales, mientras que su expresión muscular sólo modificó a los botones. Estas diferencias, podrían deberse a que este péptido resulta mucho más tóxico y agregante que los otros dos, lo que aumenta los efectos sinaptotóxicos, citotóxicos y de remodelización de la terminal anteriormente descritos.

#### **4. LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA DE PI3K PROMUEVE LA FORMACIÓN SINÁPTICA Y ES CAPAZ DE RECUPERAR EL FENOTIPO DE PÉRDIDA SINÁPTICA PROVOCADO POR A $\beta$**

La implicación de la ruta de PI3K en la supervivencia neuronal (Brunet y col. 2001), en la morfogénesis dendrítica (Ruggero y Sonenberg 2005; Jaworski y Sheng 2006), o en la polaridad y crecimiento de neuritas (Jiang y Rao 2005), está bien documentada. Una propiedad menos estudiada debido a su reciente descubrimiento, es su implicación en los procesos sinaptogénicos (Martín-Peña y col. 2006; Cuesto y col. 2011), consistentes con estudios que la han implicado en procesos de plasticidad sináptica y formación de memoria



(Opazo y col. 2003; Chen y col. 2005). Nosotros hemos explorado esta capacidad para intentar rescatar el fenotipo de pérdida sináptica provocado por A $\beta$  encontrado en nuestro sistema de estudio.

Primeramente comprobamos si la sobreactivación de PI3K en la motoneurona a lo largo del desarrollo de *Drosophila* promovía sinaptogénesis en los individuos adultos, de la misma forma que lo observado en la terminación larvaria, o en las sinapsis de interneuronas en el cerebro central (Martín-Peña y col. 2006). Efectivamente, la hiperactivación de la ruta de PI3K en motoneuronas no solo promovió el aumento del número de sinapsis en la terminación adulta, sino que además provocó una abundante arborización y crecimiento de botones del terminal axónico. Esto se corresponde con lo observado en otros modelos *in vivo* e *in vitro*, en donde la activación de la ruta a través de sus distintos efectores, también promueve dendritogénesis y crecimiento de espinas (Ruggero y Sonenberg 2005; Jiang y Rao 2005; Jaworski y Sheng 2006). Además, diversos estudios han demostrado la implicación de algunos de los componentes *downstream* de PI3K, como Akt o mTOR, así como moduladores negativos como PTEN o TSC2, en crecimiento dendrítico, de espinas y de sinapsis (Acebes y Ferrús 2001; Marygold y Leever 2002; Tang y col. 2002; Inoki y col. 2003; Tsokas y col. 2005; Kwon y col. 2006). Sin embargo todavía se desconoce el mecanismo molecular que promueve sinaptogénesis mediada por la activación de PI3K.

Después de comprobar la capacidad de morfogénesis y sinaptogénesis de la ruta de PI3K por si sola, sobreexpresamos la PI3K junto con el péptido amiloide para ver si era capaz de restaurar las sinapsis, así como la pérdida de botones y/o ramas inducida por las formas A $\beta_{42}$ . El resultado fue muy notable, ya que observamos que la sobreactivación de PI3K no solo recuperó el número de sinapsis, botones y ramas perdidos a consecuencia de la expresión en motoneuronas del péptido amiloide, sino que consiguió que los valores de dichas variables se situaran por encima de los controles. Estos datos abren la posibilidad de estudiar la modulación de la ruta PI3K como terapia de recuperación sináptica en la EA.

A pesar del claro efecto de recuperación de sinapsis promovido por PI3K, cabe destacar que los individuos que expresaban el péptido amiloide y además sobreexpresaban PI3K no alcanzaron los valores sinápticos morfo-funcionales observados con la expresión de PI3K sola. Estas diferencias se pueden deber principalmente a dos causas. Por una parte, a pesar de que PI3K promueve la formación de sinapsis, botones y ramas (Acebes y Ferrús 2001; Marygold y Leever 2002; Tang y col. 2002; Inoki y col. 2003; Tsokas y col. 2005; Kwon y col.

2006; Martín-Peña y col. 2006; Cuesto y col. 2011; esta tesis), el efecto sinaptotóxico del péptido amiloide produciría una reducción de sinapsis por un mecanismo independiente de la vía, y por tanto contrarrestaría los efectos sinaptogénicos de PI3K. Por otro lado, el péptido podría estar interactuando con componentes de la ruta de PI3K, y por tanto interfiriendo con su normal funcionamiento, lo que haría que su activación no fuese tan efectiva. Esta segunda posibilidad está apoyada en estudios que han demostrado la alteración de esta vía en la EA, y la acción del péptido sobre distintos componentes de la ruta, incluyendo receptores activadores y diversas dianas (ver Introducción).

En *Drosophila* también se ha investigado la relación de A $\beta$  con la ruta de PI3K. Así, Sofola y col. en el 2010, demostraron que la expresión de A $\beta$ <sub>42</sub>ARC promovía la activación de Shaggy (el homólogo en *Drosophila* de GSK-3, que se inhibe por la activación de PI3K), y que la inhibición de la GSK-3 (genéticamente, con un dominante negativo, o farmacológicamente con litio), reduce los niveles de A $\beta$ , así como sus efectos neurotóxicos sobre longevidad. Por tanto, proponen que debe existir una interacción recíproca entre GSK-3 y A $\beta$ . Puesto que se ha descrito que la activación de GSK-3 en motoneuronas de *Drosophila* frena el crecimiento de la terminación neuromuscular larvaria (Franco y col. 2004; Martín-Peña y col. 2006), la activación de esta kinasa por A $\beta$  interferiría en la activación de la ruta PI3K, y reduciría su efecto sinaptogénico. Sin embargo, otros investigadores han descrito que la expresión de A $\beta$ <sub>42</sub> provoca el aumento en la LTD en la terminación neuromuscular larvaria por un mecanismo que depende de la activación de PI3K (Chiang y col. 2010). De hecho los fenotipos de pérdida de memoria generada por la presencia de A $\beta$  se mejoran con la inhibición de la ruta, y esta mejora correlaciona con una disminución moderada en los niveles de oligómeros solubles, pero dramática para las formas fibrilares insolubles. En resumen, aunque los resultados sobre los mecanismos que median la interacción entre A $\beta$  y la ruta de PI3K son contradictorios, conducen a la misma consecuencia: la interacción del péptido amiloide con los componentes de la ruta de PI3K genera media parte de los efectos tóxicos del péptido. Se necesitarán estudios adicionales para dilucidar los mecanismos específicos que explican nuestros resultados en base a este proceso.



## 5. LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA DE PI3K ES CAPAZ DE RECUPERAR LA PÉRDIDA SINÁPTICA PERO NO DE ELIMINAR POR COMPLETO LA DEGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO INDUCIDA POR A $\beta$

La implicación del péptido amiloide en la degeneración del sistema nervioso ha sido ampliamente demostrada tanto en humanos (Behl y col. 1994; Mattson 2000; Selkoe 2002; Scheff y Pride 2006), como en modelos de ratón (para una revisión ver Wirths O. y Bayer TA 2012) y en *Drosophila* (Iijima y col. 2004; Crowther y col. en 2005; Iijima y col. 2008; esta tesis). Así pues, debido a la implicación de la ruta de PI3K en el crecimiento y supervivencia celular y neuronal (Brunet y col. 2001; Cantley 2002) y en vista de los resultados de recuperación sináptica, decidimos investigar si la sobreactivación de PI3K era capaz también de recuperar el fenotipo neurodegenerativo desencadenado por A $\beta_{42}$  y A $\beta_{42}$ ARC.

La sobreexpresión de PI3K no produce signos de neurodegeneración, al menos a 15 y 20 días de edad. Es lógico que, ya que A $\beta_{40}$  no produjo ningún fenotipo degenerativo, la co-expresión del péptido y PI3K no muestre ningún cambio significativo con los controles. Sin embargo, el fenotipo neurodegenerativo producido por A $\beta_{42}$  a los 15 días e vió reducidos por la sobre-activación de la vía PI3K hasta los niveles basales. Por tanto, la sobreactivación de PI3K es capaz de evitar la muerte celular causada por esta forma del péptido amiloide. Sin embargo, la comparación del fenotipo neurodegenerativo a los 20 días indica que a esta edad el rescate fenotípico atribuible a PI3K es menor, ya que la neurodegeneración de los individuos que co-expresaban A $\beta_{42}$  y PI3K no se podía diferenciar estadísticamente de la de los que sólo expresaban el péptido ni de los controles sin neurodegeneración. Esto puede deberse a que la acumulación del péptido a esta edad, y su consiguiente neurotoxicidad, sea mayor. Si esto fuera cierto, deberíamos dejar de observar rescate a edades más tardías. Por otro lado, la disparidad entre los datos, lo cual genera una desviación estándar elevada, también puede estar influenciado las diferencias estadísticas. Por lo tanto, aunque nuestros datos demuestran que la activación de PI3K puede, al menos, retrasar la neurodegeneración inducida por A $\beta_{42}$ , tendríamos que aumentar el n de los experimentos y examinar cerebros a edades más avanzadas para poder obtener conclusiones definitivas.

A pesar del claro efecto de PI3K en la reversión de la neurodegeneración causada por A $\beta_{42}$  a los 15 días de edad, la sobre-activación de PI3K no fue suficiente para revertir la neurodegeneración debida a la presencia de A $\beta_{42}$ ARC, a ninguna de las dos edades estudiadas. Este dato es especialmente sorprendente si consideramos que los niveles de neurodegeneración causados por ambos péptidos son indistinguibles a estas dos edades.

Estos datos de nuevo muestran diferencias no sólo cuantitativas, sino sobre todo cualitativas sobre el modo de acción de los distintos péptidos. Como ya se ha descrito, el péptido amiloide es capaz de interferir directamente en las dianas de señalización de la ruta PI3K. Concretamente, en *Drosophila* se ha demostrado que el efecto neurotóxico de  $A\beta_{42}$ ARC está mediado por la activación de GSK-3 que (Sofola y col. 2010), y que  $A\beta_{42}$ ARC genera una toxicidad mayor debido a su facilidad para agregarse (Crowther y col. 2005, Iijima y col. 2008; Zhao y col. 2010). Por lo tanto, es posible que la falta de efecto de PI3K sobre la neurodegeneración dependiente de  $A\beta_{42}$ ARC se deba a que este péptido tiene un efecto bloqueante de la propia vía PI3K considerablemente mayor. Sería necesario analizar neurodegeneración a edades más tempranas para obtener más datos consistentes con esta hipótesis.

**6. LAS TRES VARIANTES DEL PÉPTIDO AMILOIDE,  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  Y  $A\beta_{42}$ ARC, PRESENTAN EFECTOS SINAPTOTÓXICOS CUALITATIVA Y CUANTITATIVAMENTE DISTINTOS**

La mayoría de los modelos transgénicos murinos en los cuales se ha conseguido reproducir patologías similares a la EA consisten en la expresión de formas mutadas de los genes humanos familiares de EA (*APP* y *PSENs*). En estos modelos, el procesamiento proteolítico de *APP* da lugar a múltiples variantes del péptido  $A\beta$ . Por el contrario, experimentos en *Drosophila* han demostrado que la expresión del péptido amiloide humano, y no de su precursor, es capaz de recapitular muchas de las características patológicas de la enfermedad (para una revisión ver Iijima-Ando e Iijima 2010). Este hecho presenta una clara ventaja: podemos diseccionar *in vivo* los efectos diferenciales de cada una de las formas del péptido amiloide, expresando única y exclusivamente la variante objeto de estudio. Además, *Drosophila* posee un único gen *APP-like*, a diferencia de los tres en el genoma de mamíferos. De esta forma, la mosca permite estudiar si existe una relación entre el péptido amiloide y la función de *APP*, una cuestión que aún está por resolver. Nuestros datos han revelado interesantes diferencias debidas a la expresión presináptica de estos tres péptidos, no sólo a nivel del tipo de defecto, sino, y muy especialmente, en cuanto a la progresión temporal de la pérdida sináptica inducida por  $A\beta$ .

La diferencia más notoria es que, mientras que la pérdida sináptica producida por las variantes  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}$ ARC mantenía el patrón de oscilación edad-dependiente de las sinapsis similar a los controles (ver Figura 29 de Resultados), la expresión de  $A\beta_{40}$  produjo una

reducción que no siguió dicho patrón y que hizo que el número de sinapsis activas fuera igual y constante en todas las edades estudiadas. Este curioso efecto se mantiene incluso en condiciones en que se produce un sobre-crecimiento de la NMJ, como el inducido por la activación de la vía PI3K (Figura 40 de Resultados). Esto nos indica que  $A\beta_{40}$  tiene un efecto específico en la formación o eliminación de sinapsis que es independiente de la sobreactivación de PI3K, puesto que sigue desligando el descenso sináptico al avance de la edad del individuo. En base a estos resultados proponemos que  $A\beta_{40}$  previene la formación de nuevas sinapsis, mientras que  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}$ ARC inducen la eliminación de sinapsis.

Además de esta interesante peculiaridad de  $A\beta_{40}$ , las diferencias entre  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}$ ARC también merecen ser destacadas. En general,  $A\beta_{42}$ ARC presenta fenotipos mucho más severos que  $A\beta_{42}$ , lo cual es consistente con los datos que muestran mayor propensión a gregarse. Pero además,  $A\beta_{42}$ ARC parece afectar a la morfología del terminal sináptico, mientras que el efecto de  $A\beta_{42}$  afecta esencialmente a los sitios activos. Por último,  $A\beta_{42}$ ARC produce un fenotipo neurodegenerativo que no se puede revertir por PI3K, mientras que el de  $A\beta_{42}$  sí. La terminación neuromuscular adulta supone un buen modelo en el que desentrañar el por qué de estas diferencias.

En conjunto, los datos confirman, en primer lugar, que la presencia del péptido amiloide en *Drosophila*, provoca pérdida sináptica temprana (desde los 3 días), probablemente antes de la aparición de los primeros síntomas de neurodegeneración (15 días en los casos de  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}$ ARC). Por otra parte, también se demuestra que el efecto de la variante del péptido que se encuentra más aumentada en enfermos con EA, como es  $A\beta_{42}$  y su variante con la mutación Arctic, producen un efecto negativo mucho más acusado que la variante más común  $A\beta_{40}$ , lo que se corresponde con los datos bibliográficos (Younkin 1995; Iijima y col. 2004; Crowther y col. 2005; Iijima y Iijima-Ando 2008). Además, podemos afirmar que dependiendo de donde expresemos el péptido y a pesar de que este se secrete, podemos encontrar efectos diferenciales. Esto último se puede relacionar con los datos obtenidos por Chiang y col. en 2009, en donde también veían un efecto diferencial en la transmisión sináptica debido a la expresión pre o postsináptica del péptido amiloide.

## 7. ¿PODEMOS ASIGNAR UNA FUNCIÓN FISIOLÓGICA A $A\beta$ TAMBIÉN EN *Drosophila*?

Este trabajo presenta un dato sorprendente: la expresión de  $A\beta_{40}$  en motoneuronas es capaz de “bloquear” los cambios, aumentos o descensos, dependientes de edad en el número de sinapsis. ¿Cómo explicar este fenómeno? Que la presencia del péptido amiloide es sinaptotóxica está ampliamente demostrada (Selkoe 2002; Wirts y col. 2004; Selkoe 2008; Arendt 2009). Si embargo, recientemente se ha propuesto que el péptido en condiciones fisiológicas normales, puede jugar un papel importante en la eliminación sináptica durante el desarrollo del sistema nervioso (Wasling y col. 2009). Se apoyan para decir esto en diversos descubrimientos. Primero, se ha visto que la expresión de APP y las enzimas necesarias para la producción de  $A\beta$ , tienen un pico de expresión, entre el nacimiento y la pubertad, en el hipocampo de ratón, a la vez que se da un pico de eliminación de sinapsis glutamatérgicas. Segundo,  $A\beta$  causa modificación de los receptores postsinápticos de glutamato y retracción de espinas. Tercero, el número de sinapsis glutamatérgicas se ve incrementado en ratones APP-/-.

Así, parece plausible, que el péptido amiloide esté involucrado en la eliminación de sinapsis fisiológicamente durante el desarrollo, y patológicamente durante la EA. De hecho se ha visto que existe un efecto diferencial entre estas dos situaciones, pues mientras que la LTP madura no se ve afectada por los oligómeros de  $A\beta$ , la LTP del desarrollo no se ve afectada (Townsend y col. 2006; Wasling y col. 2009).

Con los escasos datos bibliográficos de los que disponemos, así como de los resultados de esta tesis, proponemos que es el péptido amiloide en su variante  $A\beta_{40}$  el que está implicado en los procesos de remodelación sináptica dependiente de actividad, mientras que las variantes más amiloidogénicas inducirían el daño sináptico en los procesos patológicos. Varios autores han propuesto que la función del péptido amiloide está íntimamente relacionada con la función de su precursor, APP (Waslin y col. 2009; Hoe y col. 2012), aunque no existen evidencias demostrativas. Por tanto, es posible que un factor que puede estar afectando tanto a la pérdida sináptica como a la estructura de la terminación, es la probable interacción del péptido con APPL. Desde hace mucho tiempo se conocen las propiedades de APPL en la formación de sinapsis y en la arborización neuronal (Torroja y col 1999 a y b). Además, recientemente se ha demostrado que APPL sufre un procesamiento proteolítico similar a APP, generando un péptido  $A\beta$ -like (Carmine-Simen y col. 2009). ¿Qué función

fisiológica tiene este procesamiento? Nuestra hipótesis es que el tipo de procesamiento, y por ende la liberación de  $A\beta$ , va a depender de la actividad neuronal, y del acoplamiento pre y postsináptico de esta actividad. Así,  $A\beta$  sería capaz de señalar el destino de una sinapsis en función de la actividad sináptica específica en esa sinapsis. Así, puede que la acumulación de  $A\beta$  en la terminal sináptica este interfiriendo con la señalización normal derivada del procesamiento de APPL, y esto daría lugar a la estabilidad en el número de sinapsis que se observa en la terminación neuromuscular adulta de moscas  $A\beta_{40}$ . Para estudiar este modelo, proponemos analizar el efecto de los distintos péptidos amiloides en un fondo deficiente para Appl.



# CONCLUSIONES

---





## CONCLUSIONES

1. Las tres variantes amiloides estudiadas aquí,  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}ARC$ , inducen pérdida sináptica en la NMJ adulta de *Drosophila* desde estadios muy tempranos. Puesto que sólo  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}ARC$ , pero no  $A\beta_{40}$ , inducen neurodegeneración y longevidad reducida, los efectos sinaptotóxicos del péptido parecen ser independientes de sus efectos sobre la supervivencia neuronal y del organismo.
2. Los efectos del péptido sobre la terminación neuromuscular son distintos dependiendo de si éste se expresa presinápticamente (en motoneurona) o postsinápticamente (en músculo).
3. La expresión de  $A\beta_{40}$  produce una reducción en el número de sinapsis a un valor que se mantiene constante con la edad. Por el contrario, el efecto sinaptotóxico de  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{42}ARC$  se va acentuando progresivamente con la edad. Estos datos son consistentes con los defectos progresivos observados en los enfermos de Alzheimer, y apoyan que los mecanismos por los que estos péptidos ejercen su efecto sinaptotóxico son diferentes.
4. La activación de la vía PI3K produce un crecimiento dramático de la terminación neuromuscular adulta, con un aumento en el número de sinapsis de más del 250%.
5. La activación de la vía PI3K es capaz de recuperar la pérdida sináptica inducida por el péptido amiloide. Sin embargo, la expresión del péptido amiloide tiene a su vez un efecto sinaptotóxico que interfiere con el crecimiento sináptico inducido por la vía, como se evidencia por una reducción en el efecto sinaptogénico de PI3K.
6. La activación de la vía PI3K es capaz de revertir la neurogeneración inducida por la expresión neuronal de  $A\beta_{42}$  a 15 días de edad, pero no revierte la neurodegeneración inducida por  $A\beta_{42}ARC$  en ninguna de las edades estudiadas.
7. La terminación neuromuscular adulta es un modelo ideal para el estudio de los mecanismos comunes y específicos que median los efectos sinaptotóxicos de las distintas formas de  $A\beta$ .



# BIBLIOGRAFÍA

---



**BIBLIOGRAFÍA**

**Acebes A. y Ferrús A.** *Increasing the number of synapses modifies olfactory perception in Drosophila.* Journal of Neuroscience **2001**, 21(16):6264-73.

**Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F. y col.** *The genome sequence of Drosophila melanogaster.* Science **2000**, 287, 2185-2195.

**Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** *"Molecular Biology of the Cell".* Capítulo 16: The cytoskeleton. (Pág. 935-936). Fourth edition **2002**, Garland Science.

**Alzheimer A.** *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.* Allg. Zschr. Psychiat. **1907**, 64:146-148.

**An W.L., Cowburn R.F., Li L., Braak H., Alafuzoff I., Iqbal K., Iqbal I.G., Winblad B., Pei J.J.** *Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease.* The American Journal of Pathology **2003**, 163(2):591-607.

**Anstey K.J., Lipnicki D.M., Low L.F.** *Cholesterol as a risk factor for dementia and cognitive decline: a systematic review of prospective studies with meta-analysis.* The American journal of geriatric psychiatry **2008**, 16(5):343-354.

**Arendt T.** *Synaptic degeneration in Alzheimer's disease* Acta Neuropathologica **2009**, 118(1):167-79.

**Arriagada P.V., Growdon J.H., Hedley-Whyte E.T., Hyman B.T.** *Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease.* Neurology **1992**, 42(3 Pt 1):631-639.

**Behl C., Davis J.B., Klier F.G., Schubert D.** *Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis.* Brain Research **1994**, 645(1-2):253-264.

**Benilova I., Karran E., De Strooper B.** *The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes.* Nature Neuroscience **2012**, 15(3): 349-357.

**Beramendi A., Peron S., Casanova G., Reggiani C. and Cantera R.** *Neuromuscular junction in abdominal muscles of Drosophila melanogaster during adulthood and aging.* The Journal of Comparative Neurology **2007**, 501:498-508.

**Bertram L., McQueen M.B., Mullin K., Blacker D., Tanzi R.E..** *Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database.* Nature Genetics **2007**, 39(1): 17-23.

**Bhat R.V., Budd Haeberlein S.L., Avila J.** *Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies.* Journal of Neurochemistry **2004**, 89(6):1313-1317.

**Blurton-Jones M. y Laferla F.M.** *Pathways by which Abeta facilitates tau pathology.* Current Alzheimer Research **2006**, 3(5):437-448.

**Bossy-Wetzel E., Schwarzenbacher R., Lipton SA.** *Molecular pathways to neurodegeneration.* Nature Medicine **2004**, 10 Suppl:S2-9.

**Botas J.** *Drosophila* researchers focus on human disease. *Nature Genetics* **2007**, 39(5):589-591.

**Brand A.H., Perrimon N.** *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.* *Development* **1993**, 118, 401-415.

**Brion J.P., Flament-Durand J., Dustin P.** *Alzheimer's disease and tau proteins.* *Lancet.* **1986**, 8;2(8515):1098.

**Broadie K.S. y Bate M.** *The development of adult muscles in Drosophila: ablation of identified muscle precursor cells.* *Development* **1991**, 113: 103-118.

**Brorsson A-C., Bolognesi B., Tartaglia G.G., Shammas S.L., Favrin G., Watson I., Lomas D.A., Chiti F., Vendruscolo M., Dobson C.M., Crowther D.C., Luheshi L.M.** *Intrinsic determinants of neurotoxic aggregate formation by the Amyloid  $\beta$  peptide.* *Biophysical Journal* **2010**, 98: 1677-1684.

**Brunet A., Datta S.R. and Greenberg M.E.** *Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway.* *Current Opinion in Neurobiology* **2001**, 11:297-305.

**Bubber P., Haroutunian V., Fisch G., Blass J.P., Gibson G.E.** *Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications.* *Annals of Neurology* **2005**, 57(5):695-703.

**Budnik V., Zhong Y., Wu C-F.** *Morphological plasticity of motor axons in Drosophila mutants with altered excitability.* *The Journal of Neuroscience* **1990**, 10(11): 3754-3766.

**Buée L., Bussièrè T. Buée-Scherrer V., Delacourte A., Hof P.R.** *Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders.* *Brain Research Reviews* **2000**, 33(1):95-130.

**Busciglio J., Lorenzo A., Yeh J., Yankner B.A.**  *$\beta$ -Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding.* *Neuron* **1995**, 14:879-888.

**Butterfield D.A., Castegna A., Lauderback C.M., Drake J.** *Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death.* *Neurobiology of Aging* **2002**, 23:655-664.

**Cai Z., Zhao B., Ratka A.** *Oxidative stress and  $\beta$ -Amyloid protein in Alzheimer's disease.* *Neuromolecular Medicine* **2011**,4: 223-250.

**Cantley L.C.** *The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway.* *Science* **2002**, 296:1655-1657.

**Cappai R. y Barnham K.J.** *Delineating the mechanism of Alzheimer's disease ab peptide neurotoxicity.* *Neurochemistry Research* **2008**, 33:526-532.

**Carmine-Simmen K., Proctor T., Tschäpe J., Poeck B. , Triphan T., Strauss R., Kretschmar D.** *Neurotoxic effects induced by the Drosophila amyloid- $\beta$  peptide suggest a conserved toxic function.* *Neurobiology of Disease* **2009**, 33:274-281.

**Carter J. y Lippa C.F.** *Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease.* *Current Molecular Medicine* **2001**, 1(6):733-737.

- Castellano J.M., Kim J., Stewart F.R., Jiang H., DeMattos R.B., Patterson B.W., Fagan A.M., Morris J.C., Mawuenyega K.G., Cruchaga C., Goate A.M., Bales K.R., Paul S.M., Bateman R.J., Holtzman D.M. *Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- $\beta$  peptide clearance*. *Science Translational Medicine* **2011**, 3(89):89ra57.
- Castle WE. *Inbreeding, cross-breeding and sterility in Drosophila*. *Science* **1906**, 23(578):153.
- Chang E.H., Savage M.J., Flood D.G., Thomas J.M., Levy R.B., Mahadomrongkul V., Shirao T., Aoki C., Huerta P.T. *AMPA receptor downscaling at the onset of Alzheimer's disease pathology in double knockin mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **2006**, 103(9):3410-5.
- Cheng I.H., Palop J.J., Esposito L.A., Bien-Ly N., Yan F., Mucke L. *Aggressive amyloidosis in mice expressing human amyloid peptides with the Arctic mutation*. *Nature Medicine* **2004**, 10(11):1190-1192.
- Chen J.X. y Yan S.D. *Amyloid- $\beta$ -induced mitochondrial dysfunction*. *Journal of Alzheimer's Disease* **2007**, 12:177-184 177.
- Chen X., Garelick M.G., Wang H., Li V., Athos J., Storm D.R. *PI3 kinase signaling is required for retrieval and extinction of contextual memory*. *Nature Neuroscience* **2005**, 8:925-931.
- Chiang H-C., Iijima K., Hakker I. and Zhong Y. *Distinctive roles of different  $\beta$ -amyloid 42 aggregates in modulation of synaptic functions*. *The FASEB Journal* **2009**, 23(6):1969-1977.
- Chiang H-C., Wang L., Xied Z., Yau A., Zhong Y. *PI3 kinase signaling is involved in  $A\beta$ -induced memory loss in Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **2010**, 107(15): 7060-7065.
- Cirrito J.R., Yamada K.A., Finn M.B., Sloviter R.S., Bales K.R., May P.C., Schoepp D.D., Paul S.M., Mennerick S., Holtzman D.M. *Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo*. *Neuron* **2005**, 8(6):913-22.
- Cirrito J.R., Kang J.E., Lee J., Stewart F.R., Verges D.K., Silverio L.M., Bu G., Mennerick S., Holtzman D.M. *Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo*. *Neuron* **2008**, 58(1):42-51.
- Citron M., Oltersdorf T., Haass C., McConlogue L., Hung A.Y., Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Lieberburg I., Selkoe D.J. *Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production*. *Nature* **1992**, 360(6405):672-674.
- Clark T.A., Lee H.P., Rolston R.K., Zhu X., Marlatt M.W., Castellani R.J., Nunomura A., Casadesus G., Smith M.A., H. Lee, Perry G. *Oxidative stress and its implications for future treatments and management of Alzheimer disease*. *International Journal of Biomedical Sciences* **2010**, 6(3): 225-227.
- Cohen F.E. y Kelly J.W. *Therapeutic approaches to proteinmisfolding diseases*. *Nature* **2003**, 426:905-909.
- Coleman P., Federoff H., Kurlan R. *A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias*. *Neurology* **2004**, 63(7):1155-1162.

**Collins C.A. y DiAntonio A.** *Synaptic development: insights from Drosophila*. Current Opininion in Neurobiology **2007**, 17(1):35-42. Epub 2007 Jan 16.

**Consoulas C., Restifo L.L., Levine R.B.** *Dendritic remodeling and growth of motoneurons during metamorphosis of Drosophila melanogaster*. J ournal of Neuroscience **2002**, 22(12):4906-17.

**Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-Vance M.A.** *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. Science **1993**, 13;261(5123):921-3.

**Coulson E.J., Paliga K., Beyreuther K. and Masters C.L.** *What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function*. Neurochemistry International **2000**, 36: 175-184.

**Cras P., Kawai M., Siedlak S., Mulvihill P., Gambetti P., Lowery D., Gonzalez-DeWhitt P., Greenberg B., Perry G.** *Neuronal and microglial involvement in beta-amyloid protein deposition in Alzheimer's disease*. The American Joournal of Pathology **1990**, Aug;137(2):241-246.

**Crouch P.J., Harding S.M., White A.R., Camakaris J., Bush A.I., Masters C.L.** *Mechanisms of A beta mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease*. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology **2008**, ;40(2):181-198.

**Crowther D.C., Kinghorn K.J., Miranda E., Page R., Curry J.A., Duthie F.A.I., Gubb D.C. and Lomas D.A.** *Intraneuronal A $\beta$ , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a Drosophila model of Alzheimer's disease*. Neuroscience **2005**, 132:123-135.

**Cuesto G., Enriquez-Barreto L., Caramés C., Cantarero M., Gasull X., Sandi C., Ferrús A., Acebes A., Morales M.** *Phosphoinositide-3-kinase activation controls synaptogenesis and spinogenesis in hippocampal neurons*. The Journal of Neuroscience **2011**, 31(8):2721-2733.

**Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, Rowan MJ.** *Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments*. Neuroreport **1997**, 8(15):3213-3217.

**Currie D.A. y Bate M.** *The development of adult abdominal muscles in Drosophila: myoblasts express twist and are associated with nerves*. Development **1991**, 113:91-102.

**Dahlgren K.N., Manelli A.M., Stine W.B. Jr, Baker L.K., Krafft G.A., LaDu M.J.** *Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability*. The Journal of Biological Chemistry **2002**, 277(35):32046-32053.

**Daigle I y Li C.** *apl-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A. **1993**, 90(24):12045-9.

**Datta S.R., Brunet A., Greenberg M.E.** *Cellular survival: a play in three Akts*. Genes Development **1999**, 13(22):2905-2927.

**Davies C.A., Mann D.M., Sumpter P.Q., Yates PO.** *A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease*. Journal of Neurological Sciences **1987**, 78(2):151-64.

**De Strooper B.** *Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex*. Neuron **2003**, 38(1):9-12.



- De Strooper B., Iwatsubo T., Wolfe M.S.** *Presenilins and  $\gamma$ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer disease.* Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine **2012**, 2:a006304.
- Demerec M.** *The biology of Drosophila.* Cold Spring Harbour Laboratory Press. **1994** págs. 410 y 479.
- Demuro A, Parker I, Stutzmann GE.** *Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease.* The Journal of Biological Chemistry **2010**, 285(17):12463-12468.
- Edbauer D., Winkler E., Haass C., Steiner H.** *Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid  $\beta$ -peptide production via complex formation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of USA **2002**, 99(13): 8666–8671.
- Edbauer D., Winkler E., Regula J.T., Pesold B., Steiner H., Haass C.** *Reconstitution of gamma-secretase activity.* Nature Cell Biology **2003**,5(5):486-8.
- Esch F.S., Keim .PS., Beattie E.C., Blacher R.W., Culwell A.R., Oltersdorf T., McClure D., Ward P.J.** *Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor.* Science **1990**, 248(4959):1122-4.
- Evans N.A., Facci L., Owen D.E., Soden P.E., Burbidge S.A., Prinjha R.K., Richardson J.C. and Skaper S.D..**  *$\beta$ 1–42 reduces synapse number and inhibits neurite outgrowth in primary cortical and hippocampal neurons: A quantitative analysis.* Journal of Neuroscience Methods **2008**, 175: 96–103.
- Fedrizzi L. y Carafoli E..** *Ca<sup>2+</sup> dysfunction in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease.* Biofactors **2011**,37(3):189-196.
- Ferrando-Miguel R., Rosner M., Freilinger A., Lubec G., Hengstschläger M.** *Tuberin--a new molecular target in Alzheimer's disease?* Neurochemical Research **2005**, 30(11):1413-9.
- Finelli A., Kelkar A., Song H-J., Yang H. and Konsolaki M.** *A model for studying Alzheimer's A $\beta$ 42-induced toxicity in Drosophila melanogaster.* Molecular and Cellular Neuroscience **2004**, 26:365–375.
- Fortini M.E. y Bonini N.M.** *Modeling human neurodegenerative diseases in Drosophila: on a wing and a prayer.* Trends in Genetics **2000**, 16(4):161-167.
- Franco B., Bogdanik L., Bobinnec Y., Debec A., Bockaert J., Parmentier M.L., Grau Y.** *Shaggy, the homolog of glycogen synthase kinase 3, controls neuromuscular junction growth in Drosophila.* Journal of Neuroscience **2004**, 24(29):6573-6577.
- Fyrberg C., Becker J., Barthmaier P., Mahaffey J., Fyrberg E.** *A Drosophila muscle-specific gene related to the mouse quaking locus.* Gene **1997**, 197(1-2):315-23.
- Glabbe C.** *Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease.* Journal of Molecular Neuroscience **2001**, 17:137-145.
- Glenner G.G., Wong C.W.** *Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein.* Biochemistry and Biophysical Research Communication **1984**, 16;122(3):1131-5.

- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, y col.** Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **1991**, 1;349(6311):704-706.
- Goedert M. y Spillantini M.G.** A Century of Alzheimer's Disease. *Science* **2006**, 314: 777-781.
- Gong Y., Chang L., Viola K.L., Lacor P.N., Lambert M.P., Finch C.E., Krafft G.A., Klein W.L.** Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **2003**, 100(18):10417-22.
- Götz J., Schild A., Hoernkli F., Penanen L.** Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models. *International Journal of Developmental Neuroscience* **2004**, 22(7):453-65.
- Götz J., Ittner L.M., Kins S.** Do axonal defects in tau and amyloid precursor protein transgenic animals model axonopathy in Alzheimer's disease? *Journal of Neurochemistry* **2006**, 98(4):993-1006.
- Greenberg S.M., Koo E.H., Selkoe D.J., Qui W.Q., Kosik K.S.** Secreted  $\beta$ -amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances  $\tau$  phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **1994**, 91: 7104-7108.
- Grehan S., Tse E., Taylor J.M.** Two distal downstream enhancers direct expression of the human apolipoprotein E gene to astrocytes in the brain. *Journal of Neuroscience* **2001**, 21(3):812-22.
- Griffin R.J., Moloney A., Kelliher M., Johnston J.A., Ravid R., Dockery P., O'Connor R., O'Neill C.** Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *Journal of Neurochemistry* **2005**, 93:105-117.
- Grundker-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y-C., Quinlan M., Wisniewski H.M. and Bindert L.I.** Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein  $\tau$ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **1986**, 83:4913-4917.
- Grutzendler J., Helmin K., Tsai J., Gan W.B.** Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Science* **2007**, 1097:30-39.
- Haass C. y Selkoe D.J.** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2007**, 8:101-112.
- Haass C. y Selkoe DJ.** Cellular processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid  $\beta$ -peptide. *Cell* **1993**, 75: 1039-1042.
- Hardy J.** The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *Journal of Neurochemistry* **2009**, 110(4):1129-3114.
- Hardy J. y Selkoe D.J.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, 297(5580):353-356.
- Hardy J.A. y Higgins G.A.** Alzheimer's Disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**, 256:184-185.

**Harris J.R. y Milton N.G.** *Cholesterol in Alzheimer's disease and other amyloidogenic disorders.* Subcellular Biochemistry **2010**, 51:47-75.

**Hayashi T., Shishido N., Nakayama K., Nunomura A., Smith M.A., Perry G., Nakamura M.** *Lipid peroxidation and 4-hydroxy-2-nonenal formation by copper ion bound to amyloid- $\beta$  peptide.* Free Radical Biology & Medicine **2007**, 43:1552-1559.

**Hebbar S., Hall R.E., Demski S.A., Subramanian A., Fernandes J.J.** *The adult abdominal neuromuscular junction of Drosophila: A model for synaptic plasticity.* Journal of Neurobiology **2006**, 66(10):1140-1155.

**Heinonen O., Soininen H., Sorvari H., Kosunen O., Paljärvi L. Koivisto E., Riekkinen P.J.** *Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease.* Neuroscience **1995**, 64(2):375-384.

**Hoe H.-S., Lee H.-K., Pak D.T.S** *The Upside of APP at Synapses.* CNS Neuroscience and Therapeutics **2012**, 18(1): 47-56.

**Holtzman D.M., Herz J., Bu G.** *Apolipoprotein E and Apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease.* Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine **2012**, 2(3):a006312.

<http://www.alzheimers-support.com/es/index.html>

**Hsieh H., Boehm J., Sato C., Iwatsubo T., Tomita T., Sisodia S., Malinow R.** *AMPA removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss.* Neuron **2006**, 52(5):831-843.

**Hsiao K., Chapman P., Nilsen S., Eckman C., Harigaya Y., Younkin S., Yang F., Cole G.** *Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice.* Science **1996**, 274(5284):99-102.

**Huang H.-C. y Jiang Z.-F.** *Accumulated amyloid- $\beta$  peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease.* Journal of Alzheimer's Disease **2009**, 16:15-27.

**Hurtado D.E., Molina-Porcel L., Iba M., Aboagye A.K., Paul S.M., Trojanowski J.Q., Lee V.M.** *A $\beta$  accelerates the spatiotemporal progression of tau pathology and augments tau amyloidosis in an Alzheimer mouse model.* The American Journal of Pathology **2010**, 177(4):1977-1988.

**Iijima K. y Iijima-Ando K.** *Drosophila Models of Alzheimer's Amyloidosis: The Challenge of Dissecting the Complex Mechanisms of Toxicity of Amyloid- $\beta$  42.* Journal of Alzheimer's Disease **2008**, 15: 523-540.

**Iijima K., Liu H.P., Chiang A.S., Hearn S.A., Konsolaki M., Zhong Y.** *Dissecting the pathological effects of human A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 in Drosophila: A potential model for Alzheimer's disease.* Proceedings of the National Academy of Sciences of USA **2004**, 101(17): 6623-6628.

**Iijima K., Chiang H.C., Hearn S.A., Hakker I., Gatt A., Shenton C., Granger L., Leung A., Iijima-Ando K., Zhong Y.** *A $\beta$ 42 mutants with different aggregation profiles induce distinct pathologies in Drosophila.* PLOS **2008**, 3(2) e1703.

- Iijima-Ando K. e Iijima K.** *Transgenic Drosophila models of Alzheimer's disease and tauopathies.* Brain Structure and Function **2010**, 214:245–262.
- Imlach W. y McCabe B.D.** *Electrophysiological Methods for Recording Synaptic Potentials from the NMJ of Drosophila Larvae.* JoVE. 24. **2009**.
- Inoki K., Zhu T., Guan K.L.** *TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival.* Cell **2003**, 115(5):577-590.
- Ishiguro K., Shiratsuchi A., Sato S., Omori A., Arioka M., Kobayashi S., Uchida T., Imahori K.** *Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments.* FEBS Letters **1993**, 325(3):167-172.
- Jarrett J.T., Berger E.P., Lansbury P.T. Jr.** *The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease.* Biochemistry **1993**, 32(18):4693-7.
- Jaworski J. y Sheng M.** *The growing Role of mTOR in neuronal development and plasticity.* Molecular Neurobiology **2006**, 34:11300-11312.
- Jiang H. y Rao Y.** *Axon formation: fate versus growth.* Nature Neuroscience **2005**, 8:544-546.
- Jimenez S., Torres M., Vizuite M., Sanchez-Varo R., Sanchez-Mejias El., Trujillo-Estrada L., Carmona-Cuenca I., Caballero C.** *Age-dependent accumulation of soluble amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-a (sAPPa) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 $\beta$ . Pathway in Alzheimer mouse model.* The Journal of Biological Chemistry **2011**, 286(21):18414–18425.
- Johansson A.S., Berglind-Dehlin F., Karlsson G., Edwards K., Gellerfors P., Lannfelt L..** *Physicochemical characterization of the Alzheimer's disease-related peptides A beta 1-42Arctic and A beta 1-42wt.* FEBS Journal **2006**, 273(12):2618-2630.
- Jordán-Álvarez S., Fouquet W., Sigrist S.J., Acebes A.** *Presynaptic PI3K activity triggers the formation of glutamate receptors at neuromuscular terminals of Drosophila.* Journal of Cell Science **2012**, en prensa.
- Kamenetz F., Tomita T., Hsieh H., Seabrook G., Borchelt D., Iwatsubo T., Sisodia S., Malinow R.** *APP processing and synaptic function.* Neuron **2003**, 37(6):925-37.
- Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., Müller-Hill B.** *The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.* Nature **1987**, 19-25; 325(6106):733-6.
- Kauwe J.S., Cruchaga C., Mayo K., Fenoglio C., Bertelsen S., Nowotny P., Galimberti D., Scarpini E., Morris J.C., Fagan A.M., Holtzman D.M., Goate A.M.** *Variation in MAPT is associated with cerebrospinal fluid tau levels in the presence of amyloid-beta deposition.* Proceedings of the National Academy of Sciences of USA **2008**, 105(23):8050-8054.
- Kawahara M.** *Neurotoxicity of  $\beta$ -Amyloid Protein: Oligomerization, Channel Formation and Calcium Dyshomeostasis.* Current Pharmaceutical Design **2010**, 16:2779-2789.

- Keshishian H., Broadie K., Chiba A., Bate M.** *The Drosophila neuromuscular junction: a model system for studying synaptic development and function.* Annual Review in Neuroscience **1996**, 19:545-75.
- Kim J.H., Anwyl R., Suh Y.H., Djamgoz M.B., Rowan M.J.** *Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of (beta)-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo.* Journal of Neuroscience **2001**, 21(4):1327-1333.
- Kim J., Basak J.M., Holtzman D.M.** *The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease.* Neuron **2009**, 63:287-303.
- Kivipelto M., Helkala E-L, Laakso M.P., Hänninen T., Hallikainen M., Alhainen K., Soininen H., Tuomilehto J., Nissien A.** *Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study.* British medical journal / British Medical Association **2001**,322(7300):1447-51.
- Kivipelto M., Helkala E.L., Laakso M.P., Hänninen T., Hallikainen M., Alhainen K., Iivonen S., Mannermaa A., Tuomilehto J., Nissinen A., Soininen H.** *Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease.* Annals of Internal Medicine **2002**, 137(3):149-55.
- Knafo S., Venero C., Merino-Serrais P., Feraud-Espinosa I., Gonzalez-Soriano J., Ferrer I., Santpere G., DeFelipe J.** *Morphological alterations to neurons of the amygdala and impaired fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.* Journal of Pathology **2009** 219(1):41-51.
- Knox S., Ge H., Dimitroff B.D., Ren Y., Howe K.A., Arsham A.M., Easterday M.C., Neufeld T.P., O'Connor M.B., Selleck S.B.** *Mechanisms of TSC-mediated control of synapse assembly and axon guidance.* PLoS One. **2007** Apr 18;2(4):e375.
- Koh Y.H., Gramates L.S. and Budnik V.** *Drosophila larval neuromuscular junction: molecular components and mechanisms underlying synaptic plasticity.* Microscopy research and technique **2000**, 49:14-25.
- Kojro E., Fügler P., Prinzen C., Kanarek A.M., Rat D., Endres K., Fahrenholz F., Postin R.** *Statins and the squalene synthase inhibitor Zaragozic Acid stimulate the non-amyloidogenic pathway of Amyloid- $\beta$  protein precursor processing by a suppression of cholesterol synthesis.* Journal of Alzheimer's Disease **2010**, 20: 1215-1231.
- Kuret J., Chirita C.N., Congdon E.E., Kannanayakal T., Li G., Necula M., Yin H., Zhong Q.** *Pathways of tau fibrillization.* Biochimica et Biophysica Acta **2005**, 1739(2-3):167-78.
- Kwon C-H., Luikart B.W.Powell C.M., Zhou J., Matheny S.A., Zhang W., Li Y., Baker S.J., Parada L.F.** *Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice.* Neuron **2006**, 50(3):377-388.
- Lacor P.N., Buniel M.C., Chang L., Fernandez S.J., Gong Y., Viola K.L., Lambert M.P., Velasco P.T., Bigio E.H., Finch C.E., Krafft G.A., Klein W.L.** *Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers.* Journal of Neuroscience **2004**, 24(45):10191-10200.



- Lacor P.N., Buniel M.C., Furlow P.W., Sanz Clemente A., Velasco P.T., Wood M., Viola K.L., Klein W.L.** *A $\beta$  oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease.* The Journal of Neuroscience **2007**, 27(4):796–807.
- Lee R.K., Wurtman R.J., Cox A.J., Nitsch R.M.** *Amyloid precursor protein processing is stimulated by metabotropic glutamate receptors.* Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A **1995**, 92(17):8083-8087.
- Leevers S.J., Weinkove D., MacDougall L.K., Hafen E., Waterfield M.D.** *The Drosophila phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth.* EMBO Journal **1996**, 15:6584–6594.
- Legan S.K., Rebrin I., Mockett R.J., Radyuk S.N., Klichko V. I., Sohal R. , Orr W.C** *Overexpression of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Extends the Life Span of Drosophila melanogaster.* The Journal of Biological Chemistry **2008**,283 (47): 32492–32499.
- Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., Pettingell W.H., Yu C., Jondro P.D., Schmidt S.D., Wang K., Crowley A.C., Fu Y-H, Guenette S.Y., Galas D., Nemens E., Wijsman E.M., Bird T.D., Schellenberg G.D., Tanzi R.E.** *Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus.* Science **1995**, 269:973-977.
- Lewis J., Dickson D.W., Lin W.L., Chisholm L., Corral A., Jones G., Yen S.H., Sahara N., Skipper L., Yager D., Eckman C., Hardy J., Hutton M., McGowan E.** *Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP.* Science **2001**, 293(5534):1487-1491.
- Li S., Hong S., Shepardson N.E., Walsh D.M., Shankar G.M., Selkoe D.** *Soluble oligomers of amyloid  $\beta$ -protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake.* Neuron **2009**, 62(6): 788–801.
- Li S., Jin M., Koeglsperger T., Shepardson N.E., Shankar G.M., Selkoe D.J.** *Soluble A $\beta$  oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors.* Journal of Neuroscience **2011**, 31(18):6627-38.
- Li X., Alafuzoff I., Soininen H., Winblad B., Pei J.J.** *Levels of mTOR and its downstream targets 4E-BP1, eEF2, and eEF2 kinase in relationships with tau in Alzheimer's disease brain.* The FEBS Journal **2005**, 272(16):4211-20.
- Li X., Lu F., Tian Q., Yang Y., Wang Q., Wang J.-Z.** *Activation of glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation in rat hippocampus slices in culture.* The Journal of Neural Transmission **2006**, 113: 93–102.
- Liu Z., Chen Y., Wang D., Wang S., Zhang Y.Q.** *Distinct presynaptic and postsynaptic dismantling processes of Drosophila neuromuscular junctions during metamorphosis.* The Journal of Neuroscience **2010**, 30(35):11624 –11634.
- Lord A., Kalimo H., Eckman C., Zhang X.Q., Lannfelt L., Nilsson L.N.** *The Arctic Alzheimer mutation facilitates early intraneuronal A $\beta$  aggregation and senile plaque formation in transgenic mice.* Neurobiology of Aging **2006**, 27(1):67-77.
- Lovestone S. y Reynolds C.H.** *The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes.* Neuroscience **1997**, 78(2):309-324.

- Luheshi L.M., Tartaglia G.G., Brorsson A-C, Pawar A.P., Watson I.E., Chiti F., Vendruscolo M., Lomas D.A., Dobson C.M., Crowther D.C.** *Systematic in vivo analysis*  
**Luo L., Tully T., White K.** *Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for *Appl* gene.* *Neuron* **1992**, 9:595- 605.
- Ma T. y Klann E.** *Amyloid  $\beta$ : linking synaptic plasticity failure to memory disruption in Alzheimer's disease.* *Journal of Neurochemistry* **2012**, J120 Suppl 1:140-1408.
- Mahley RW.** *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology.* *Science* **1988**,240(4852):622-30.
- Manczak M., Park B.S., Jung Y., Reddy P.H.** *Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage.* *Neuromolecular Medicine* **2004**, 5(2):147-162.
- Manczak M., Calkins M.J., Reddy P.H.** *Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage.* *Human Molecular Genetics* **2011**, 20(13):2495-2509.
- Marcello E., Gardoni F., Mauceri D., Romorini S., Jeromin A., Epis R., Borroni B., Cattabeni F., Sala C., Padovani A., Di Luca M.** *Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity.* *Journal of Neuroscience* **2007**, 27(7):1682-9161.
- Marqués G., Haerry T.E., Crotty M.L., Xue M., Zhang B., O'Connor M.B.** *Retrograde Gbb signaling through the Bmp type 2 receptor *Wishful Thinking* regulates systemic FMRFa expression in *Drosophila*.* *Development* **2003**, 130:5457-5470.
- Martín-Peña A., Acebes A., Rodríguez J.R., Sorribes A., de Polavieja G.G., Fernández-Fúnez P., Ferrús A.** *Age-independent synaptogenesis by Phosphoinositide 3 Kinase.* *The Journal of Neuroscience* **2006**, 26(40):10199 -10208.
- Marx J.** *Neuroscience. New leads on the 'how' of Alzheimer's.* *Science* **2001**, 293(5538):2192-2194.
- Marygold S.J. y Leever S.J.** *Growth signaling: TSC takes its place.* *Current Biology* **2002**, 12(22):R785-7.
- Masliah E. y Terry R.** *The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system.* *Brain Pathology* **1993**, 3(1):77-85.
- Masliah E., Mallory M., Alford M., DeTeresa R., Hansen L.A., McKeel D.W. Jr, Morris J.C.** *Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease.* *Neurology* **2001**, 56(1):127-9.
- Masters C.L., Simm G., Weinma N.A. , Multhaup G., McDonald B.L., Beyreuther K.** *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome.* *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **1985**, 82: 4245-4249.
- Mattson M.P.** *Cellular actions of  $\beta$ -amyloid precursor protein and Its soluble and fibrillogenic derivatives.* *Physiological Reviews* **1997**, 77(4):1081-1132.
- Mattson M.P.** *Apoptosis in Neurodegenerative disorders.* *Nature Reviews* **2000**, 1:120-129.

**Mattson M.P.** *Pathways towards and away from Alzheimer's disease.* Nature **2004**, 430:631-640.

**McGurk L., Morrison H., Keegan L.P., Sharpe J., O'Connell M.A.** *Three-dimensional imaging of Drosophila melanogaster.* PLoS One **2007**, 5;2(9):e834.

**Mercado-Gómez O., K. Hernández-Fonseca, Villavicencio-Queijeiro A., Massieu L., Chimal-Monroy J., Arias C.** *Inhibition of Wnt and PI3K signaling modulates GSK-3 $\beta$  activity and induces morphological changes in cortical neurons: Role of Tau phosphorylation.* Neurochemical Research **2008**, 33:1599-1609.

**Morris J.C. y Price J.L.** *Pathologic correlates of nondemented aging, mild cognitive impairment, and early-stage Alzheimer's disease.* Journal of Molecular Neuroscience **2001**, 17(2):101-118.

**Mucke L. y Selkoe D.J.** *Neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein: synaptic and network dysfunction.* Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **2012**,  
<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/cgi/collection/>

**Myers A.J., Kaleem M., Marlowe L., Pittman A.M., Lees A.J., Fung H.C., Duckworth J., Leung D., Gibson A., Morris C.M., de Silva R., Hardy J.** *The H1c haplotype at the MAPT locus is associated with Alzheimer's disease.* Human Molecular Genetics **2005**, 14(16):2399-2404.

**Muyllaert D., Kremer A. Jaworski T., Borghgraef P., Devijver H., Croes S., Dewachter I., Van Leuven F.** *Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , or a link between amyloid and tau pathology?* Genes, Brain and Behavior **2008**, 7 Suppl 1:57-66.

**Namba Y., Tomonaga M., Kawasaki H., Otomo E., Ikeda K.** *Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease.* Brain Res. **1991**,541(1):163-6.

**Näslund J., Schierhorn A., Hellman U., Lannfelt L., Roses A.D., Tjernberg L.O., Silberring J., Gandy S.E., Winblad B., Greengard P., Nordstedt C., Terenius L.** *Relative abundance of Alzheimer A $\beta$  amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging.* Proceedings of the National Academy of Sciences of USA **1994**, 91:8378-8382.

**Nichols C.D.** *Drosophila melanogaster neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery.* Pharmacology and Therapeutics **2006**, 112:677-700.

**Nilsberth C., Westlind-Danielsson A., Eckman C.B., Condrón M.M., Axelman K., Forsell C., Stenb C., Luthman J., Teplow D.B., Younkin S.G., Näslund J., Lannfelt L.** *The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A $\beta$  protofibril formation.* Nature Neuroscience **2001**, 4:488-893.

**Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM.** *Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study.* Journal of Neuropathology and Experimental Neurology **2005**, 64(2):113-122.

**Oddo S., Caccamo A., Kitazawa M., Tseng B.P., LaFerla F.M.** *Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease.* Neurobiology of Aging **2003**, 24(8):1063-1070.



- Opazo P., Watabe A.M., Grant S.G.N., O'Dell T.J.** *Phosphatidylinositol 3-Kinase regulates the induction of long-term potentiation through extracellular signal- related kinase- independent mechanisms.* The Journal of Neuroscience **2003**, 23(9):3679 -3688.
- Ossowska K.** *Disturbances in neurotransmission processes in aging and age-related diseases.* Polish Journal of Pharmacology **1993**, 45(2):109-131.
- Paliga K, Peraus G, Kreger S, Dürrwang U, Hesse L, Multhaupt G, Masters CL, Beyreuther K, Weidemann A.** *Human amyloid precursor-like protein 1--cDNA cloning, ectopic expression in COS-7 cells and identification of soluble forms in the cerebrospinal fluid.* European journal of biochemistry **1997**, 250(2):354-63.
- Palop J.J. y Mucke L..** *Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks.* Nature Neuroscience **2010**, 13(7):812-818.
- Panegyres P. K. y Atkins E.R.** *The functions of the amyloid precursor protein gene and its derivative peptides:II experimental evidence and clinical studies.* Neuroscience & Medicine **2011** , 2:239-266.
- Parkes T.L., Elia A.J., Dickinson D., Hilliker A.J. , Phillips J.P., Boulianne G.L.** *Extension of Drosophila lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons.* Nature Genetics **1998**, 19: 171-174.
- Pei J.J. y Hugon J.** *mTOR-dependent signalling in Alzheimer's disease.* Journal of Cellular and Molecular Medicine **2008**, 12(6B):2525-2532.
- Peña F., Gutiérrez-Lerma A., Quiroz-Baez R., Arias C.** *The role of beta-amyloid protein in synaptic function: implications for Alzheimer's disease therapy.* Current Neuropharmacology **2006**, 4(2):149-163.
- Perrin R.J., Fagan A.M., Holtzman D.M.** *Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease.* Nature **2009**, 461: 916-922.
- Pitas R.E., Boyles J., Lee S.H., Foss D., Mahley R.W.** *Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins.* Biochimica et Biophysica Acta **1987**, 13;917(1):148-61.
- Qin W., Haroutunian V., Katsel P., Cardozo C.P., Ho L., Buxbaum J.D., Pasinetti G.M.** *PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia.* Archives of Neurology **2009**, 66(3):352-61.
- Rapoport M., Dawson H.N., Binder L.I., Vitek M.P., Ferreira A..** *Tau is essential to beta - amyloid-induced neurotoxicity.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A. **2002**, 99(9):6364-9.
- Reddy P.H.** *Amyloid beta, mitochondrial structural and functional dynamics in Alzheimer's disease.* Experimental Neurology **2009**, 218: 286-292.
- Reiff D.F., Thiel P.R., Schuster C.M.** *Differential regulation of active zone density during long-term strengthening of Drosophila neuromuscular junctions.* Journal of Neuroscience **2002**, 22(21):9399-409.

- Reiter L.T., Potocki L., Chien S., Gribskov M., Bier E.** *A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster.* Genome Research **2001**,11(6):1114-25.
- Rezával C., Werbajh S., Ceriani M.F.** *Neuronal death in Drosophila triggered by GAL4 accumulation.* European Journal of Neuroscience **2007**, 25: 683-694.
- Ribé EM, Pérez M, Puig B, Gich I, Lim F, Cuadrado M, Sesma T, Catena S, Sánchez B, Nieto M., Gómez-Ramos P., Morán M.A., Cabodevilla F., Samaranch L., Ortiz L., Pérez A., Ferrer I., Avila J., Gómez-Isla T.** *Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice.* Neurobiology of Disease **2005**, 20(3):814-822.
- Rivlin P.K., St. Clair R.M., Vilinsky I., Deitcher D.L.** *Morphology and molecular organization of the adult neuromuscular Junction of Drosophila.* The Journal of Comparative Neurology **2004**, 68:596-613.
- Roberson E.D., Scearce-Levie K., Palop J.J., Yan F., Cheng I.H., Wu T., Gerstein H., Yu G.Q., Mucke L.** *Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model.* Science **2007**,316(5825):750-4.
- Robinow S. y White K.** *The locus elav of Drosophila melanogaster is expressed in neurons at all developmental stages.* Developmental Biology **1988**, 126(2):294-303.
- Roselli F., Tirard M., Lu J., Hutzler P., Lamberti P., Livrea P., Morabito M., Imeida O.F.X.** *Soluble  $\beta$ -amyloid<sub>1-40</sub> Induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses.* The Journal of Neuroscience **2005**, 25(48):11061-11070.
- Rosen D.R., Martin-Morris L., Luo L., White K.** *A Drosophila Gene Encoding a Protein Resembling the Human  $\beta$ -amyloid Protein Precursor.* Proceedings of the National Academy Of Sciences of USA **1989**, 86:2478-2482.
- Roßner S.** *New players in old amyloid precursor protein processing pathways.* International Journal of Developmental Neuroscience **2004**, 22: 467-474.
- Ruggero D. y Sonenberg N.** *The Akt of translational control.* Oncogene **2005**, 24, 7426-7434.
- Sahlin, C., Lord A., Magnusson K., Englund H., Almeida C,G,, Greengard P., Nyberg F., Gouras G,K,, Lannfelt L., Nilsson L,N.** *The Arctic Alzheimer mutation favors intracellular amyloidbeta production by making amyloid precursor protein less available to alphasecretase.* Journal of Neurochemistry **2007**, 101(3): 854-862.
- Scheff S.W. y Price D.A.** *Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: Neocortex and hippocampus.* Journal of Alzheimer's Disease **2006**, 9:101-115.
- Scheff S.W., Price D.A., Schmitt F.A., Mufson E.J.** *Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment.* Neurobiology of Aging **2006** , 27(10):1372-1384.
- Scheff S.W., Price D.A., Schmitt F.A., DeKosky S.T., Mufson E.J.** *Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment.* Neurology **2007**, 68(18):1501-1508.
- Scott A. Small y Sam Gandy.** *Sorting through the Cell Biology of Alzheimer's Disease: Intracellular Pathways to Pathogenesis.* Neuron **2006**, 52:15-31.

- Selkoe D.J.** *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.* *Physiological Reviews* **2001**, 81(2):741-766.
- Selkoe D.J.** *Alzheimer's disease is a synaptic failure.* *Science* **2002**, 298:789-791.
- Selkoe D.J.** *Soluble oligomers of the Amyloid  $\beta$ -Protein impair synaptic plasticity and behavior.* *Behaviour Brain Research* **2008**, 192(1): 106-113.
- Shacka J.J., Roth K.A., Zhang J.** *The autophagy-lysosomal degradation pathway: role in neurodegenerative disease and therapy.* *Frontiers in Bioscience* **2008**, 13:718-736.
- Shankar G.M., Bloodgood B.L., Townsend M., Walsh D.M., Selkoe D.J., Sabatini B.L.** *Natural oligomers of the Alzheimer Amyloid- $\beta$  protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type Glutamate Receptor-dependent signaling pathway.* • *The Journal of Neuroscience* **2007**, 27(11):2866 -2875.
- Sheng B., Wang X., Su B., Lee H.G., Casadesus G., Perry G., Zhu X.** *Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease.* *Journal of Neurochemistry* **2012**, 120(3):419-429.
- Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Li C., Holman K., Tsuda T., Mar L., Foncin J.F., Bruni A.C, Montesi M.P., Sorbi S., Rainiero I., Pinessi L., Nee L., Chumakov I., Pollen D., Brookes A., Sanscar P., Polinsky R.J., Wasco W., Da Silva H.A.R., Haines J.L., Pericak-Cance M.A., Tanzi R.E., Roses A.D., Fraser P.E., Rommens J.M., St George-Hyslop P.H.** *Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease.* *Nature* **1995**, 375:754-760.
- Shulman J.M., Shulman L.M., Weiner W.J., Feany M.B.** *From fruit fly to bedside: translating lessons from Drosophila models of neurodegenerative disease.* *Current Opinion in Neurology* **2003**, 16:443-449.
- Sigrist S.J., Thiel P.R., Reiff D.F., Schuster C.M.** *The postsynaptic glutamate receptor subunit DGluR-IIA mediates long-term plasticity in Drosophila.* *Journal of Neuroscience* **2002**, 22(17):7362-72.
- Simón A.M., Frechilla D., del Río J.** *Perspectivas sobre la hipótesis de la cascada del amiloide en la enfermedad de Alzheimer.* *Revision en Neurología* **2010**, 50 (11): 667-675.
- Small D.H., Gasperini R., Vincent A.J., Hung A.C., Foa L.** *The role of Abeta-induced calcium dysregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease.* *Journal of Alzheimers Disease* **2009**, 16(2):225-33.
- Small S.A. y Gandy S.** *Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis.* *Neuron* **2006**, 52(1):15-31.
- Snyder E.M., Nong Y., Almeida C.G., Paul S., Moran T., Choi E.Y., Nairn A.C., Salter M.W., Lombroso P.J., Gouras G.K., Greengard P.** *Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta.* *Nature Neuroscience* **2005**, 8(8):1051-1058.
- Sofola O., Kerr F., Rogers I., Killick R., Augustin H., Gandy C., Allen M.J., Hardy J., Lovestone S., Partridge L.** *Inhibition of GSK-3 ameliorates Ab pathology in an adult-onset Drosophila model of Alzheimer's disease.* *PLoS Genetics* **2010**, 6(9). pii: e1001087.

- Solomon A., Kåreholt I., Ngandu T., Winblad B., Nissinen A., Tuomilehto J., Soininen H., Kivipelto M.** Serum cholesterol changes after midlife and late-life cognition: twenty-one-year follow-up study. *Neurology* **2007**,68(10):751-756.
- Sonoda Y., Mukai H., Matsuo K., Takahashi M., Ono, Y. Maedac K., Akiyamad H., Kawamataa T.** Accumulation of tumor-suppressor PTEN in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neuroscience Letters* **2010**, 471:20–24.
- Sorg C., Riedl V., Mühlau M., Calhoun V.D., Eichele T., Læer L., Drzezga A., Förstl H., Kurz A., Zimmer C., Wohlschläger A.M.** Selective changes of resting-state networks in individuals at risk for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **2007**, 104(47):18760-18765.
- Speretta E., Jahn T.R., Tartaglia G.G., Favrin G., Barros T.P., Imarisio S., Lomas D.A., Luheshi L.M., Crowther D.C., Dobson C.M.** Expression in drosophila of tandem A $\beta$  peptides provides insights into the link between aggregation and neurotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* **2012**, en prensa.
- Sprecher C.A., Grant F.J., Grimm G., O'Hara P.J., Norris F., Norris K., Foster D.C.** Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry* **1993**, 32(17):4481-6.
- Stambolic V., Suzuki A., de la Pompa J.L., Brothers G.M., Mirtsos C., Sasaki T., Ruland J., Penninger J.M., Siderovski D.P., Mak T.W.** Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell Survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **1998**, 95:29–39.
- Stefani M. y Liguri G.** Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions. *Current Alzheimer Research* **2009**,6(1):15-29.
- Strittmatter W.J., Saunders A.M., Schmechel D., Pericak-Vance M., Enghild J., Salvesen G.S., Roses A.D.** Apolipoprotein E: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **1993**, 90:1977-1981.
- Su B., Wang X., Bonda D., Perry G., Smith M., Zhu X.** Abnormal mitochondrial dynamics—a novel therapeutic target for Alzheimer's disease? *Molecular Neurobiology* **2010**, 41(2-3):87-96.
- Sun B. and Salvaterra P.M.** Characterization of Nervana, a *Drosophila melanogaster* neuron-specific glycoprotein antigen recognized by Anti-Horseradish Peroxidase antibodies. *Journal of Neurochemistry* **1995**, 65:434-443.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG.** An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* **1994**, 264(5163):1336-1340.
- Takashima A., Noguchi K. Michel G., Mercken M., Hoshi M., Ishiguro K., Imahori K.** Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neuroscience Letters* **1996**, 203(1):33-36.
- Tampellini D., Magrane J., Takahashi R.H., F.Li, Lin M.T., Almeida C.G., Gouras G.K.** Internalized antibodies to the A $\beta$  domain of APP reduce neuronal A $\beta$  and protect against synaptic alterations. *The Journal of Biological Chemistry* **2007**, 282(26): 18895–18906.

- Tampellini D, Rahman N, Gallo EF, Huang Z, Dumont M, Capetillo-Zarate E, Ma T, Zheng R, Lu B, Nanus DM, Lin MT, Gouras GK.** *Synaptic activity reduces intraneuronal Abeta, promotes APP transport to synapses, and protects against Abeta-related synaptic alterations.* The Journal of Neuroscience **2009**, 29(31):9704-13.
- Tang S.J., Reis G., Kang H., Gingras A.C., Sonenberg N., Schuman E.M.** *A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus.* Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. **2002**, 99(1):467-742.
- Terry R.D., Masliah E., Salmon D.P., Butters N., DeTeresa R., Hill R., Hansen L.A., Katzman R.** *Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment.* Annals of Neurology **1991**, 30(4):572-580.
- Thathiah A. y De Strooper B.** *The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease.* Nature Reviews. Neuroscience **2011**, 12(2):73-87.
- Thinakaran G. y Koo E.H.** *Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function.* The Journal of Biological Chemistry **2008**, 283(44):29615-29619.
- Ting J.T., Kelley B.G., Lambert T.J., Cook D.G., Sullivan J.M.** *Amyloid precursor protein overexpression depresses excitatory transmission through both presynaptic and postsynaptic mechanisms.* Proc Natl Acad Sci U S A. **2007**, 104(1):353-358.
- Tissot M. y Stocker R.F.** *Metamorphosis in drosophila and other insects: the fate of neurons throughout the stages.* Progress in Neurobiology **2000**, 62(1):89-111.
- Torroja, L. Packard M., Budnik V., White K.** *Overexpression of APPL, a Drosophila APP homologue, compromises microtubule associated axonal transport and promotes synapse formation.* The Journal of Neuroscience **1999a**, 19(18):7793-7803.
- Torroja, L. Packard M., Gorczyca M., White K., Budnik V.** *The Drosophila  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Homolog Promotes Synapse Differentiation at the Neuromuscular Junction.* The Journal of Neuroscience **1999b**, 19(18):7793-7803.
- Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ.** *Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers.* The Journal of Physiology **2006**, 572(Pt 2):477-492.
- Tsai J., Grutzendler J., Duff K., Gan W-B.** *Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches.* Nature Neuroscience **2004**, 7:1181-1183
- Tsokas P., Grace E.A., Chan P., Ma T., Sealfon S.C., Iyengar R., Landau E.M., Blitzer R.D.** *Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation.* Journal of Neuroscience **2005**, 25(24):5833-5843.
- Turner P.R., O'Connor K., Tate W.P., Abraham W.C.** *Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory.* Progress in Neurobiology **2003**, 70:1-32.
- van der Heide L.P., Ramakers G.M.J., Smidt M.P.** *Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive.* Progress in Neurobiology **2006**, 79: 205-221.



**Vanhaesebroeck B., Leever S.J., Ahmadi K., Timms J., Katso R., Driscoll P.C., Woscholski R., Parker P.J, Waterfield MD.** *Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids.* Annual Review of Biochemistry **2001**, 70:535–602.

**Vassar R., Bennett B.D., Babu-Khan S., Kahn, E.A. Mendiaz S., Denis P., Teplow D.B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jarosinski M.A., Leona Biere A., Curran E., Burgess T., Louis J-C., Collins F., Treanor J., Rogers G., Citron M.**  *$\beta$ -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE.* Science **1999**, 286:735-741.

**Vestergaard M., Hamada T., Morita M., Takagi M.** *Cholesterol, lipids, amyloid Beta, and Alzheimer's.* Current Alzheimer Research **2010**,7(3):262-70.

**Vingtdeux V. y Marambaud P.** *Identification and biology of a-secretase.* Journal of Neurochemistry **2012**, 120 Suppl 1:34-45. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07477.x.

**Vivanco I. y Sawyers C.L.** *The phosphatidylinositol 3-kinase-akt pathway in human Cancer.* Nature Reviews, Cancer **2002**, 2:489-501.

**Wagh D.A., Rasse T.M., Asan E., Hofbauer A., Schwenkert I., Dürrbeck H., Buchner S., M.C. Dabauvalle, Schmidt M., Qin G., Wichmann C., Kittel R.,, Sigrist S.J., Buchner E.** *Bruchpilot, a Protein with Homology to ELKS/CAST, is Required for Structural Integrity and Function of Synaptic Active Zones in Drosophila.* Neuron **2006**, 49:833–844.

**Walker E.S., Martinez M., Brunkan A.L., Goate A.** *Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in A $\beta$  42/40 ratios.* Journal of Neurochemistry **2005**, 92, 294–301.

**Wang X., Sun B., Yasuyama K. Salvaterra P.M..** *Biochemical analysis of proteins recognized by anti-HRP antibodies in Drosophila melanogaster: identification and characterization of neuron specific and male specific glycoproteins.* Insect Biochemistry and Molecular Biology **1994** , 24(3):233-42.

**Wang X., Su B., Lee H.G., Li X., Perry G., Smith M.A., Zhu X.** *Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease.* Journal of Neuroscience **2009**, 29(28):9090-9103.

**Wang Z.F., Li H.L, Li X.C., Zhang Q., Tian Q., Wang Q., Xu H., Wang J.Z.** *Effects of endogenous beta-amyloid overproduction on tau phosphorylation in cell culture.* Journal of Neurochemistry **2006**, 98(4):1167-1175.

**Wasco W., Bupp K., Magendantz M., Gusella J.F., Tanzi R.E., Solomon F.** *Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor.* Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A. **1992**, 89(22):10758-62.

**Wasco W., Gurubhagavatula S., Paradis M.D., Romano D.M., Sisodia S.S., Hyman B.T., Neve R.L., Tanzi R.E.** *Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor.* Nature Genetics **1993**, 5(1):95-100.

- Wasling P., Daborg J., Riebe I., Andersson M., Portelius E., Blennow K., Hanse E., Zetterberg H.** *Synaptic retrogenesis and amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease.* Journal of Alzheimer's Disease **2009**, 16: 1-14 1.
- Weiner H.L. y Frenkel D.** *Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease.* Nature Reviews. Immunology **2006**, 6(5):404-416.
- Weuve J, McQueen MB, Blacker D.** The AlzRisk Database. Alzheimer Research Forum. Available at: <http://www.alzforum.org>. Accessed May 2012.
- Whalen B.M., Selkoe D.J., Hartley D.M.** *Small non-fibrillar assemblies of amyloid beta-protein bearing the Arctic mutation induce rapid neuritic degeneration.* Neurobiology of Disease **2005**, 20(2):254-266.
- Wilcox K.C., Lacor P.N., Pitt J., Klein W.L.** *Ab oligomer-induced synapse degeneration in Alzheimer's disease.* Cell Molecular Neurobiology **2011**, 31:939-948.
- Wirhth O., Multhaup G., Bayer T.A.** *A modified b-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the  $\beta$ -amyloid peptide – the first step of a fatal cascade.* Journal of Neurochemistry **2004**, 91, 513-520.
- Wirhth O. y Bayer TA.** *Intraneuronal A $\beta$  accumulation and neurodegeneration: Lessons from transgenic models.* Life Sciences **2012**, artículo en prensa.
- Wisniewski T. y Frangione B.** *Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid.* Neuroscience Letters **1992**, 135(2):235-8.
- Wu M.N., Joiner W.J., Dean T., Yue Z., Smith C.J., Chen D., Hoshi T., Sehgal A., Koh K.** *SLEEPLESS, a Ly-6/neurotoxin family member, regulates the levels, localization and activity of Shaker.* Nature Neuroscience **2010**, 13(1):69-77.
- Wymann M.P. y Pirola L.** *Structure and function of phosphoinositide 3-kinases.* Biochimica et Biophysica Acta **1998**, 1436:127-150.
- Xia W., Zhang J., Ostaszewski B.L., Kimberly W.T., Seubert P., Koo E.H., Shen J., Selkoe D.J.** *Presenilin 1 Regulates the Processing of  $\beta$ -Amyloid precursor protein C-Terminal fragments and the generation of amyloid  $\beta$ -Protein in endoplasmic reticulum and golgi.* Biochemistry **1998**, 37, 16465-16471.
- Yan Y.C., Bai Y., Wang L.F., Miao S.Y., Koide S.S.** *Characterization of cDNA encoding a human sperm membrane protein related to A4 amyloid protein.* Proceedings of the National Academy of Sciences of USA **1990**, 87(7):2405-8.
- Yeh E., Gustafson K., Bouliannet G.L.** *Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in Drosophila.* Proceedings of the National Academy of Sciences **1995**, 92:7036-7040.
- Younkin S.G.** *Evidence that A $\beta$ 42 is the real culprit in Alzheimer's disease.* Annals of Neurology **1995**, 37(3):287-288.
- Yu W.H., Cuervo A.M., Kumar A., Peterhoff C.M., Schmidt S.D., Lee J.H., Mohan P.S., Mercken M., Farmery M.R., Tjernberg L.O., Jiang Y., Duff K., Uchiyama Y., Näslund J.,**

**Mathews P.M., Cataldo A.M., Nixon R.A.** *Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease.* Journal of Cell Biology **2005**, 171(1):87-98.

**Zar J.H.** *Biostatistical Analysis*, 4<sup>th</sup> edition, **2004**. Editorial Pearson Education, New Jersey.

**Zhang H., Ma Q., Zhang Y.W., Xu H.** *Proteolytic processing of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein.* Journal of Neurochemistry **2012**, 120 Suppl 1:9-21.

**Zhang X.** *Cholinergic activity and amyloid precursor protein processing in aging and Alzheimer's disease.* Current drug targets. CNS and neurological disorders **2004**, 3(2):137-152.

**Zhang Y-W., Thompson R., Zhang H., Xu H.** *APP processing in Alzheimer's disease.* Molecular Brain **2011**, 4:3.

**Zhao X-L., Wang W-A., Tan J-X., Huang J-K., Zhang X., Zhang B-Z., Wang Y-H., Yang Cheng H-Y., Zhu H-L., Sun X-J. and Huang F-D.** *Expression of  $\beta$ -Amyloid induced age-dependent presynaptic and axonal changes in Drosophila.* The Journal of Neuroscience **2010**, 30(4):1512-1522.

**Zheng H. y Koo E.H.** *The amyloid precursor protein: beyond amyloid.* Molecular Neurodegeneration **2006**, 1:5.

**Zheng W.H., Bastianetto S., Mennicken F., Ma W., Kar S.** *Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures.* Neuroscience **2002**; 115(1):201-11.

**Zhu X., Raina A.K., Lee H., Casadesus G. Smith M.A., Perry G.** *Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease.* Brain Research **2004**, 1000:32-39.

**Zhu X., Perry G., Moreira P.I., Aliev G., Cash A.D., Hirai K., Smith M.A.** *Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease.* Journal of Alzheimers Disease **2006**, 9(2):147-153.

**Zhu X., Su B., Wang X., Smith M.A., Perry G.** *Causes of oxidative stress in Alzheimer disease.* Cellular and Molecular Life Science **2007**, 64 :2202 - 2210.





