



**Instituto
Teófilo Hernando**
para la I+D del Medicamento



Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento
Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Caracterización farmacológica de los efectos del péptido amiloide β sobre los receptores nicotínicos neuronales

Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor presentada por

Ángela Orozco Alarcón

Director

Luis Gandía Juan



Instituto
Teófilo Hernando
para la I+D del Medicamento



Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento
Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

D. LUIS GANDÍA JUAN, Profesor Titular del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, por medio de la presente

CERTIFICA QUE:

D^a. ANGELA OROZCO ALARCÓN ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado **“CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS EFECTOS DEL PÉPTIDO AMILOIDE β SOBRE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES”**, como Tesis para alcanzar el grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid

Y para que conste a los efectos oportunos, firma la presente en Madrid a 11 de marzo de 2013

Fdo. Luis Gandía Juan
Profesor Titular
DNI. 22.121.980-M

INDICE

MARCO EN EL QUE SE HA DESARROLLADO ESTA TESIS	1
1.-INTRODUCCIÓN	3
1.1.-EL RECEPTOR NICOTINICO DE TIPO NEURONAL	3
1.1.1.-Estructura y composición de los receptores nicotínicos neuronales	3
1.1.2.-Clasificación de los receptores nicotínicos neuronales	7
1.1.3.-Aspectos funcionales de los receptores nicotínicos neuronales	8
1.1.4.-Farmacología de los receptores nicotínicos neuronales	11
1.1.5.-Implicaciones fisiopatológicas de los receptores nicotínicos neuronales	14
1.2.-LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	16
1.2.1.-Características clínicas de la enfermedad de Alzheimer	17
1.2.2.-Características histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer	18
1.2.3.-La hipótesis colinérgica de la enfermedad de Alzheimer	19
1.2.4.-El péptido amiloide β en la enfermedad de Alzheimer	20
 MARCO EN EL QUE SE HA DESARROLLADO ESTA TESIS.....	 1
1 INTRODUCCIÓN	4
1.1 EL RECEPTOR NICOTÍNICO DE TIPO NEURONAL.....	4
1.1.1 <i>Estructura y composición de los receptores nicotínicos neuronales.....</i>	<i>5</i>
1.1.2 <i>Clasificación de los receptores nicotínicos neuronales.....</i>	<i>9</i>
1.1.3 <i>Aspectos funcionales de los receptores nicotínicos neuronales.....</i>	<i>11</i>
1.1.4 <i>Farmacología de los receptores nicotínicos neuronales.....</i>	<i>15</i>
1.1.5 <i>Implicaciones fisiopatológicas de los receptores nicotínicos neuronales</i>	<i>17</i>
1.2 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	20



Instituto
Teófilo Hernando
para la I+D del Medicamento



1.2.1	Características clínicas de la enfermedad de Alzheimer.	21
1.2.2	Características histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer.	23
1.2.3	La Hipótesis colinérgica de la enfermedad de Alzheimer.	23
1.2.4	El péptido amiloide β en la enfermedad de Alzheimer.	25
1.2.5	Péptido amiloide β y receptores nicotínicos neuronales en la enfermedad de Alzheimer.	27
2	HIPÓTESIS JUSTIFICATIVA	30
3	MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1	OBTENCIÓN DE LOS ARNM.	32
3.2	SISTEMA DE EXPRESIÓN.....	33
3.2.1	Extracción de los ovocitos	33
3.3	CULTIVO DE LOS OVOCITOS.....	41
3.3.1	Preincubaciones	41
3.4	SOLUCIONES EXPERIMENTALES.....	42
3.4.1	Soluciones de cultivo.....	42
3.4.2	Soluciones de registro	42
3.5	REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS	42
3.5.1	Sistema de perfusión.....	44
3.5.2	Capilares de registro y electrodos.....	47
3.5.3	Cloruración de los electrodos	47
3.5.4	Creación de protocolos y aplicación.....	48
3.5.5	Fijación del potencial de membrana.....	48
3.5.6	Agonistas utilizados e intervalos de aplicación	48
3.5.7	Protocolo de agregación del péptido amiloide β	49
3.5.8	Justificación del uso del fragmento 25-35 del péptido amiloide β	49
3.6	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	49

4 RESULTADOS.....	51
4.1 EFECTO DEL PÉPTIDO AMILOIDE β SOBRE RECEPTORES $\alpha 3\beta 4$ EXPRESADOS EN OVOCITOS DE XENOPUS.....	51
4.1.1 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos en un protocolo de aplicación aguda.....	53
4.1.2 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos en un protocolo de aplicación crónica.....	58
4.1.3 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos en un protocolo de incubación crónica con antagonistas nicotínicos.....	65
4.1.4 Efecto del lavado del péptido amiloide β sobre los ovocitos expresando receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos.....	67
4.1.5 Efecto de dializar el péptido amiloide β en los ovocitos expresando receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos.....	68
4.2 EFECTO DEL PÉPTIDO AMILOIDE β SOBRE RECEPTORES $\alpha 7$ EXPRESADOS EN OVOCITOS DE XENOPUS.....	70
4.2.1 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos en un protocolo de aplicación aguda.....	71
4.2.2 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos en un protocolo de aplicación crónica.....	76
4.2.3 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos en un protocolo de incubación crónica con antagonistas nicotínicos.....	78
4.2.4 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha 3\beta 4$ bovino con el uso de otros agonistas nicotínicos.....	80
5 REFERENCIAS.....	105

MARCO EN EL QUE SE HA DESARROLLADO ESTA TESIS

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento (ITH) y se enmarca en una línea de investigación básica-aplicada orientada a la caracterización, desde un punto de vista farmacológico y funcional, de los receptores nicotínicos para la acetilcolina de tipo neuronal (nAChRs) y su implicación en la fisiopatología y el posible tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer.

En el año 1911 Santiago Ramón y Cajal postuló la *Teoría Neuronal*, que afirma que el sistema nervioso está compuesto por células individuales (neuronas) que contactan entre sí por unas minúsculas regiones especializadas (sinapsis). Esta hipótesis abrió la puerta a otra gran pregunta para la Ciencia, relativa a la naturaleza de la señal que se transmitía entre distintas neuronas. Así se postularon dos teorías: la neurotransmisión eléctrica y la química. Finalmente, fueron los experimentos realizados por Otto Loewi en 1921 los que vinieron a confirmar la existencia de una neurotransmisión química, demostrando que una sustancia que él denominó *vagustoff* (actualmente conocida como acetilcolina) se liberaba tras la estimulación del nervio vago y servía para estimular a otras neuronas. Unos años más tarde, en 1936, Sir Henry Dale demostró que la acetilcolina (ACh) era liberada por estimulación de los nervios motores en la placa motora.

No obstante, hasta los años 50 no se demostró la *Teoría iónica* mediante la que Fatt y Katz afirmaron que la transmisión química estaba mediada por la estimulación de un receptor por su correspondiente agonista fisiológico (en el caso de la unión neuromuscular la ACh, actuando sobre receptores de tipo nicotínico), lo que producía la apertura de un canal por el que pasaban iones, generando así una acción excitadora en el músculo.

Tras estas aportaciones, el estudio y caracterización del receptor nicotínico se convirtió en una prioridad. Se trató de indagar en la naturaleza y función de estos receptores presentes en el sistema nervioso. La principal contribución para llevar a

cabo este estudio fue la detección de gran cantidad de estos receptores en el órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata*, cuyo receptor es homólogo al receptor de la placa motora. Los estudios realizados por el grupo de Raftery (Raftery, Vandlen et al. 1976) permitieron solubilizar y aislar el primer canal iónico de células excitables, al mismo tiempo que Neher y Sakmann (Neher and Sakmann 1976) realizaron los primeros registros electrofisiológicos de canal único del receptor nicotínico de células musculares de rana. En los años 80 el abordaje de este tipo de estudios se realizó mediante técnicas de biología molecular, clonando los genes que codificaban la expresión de las diferentes subunidades que componen este receptor, y expresándolos en sistemas heterólogos, fundamentalmente en ovocitos de *Xenopus laevis* (Noda, Takahashi et al. 1982; Noda, Furutani et al. 1983; Noda, Takahashi et al. 1983).

Desde entonces se han conseguido identificar una amplia variedad de subtipos de receptores nicotínicos que comparten una gran similitud con el del órgano eléctrico del *Torpedo* y el de la placa motora. Estos receptores se engloban bajo la denominación de receptores nicotínicos para la acetilcolina (nAChRs) y constituyen un pequeño grupo dentro de los receptores activados por ligando (RAL).

El conocimiento de su estructura y función ha hecho posible el estudio de sus implicaciones fisiológicas y patológicas, lo que conlleva al abordaje de su posible farmacología y con ello al diseño y síntesis de nuevos fármacos que potencialmente puedan servir para atenuar las deficiencias de estos receptores que se aprecian en diversas enfermedades neurodegenerativas, entre otras diversos tipos de demencia.

Así, por ejemplo, se ha descrito que los déficits cognitivos que se producen en la demencia asociada a la enfermedad de Alzheimer (EA) se correlacionan con la afectación de vías colinérgicas a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), apreciándose una reducción del número de nAChRs en éstas. Igualmente hay evidencias que indican que los nAChRs interactúan con el péptido amiloide β ($A\beta$), el cual se acumula extracelularmente, particularmente en el hipocampo y en la corteza cerebral, en la enfermedad de Alzheimer. Actualmente, los fármacos utilizados en el tratamiento de las etapas tempranas de la EA basan su mecanismo de acción en una

mejora de la neurotransmisión colinérgica, por lo que se podría pensar que los nAChR podrían constituir una excelente diana terapéutica para tratar a los pacientes con EA, especialmente en las etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad (Parri and Dineley 2010).

En base a estos antecedentes, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido caracterizar los posibles efectos del péptido A β sobre los receptores nicotínicos los subtipos $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$, expresados heterológamente en ovocitos de *Xenopus laevis*, utilizando la técnica de fijación de voltaje de doble electrodo.

1 INTRODUCCIÓN

Durante la activación neuronal se liberan a la hendidura sináptica pequeñas moléculas, llamadas neurotransmisores, desde la neurona presináptica; con ello se transmite la información desde esta neurona presináptica a otra o a un órgano diana (por ejemplo el músculo). Estos neurotransmisores van a realizar su función mediante la activación de receptores específicos presentes en la membrana de la célula postsináptica, denominados comúnmente como “receptores activados por ligandos (RAL)”.

La activación de estos receptores por el correspondiente agonista conduce a una serie de cambios conformacionales en su estructura, con la consiguiente apertura de un canal iónico, generalmente de baja selectividad, que permite el paso de diversos iones a su través, fundamentalmente cloruro (receptor GABA), sodio y calcio (receptores nicotínicos y NMDA). La despolarización que sigue a estos cambios iónicos genera señales rápidas en la neurona postsináptica (potenciales de acción) o lentas (elevación de la concentración citosólica del catión calcio y de otros segundos mensajeros).

1.1 EL RECEPTOR NICOTÍNICO DE TIPO NEURONAL

A pesar de que en el SNC existen diferentes poblaciones de neuronas que contienen y liberan acetilcolina, hasta 1986 se pensaba que ésta actuaba exclusivamente a través de receptores muscarínicos. En esta fecha, en un trabajo de Boulter y col. (Boulter, Evans et al. 1986) se describieron los resultados obtenidos mediante hibridización *in situ* en los que se mostraba que los receptores nicotínicos eran abundantes en muchas partes del cerebro. Desde entonces, la forma más clara y simple de clasificar los receptores nicotínicos es aquella que los agrupa en musculares y neuronales.

El receptor nicotínico neuronal (nAChR) se encuentra ampliamente distribuido, con localizaciones pre- y post-sinápticas, tanto a nivel del sistema nervioso autónomo

(SNA), como en células cromafines de la suprarrenal y en muchas neuronas del SNC, particularmente en el hipocampo y en la corteza prefrontal (McGehee and Role 1995). Se ha descrito también su presencia en diferentes tejidos no-nerviosos como el epitelio intestinal, el epitelio y el endotelio pulmonar, el tejido adiposo, el sistema inmune, el epitelio oral y el endotelio vascular, en queratinocitos, en órganos reproductores, en vejiga urinaria o en células cancerígenas (Gahring and Rogers 2005; Kawashima and Fujii 2008), donde se han relacionado con la patología de ciertas enfermedades, convirtiéndolos así en potenciales dianas terapéuticas (Gwilt, Donnelly et al. 2007; Fujii, Takada-Takatori et al. 2008; Kawashima and Fujii 2008; Arias, Richards et al. 2009; Egleton, Brown et al. 2009; Foster, Jones et al. 2012).

1.1.1 Estructura y composición de los receptores nicotínicos neuronales

El receptor nicotínico neuronal, al igual que su homólogo de la placa motora, pertenece a la gran superfamilia de receptores ionotrópicos, en la que se incluyen los receptores de glicina, GABA_A, 5-HT₃ para serotonina y NMDA y AMPA para glutamato (Bormann and Clapham 1985; Castro, Oset-Gasque et al. 1989; Ortells and Lunt 1995).

Gran parte de lo que se conoce sobre la estructura de los nAChRs se ha extrapolado a partir de los estudios de microscopía electrónica realizados en los nAChRs post-sinápticos del órgano eléctrico del pez *Torpedo* (Unwin 1993; Unwin 1995; Miyazawa, Fujiyoshi et al. 1999; Miyazawa, Fujiyoshi et al. 2003; Unwin 2005), así como de los estudios estructurales de alta resolución de la AChBP (*Acetylcholine binding protein*) (Brejc, van Dijk et al. 2001). Esta última es una proteína soluble homopentamérica que secretan las células gliales del caracol *Lymnaea* en las sinapsis colinérgicas, en las que modula la transmisión sináptica mediante su unión a la ACh. Su hallazgo ha permitido avanzar enormemente en el conocimiento de la estructura extracelular de los receptores nicotínicos, en particular de su lugar de unión al agonista.

Desde un punto de vista estructural, el receptor nicotínico neuronal es una proteína transmembrana formada por la combinación de cinco subunidades que se

insertan en la membrana celular de forma simétrica, a modo de barril, en torno a un poro central (**figura 1**), cada una de las cuales ejerce una función determinada en el receptor. Estas subunidades se asocian entre sí con diferentes estequiometrías para dar lugar a receptores funcionales.

Cada una de estas subunidades consta de cuatro zonas bien definidas (Corringer, Le Novere et al. 2000; Karlin 2002):

- (1) Un largo **dominio extracelular** que abarca la región comprendida entre el extremo N-terminal y el primer segmento transmembrana (M1), que contiene sitios para glicosilación y los elementos esenciales del sitio de unión de agonistas y antagonistas.
- (2) Cuatro **segmentos transmembrana** de carácter lipofílico denominados M1, M2, M3 y M4. El poro iónico está formado por el segmento transmembrana M2 y por parte del extremo N-terminal del segmento transmembrana M1 de cada una de las subunidades que forman el receptor.
- (3) Un largo **dominio citoplasmático**, comprendido entre los segmentos M3 y M4, donde se sitúan sitios de fosforilación, que condicionan la modulación del receptor. A pesar de que todas las subunidades presentan secuencias homólogas, ésta es la región más variable (Sargent 1993; Lindstrom, Anand et al. 1995).
- (4).-Un corto **dominio C-terminal** orientado extracelularmente.

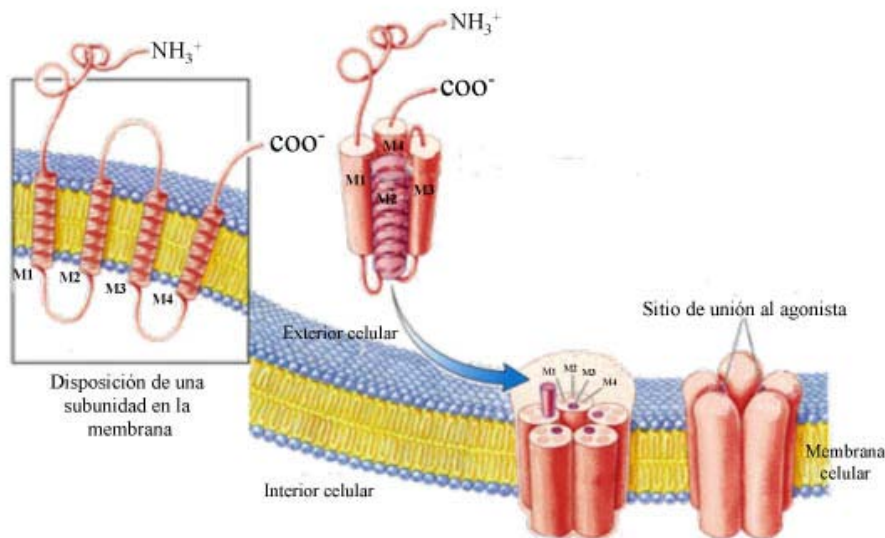


Figura 1. Estructura del receptor nicotínico inserto en la membrana. La glicoproteína está formada por 5 subunidades homólogas, cada una de las cuales presenta 4 segmentos hidrofóbicos (M1-M4) que se disponen atravesando la membrana. Los extremos N- y C- terminal de la proteína son extracelulares.

Las diferentes subunidades que forman parte de un nAChR se pueden clasificar en dos grandes grupos según su función (**figura 2**):

- a) Subunidades de unión al agonista o subunidades α :** Caracterizadas por la presencia de dos residuos de cisteínas contiguos en las posiciones 192 y 193, situadas en el extremo N-terminal (Karlin and Akabas 1995). El agonista se une a 2 subunidades α o en lugares cercanos a la interfase entre éstas y otras subunidades.
- b) Subunidades estructurales o subunidades β :** su función principal es estructural, si bien en los últimos años se les está otorgando un papel importante en el proceso de unión del agonista (Duvoisin, Deneris et al. 1989; Sine 1993; Parker, Beck et al. 1998; Boorman, Beato et al. 2003; Unwin and Fujiyoshi 2012) y en la funcionalidad y sensibilidad farmacológica del receptor

(Duvoisin, Deneris et al. 1989; Cachelin and Jaggi 1991; Luetje and Patrick 1991; Papke and Heinemann 1991; Harvey and Luetje 1996; Bohler, Gay et al. 2001; Wu, Liu et al. 2006).

En este apartado podría incluirse a la subunidad $\alpha 5$, que si bien se designó como subunidad α por la presencia de las dos cisteínas contiguas en el extremo N-terminal, no presenta en su secuencia determinados aminoácidos característicos conservados en todas las subunidades α , que parece estar implicados en la unión al agonista (Karlin and Akabas 1995). Además, su secuencia guarda gran parecido con la subunidad $\beta 3$ (Boulter, O'Shea-Greenfield et al. 1990) y no es capaz de formar receptores con sitios de unión al agonista funcionales cuando se co-inyecta con otras subunidades α o β en ovocitos de *Xenopus*. No obstante, se le han atribuido funciones tanto estructurales como modificadoras de las características biofísicas y farmacológicas del receptor (Ramirez-Latorre, Yu et al. 1996; Wang, Gerzanich et al. 1996; Kuryatov, Onksen et al. 2008).

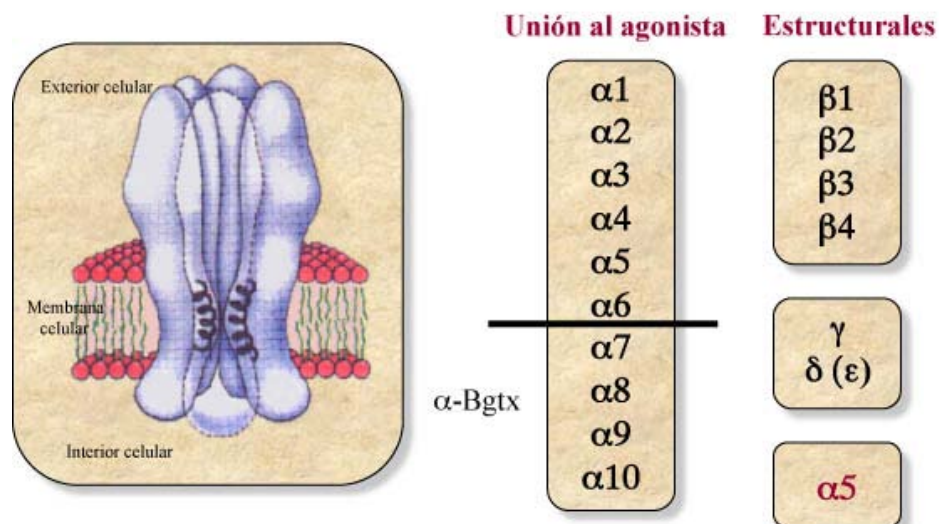


Figura 2. Diferentes subunidades que pueden formar parte de un receptor nicotínico neuronal

1.1.2 Clasificación de los receptores nicotínicos neuronales

Hasta la fecha se han identificado 12 genes distintos que codifican otras tantas subunidades del receptor nicotínico neuronal. De todos estos genes, nueve codifican para las denominadas subunidades α (α_2 - α_{10}), mientras que las tres restantes se denominan subunidades β (β_2 - β_4). Algunos de estos genes han sido clonados en la especie humana (α_2 - α_5 , α_7 , β_2 y β_4)(Sargent 1993; Dani 2001).

A diferencia de lo que ocurre con el receptor nicotínico de músculo esquelético, que está constituido por la combinación de 4 subunidades diferentes (α_1 , β_1 , γ y δ) (**figura 3**), la combinación exacta de subunidades del pentámero que configura el receptor nicotínico neuronal no ha podido ser aún esclarecida *in vivo*; es razonable pensar en la existencia de varias combinaciones posibles entre las distintas subunidades, que dan lugar a diversos subtipos de receptores nicotínicos, pudiendo éstos estar formados por la agrupación de 5 subunidades α del mismo tipo (lo que origina receptores **homoméricos**), o por la combinación de como mínimo dos subunidades α con subunidades β (receptores **heteroméricos**).

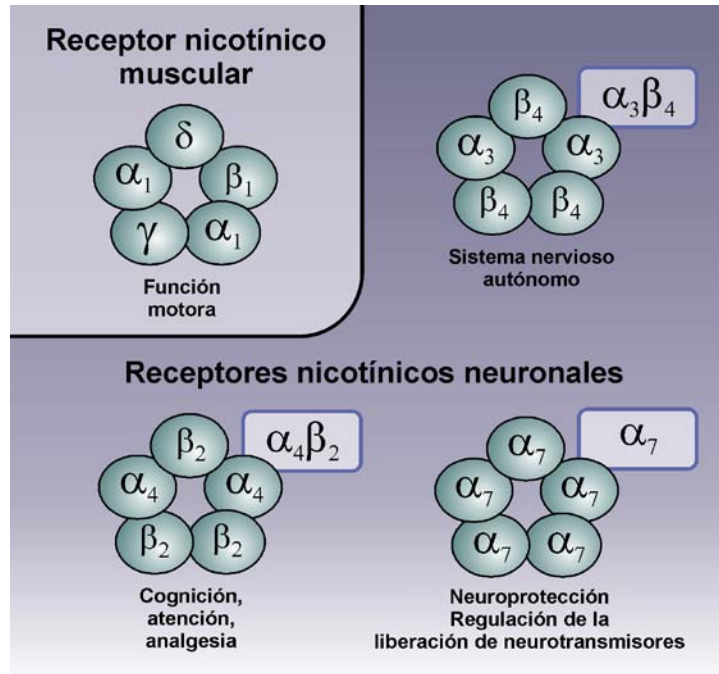


Figura 3. Subunidades que componen los principales subtipos de receptores nicotínicos presentes en el sistema nervioso y funciones fisiológicas que se asocian a los mismos (Gandía 2006).

De hecho, se conocen al menos ocho combinaciones posibles entre distintas subunidades α y β del receptor nicotínico, que han sido ya transfectadas y expresadas eficientemente en diversos sistemas de expresión, dando lugar a distintos subtipos de receptores nicotínicos, algunos de los cuales presentan propiedades fisiológicas y farmacológicas similares a las de los receptores naturales encontrados en el cerebro. Las combinaciones más frecuentemente encontradas en el SNC corresponden a los receptores heteroméricos $\alpha_3\beta_4$, y $\alpha_4\beta_2$ y a los receptores homoméricos α_7 (**figura 3**) (Sargent 1993; Dani 2001; Albuquerque, Pereira et al. 2009).

La composición en cuanto a subunidades de los nAChRs va a determinar tanto sus propiedades biofísicas (rapidez y tiempo medio de apertura, conductancia, desensibilización, permeabilidad al calcio, etc.) como sus propiedades farmacológicas y, por tanto, sus implicaciones fisiológicas y patológicas, de ahí la importancia de su caracterización.

Actualmente, la identificación de las subunidades que conforman un determinado receptor se basa en la combinación de técnicas de detección de ARNm (hibridación *in situ* o PCR) o proteínas (co-inmunoprecipitación o inmunocitoquímica), junto con ensayos funcionales (electrofisiología o secreción de neurotransmisores).

1.1.3 Aspectos funcionales de los receptores nicotínicos neuronales.

Como se ha comentado anteriormente, la activación del nAChR tiene lugar cuando un ligando (agonista) se une a dicho receptor, provocando una serie de cambios conformacionales que llevan a la apertura del poro iónico del canal, lo que favorecerá los movimientos iónicos a través de este receptor. Dentro de este proceso de activación del nAChR debemos comentar los siguientes aspectos que pueden tener importantes repercusiones en el funcionamiento de los distintos subtipos de receptores nicotínicos neuronales:

A) Sitios de unión del ligando: es necesaria la unión de dos moléculas de agonista al nAChR para provocar el cambio conformacional que va a afectar a todas las subunidades y que tiene como consecuencia final la apertura de su canal iónico (Sine and Taylor 1980; Kistler, Stroud et al. 1982; Unwin 1996).

En el caso de los receptores homoméricos, este sitio de unión se sitúa en la interfase entre subunidades adyacentes, mientras que en el caso de receptores de tipo heteromérico, estos sitios de unión se encuentran en la interfase entre subunidades α y β (**figura 4**).

En ambos casos, el sitio de unión del ligando está formado por una serie de residuos aminoacídicos pertenecientes al componente principal o lado positivo (A, B y C) y al componente secundario o lado negativo (D, E y F)(Corringer, Le Novere et al. 2000; Dougherty and Lester 2001). Mientras que en los receptores heteroméricos el componente principal lo aportan las subunidades α y el secundario las subunidades β , en los receptores homoméricos todas las subunidades contribuyen a ambos componentes (Krause, Buisson et al. 1998).

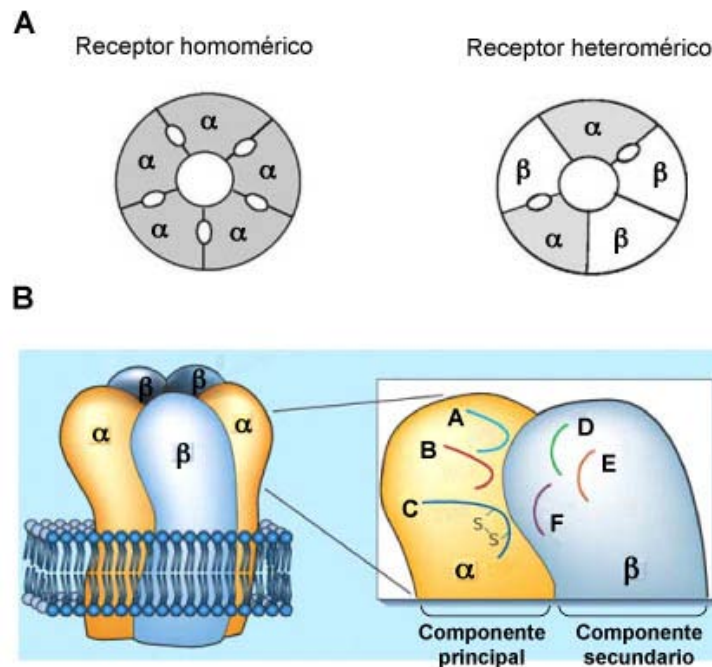


Figura 4. A) Localización de los sitios de unión del ligando en receptores de tipo homomérico y heteromérico (Adaptado de Gotti y Clementi, 2004); **B)** Localización de los componentes principal y secundario en un receptor heteromérico (Adaptado de Dourgherty y Lester, 2001).

Es de destacar que ni la subunidad α_5 ni la β_3 forman parte de los sitios de unión del ligando, ya que estas subunidades carecen de los aminoácidos necesarios para ello y, por tanto, están consideradas como subunidades auxiliares (Gotti and Clementi 2004).

B) Comportamiento cinético: como ya se ha comentado, la unión del agonista al receptor provoca una serie de cambios conformacionales que llevan a una rotación de las subunidades y concluyen con la apertura del poro y el paso de cationes a su través.

De una manera muy simplista, el proceso de unión del agonista y activación del receptor se pueden explicar a través de un modelo cinético sencillo (**figura 5**). Según este modelo, desde un punto de vista funcional, los distintos subtipos de

nAChRs pueden encontrarse en tres estados distintos (Karlín and Akabas 1995):

- Reposo o estacionario: predomina en ausencia de agonista. En este caso la probabilidad de apertura del canal es muy baja.
- Abierto: la unión de dos moléculas de agonista favorece la apertura del canal durante unas decenas de milisegundos.
- Desensibilizado: en la presencia continua del agonista provoca un cambio conformacional en el receptor que hace que el canal pierda su funcionalidad.

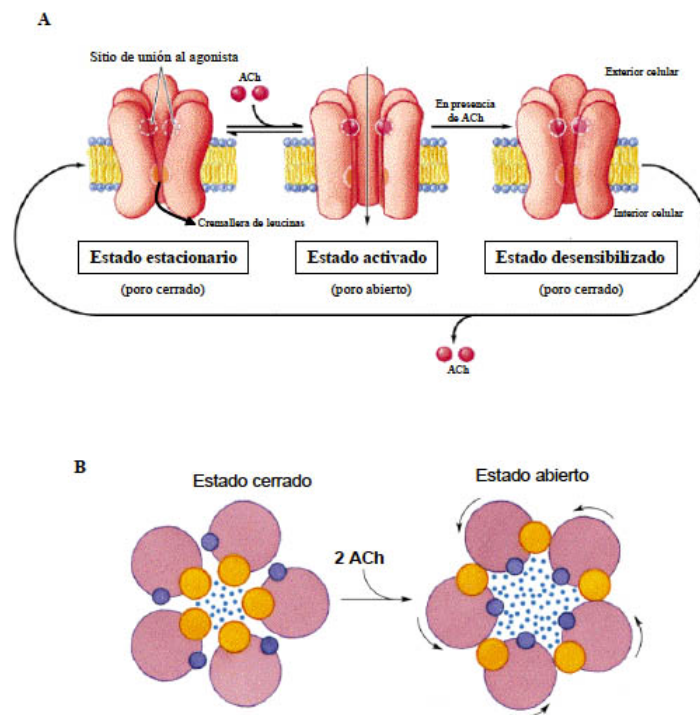


Figura 5. Activación del nAChR. **(A)** Modelo cinético sencillo del proceso de activación del canal que incluye 3 estados conformacionales del receptor. **(B)** Cambios conformacionales que tienen lugar tras la unión de 2 moléculas de agonista, que conlleva a la apertura del poro iónico.

C) Selectividad iónica del canal: Los nAChRs son canales iónicos selectivos al paso de cationes (Na^+ en mayor medida, Ca^{2+} y K^+). En esta selectividad iónica

se ven implicados una serie de aminoácidos cargados negativamente (Glu, Gln y Asp) del segmento M2 de cada una de las subunidades que forman el canal, los cuales confieren un entorno óptimo al paso de cationes, impidiendo el paso de aniones por repulsión electrostática (Imoto, Methfessel et al. 1986; Imoto, Busch et al. 1988).

Particularmente interesante resulta la permeabilidad al catión Ca^{2+} de los receptores nicotínicos neuronales. Dependiendo de la estructura molecular del receptor, la permeabilidad iónica a este catión varía de unos receptores a otros.

Así, se ha descrito que el receptor nicotínico de la unión neuromuscular en vertebrados presenta una muy baja permeabilidad a Ca^{2+} (Lewis 1979; Adams, Dwyer et al. 1980) con respecto a la permeabilidad descrita para los receptores de glutamato, en concreto para el subtipo de receptor NMDA, que se ha descrito como un receptor sumamente permeable a calcio.

Por el contrario, los receptores nicotínicos neuronales presentan una permeabilidad relativamente alta a Ca^{2+} (Mulle, Choquet et al. 1992; Vernino, Amador et al. 1992; Rathouz and Berg 1994), si bien, esta permeabilidad depende de la subunidad presente en el receptor funcional. Algunos de estos receptores se han descrito como altamente permeables a calcio, como es el caso de los receptores homoméricos, que presentan una elevada permeabilidad al ión Ca^{2+} , siendo ésta equiparable incluso a la de los receptores de glutamato de tipo NMDA, en el caso de receptores $\alpha 7$ (Rogers and Dani 1995; Fucile 2004), o incluso a la de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, como es el caso de los receptores $\alpha 9$ (Jagger, Griesinger et al. 2000; Katz, Verbitsky et al. 2000).

Finalmente, cabe destacar que la presencia de la subunidad $\alpha 5$ ha sido relacionada con un aumento ostensible de la permeabilidad a este catión en receptores heteroméricos (Gerzanich, Wang et al. 1998).

1.1.4 Farmacología de los receptores nicotínicos neuronales.

Gracias a las técnicas de biología molecular y de mutagénesis dirigida, combinadas con técnicas electrofisiológicas, ha sido posible la identificación de determinados aminoácidos en el nAChR implicados en los procesos de reconocimiento de los diferentes fármacos. Además del lugar de unión del agonista, donde también pueden unirse antagonistas competitivos, también han sido descritos otros sitios de unión para fármacos no competitivos, tanto agonistas como antagonistas, y para otras sustancias moduladoras (Paterson and Nordberg 2000) (**figura 6**).

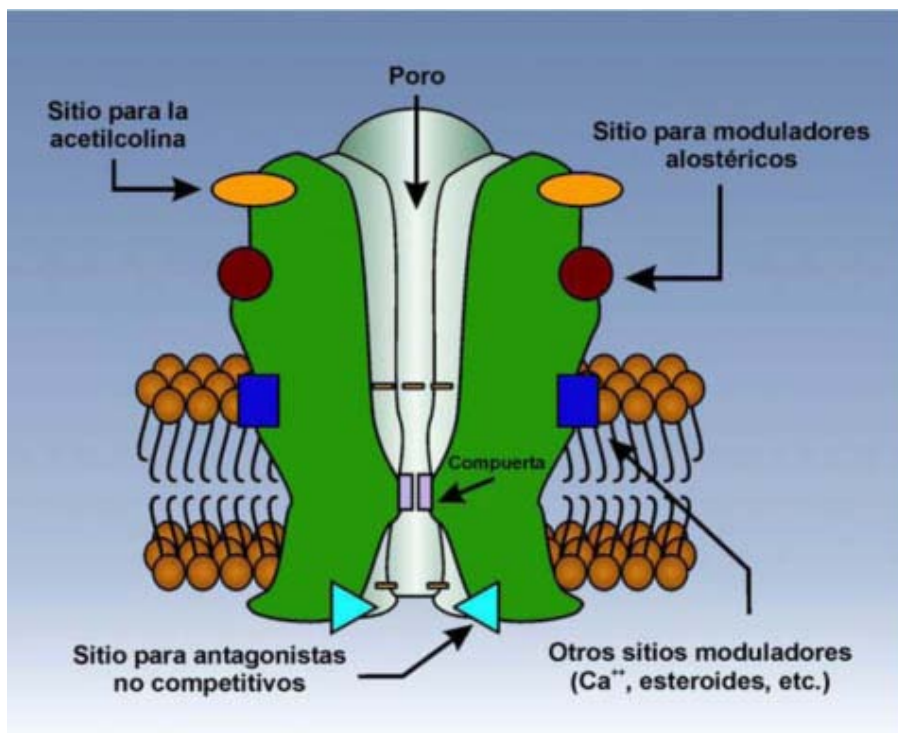


Figura 6. Representación esquemática del receptor nicotínico neuronal con los sitios de unión para diferentes ligandos farmacológicos (agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos).

La combinación de subunidades presentes en un determinado receptor no sólo determina su especificidad funcional, sino también un perfil farmacológico

característico. La farmacología de los compuestos que actúan sobre los distintos subtipos de receptores se evalúa mediante técnicas electrofisiológicas y bioquímicas, tanto en preparaciones celulares, como en sistemas de expresión heteróloga de los ARNm que codifican las distintas subunidades. A pesar de la diferencia que pueda existir entre el funcionamiento de los receptores recombinantes y los nativos (Sivilotti, McNeil et al. 1997), el objetivo de los estudios realizados en sistemas de expresión heteróloga es determinar qué subtipos están implicados en cada uno de los efectos de los distintos fármacos nicotínicos.

La mayor parte de los agonistas nicotínicos disponibles actualmente (**Tabla 1**) se caracterizan por no poseer selectividad receptorial, es decir, son capaces de activar todos los subtipos de receptores nicotínicos. La aparición de nuevos compuestos selectivos ha permitido conocer la implicación de un determinado subtipo de receptor en una determinada función fisiológica o fisiopatológica.

<p><u>Agonistas no selectivos</u> 5-I-A85380 ABT-418 / ABT-089 / ABT-594 Acetilcolina Anabaseína Anatoxina Carbacol Dimetilfenilpiperazinio (DMPP) Epibatidina Lobelina Nicotina</p>	<p><u>Agonistas selectivos $\alpha 7$</u> 4-OH-GTS-21 AR-R17779 Colina GTS-21 JN403 PNU-282987</p>
<p><u>Antagonistas no selectivos</u> α-conotoxina MII Clorisondamida Dihidro-β-eritroidina D-tubocurarina Erisodina Hexametonio Mecamilamina Trimetafán</p>	<p><u>Antagonistas selectivos $\alpha 7$</u> α-bungarotoxina α-conotoxina Iml Metilicaconitina</p>
<p><u>Moduladores alostéricos no selectivos</u> Codeína</p>	<p><u>Moduladores alostéricos selectivos $\alpha 7$</u> 5-OH-indol PNU120596</p>

Fisostigmina (eserina) Galantamina Ivermectina	
--	--

Tabla 1. Algunos ligandos de receptores nicotínicos neuronales

Actualmente están adquiriendo gran importancia los moduladores alostéricos, tanto en el campo de la terapéutica, como en el de la farmacología. El concepto de modulador alostérico surgió de la mano de la galantamina, un fármaco actualmente utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y que, aunque inhibe débilmente la acetilcolinesterasa, mejora de forma significativa la cognición y retrasa el deterioro del paciente. Se ha planteado la posibilidad de que su efecto alostérico, a nivel de receptores nicotínicos cerebrales, sea el responsable de su eficacia en la prevención del deterioro cognitivo, por lo que en la actualidad se está trabajando en la síntesis de nuevos moduladores alostéricos que puedan actuar mejorando la transmisión colinérgica en otras enfermedades (Williams, Wang et al. 2011).

Los moduladores alostéricos se unen al receptor nicotínico en un lugar diferente al sitio de unión del agonista (**figura 6**), induciendo un cambio conformacional que provoca una hipersensibilidad del receptor al agonista (Changeux and Edelstein 2001). La principal ventaja de estos compuestos como agentes terapéuticos es que no son activos en ausencia de agonista. Además, los moduladores alostéricos selectivos, por ejemplo, para el receptor $\alpha 7$, constituyen una herramienta farmacológica muy útil para la comprensión de la farmacología y del papel fisiológico de estos receptores (Williams, Wang et al. 2011).

1.1.5 Implicaciones fisiopatológicas de los receptores nicotínicos neuronales

Para entender el papel fisiológico que los receptores nicotínicos neuronales es importante tener un buen conocimiento sobre la distribución de estos receptores en el SNC, es decir, conocer qué subtipos de nAChR se expresan en una determinada área cerebral. Este conocimiento sobre la distribución de los diferentes subtipos de nAChR nos permitirán también entender la posible correlación entre disfunciones receptoriales

y alteraciones o patologías del SNC. Para llevar a cabo este mapeo de los distintos subtipos de receptores nicotínicos neuronales se han utilizado diversas metodologías, entre otras el estudio de los ARNm en distintas áreas cerebrales, el uso de distintos fármacos agonistas y/o antagonistas combinado con técnicas de imagen (por ejemplo tomografía de emisión de positrones; PET), el uso de anticuerpos selectivos como marcadores de subtipos de nAChR, o mediante técnicas de inmunoprecipitación con anticuerpos o toxinas selectivas (Hurst, Rollema et al. 2013). La figura 7 muestra un ejemplo de uno de estos estudios orientados a la identificación de los diferentes subtipos de nAChRs presentes en cada zona cerebral (Gotti, Zoli et al. 2006; Gotti, Clementi et al. 2009).

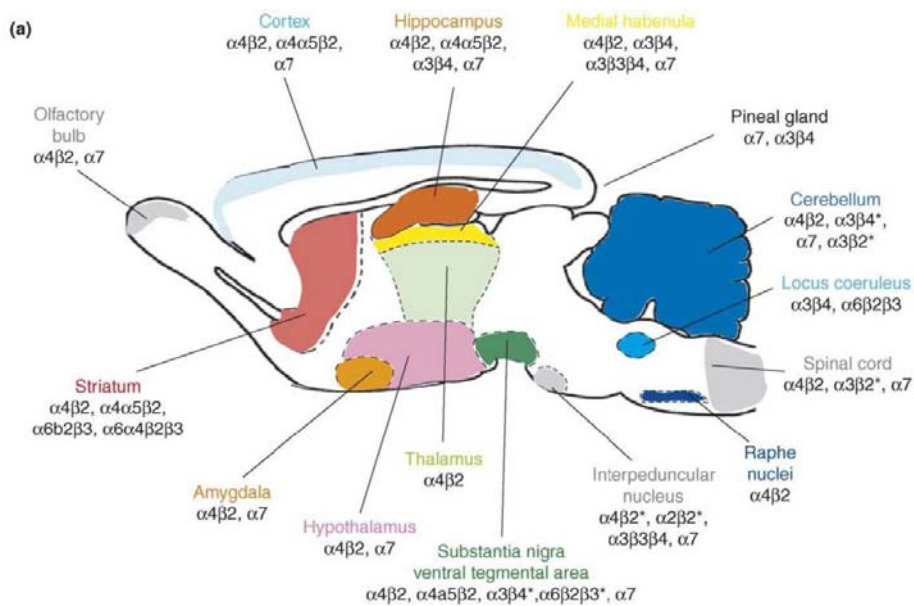


Figura 7. Distribución regional de los distintos subtipos del receptor nicotínico de acetilcolina en el Sistema Nervioso de ratón (Adaptado de Gotti y col., 2006).

Gracias a estos estudios de mapeo receptorial, en los últimos años se ha descrito que los receptores nicotínicos neuronales están involucrados en diversas funciones cognitivas del sistema nervioso, entre otras el aprendizaje y la memoria, la atención, el control de la actividad motora, percepción sensorial y del dolor, y la

regulación corporal de la temperatura. Generalmente estos efectos están relacionados con la existencia de receptores nicotínicos (que suelen contener la subunidad $\alpha 7$) en la terminal presináptica, que actúan modulando la secreción de neurotransmisores (Wonnacott 1997; Rushforth, Allison et al. 2010). Sin embargo, no hay que olvidar el papel de estos receptores a nivel postsináptico en el control de la transmisión en ganglios periféricos, hipocampo y corteza sensorial (Jones, Sudweeks et al. 1999). Otra implicación que a lo largo de los últimos años ha ido adquiriendo más adeptos es la acción neuroprotectora ejercida por los receptores nicotínicos neuronales, fundamentalmente por el receptor $\alpha 7$, al inducir la síntesis de factores de crecimiento nervioso o reducir la citotoxicidad mediada por glutamato (Shimohama, Akaike et al. 1996; Kaneko, Maeda et al. 1997; Picciotto, Zoli et al. 1998; Marubio, Gardier et al. 2003; Liu, Zhang et al. 2007; Kawamata and Shimohama 2011; Kawamata, Suzuki et al. 2011; Liu, Hu et al. 2012; Hurst, Rollema et al. 2013).

Por último, también se postula la implicación de estos receptores en una gran variedad de patologías neuronales: enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson o demencia por cuerpos de Lewy (Zanardi, Leo et al. 2002; Francis and Perry 2007; Hernandez and Dineley 2012), disfunciones cerebrales como el autismo o la esquizofrenia (Freedman, Harley et al. 1988; Gotti, Zoli et al. 2006; Wallace and Bertrand 2013) o epilepsias como la hereditaria de tipo ADNFL (del inglés *Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy*) (Greenlee, Clader et al. 2001; Steinlein 2007), en la que se han descrito mutaciones de la subunidad $\alpha 4$ o de la subunidad $\beta 2$ (De Fusco, Becchetti et al. 2000).

Todos estos hallazgos sobre las posibles implicaciones fisiopatológicas de los diversos subtipos de receptores nicotínicos neuronales ha llevado a postular que fármacos con actividad sobre estos receptores (fundamentalmente agonistas con mayor o menor selectividad receptorial y/o moduladores alostéricos), podrían tener potencialidad terapéutica frente a distintas situaciones patológicas, desde la adicción al tabaco, hasta la epilepsia, pasando por la esquizofrenia, alteraciones de la cognición, la inflamación y el dolor, entre otras (Hurst, Rollema et al. 2013).

1.2 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La Enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por primera vez por el psiquiatra y neuropatólogo alemán Alois Alzheimer en 1906 en el XXXVII Congreso de Psiquiatras del suroeste de Alemania (Zilka and Novak 2006). Alois, considerado el padre de la neuropatología, presentó el caso de una mujer (Augusta D.) de 51 años con demencia progresiva, entre cuyos síntomas se relataban: pérdida grave de memoria, desorientación, alteraciones del lenguaje e ideas paranoides. La paciente moriría cuatro años después en un estado de demencia grave. La autopsia reveló lesiones cerebrales importantes, atrofia cerebral y la presencia de placas seniles extracelulares y ovillos neurofibrilares intraneurales (NFT) que se convirtieron en las huellas características de la enfermedad.



Figura 8: A la **izquierda**, una foto de Alois Alzheimer. A la **derecha**, una imagen de un ovillo neurofibrilar en el cerebro de Augusta D. descrito por primera vez por el Dr. Alzheimer. Adaptado de (Zilka and Novak 2006)

Comenzaba en este momento una apasionante historia, la descripción y preocupación por una enfermedad que ha dado lugar a la mayor investigación sobre el funcionamiento del sistema nervioso humano, y que fue denominada con el nombre de su descubridor, la enfermedad de Alzheimer (EA). Actualmente el diagnóstico de casos de demencia es diez veces superior al detectado a principios de siglo. Diversos estudios en todo el mundo han detectado que el crecimiento de la enfermedad discurre en paralelo al envejecimiento de las poblaciones. La mayor longevidad y el consecuente aumento de población mayor de 65 años provocarán, en un futuro inmediato, un importante problema socio-sanitario (Wimo, Jonsson et al. 2013). Datos publicados por la Organización Mundial de la Salud indican que la prevalencia es variable, y se duplica cada 5 años a partir de los 65 años hasta los 85 años. Así, se estima una prevalencia desde un 1% a los 60 años hasta el 32% a los 94 años. En sujetos menores de 75 años la prevalencia es ligeramente mayor en hombres, mientras que en mayores de 75 años la prevalencia es mayor en mujeres (Wortmann 2012; Hebert, Weuve et al. 2013; Misiak, Cialkowska-Kuzminska et al. 2013).

1.2.1 Características clínicas de la enfermedad de Alzheimer.

La EA es una enfermedad neurodegenerativa, progresiva e irreversible cuya sintomatología clínica se caracteriza principalmente por la pérdida de memoria y la disminución de la cognición, siendo la más frecuente de todos los tipos de demencias conocidas. El tipo más común y complejo de EA es la de inicio tardío (comienzo después de los 60 años), donde poseer el alelo $\epsilon 4$ del gen que codifica para la apolipoproteína E (APOE), localizado en el brazo largo del cromosoma 21, se ha reconocido como un factor de riesgo genético principal (Selkoe and Podlisny 2002). Aunque las mutaciones en ciertos genes representan sólo el 1% de los casos de EA, el riesgo de padecer Alzheimer atribuible a la genética se estima que puede llegar a ser de hasta un 70%. Se sabe que mutaciones en los genes que codifican para la proteína precursora de amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2) se asocian con la aparición de EA de comienzo precoz (antes de los 60 años), siendo mutaciones que se heredan de forma autosómica dominante.

Se describen cuatro etapas en el desarrollo de la enfermedad:

1. Fase **prodómica** o incipiente: los síntomas pueden ser muy sutiles y pueden parecerse a signos que muchas personas erróneamente atribuyen al "envejecimiento normal". Así inicialmente se produce lo que se ha denominado "deterioro cognitivo leve", es decir, la afectación de escasa intensidad de ciertas funciones superiores (como la memoria) sin que ello llegue a dificultar la capacidad del paciente para realizar sus tareas habituales.
2. Fase **inicial**: a medida que la enfermedad empieza a afectar la corteza cerebral, la pérdida de la memoria se acentúa y comienzan a surgir cambios en otras capacidades cognitivas. El diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer se hace generalmente durante esta etapa.
3. Fase **moderada**: en esta etapa, el daño ha progresado más hacia las áreas de la corteza cerebral que controlan el lenguaje, el razonamiento, el procesamiento sensorial y el pensamiento consciente. Las regiones afectadas siguen atrofiándose y las señales y los síntomas de la enfermedad se tornan más pronunciados y generalizados. Podrían llegar a presentarse problemas de comportamiento, como la deambulación o vagabundeo y la agitación. La supervisión y atención más intensiva se vuelven necesarias, y esto puede ser difícil para muchos cónyuges y familias.
4. Fase **avanzada**: las lesiones características como las placas seniles y los ovillos neurofibrilares se encuentran distribuidos por todo el cerebro y algunas áreas del cerebro han sufrido una marcada atrofia. Los pacientes no pueden reconocer a la familia y a los seres queridos ni comunicarse, por lo que van a ser completamente dependientes de otras personas. Dependen completamente de otras personas.

1.2.2 Características histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer.

Macroscópicamente los pacientes que padecen la enfermedad sufren una atrofia generalizada del cerebro, pero es a nivel microscópico donde la EA presenta tres características patognomónicas:

- 1) presencia de **placas seniles**, que se localizan extracelularmente y son el resultado de una acumulación y precipitación anormal de su principal componente, el péptido amiloide β ($\text{A}\beta$).
- 2) presencia de **ovillos neurofibrilares**, que son fibras helicoidales, unidas de forma pareada, compuestas de proteína *tau* hiperfosforilada que se acumulan en el interior de las neuronas. El papel de la proteína tau como desencadenante de la neurodegeneración que se produce en la EA, aún no está claro; sin embargo, algunos estudios implican a esta proteína en la muerte neuronal (Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986) (Iqbal and Grundke-Iqbal 2008).
- 3) presencia de **degeneración neuronal** granulovacuolar, que afecta principalmente al hipocampo y a la circunvolución temporal media y es característica única de la enfermedad, ya que las placas y ovillos pueden encontrarse, aunque muy raramente, en personas sanas de edad avanzada que no padecen la enfermedad.

1.2.3 La Hipótesis colinérgica de la enfermedad de Alzheimer.

En 1977, Petersen administró escopolamina (un antagonista competitivo de los receptores muscarínicos) a bajas concentraciones, a voluntarios sanos con el fin de bloquear la transmisión colinérgica e intentar reproducir los episodios amnésicos que sufren los enfermos de EA. El resultado fue que se produjo un déficit cognitivo cualitativamente similar al que acontece durante la EA, mostrando los voluntarios episodios recurrentes de amnesia anterógrada, característica de la EA, evidenciando así que la EA y alteraciones en las vías colinérgicas estaban estrechamente relacionadas (Petersen 1977). Estudios posteriores demostraron que el déficit

cognitivo producido por la escopolamina podía ser revertido, al menos parcialmente, por la fisostigmina, un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa, que impide la degradación de la acetilcolina y mejora así la función cognitiva (Drachman 1977).

En 1978, Smith y Swash observaron que el tipo de amnesia que se observaba en pacientes que padecían la demencia de Alzheimer, era semejante a aquella que se manifestaba en pacientes que sufrían el Síndrome de Korsakoff. El Síndrome de Korsakoff es un trastorno neurológico que se da principalmente en personas que sufren de alcoholismo crónico y se produce como consecuencia de daños cerebrales a nivel de hipocampo y lóbulo temporal medio, zonas íntimamente relacionadas con la memoria, además de una importante pérdida de neuronas colinérgicas en el núcleo basal de Meynert. Su tratamiento se basa en administrar anticolinesterásicos al enfermo y la mejoría aparece a los pocos días de comenzar el tratamiento terapéutico (Smith and Swash 1978).

Basándose en estas evidencias y en lo ya descrito por otros autores de la época que describieron que durante la EA se producía una pérdida selectiva de neuronas colinérgicas a nivel central (Davies and Maloney 1976; Perry, Tomlinson et al. 1978), Bartus propuso la **“Hipótesis colinérgica”** como una posible explicación para describir que el deterioro cognitivo asociado a la EA está íntimamente relacionado con la pérdida de función colinérgica en el SNC (Bartus, Dean et al. 1982; Terry and Buccafusco 2003). Bartus propuso que, para que esta **Hipótesis colinérgica** fuese una explicación causal, debían cumplirse los siguientes tres requerimientos:

1.-En los pacientes con EA deberían encontrarse marcadores específicos que indiquen la existencia de una alteración colinérgica. Así pues y basándose en la bibliografía de ese momento propuso:

- a) Determinar la actividad de la enzima colino-acetil-transferasa (CAT), responsable de la síntesis de acetilcolina, en el cerebro del enfermo. Se ha descrito que, aunque la actividad de la CAT disminuye debido al proceso senescente natural, los pacientes que sufren de EA muestran reducciones

muy significativas en la actividad de la misma, especialmente en aquellas regiones más vulnerables a los efectos de la enfermedad, como son el hipocampo, el córtex y el *striatum* (Kuhar, Sethy et al. 1973).

- b) Observar la estructura del Núcleo Basal de Meynert pues se ha demostrado que durante la EA se produce una pérdida importante de neuronas colinérgicas en este Núcleo (Whitehouse, Price et al. 1981; Arendt, Bigl et al. 1983; Arendt, Bigl et al. 1984; Arendt, Bigl et al. 1985).

2.-Experimentalmente se deberían poder provocar alteraciones artificiales de la función colinérgica en pacientes jóvenes que mimetizasen las alteraciones cognitivas características de personas que sufren EA. Este hecho ya había sido confirmado por Petersen, en sus investigaciones con la escopolamina, que producía amnesia debido a una interrupción específica de los mecanismos colinérgicos (Petersen 1977).

3.-Si se consigue producir una mejora en la actividad colinérgica en estos pacientes deberían reducirse significativamente los déficits cognitivos. Así, se ha observado que el tratamiento con fármacos anticolinesterásicos ayudan a mejorar la función cognitiva de forma significativa. Lamentablemente, si bien estos fármacos resultan efectivos al inicio de su administración, se desconocen las causas por las que éstos dejan de funcionar transcurrido un tiempo, más o menos prolongado, de tratamiento.

1.2.4 El péptido amiloide β en la enfermedad de Alzheimer.

El péptido amiloide β es un pequeño péptido de 35-42 aminoácidos que se sintetiza a partir del precursor proteico amiloide (conocido como la proteína APP).

La proteína APP es una glicoproteína de membrana con una función fisiológica no claramente establecida, si bien se le relaciona con la activación de quinasas (Bogoyevitch, Boehm et al. 2004; Tabaton, Zhu et al. 2010), con la protección frente al estrés oxidativo (Zou, Gong et al. 2002; Baruch-Suchodolsky and Fischer 2009), con la regulación del transporte del colesterol (Yao and Papadopoulos 2002; Igbavboa, Sun

et al. 2009), así como con una actividad antimicrobiana asociada a su acción pro-inflamatoria (Soscia, Kirby et al. 2010); pero es bajo condiciones patológicas cuando esta proteína adquiere un papel protagonista debido a uno de sus productos de degradación, el péptido amiloide β .

La proteína APP es procesada secuencialmente por 2-3 secretasas (Goldgaber, Lerman et al. 1987). Como se muestra en la figura 9, la APP sufre, de forma constitutiva (lo que se conoce como la **vía no amiloidogénica**), una doble escisión primeramente por una α -secretasa, que va a dar lugar a la formación de una proteína APP soluble (APPs- α) y un fragmento C-terminal de 83 residuos (C83) que queda anclado en la membrana. Posteriormente, este fragmento C83 va a sufrir una segunda escisión por otra proteasa llamada γ -secretasa, liberándose un péptido p3.

Sin embargo, en ciertas condiciones patológicas se pone en marcha una **vía amiloidogénica**, en la que va a entrar en juego una enzima β -secretasa, que da como resultado la secreción de una proteína ligeramente truncada (APPs- β) y un fragmento C-terminal de 99 residuos. Este fragmento C99 sufrirá una escisión por la γ -secretasa, dando lugar al péptido A β (Selkoe 1998)

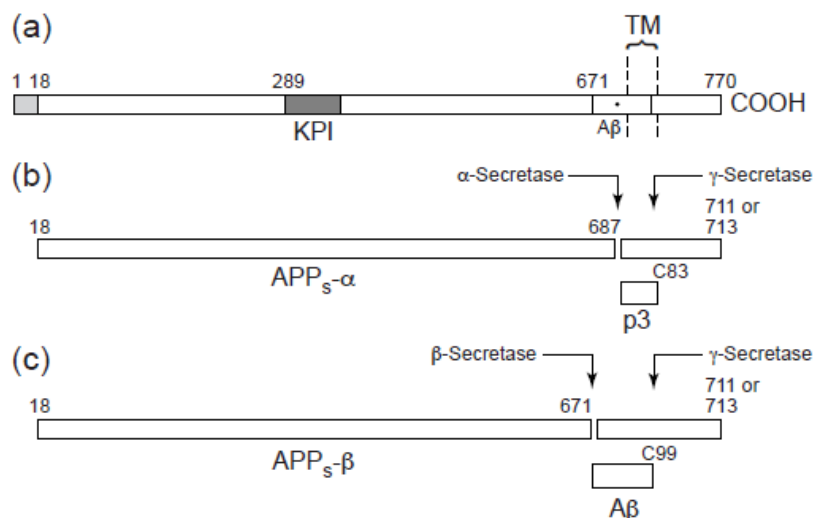


Figura 9: Representación esquemática de las rutas de degradación de la proteína APP (a). **(b)** Ruta no amiloidogénica: Las flechas indican los sitios donde se produce la escisión proteolítica constitutiva realizada por la α -secretasa y la γ -secretasa. **(c)** Vía amiloidogénica: La escisión

proteolítica alternativa por la β -secretasa da como resultado la secreción de la molécula, ligeramente truncada, APPs- β y la posterior escisión por la γ -secretasa va a liberar el péptido A β (Selkoe 1998).

El péptido A β exhibe una alta propensión a agregarse en solución acuosa dando lugar a una variedad de agregados de distintos tamaños, desde oligómeros a fibras amiloides insolubles (Selkoe, Yamazaki et al. 1996; Gralle and Ferreira 2007). Exceptuando la forma monomérica del A β las formas agregadas del péptido son altamente tóxicas para las neuronas y han sido relacionadas directamente con la patogénesis de la EA (Haass and Selkoe 2007; Miranda-Ferreira, Pascual et al. 2007).

1.2.5 Péptido amiloide β y receptores nicotínicos neuronales en la enfermedad de Alzheimer.

Si bien no están totalmente esclarecidas las razones para la “selectividad” de la EA por las neuronas colinérgicas (Terry and Buccafusco 2003), hay datos que apuntan a que el depósito del péptido A β puede favorecer la neurodegeneración de las neuronas colinérgicas preferentemente. En esta dirección, se ha encontrado una concentración particularmente elevada de receptores nicotínicos neuronales del subtipo $\alpha 7$ cerca de las placas seniles del cerebro de pacientes con EA, resultando particularmente llamativo el hecho de que estos nAChR $\alpha 7$ inmunoprecipiten conjuntamente con el péptido A $\beta_{(1-42)}$, lo que sugiere que puede existir una fuerte unión entre ambas estructuras (Wang, Lee et al. 2000).

Inicialmente se pensó que las fibras amiloides presentes en las placas seniles eran las principales responsables del daño neuronal (Hardy, Chartier-Harlin et al. 1992). Sin embargo, esta hipótesis, ha sido modificada posteriormente (Hardy and Selkoe 2002) al observarse que eran probablemente las formas solubles de oligómeros de A β las responsables de la neurotoxicidad del A β en la EA. De hecho, actualmente se sabe que son las formas oligoméricas de A β que inician los mecanismos que conducen a la hiperfosforilación de *tau*, el estrés oxidativo neuronal, la inhibición de la plasticidad sináptica, la pérdida de sinapsis y, por último, la muerte

neuronal características de la EA (Lambert, Barlow et al. 1998; Walsh, Klyubin et al. 2002; De Felice, Velasco et al. 2007; Lacor, Buniel et al. 2007; De Felice, Wu et al. 2008; Shankar, Li et al. 2008; De Felice, Vieira et al. 2009).

Con respecto a la disminución del número de nAChRs que se observa en la EA, se sabe que durante el proceso de envejecimiento normal se produce una pérdida progresiva de nAChRs que determina una senescencia celular, pero es durante la EA cuando esta pérdida se hace mucho más significativa afectando a diversas áreas del cerebro como son el córtex cerebral y el hipocampo (Kellar, Whitehouse et al. 1987; Wevers and Schroder 1999); (Perry, Martin-Ruiz et al. 2000).

Aparentemente la reducción en el número de nAChRs durante la EA no es debida a una disminución en la expresión de estos receptores, ya que los niveles de ARNm de diferentes subunidades nicotínicas (medida por técnicas de hibridación *in situ* o PCR cuantitativa) de pacientes enfermos y de individuos sanos no mostraron diferencias (como por ejemplo, para las subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 4$) o incluso eran superiores en pacientes de EA (como es el caso de la subunidad $\alpha 7$) (Terzano, Court et al. 1998; Mousavi, Hellstrom-Lindahl et al. 2003). Esto sugiere que debe haber un componente en la patogénesis de la EA que hace que se pierdan los nAChRs pre-existentes, posiblemente debido a una alteración en el tráfico de receptores o en la activación de los mismos, en lugar de una interferencia durante la transcripción (Jurgensen and Ferreira 2010).

Durante las últimas dos décadas se han publicado numerosos trabajos que demuestran que existe una evidente interacción entre los nAChRs y el péptido A β . Se ha descrito que el péptido A β es capaz de unirse selectivamente a los receptores nAChR $\alpha 7$, bloqueando las corrientes nicotínicas en neuronas en cultivo y rodajas de hipocampo (Wang, Lee et al. 2000; Liu, Kawai et al. 2001; Dineley, Bell et al. 2002; Magdesian, Nery et al. 2005; Dineley 2007; Puzzo, Privitera et al. 2008). En esta línea Nagele y col. describieron como esta unión nAChR-A β conduce a la internalización del complejo péptido-receptor (Nagele, D'Andrea et al. 2002). Por ello, se sospecha que la producción excesiva de A β durante las fases tempranas de la enfermedad de



Alzheimer podría estar bloqueando los receptores nicotínicos $\alpha 7$, lo que podría conducir a la muerte de las neuronas colinérgicas.

Finalmente, cabe destacar que también se ha descrito que la activación de los nAChRs puede actuar regulando en sentido favorable el procesamiento de la proteína precursora de $A\beta$ (APP), disminuyendo de esta forma la formación de péptidos potencialmente amiloidogénicos (Kim, Kim et al. 1997; Gutala, Wang et al. 2006; Mousavi and Hellstrom-Lindahl 2009; Nie, Shi et al. 2010; Scerri, Stewart et al. 2012).

2 HIPÓTESIS JUSTIFICATIVA

HIPÓTESIS JUSTIFICATIVA

A pesar de que los procesos que se producen durante el procesamiento por distintas secretasas de la proteína APP son bien conocidos, no lo son tanto los mecanismos que regulan la producción, liberación y depósito del péptido A β tóxico, lo cual puede ser la causa de que las distintas estrategias farmacológicas que se han venido ensayando con el objetivo de modificar el procesamiento de la proteína APP y, por ende, de la producción del A β , como los bloqueantes α - y β -secretasas, activadores de γ -secretasas, estatinas, quelantes de A β , vacuna frente al A β , incremento de la eliminación de A β por proteasas (Walsh, Klyubin et al. 2002) no hayan resultado satisfactorias, con lo que ninguna de ellas ha alcanzado la clínica todavía.

Por este motivo, consideramos que se hace altamente necesario profundizar en el estudio de los posibles mecanismos implicados en los efectos tóxicos del péptido A β que conducen al deterioro del paciente con EA.

Puesto que, como hemos descrito en esta introducción, existen evidencias recientes que sugieren que la toxicidad del A β se relaciona con una alteración de la actividad sináptica, nos planteamos en este proyecto estudiar los posibles efectos de este péptido sobre distintos parámetros que controlan y/o regulan el proceso excitotóxico de liberación de neurotransmisores. Como punto de partida, pretendemos caracterizar a nivel electrofisiológico, farmacológico, cinético y funcional, el efecto del péptido A β sobre los nAChRs bovinos α 3 β 4 y α 7 expresados heterológamente en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Para ello, llevaremos a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Efecto del péptido A β ₂₅₋₃₅ agregado (fragmento 25-35) sobre receptores α 3 β 4 expresados en ovocitos de *Xenopus*;

2. Efecto del péptido $A\beta_{25-35}$ agregado (fragmento 25-35) sobre receptores $\alpha 7$ expresados en ovocitos de *Xenopus*;
3. Efecto de la pre-incubación de $A\beta_{25-35}$ sobre las corrientes nicotínicas $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$.
4. Efecto del uso de antagonistas nicotínicos sobre ovocitos de *Xenopus* pre-incubados con $A\beta_{25-35}$.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN DE LOS ARNm.

Para la síntesis del ARN mensajero (ARNm) bovino el Dr. Manuel Criado (Depto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Miguel Hernández de Alicante), nos proporcionó los ADNc copia (ADNc) que codifican para los genes de las subunidades del nAChR bovino $\alpha 7$, $\alpha 3$, y $\beta 4$, incluidos en el vector pSP64T (subunidades $\alpha 7$ y $\beta 4$) y en el vector “casero” p642 ($\alpha 3$) que proporcionan resistencia a ampicilina.

Las bacterias competentes DH5 α se transformaron, por choque térmico, con estos vectores, de tal manera que se seleccionaron aquellas bacterias que contenían el vector, haciéndolas crecer en un medio con el antibiótico de selección. Posteriormente realizamos una extracción del ADNc plasmídico mediante una miniprep, con el kit comercial Qiagen (Ambion). Los productos de ADNc obtenidos fueron cuantificados mediante espectrofotometría para determinar el rendimiento de la reacción y las cantidades de ADN plasmídico obtenidas.

Para la obtención del material genético lineal, el ADNc incluido en el vector pSP64T se cortó con la enzima de restricción XbaI (New Englan Biolabs), mientras que el vector p642 se digirió con la enzima NotI (Fermentas Internacional). Los ADNc linearizados se purificaron mediante su precipitación por acetato amónico (5 M), diluyéndose con agua hasta una concentración en torno a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Posteriormente, a partir de estos ADNc se llevó a cabo la transcripción para obtener ARNm de cada una de las subunidades bovinas (kit comercial mMessage mMachine, Ambion), utilizándose la enzima polimerasa polSP6 para la síntesis de ARNm. Este ARNm resultante fue purificado mediante el kit MEGAClear (Ambion). Finalmente los productos fueron cuantificados nuevamente mediante espectrofotometría y se llevaron diluciones hasta la concentración deseada (250 ng/ μL).

Se realizaron alícuotas de este mensajero que se conservaron a -80°C .

3.2 SISTEMA DE EXPRESIÓN

Como sistema de expresión heteróloga de nuestras proteínas se utilizaron los ovocitos extraídos de hembras de sapos africanos *Xenopus laevis* proporcionados por un suministrador comercial (Xenopus Express, Francia) a los que se les inyectó el ARNm que codifica para cada una de las subunidades del receptor nicotínico bovino previamente sintetizado. Como consecuencia de la inyección del mensajero se produce la traducción a proteína a través de la maquinaria interna del ovocito, dando como resultado la expresión de un receptor funcional en la membrana del ovocito. La caracterización electrofisiológica se realizó mediante la técnica de fijación de doble electrodo (FVDE). Para más información → ver **Apéndice I**.

3.2.1 Extracción de los ovocitos

3.2.1.1 Anestesia

Los sapos son animales muy vitales, difíciles manejar, sobre todo en su medio natural. Para facilitar su manipulación es importante mantenerlos aletargados. Esto se consigue manteniendo la temperatura del agua por debajo de los 4º C. Los animales, una vez proporcionados por el animalario, son introducidos en un recipiente con agua a baja temperatura durante media hora. Pasado este tiempo, se provoca la sedación del animal con una solución anestésica local que se absorbe a través de la piel. Es el caso de la tricaina (ácido etil 3-aminobenzoato-metanosulfónico, SIGMA, Madrid, España) que es efectiva en un rango de 0,15 al 0,5%. Este producto se disuelve fácilmente en agua y puede ser reutilizada en sucesivos experimentos cuando la solución se mantiene a una temperatura de 4º C. El animal se introduce en una solución al 0,15% de tricaina durante media hora. Pasado este tiempo el animal está completamente anestesiado, y en condiciones para ser operado, a fin de extraer los ovocitos.

3.2.1.2 Cirugía

Cuando el animal está completamente anestesiado, se coloca en decúbito supino sobre un recipiente con hielo de base plana, pero evitando que el hielo tenga

contacto con la piel del anfibio, ya que, de lo contrario, se producirían quemaduras que provocarían la pérdida de piel. Para evitarlo, se protege al animal con una gasa fina húmeda, impregnada de triclaína.

La operación comienza con una incisión sobre el abdomen en su parte lateral de una longitud de 1 cm aproximadamente. El mismo sapo puede ser operado repetidamente, alternando los sitios de incisión en el abdomen. El corte debe perforar la piel y la capa de tejido muscular, de tal manera que, tras la incisión, quedan visibles los ovocitos. Con ayuda de unas pinzas de punta curva, se va retirando suavemente el ovario desde el interior (durante la operación, la incisión puede resultar sangrante, si fuese así, la incisión se irá lavando con medio BARTH sin Ca^{2+}). Una vez tomado el material suficiente para el desarrollo de los experimentos, se corta parte de los lóbulos del ovario extraído, y el resto es introducido de nuevo en la cavidad abdominal. Finalmente, se cierra la herida con puntos quirúrgicos, tanto en la capa muscular como en la piel.

Los lóbulos ováricos extraídos, se sitúan en una placa de cultivo de 60 mm de diámetro que contiene una solución de medio L15 + HEPES (20 mM), en proporción 1:1, + Penicilina/Estreptomicina 1% (10 U/mL de penicilina + 10 mg/mL de estreptomicina) para su posterior preparación.

La operación debe realizarse en condiciones de limpieza, pero sin necesidad de utilizar material estéril. Los *Xenopus* tienen la capacidad de secretar un péptido denominado magainina con propiedades antimicrobianas, que facilita la recuperación del sapo tras la operación, sin necesidad de aportar antibióticos o antifúngicos al animal.

Para la reanimación del sapo, se introduce a éste en un recipiente con agua a temperatura ambiente, de tal forma que la recuperación del animal de la anestesia se produce en 15-30 minutos.

3.2.1.3 Preparación de los ovocitos

La inyección del ARNm se debe realizar sobre ovocitos “limpios”, carentes de ningún tipo de membrana propia. Así la introducción del capilar dentro del ovocito para inyectar el mensajero es más sencilla y menos problemática sin la presencia de membranas que interfieran con la inyección. Por otro lado, esta limpieza evita la obturación del capilar de inyección.

La extracción de la membrana folicular puede hacerse por métodos mecánicos (manualmente) o mediante tratamientos enzimáticos (colagenasa). Ambos métodos son viables, si bien la retirada de las membranas del ovocito de manera manual es más lenta y pesada, con ella se consiguen habitualmente ovocitos de mejor calidad. En la práctica el método más utilizado es el de la defoliculación mecánica. Durante la defoliculación mecánica los ovocitos son mantenidos en un medio BARTH con Ca^{2+} .

Una vez defoliculados, los ovocitos se dejarán reposar una hora en un medio BARTH con Ca^{2+} . Durante ese proceso los restos de membrana folicular de los ovocitos quedarán adheridos a la placa de cultivo.

La selección de ovocitos se realiza bajo la lupa, de forma individual. Se van a seleccionar aquellos ovocitos que se encuentran en los estadios embrionarios IV, V y VI (ver **Apéndice I** para más información).

Los ovocitos seleccionados no deben presentar restos de la membrana folicular, que se pone de manifiesto por la presencia de pequeños capilares venosos en la superficie del ovocito. Además, un ovocito apto para poder ser utilizado en nuestro estudio debe presentar una membrana de aspecto homogéneo, sin manchas ni deformaciones, y sin ningún rasgo que haga sospechar que su membrana pueda estar dañada.

Finalmente los ovocitos seleccionados se pasarán a un medio de cultivo más rico en nutrientes como es el medio L-15 + HEPES (20 mM) 1:1 + Penicilina/Estreptomicina y se dejarán reposar toda una noche.

Al día siguiente se vuelve a realizar una selección bajo la lupa de ovocitos por si en el cultivo han sufrido algún daño y han muerto. De esta manera se asegura que los ovocitos restantes son viables para inyectar el mensajero.

3.2.1.4 Microinyección de ARNm en los ovocitos.

El proceso de inyección del ARNm es uno de los pasos más críticos en este proceso de expresión heteróloga, ya que si no se realiza con rigor, se puede provocar la muerte del ovocito, así como la pérdida de buenos registros. Por ello es tan importante tener en cuenta el buen estado de la membrana del ovocito. El proceso de inyección se realiza bajo la lupa, mediante un microinyector acoplado a un micromanipulador con capacidad de movimientos precisos y tridimensionales. El proceso de inyección se realiza bajo la lupa, mediante un microinyector acoplado a un micromanipulador con capacidad de movimientos precisos y tridimensionales.

Esta inyección consiste en la introducción de un capilar de inyección en el interior del citoplasma del ovocito, atravesando su membrana.

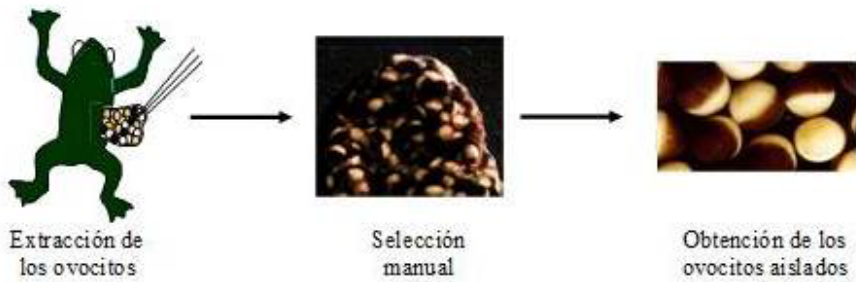
Para la inyección del ARNm se utilizaron capilares de borosilicato (Drummond Scientific Company). Estos capilares fueron estirados en un estirador vertical de vidrio (modelo PP-830 Narishige, Tokio, Japón) utilizando unos determinados parámetros de intensidad de calor para conseguir que la punta del capilar de inyección tenga las características deseadas. Así, a partir de un único capilar de vidrio, se obtienen dos capilares de inyección simétricos cuyo diámetro de la punta del capilar de inyección sea menor de 30 micras.

Debido a que estos capilares van a estar en contacto con el ARNm y que esta molécula se degrada con suma facilidad por la acción de las ARNasas, se deben extremar las precauciones en la manipulación del capilar, utilizando en todo momento guantes, a fin de evitar la contaminación con ARNasas presentes en las manos del manipulador

A *Xenopus laevis* "sapo de uñas sudafricano"



B Obtención de los ovocitos



C Obtención de ovocitos aislados

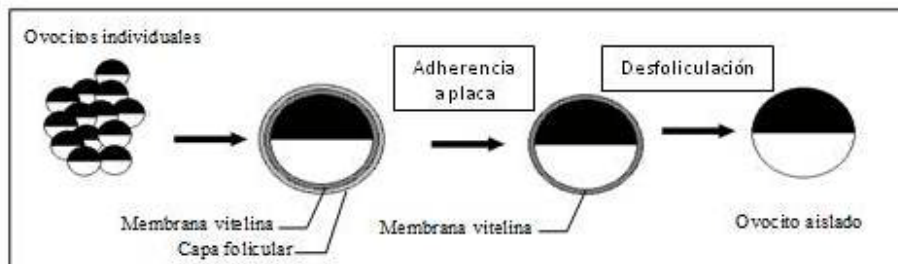


Ilustración 5: Material biológico. (A) Para la expresión heteróloga del receptor nicotínico se utilizaron ovocitos extraídos del sapo *Xenopus laevis*. (B) El animal es anestesiado y operado a fin de obtener parte de los folículos ováricos. Los ovocitos son separados uno a uno y posteriormente desfolliculados manualmente. (C) El proceso consiste en retirar las membranas nativas presentes en el ovocito, obteniendo un ovocito limpio y preparado para ser inyectado con el ARNm de las subunidades del receptor nicotínico bovino.

3.2.1.5 Microinyección de ARNm en los ovocitos.

El proceso de inyección del ARNm es uno de los pasos más críticos en este proceso de expresión heteróloga, ya que si no se realiza con rigor, se puede provocar la muerte del ovocito, así como la pérdida de buenos registros. Por ello es tan importante tener en cuenta el buen estado de la membrana del ovocito. El proceso de inyección se realiza bajo la lupa, mediante un microinyector acoplado a un micromanipulador con capacidad de movimientos precisos y tridimensionales.

Esta inyección consiste en la introducción de un capilar de inyección en el interior del citoplasma del ovocito, atravesando su membrana.

Para la inyección del ARNm se utilizaron capilares de borosilicato (Drummond Scientific Company). Estos capilares fueron estirados en un estirador vertical de vidrio (modelo PP-830 Narishige, Tokio, Japón) utilizando unos determinados parámetros de intensidad de calor para conseguir que la punta del capilar de inyección tenga las características deseadas. Así, a partir de un único capilar de vidrio, se obtienen dos capilares de inyección simétricos cuyo diámetro de la punta del capilar de inyección sea menor de 30 micras.

Debido a que estos capilares van a estar en contacto con el ARNm y que esta molécula se degrada con suma facilidad por la acción de las ARNasas, se deben extremar las precauciones en la manipulación del capilar, utilizando en todo momento guantes, a fin de evitar la contaminación con ARNasas presentes en las manos del manipulador.

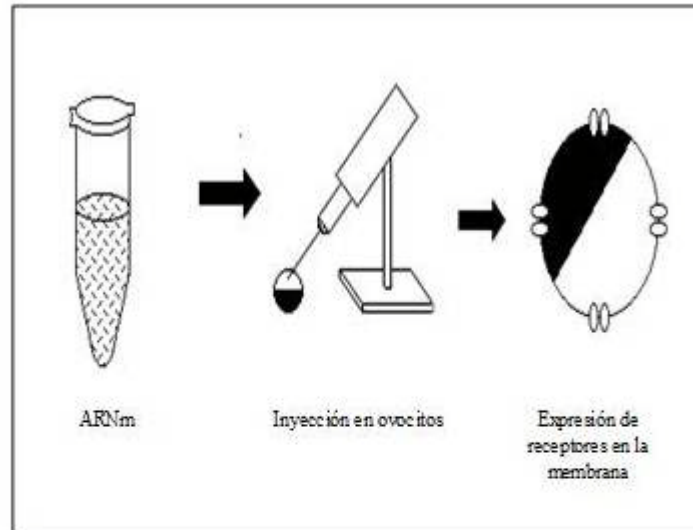
Debido a que el tamaño de la punta del capilar es sumamente pequeño, es preciso hacer los capilares de inyección en el momento en el que se vaya a realizar la inyección, ya que podrían obstruirse por la acumulación de polvo e impurezas en la punta del capilar.

Al capilar estirado se le realiza un corte manualmente con la ayuda de unas pinzas, bajo un microscopio a 100 aumentos y a continuación se rellena con aceite mineral (Sigma) con la ayuda de una jeringa de insulina acoplada a una microaguja de inyección (World Precision Instruments, Stevenage, Reino Unido). Este aceite sirve de sustancia de relleno del capilar haciendo que la presión a lo largo del mismo sea constante, además al ser inmiscible con el agua, evita pérdidas de ARNm y permite monitorizar la inyección, observando bajo la lupa la separación de ambas fases (ARNm-agua y aceite). Una vez relleno con el aceite, se acopla al inyector de manera hermética. De esta manera, la presión aplicada por el émbolo se transmitirá de manera homogénea a la punta de la pipeta.

La muestra de ARNm (aproximadamente 4 μL) se deposita en superficie estéril y el rellenado del capilar con esa muestra se realiza introduciendo la punta del capilar en la muestra y se comienza a succionar el ARNm con ayuda de los mandos del microinyector hasta que se recoge completamente el volumen de ARNm. Hay que evitar la succión de aire, lo que impediría una inyección constante del volumen de muestra.

La inyección se realiza con el inyector Nanoject II (Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA) acoplado a un micromanipulador tridimensional. El proceso se realiza de manera individual inyectando a cada ovocito 46 nl de ARNm a una concentración 250 $\mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$. En la formación de receptores heteroméricos como es el caso de los receptores $\alpha 3\beta 4$, se co-inyectan ambas subunidades a la misma concentración siguiendo la estequiometría 1:1.

A. Inyección del ARNm



B. Obtención de registros electrofisiológicos

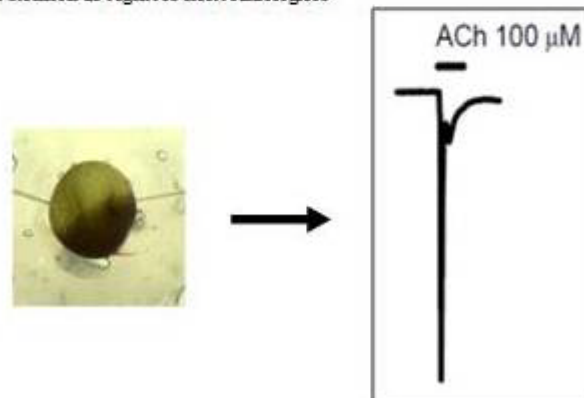


Ilustración 6 Sistema de expresión heteróloga de receptores. (A) En esta figura se esquematiza el proceso de inyección del ARNm. De manera individual, cada ovocito es inyectado con 46 nl del ARNm que codifica para cada una de las subunidades del receptor nicotínico bovino. Tras 1-3 días de cultivo, estos ovocitos expresan en su membrana receptores funcionales que serán utilizados para realizar registros electrofisiológicos. (B) La obtención de registros electrofisiológicos se realizan por fijación de voltaje de doble electrodo. En esta figura se muestra un ovocito con ambos electrodos insertados en la membrana. Además se muestra un ejemplo de un ovocito que ha expresado receptores $\alpha 3\beta 4$ que han sido estimulados con ACh 100 μ M a dos concentraciones de Ba²⁺ extracelular 2 mM.

3.3 CULTIVO DE LOS OVOCITOS

Una vez que los ovocitos han sido microinyectados con el ARNm correspondiente, se mantienen en placas de Petri de 15mm de diámetro con medio L15 + HEPES + Penicilina/Estreptomicina dentro de un incubador con una temperatura constante de 16-18°C.

El medio de cultivo debe cambiarse diariamente, eliminando bajo la lupa aquellos ovocitos que presentan daños en la membrana. Así el cultivo de ovocitos podrá mantenerse durante un período máximo de una semana. Durante este período y en un tiempo variable (dependiendo del subtipo de receptor nicotínico) se producirá la traducción a proteína y la expresión de receptores funcionales en la membrana.

Los registros electrofisiológicos se realizaron entre el 2-5º día de cultivo, dependiendo del subtipo nicotínico que deseábamos registrar. El subtipo nicotínico $\alpha\beta4$ se expresa en membrana apenas 24 h tras la microinyección, sin embargo en el caso del subtipo $\alpha7$, la expresión en membrana no alcanza su máximo hasta transcurridas 48-72h desde la microinyección.

3.3.1 Preincubaciones

Durante el desarrollo de esta tesis se realizaron preincubaciones, a distintos tiempos, de los ovocitos con β -amiloide y con antagonistas de los receptores nicotínicos del tipo mecamilamina o metilcaconitina.

Estos compuestos se mezclaban, a la concentración final deseada, junto al medio de cultivo de los ovocitos (L15 + HEPES + Penicilina/Estreptomicina) en placas Petri y se mantenían en el incubador de ovocitos a una temperatura de 16-18°C.

Cabe citar que el medio de cultivo era renovado diariamente. Las placas que contenían β -amiloide o antagonistas en el medio eran renovadas igualmente pero se añadían nuevamente estos agentes al medio con el fin de estudiar su efecto a largo plazo.

3.4 SOLUCIONES EXPERIMENTALES

3.4.1 Soluciones de cultivo

BARTH sin Ca²⁺: Utilizado durante la cirugía del sapo. Composición (en mM): NaCl 88; KCl 1; NaHCO₃ 2,4; MgSO₄ 0,82; TRIS 7,5, pH 7,4 con HCl.

BARTH con Ca²⁺: Utilizado para la defoliculación de los ovocitos bajo la lupa. Composición (en mM): NaCl 88; KCl 1; NaHCO₃ 2,4; MgSO₄ 0,82; TRIS 7,5; CaCl₂ 0,41; Ca(NO₃) 0,33, pH 7,4 con HCl, suplementado con penicilina/estreptomicina 1% (10 U/mL de penicilina + 10 mg/mL de estreptomicina).

L15 Medium Leibovitz. Sigma-Aldrich. Irvine, UK.

3.4.2 Soluciones de registro

Oocyte Ringer Ba²⁺ 2mM: Este medio será utilizado como solución de baño y como medio control a la hora de realizar registros electrofisiológicos, el ión Ca²⁺ es sustituido por el ión Ba²⁺ como ión de carga para evitar la activación de canales de cloruro activados por Ca²⁺ (I_{ClCa}) presentes de forma endógena en la membrana del ovocito. La composición iónica de esta solución es la siguiente (en mM): NaCl 82,5; KCl 2,5; BaCl 2; MgCl 1; HEPES 5; pH 7,4 con NaOH.

Solución conductora: esta solución será utilizada para rellenar los capilares de registro y así servir de sustancia conductora entre la célula y el sistema de registro. Composición iónica (en M): KCl 3

3.5 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

La técnica electrofisiológica de fijación de voltaje (“voltage-clamp”) consiste en mantener fijo un potencial de membrana determinado en una célula, mediante un sistema de retroalimentación. Inicialmente esta técnica se desarrolló en los años 50 para el estudio de potenciales de acción (Cole 1949; Marmont 1949; Hodgkin, Huxley et al. 1952).

Una aproximación de este método es la fijación de voltaje de doble electrodo, que ha sido de extraordinaria ayuda en el estudio electrofisiológico de canales iónicos expresados heterológicamente en ovocitos de *Xenopus* (Stuhmer 1992; Stuhmer 1998). El principio de la técnica se refleja en la figura 11A. La membrana del ovocito se atraviesa con dos electrodos, uno de ellos realiza medidas de la diferencia de potencial a ambos lados de la membrana (electrodo de voltaje) mientras que el otro (electrodo de corriente) se encarga de introducir o retirar la corriente necesaria para mantener el potencial a un determinado valor predeterminado, fijado por el amplificador. De esta manera, tras la estimulación de un receptor por su agonista, se produce una apertura del canal, con la consiguiente entrada de iones. Esto provoca una variación de la diferencia de potencial, que es recogida por el electrodo de voltaje. Como consecuencia, se produce de manera rápida una compensación de esta diferencia de potencial por medio de la introducción o retirada de carga por parte del electrodo de corriente, tal que se registra en el ordenador una corriente de entrada o de salida, proporcional a la carga suministrada por el electrodo de corriente.

Para realizar registros electrofisiológicos sobre los ovocitos que han expresado receptores del subtipo $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$ se ha utilizado esta técnica, permitiéndonos registrar corrientes macroscópicas en el ovocito cuando se estimulan los receptores expresados con el correspondiente agonista. Para ello hemos utilizado un amplificador (oocyte clamp OC-725-C, Warner Instrument Corp., Hamden, USA) acoplado a un osciloscopio (Hameg 20 MHz 303-6, Hameg Instrument, Mainhausen, Alemania) para la monitorización del proceso.

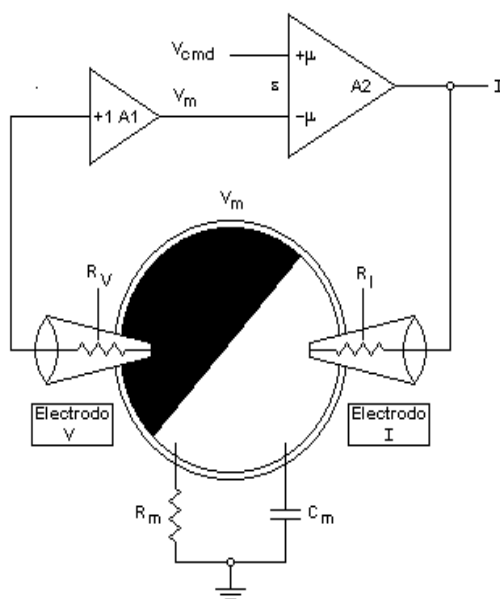
El ovocito se sitúa en una pequeña cámara de perfusión, y mediante un sistema de flujo permite aplicar el agonista y registrar la respuesta obtenida, tal y como se explica en el siguiente apartado.

Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22-24° C), en la solución de registro extracelular Oocyte Ringer Ba^{2+} 2mM. Los agonistas, antagonistas y β -amiloide fueron aplicados a través de una pipeta de perfusión con su punta localizada cerca del hemisferio animal del ovocito. Las corrientes en este hemisferio son sustancialmente mayores que las del hemisferio vegetal. Para cada tipo

de experimento se utilizaron ovocitos de al menos tres donadores distintos. La velocidad de perfusión de las distintas soluciones se controlaba por gravedad.

3.5.1 Sistema de perfusión

El sistema de perfusión está formado por una pequeña cámara con capacidad para un volumen de 1 ml, en la que se sitúa el ovocito para realizar los registros de corriente. Esta cámara presenta una morfología especial, de forma que el ovocito está continuamente bañado por un flujo basal de solución de registro evitando así la desensibilización tras la aplicación de los agonistas.





**Instituto
Teófilo Hernando**
para la I+D del Medicamento



Ilustración 7: Medidas electrofisiológicas por fijación de voltaje de doble electrodo. (A) El potencial de membrana del ovocito (V_m) se registra mediante un amplificador conectado al electrodo de voltaje (V). El V_m se compara con el potencial al cual se quiere mantener la membrana del ovocito. La salida por A2 fuerza a la corriente a entrar dentro de la célula a través del electrodo I, que será el valor que se registra en el ordenador. (B) Sistema de perfusión. El ovocito se sitúa en medio de la cámara, y es bañado por un flujo constante tal y como se indican por las flechas de la figura.

Sobre este ovocito se fija el potencial de membrana introduciendo los capilares de voltaje y corriente a través de su membrana hasta el citosol, y realizando la fijación de voltaje a través del amplificador. Sobre el ovocito se mantiene un flujo basal de 12 ml.min⁻¹ de solución de registro basal. Esta vía siempre está abierta, bañando al ovocito. Con este sistema se consigue el “lavado” de los receptores tras la retirada del agonista, lo que permite recuperar al receptor de la desensibilización. Además, sobre esta célula se sitúa una pipeta de perfusión que consta de 5 vías rápidas de aplicación que confluyen en un tubo de salida común con un diámetro interior de de 1,2 mm, tamaño semejante al volumen del ovocito. Por medio de la vía rápida se aplica el agonista a una velocidad de 9 ml.min⁻¹. De esta manera la respuesta al agonista es rápida, evitando problemas de desensibilización.

El sistema de válvulas está acoplado a un controlador electrónico, que a su vez está controlado por el protocolo aplicado desde un ordenador.

3.5.2 Capilares de registro y electrodos

Para realizar las medidas electrofisiológicas mediante la fijación de voltaje de doble electrodo se han utilizado capilares de borosilicato (Sutter Instrument, Novato, USA). Por medio del estirador de vidrio, se estiran los capilares hasta formar capilares de registro de manera similar a la descrita en el apartado 3.2.1.4- *Microinyección de ARNm en los ovocitos*, si bien la aplicación de calores varía de estos capilares de registro a los de inyección, el procedimiento es el mismo. De esta manera se consigue capilares con una resistencia comprendida entre 2-5 MΩ, que se rellenan de una solución conductora de KCl 3 M, y se acoplan a los electrodos de registro.

Los electrodos de registro consisten en un hilo de plata, que una vez clorurado aportan los electrones necesarios para la fijación de voltaje a modo de iones Cl⁻.

3.5.3 Cloruración de los electrodos

La cloruración de los electrodos se realiza introduciendo el electrodo en una solución de KCl 3 M y aplicando una corriente eléctrica. El polo positivo se ancla al hilo de plata, el cual se introduce en la solución de KCl 3M así como también se introduce

una placa metálica de pequeño tamaño anclada al polo negativo. Ambos polos estarán conectados a una pila de tipo petaca de 4.5V. Con ayuda de ésta, pasará la corriente a través de la solución y los iones cloruro se van depositando en el filamento de plata, de tal manera que serán estos iones los que se utilizarán para estabilizar y fijar el potencial de membrana del ovocito.

3.5.4 Creación de protocolos y aplicación

Para la creación de protocolos, el registro de los resultados y su posterior análisis se utilizó el programa informático pClamp 5.03 (Axon Instrument, Union City, CA, USA). Las corrientes se obtuvieron filtrando la señal a 50 Hz mediante un filtro Bessel y usando la interfase Digidata 1200.

Mediante la confección de protocolos se puede determinar el tiempo de aplicación del agonista de una manera estricta, así como el periodo entre los pulsos y el potencial de membrana.

3.5.5 Fijación del potencial de membrana

En los experimentos realizados en este trabajo se ha fijado el potencial de membrana de reposo a -70 mV.

3.5.6 Agonistas utilizados e intervalos de aplicación

La activación de los receptores $\alpha 7$ se realizó por la aplicación de pulsos de agonista de 2 segundos de duración con un intervalo de 2 minutos entre pulsos. En el caso de los receptores $\alpha 3\beta 4$ se aplicaron pulsos de 5 segundos de duración a intervalos de 2 minutos. Estos protocolos de aplicación del agonista permiten obtener una activación completa y reproducible de los receptores estudiados, evitando una posible inactivación de los mismos.

La activación de los receptores estudiados en esta Tesis se realizó por la aplicación de acetilcolina (ACh) a la concentración de 100 μ M (que se corresponde con la EC_{80} para nuestro modelo celular) como agonista no selectivo, o colina a 10 mM de concentración (correspondiéndose con la CE_{90} para este agonista en nuestro

modelo) como un agonista parcial y selectivo de los receptores $\alpha 7$ (Papke, Bencherif et al. 1996).

3.5.7 Protocolo de agregación del péptido amiloide β

El péptido amiloide- β 25-35 (Sigma) se disolvió en DMSO a una concentración de 10^{-2} M y se agregó durante 2 horas a 37°C en un agitador Thermomixer compact (Eppendorf). Posteriormente se hicieron alícuotas de $50\mu\text{M}$ en Oocyte Ringer Ba^{2+} 2mM y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

3.5.8 Justificación del uso del fragmento 25-35 del péptido amiloide β

A pesar de que la mayoría de autores describen en sus trabajos la toxicidad ejercida por los fragmentos $\text{A}\beta_{1-40}$ y $\text{A}\beta_{1-42}$ (Dineley, Bell et al. 2002), (Pym, Kemp et al. 2005), (Fraser, Suh et al. 1996), (Kayed, Head et al. 2003), (Grassi, Palma et al. 2003), (Lamb, Melton et al. 2005), nosotros hemos basado nuestro trabajo en el péptido $\text{A}\beta_{25-35}$ en base a los resultados obtenidos por Pike y cols. (Pike, Burdick et al. 1993) en los que describen la toxicidad de $\text{A}\beta$ agregado (esta agregación era facilitada por los aminoácidos 29 al 35) frente a la ausencia de la misma con el $\text{A}\beta$ soluble (Pike, Walencewicz-Wasserman et al. 1995) donde se describe que es en esta misma región (29-35) donde se localiza el fragmento activo del $\text{A}\beta$ pues es la única zona que confiere neurotoxicidad a las células. Para llevar a cabo estos experimentos los autores se basaron en sustituciones/delecciones aminoacídicas que resultaron claves en la determinación de sus conclusiones. Además, estos resultados están apoyados por otros autores como (Yankner, Duffy et al. 1990), (Mattson, Cheng et al. 1992), entre otros.

3.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

Los resultados incluidos en esta memoria se expresaron como el valor promedio \pm el error estándar (ES).



Las diferencias estadísticas entre las medias de los resultados de dos variables se obtuvieron mediante tratamiento estadístico con el programa Sigma stat. Se consideró como límite de significancia un valor de $p \leq 0,05$.

Las curvas concentración respuesta y demás figuras se realizaron mediante el programa de análisis de gráficos Origin 8.0 (Microcalc Software Inc.).

4 RESULTADOS

4.1 EFECTO DEL PÉPTIDO AMILOIDE β SOBRE RECEPTORES $\alpha 3\beta 4$ EXPRESADOS EN OVOCITOS DE *XENOPUS*.

A la luz de los resultados obtenidos previamente por otros autores, y basándonos en la bibliografía descrita hasta el momento, quisimos investigar el posible subtipo de nAChR afectado por el péptido A β . Para ello, se expresó el subtipo $\alpha 3\beta 4$ (uno de los subtipos nicotínicos encontrados en la célula cromafín bovina) heterológamente en ovocitos de *Xenopus laevis* y se estudiaron las corrientes nicotínicas por la técnica de doble electrodo y fijación de voltaje.

Inicialmente, se inyectó el ARN mensajero que codifica para las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$, de tal manera que estos ovocitos son capaces de expresar en su membrana receptores funcionales del tipo $\alpha 3\beta 4$ heteroméricos.

Como protocolo experimental, se dieron pulsos del agonista ACh durante 5 segundos, aplicado a intervalos de 2 minutos. Todos los experimentos se realizaron en presencia del ión Ba²⁺ como ión transportador de carga, para evitar o minimizar la activación de canales de Cl⁻ que pudieran enmascarar los resultados obtenidos.

Nuestro primer paso en el estudio de la caracterización de los efectos del péptido A β en las corrientes ~~ínicas~~ $\alpha 3\beta 4$ ha sido construir una curva concentración respuesta para el agonista ACh (**Figura 1**) siguiendo el protocolo experimental de pulsos de ACh de 5 segundos de duración a intervalos de 2 minutos. Los resultados muestran un efecto concentración-dependiente para la ACh realizándose una regresión no lineal con los datos y ajustándolos a un Modelo de Hill. Se obtuvo una curva sigmoideal a partir de la cual calculamos que la EC₅₀ para ACh en receptores nicotínicos bovinos $\alpha 3\beta 4$ era de 75,4 μ M.

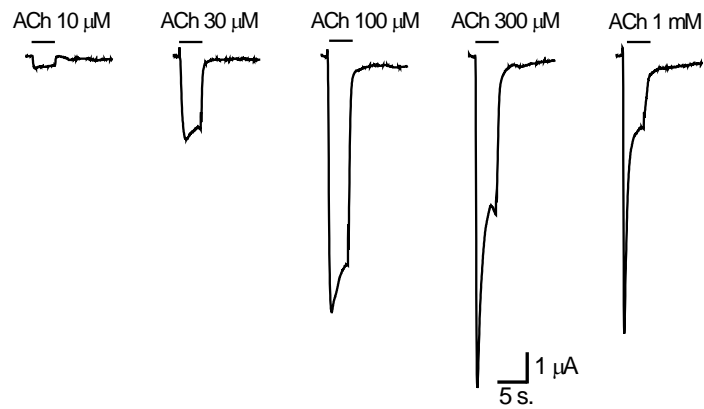
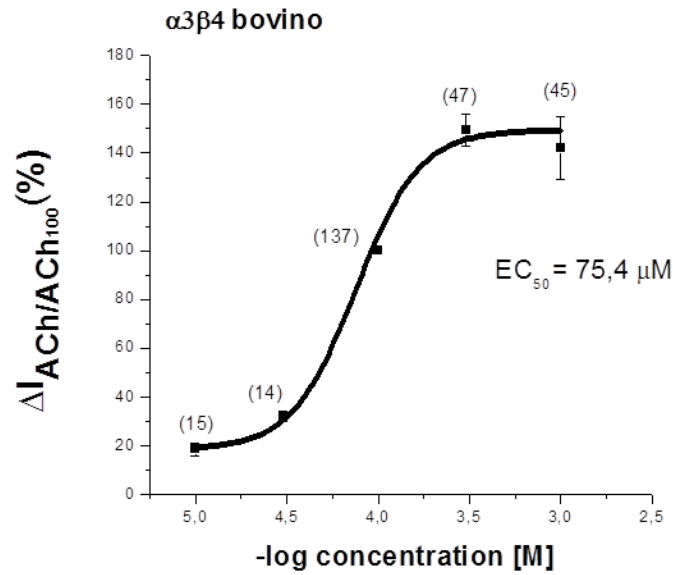


Figura 1. (Panel superior) Curva concentración-respuesta para ACh sobre receptores nicotínicos bovinos $\alpha 3\beta 4$. Los ovocitos expresando receptores $\alpha 3\beta 4$ se han perfundido con ACh a diferentes concentraciones durante 5 segundos cada 2 minutos. Ajuste de Hill sobre la curva concentración-respuesta original. El número de ovocitos empleados en cada experimento se encuentra indicado entre paréntesis. **(Panel inferior)** Trazados originales de las distintas concentraciones de ACh. Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación del agonista

4.1.1 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos en un protocolo de aplicación aguda.

4.1.1.1 Protocolo en co-aplicación

A continuación, y basándonos en resultados previos obtenidos por (Pym, Kemp et al. 2005) donde testaban los efectos producidos por $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ sobre corrientes nicotínicas humanas, quisimos explorar que efecto tendría la coaplicación de ACh y $A\beta_{25-35}$, en un mismo pulso, sobre las corrientes nicotínicas bovinas en nuestro modelo experimental.

Como protocolo experimental, se dieron pulsos de ACh + $A\beta_{25-35}$ durante 5 segundos, aplicado a intervalos de 2 minutos. Así pues, llevamos a cabo la construcción de dos curvas concentración-respuesta. Cada una de estas curvas consistía en concentraciones crecientes de ACh a las que añadimos:

- 0,5 μ M de $A\beta_{25-35}$ ó
- 1 μ M de $A\beta_{25-35}$.

Todos los experimentos se realizaron en presencia del ión Ba^{2+} como ión transportador de carga.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 2**, donde se representa en negro la curva control de ACh, en verde oliva la respuesta para ACh + $A\beta_{25-35}$ 0,5 μ M y en rojo la correspondiente a ACh + $A\beta_{25-35}$ 1 μ M. Las corrientes nicotínicas evocadas por las concentraciones más altas de ACh (100, 300 y 1000 μ M) fueron inhibidas en un $\sim 20 \pm 1,21\%$ cuando se co-aplicaba con $A\beta_{25-35}$ 0,5 μ M. Por otro lado, cuando testamos el efecto de coaplicar distintas concentraciones de ACh junto a 1 μ M de $A\beta_{25-35}$ resultó en una inhibición de las corrientes nicotínicas de un $\sim 42 \pm 4,45\%$ en las concentraciones de 100 y 300 μ M, mientras que cuando se coaplicaba ACh 1000 μ M + 1 μ M de $A\beta_{25-35}$ la inhibición de las corrientes alcanzaba el $\sim 48 \pm 4,53\%$. Es decir, en ambos casos, el mayor grado de inhibición se conseguía a concentraciones de Ach

100 μM o superiores, tanto cuando se usaba 0,5 μM como cuando se aplicaba 1 μM de $\text{A}\beta_{25-35}$.

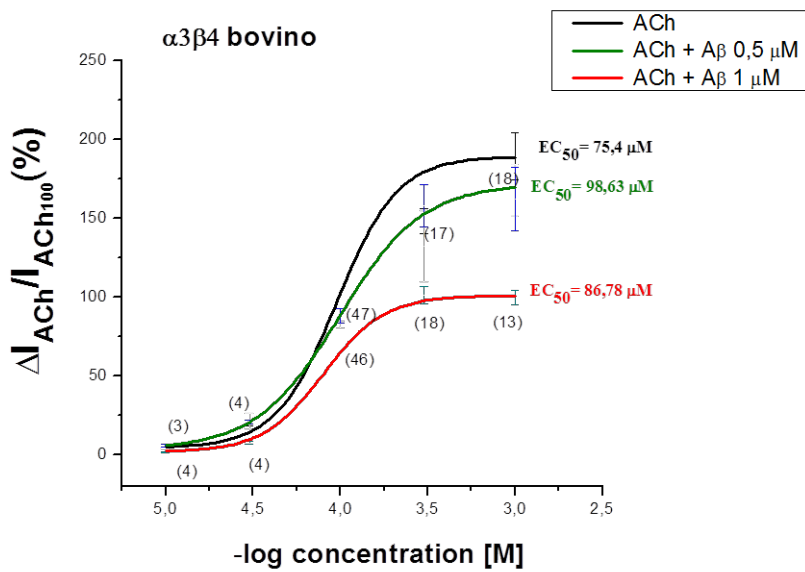
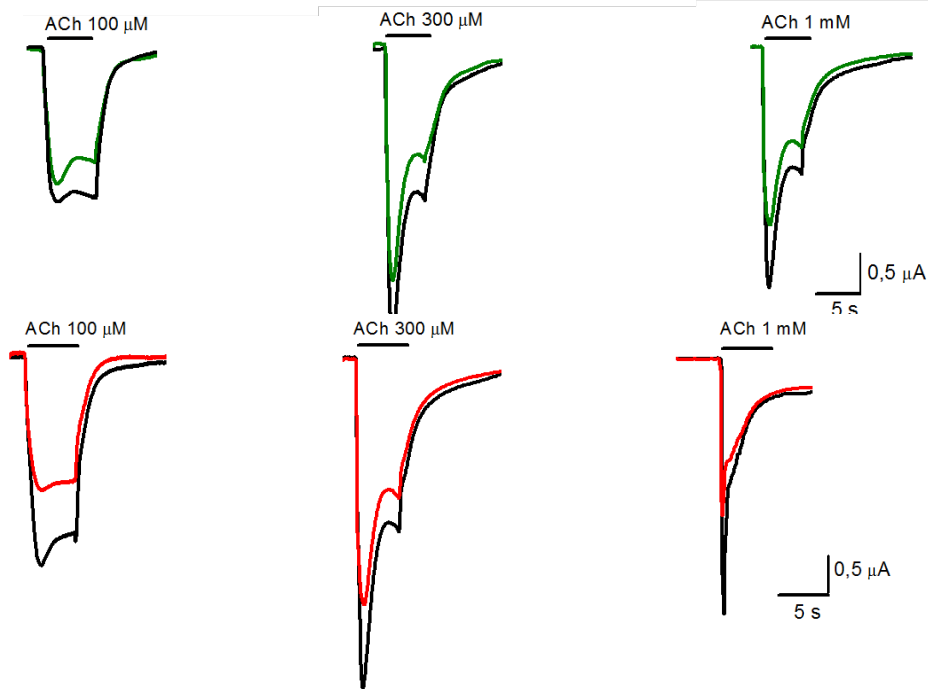


Figura 2. Curva concentración-respuesta para ACh + $A\beta_{25-35}$ sobre receptores nicotínicos bovinos $\alpha 3\beta 4$. (**Panel superior**) Trazos originales de las distintas concentraciones de ACh + 0,5 (verde)/1 (rojo) μM de $A\beta_{25-35}$. Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación del agonista. (**Panel inferior**) Ajuste según modelo de Hill de los resultados. La curva control de ACh es representada de color negro, la curva de ACh + $A\beta$ 0,5 μM se representa en color verde y la curva para ACh + $A\beta$ 1 μM pertenece al color rojo. Los ovocitos expresando receptores $\alpha 3\beta 4$ se han perfundido con ACh ó ACh + $A\beta_{25-35}$ a diferentes concentraciones durante 5 segundos cada 2 minutos.

4.1.1.2 Protocolo en pre-aplicación.

A continuación, quisimos caracterizar qué efecto tendría una pre-aplicación del péptido sobre el receptor en configuración “cerrada”, es decir, sin la presencia del agonista.

Para ello, realizamos una aplicación de $A\beta_{25-35}$ durante 5 segundos justo antes del pulso de ACh 100 μM . Cabe citar que con el fin de poder caracterizar el efecto del péptido $A\beta_{25-35}$, para los experimentos siguientes, decidimos trabajar con las concentraciones de 100 y 300 μM de ACh por dos razones:

- 1) ACh 100 μM se sitúa cerca del valor de EC_{50} obtenida para este subtipo nicotínico.
- 2) A estas concentraciones se logró un efecto inhibitorio máximo en la curva concentración-respuesta.
- 3) A pesar de que a la concentración de 1 mM de ACh se obtuvo el mayor grado de inhibición, es una concentración que puede llegar a ser desensibilizante para la respuesta del receptor y, por ende, proporcionar resultados erróneos en cuanto al efecto del $A\beta_{25-35}$.

Por otro lado, la concentración de $A\beta_{25-35}$ usada en este protocolo es de 1 μM pues resultó ser la concentración de $A\beta_{25-35}$ más inhibitoria (**Figura 2**).

En la **Figura 3** se muestran los resultados obtenidos para una pre-aplicación de 5 segundos del péptido $A\beta_{25-35}$ a una concentración de 1 μM sobre el receptor $\alpha 3\beta 4$ bovino. Se puede ver que la perfusión previa del péptido al pulso de ACh 100 μM provocó una inhibición de un $36,1 \pm 2,38\%$ en la I_{ACh} .

Este mismo protocolo fue llevado a cabo igualmente sobre ovocitos de *Xenopus laevis* que expresaban receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos, pero usando concentraciones de 300 μM de ACh. El resultado fue que la I_{ACh} evocada por 300 μM resultaba inhibida un $39,23 \pm 3,7\%$ cuando se realizaba la perfusión previa del péptido $\text{A}\beta_{25-35}$ agregado.

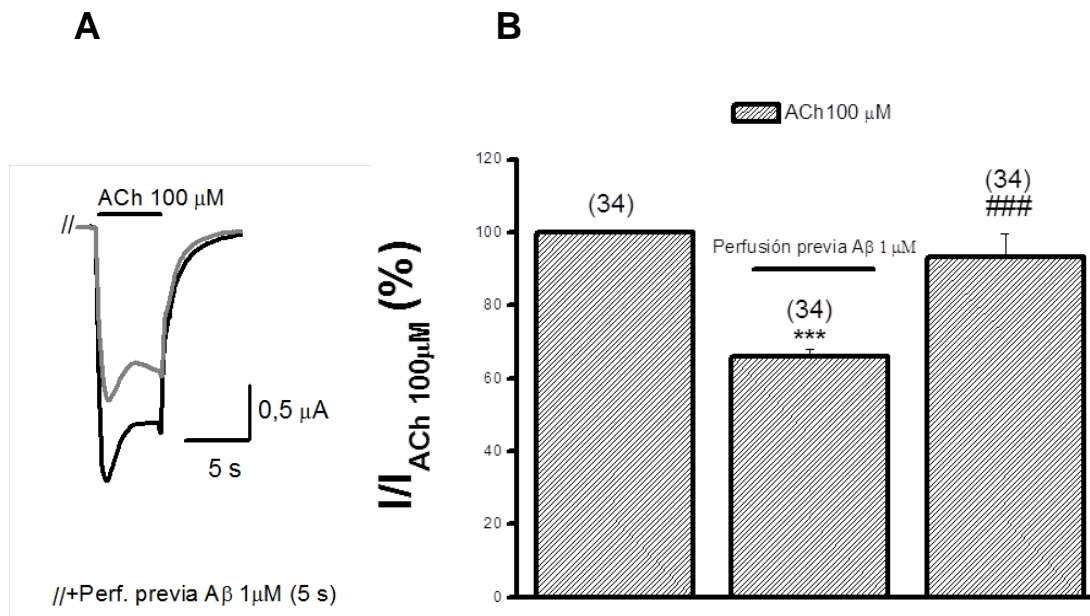


Figura 3. En el **Panel A** se muestran registros originales de un pulso control de ACh 100 μM (trazo negro) y un registro original resultado de la inhibición de la corriente inducida por 5 segundos de perfusión (//) del péptido $\text{A}\beta_{25-35}$ previa al pulso de ACh 100 μM . En los diagramas de barras del **Panel B** están representadas entre paréntesis las medias de las respuestas observadas, con el número de ovocitos indicado entre paréntesis, normalizados respecto a ACh 100 $\mu\text{M} \pm \text{EEM}$ (*** $p < 0,001$ y ### $p < 0,001$ respecto al control normalizado).

Tras la obtención de estos resultados nos planteamos que, si la pre-aplicación del péptido con el receptor en configuración “cerrada” producía una disminución en la I_{ACh} , sumar ambos procedimientos, es decir, una pre-aplicación del péptido $\text{A}\beta_{25-35}$ más una coaplicación de ACh 100 $\mu\text{M} + \beta\text{A}_{25-35}$ 1 μM en un mismo pulso, el resultado esperado sería una mayor inhibición. Este procedimiento se muestra en la **Figura 4** y

en ellos se observa que sumar ambos protocolos terminaba en una inhibición de la I_{ACh} evocada de un $47,37 \pm 6,45 \%$, lo cual no era significativamente diferente de lo obtenido para cada uno de los protocolos llevados a cabo individualmente.

Nuevamente, este protocolo fue realizado bajo las mismas condiciones experimentales pero usando la concentración de $300 \mu M$ de ACh, y el dato obtenido fue de un bloque de $50,84 \pm 6,3 \%$ respecto a su control.

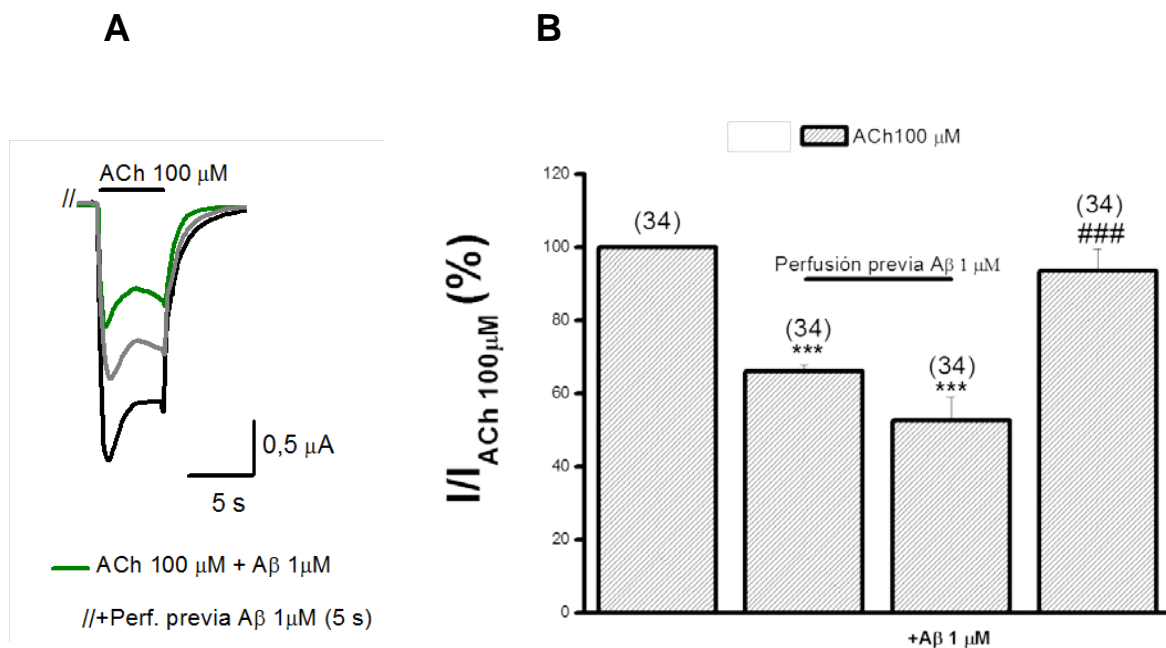


Figura 4. En el **Panel A** se muestran los siguientes trazos originales: el pulso control de ACh 100 μM (trazo negro), la I_{ACh} resultante de la pre-aplicación de 5 segundos de perfusión (//) del péptido A β_{25-35} 1 μM previa al pulso de ACh 100 μM (trazo en color gris) y el registro original del protocolo combinado (pre-aplicación + coaplicación del A β_{25-35} 1 μM en color verde). En el **Panel B** están representadas los valores medios de todas las células empleadas en cada experimento, normalizadas respecto a ACh 100 $\mu M \pm EEM$ (**p<0,001 y ###p<0,001 respecto al control normalizado). Entre paréntesis se indica el número de datos obtenidos para cada grupo.

4.1.2 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos en un protocolo de aplicación crónica.

A la vista de los resultados obtenidos con una aplicación aguda del péptido $A\beta_{25-35}$ y basándonos en bibliografía descrita ya por otros autores (Lain, Penke et al. 2005), (Xiu, Nordberg et al. 2005) quisimos explorar qué efecto tendría exponer, los ovocitos de *Xenopus laevis* expresando el receptor $\alpha 3\beta 4$ bovino, de forma crónica al péptido. De esta manera, podríamos caracterizar mejor el mecanismo de actuación del $A\beta_{25-35}$ sobre este subtipo nicotínico. Para llevar a cabo este protocolo testamos diferentes concentraciones del péptido así como distintos tiempos de incubación.

4.1.2.1 Tratamiento crónico 24 horas.

Inicialmente, y además de basarnos en protocolos llevados a cabo por otros autores (Xiu, Nordberg et al. 2005), optamos por comenzar con tiempos de incubación cortos. Por ello se probó una incubación de los ovocitos durante 24 horas con $1 \mu\text{M}$ de $A\beta_{25-35}$.

Para realizar este protocolo experimental creamos dos grupos de tratamiento, uno compuesto por ovocitos que no eran expuestos a $A\beta_{25-35}$ (de ahora en adelante, *ovocitos control*), y otro compuesto por ovocitos a cuyo medio de mantenimiento L-15 se le añadía el péptido $A\beta_{25-35}$ (de ahora en adelante, *ovocitos pre-tratados*).

Los datos que se obtuvieron se muestran en la **Figura 5** y en ellos se observa que al contrario de lo que esperábamos (un bloqueo total o parcial de la respuesta del receptor al agonista) podemos resaltar que se observó una tendencia al alza del valor neto de la corriente tras el pulso de ACh $100 \mu\text{M}$ (la I_{ACh} aumentó un $19 \pm 1,12\%$ en los ovocitos pre-tratados). Si bien había una tendencia, los resultados de las I_{ACh} en los ovocitos pre-tratados no fueron estadísticamente diferentes de las I_{ACh} obtenidas en con los ovocitos control.

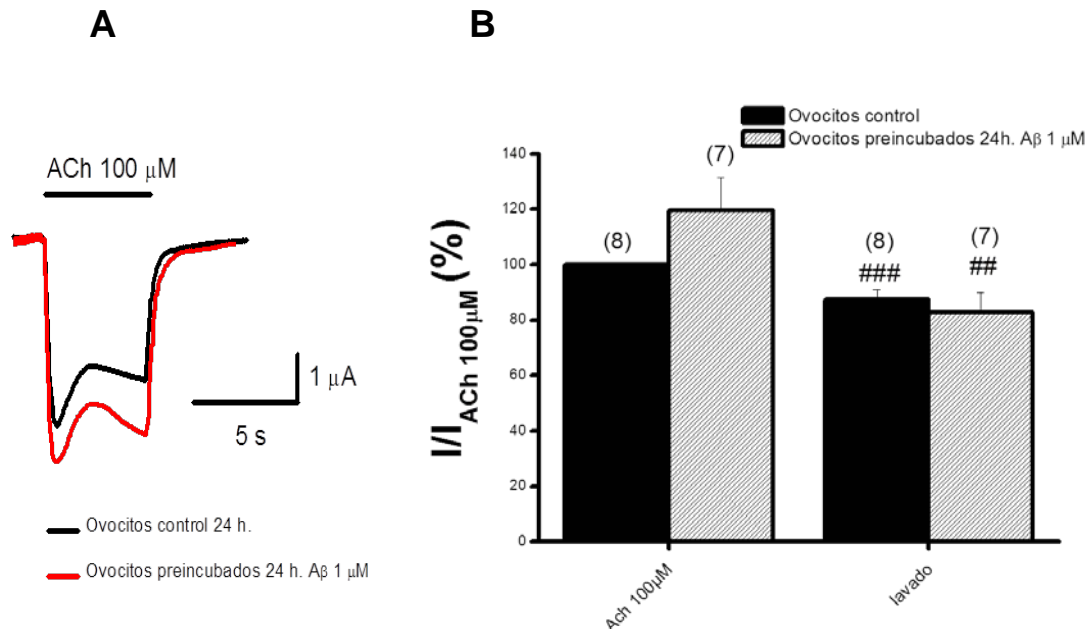


Figura 5. En el **Panel A** se muestra el registro original ACh 100 μ M del ovocito control (negro) y el registro original de 100 μ M del ovocito pre-tratado 24h. con 1 μ M de $A\beta_{25-35}$ agregado (rojo). En el **Panel B** están representadas los valores medios de todas las células empleadas en cada experimento, normalizadas respecto a 100 μ M ACh \pm EEM (## p <0,01 y ### p <0,001 respecto al control normalizado). Entre paréntesis se indica el número de datos obtenidos para cada grupo.

Este mismo protocolo se llevó a cabo también a concentraciones de ACh de 300 μ M. Los ovocitos pre-tratados mostraron un $9 \pm 0,46\%$ más de corriente respecto a los ovocitos control, un valor ligeramente inferior al alcanzado en el caso anterior, aunque el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento.

Basándonos en los resultados obtenidos en el apartado 4.2.1.2 con un protocolo de pre-aplicación (**Figura 3**), sobre ovocitos que no habían sido expuestos crónicamente al péptido, nos planteamos aplicar esta pre-aplicación sobre ovocitos que habían sido pre-tratados con $A\beta_{25-35}$ (1 μ M) agregado durante 24 horas.

Así pues se procedió igual que en el apartado 4.2.1.2 realizando una perfusión previa de $A\beta_{25-35}$ 1 μ M durante 5 segundos, previo al pulso de ACh 100 μ M.

Los resultados se muestran en la **Figura 6** donde se puede ver que la perfusión de $A\beta_{25-35}$ sobre ovocitos pre-tratados pareció provocar una mayor sensibilización a la presencia del péptido y por tanto, una mayor inhibición de la I_{ACh} . Sin embargo, los análisis estadísticos demostraron que no había diferencias significativas entre la inhibición ejercida por el $A\beta_{25-35}$ en pre-aplicación sobre ovocitos control ($33,17 \pm 2,48\%$) y la ejercida sobre los ovocitos pre-tratados 24 hora con $A\beta_{25-35}$ $1 \mu M$ ($38 \pm 2,65\%$).

Estos experimentos fueron repetidos con $300 \mu M$ de ACh y los resultados obtenidos fueron los siguientes: en ovocitos control, la I_{ACh} evocada por $300 \mu M$ de ACh fue inhibida un $38,52 \pm 4,46 \%$ por la perfusión previa de $A\beta_{25-35}$, mientras que en el grupo tratado la corriente disminuyó un $37,4 \pm 2,57 \%$. Si analizamos los datos estadísticamente, en ambos grupos de tratamiento, la corriente disminuyó significativamente ($n=6$; $**p<0,01$) respecto a su control pero no así entre ellos. Por tanto, la exposición crónica de los ovocitos a $A\beta$ no pareció sensibilizar en este caso al receptor $\alpha 3\beta 4$ cuando se activaba con $300 \mu M$ de ACh.

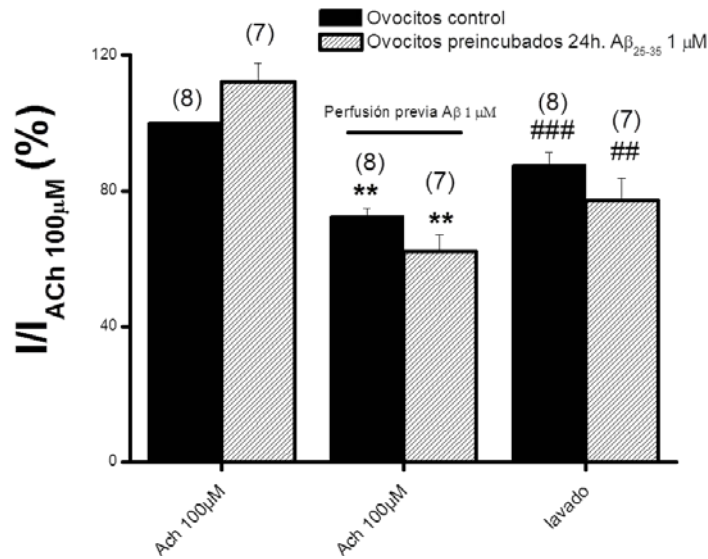
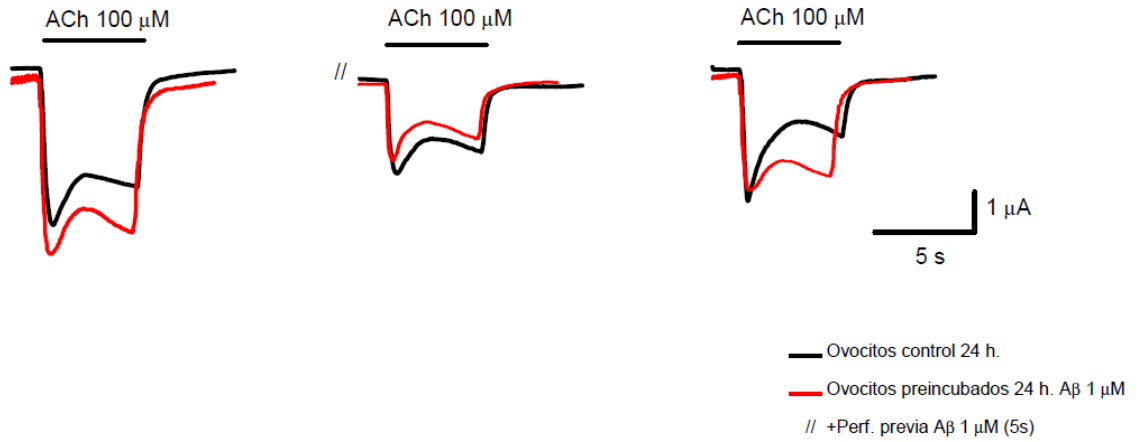


Figura 6. En el **Panel superior**, se localizan los trazos originales de la I_{ACh} en ovocitos control 24h. (negro) y en ovocitos pre-incubados 24h. con $A\beta_{25-35}$ 1 μ M e I_{ACh} (rojo). En el **Panel inferior**, diagrama de barras en el que se muestran los valores medios de todas las células empleadas en cada experimento, normalizadas respecto a su control de ACh 100 μ M \pm EEM (** p <0,01; ### p <0,001). La barra horizontal representa las células que fueron sometidas a perfusión previa del péptido. Entre paréntesis se indica el número de datos obtenidos para cada grupo.

4.1.2.2 Tratamiento crónico 48 horas.

Continuando en un protocolo de exposición crónica, con $A\beta_{25-35}$, de los ovocitos de *Xenopus laevis* expresando receptores $\alpha 3\beta 4$ bovino, aumentamos el tiempo de incubación hasta 48 horas. En este caso, previniendo un efecto tóxico, disminuimos la concentración de $A\beta_{25-35}$ hasta 0,5 μ M.

En la **Figura 7** se muestran los resultados analizados y en ellos se advierte que la tendencia inicial, de un aumento en el valor neto de la I_{ACh} se hace más patente, llegando a aumentar un $29,54 \pm 5,2\%$ el valor de la I_{ACh} en los ovocitos pre-tratados respecto al grupo no tratado. Este dato nos hizo pensar que al estar, $A\beta_{25-35}$, bloqueando totalmente los receptores de forma crónica, quizás estuviese modulando de alguna forma la expresión del receptor nicotínico sobre la membrana de los ovocitos de *Xenopus laevis*.

Si nos fijamos en la **Figura 7**, concretamente en las barras que muestran los resultados obtenidos tras la perfusión de $A\beta_{25-35}$, previa al pulso de agonista, podemos apreciar como nuevamente, la respuesta evocada por ACh sobre $\alpha 3\beta 4$, fue menor en los ovocitos pre-tratados respecto a su I_{ACh} control ($\%_{\text{bloqueo}} I_{ACh} = 50,89 \pm 2,08\%$). Esto puede ser debido, como se citó anteriormente, a una pre-sensibilización del receptor, a la presencia del $A\beta_{25-35}$.

Cabe citar, que si bien en el lavado del grupo control, la respuesta a ACh era casi revertida, en el grupo tratado, el lavado aparece disminuido, advirtiéndose un no lavado completo del $A\beta_{25-35}$ tras la perfusión.

Este mismo protocolo fue llevado a cabo, igualmente, a concentraciones de 300 μ M, obteniéndose resultados similares: el valor neto de la I_{ACh} aumentó un $30,16 \pm 7,76\%$ en el grupo tratado respecto al grupo control. La perfusión previa de $A\beta$ sobre los ovocitos tratados disminuía la respuesta evocada por ACh en $30,06 \pm 7,63\%$ respecto a su control ($n=9$; $***p < 0,001$)

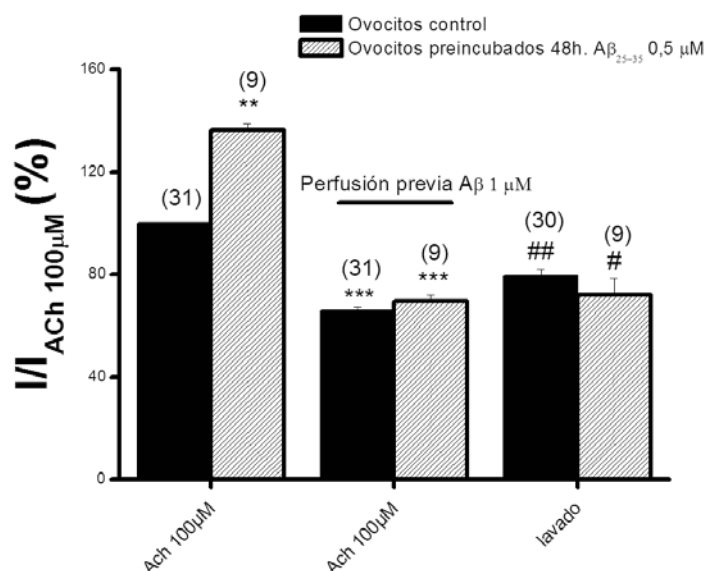


Figura 7. Diagrama de barras en el que se muestran los valores medios de todas las células empleadas en cada experimento, normalizadas respecto a su control de ACh 100 µM ± EEM (**p<0,01; ***p<0,001; #p<0,5 y ##p<0,01). La barra horizontal representa las células que fueron sometidas a perfusión previa del péptido. Entre paréntesis se indica el número de datos obtenidos para cada grupo

A la luz de estos resultados, y al no observar efecto tóxico a nivel de muerte celular durante las preincubaciones, decidimos aumentar la concentración de Aβ₂₅₋₃₅ durante las 48 horas de incubación hasta 1 µM. El objetivo de este aumento en la concentración de Aβ₂₅₋₃₅ era intentar manifestar mejor el efecto del aumento de las I_{ACh} en los ovocitos pre-tratados y, por ende, entender mejor de qué forma estaba actuando el Aβ₂₅₋₃₅ sobre los receptores nicotínicos α3β4.

Los resultados que obtuvimos se muestran en la **Figura 8** y en de ellos se extrae que el aumento en el valor neto de la I_{ACh} no fue directamente proporcional al aumento en la concentración de Aβ₂₅₋₃₅. Los datos muestran que a 48 horas de incubación con 1 µM de Aβ, el aumento de la I_{ACh} en el grupo pre-tratado fue de 43,91 ± 16,87% respecto a la I_{ACh} del grupo control.

En lo que se refiere a la perfusión de Aβ₂₅₋₃₅ previa al pulso de ACh, en este grupo de tratamiento, el %_{bloqueo Aβ} = 58,35 ± 2,52% respecto a su control. Esta dato es mayor que el obtenido para las incubaciones de 48 horas con 0,5 µM de Aβ₂₅₋₃₅

(Figura.7) Nuevamente los ovocitos pre-tratados parecían ser más “sensibles” a la perfusión del péptido que los ovocitos no tratados.

Respecto al lavado, debe notarse que la pérdida de corriente en los ovocitos pre-tratados, fue igual de significativa que para el caso anterior (48 horas/ 0,5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$), no consiguiendo, la ACh, revocar el valor inicial de corriente durante los pulsos de lavado.

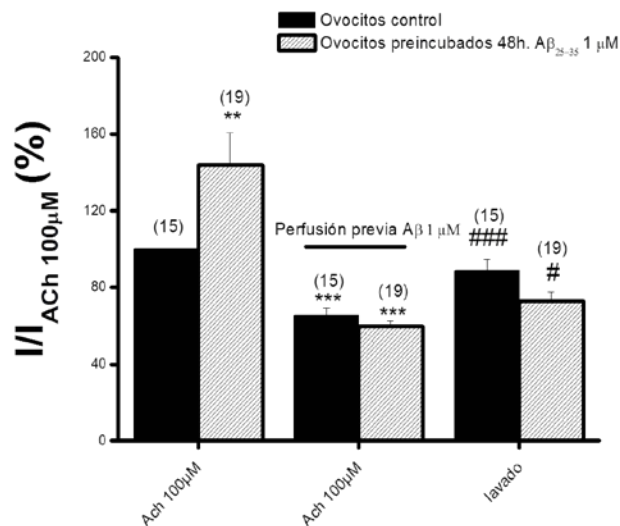
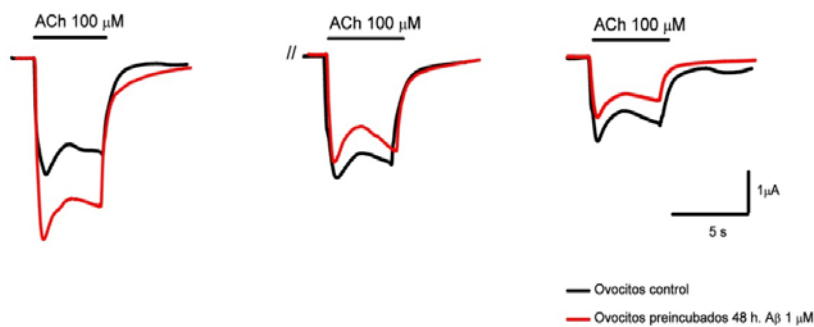


Figura 8. En el **Panel superior**, se muestran los registros originales para la I_{ACh} en ovocitos control 48h. (negro) y la I_{ACh} para ovocitos pre-incubados 48h. con $1 \mu M$ de $A\beta_{25-35}$ (rojo). En el **Panel inferior**, se muestra diagrama de barras con los valores medios de todas las células empleadas para el tratamiento de 48 h. de incubación con $1 \mu M$ de $A\beta_{25-35}$, los datos fueron normalizados respecto a su control de ACh $100 \mu M \pm EEM$ (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; # $p < 0,5$ y ### $p < 0,001$). La barra horizontal representa las células que fueron sometidas a perfusión previa del péptido $A\beta$. Entre paréntesis se indica el número de datos obtenidos para cada grupo.

4.1.3 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos en un protocolo de incubación crónica con antagonistas nicotínicos.

Habiendo determinado que una pre-incubación con $A\beta_{25-35}$ conseguía potenciar las corrientes nicotínicas significativamente, nos preguntábamos si de algún modo el $A\beta$ estaba antagonizando el efecto de la ACh sobre el receptor $\alpha 3\beta 4$ bovino, y por tanto, induciendo una mayor expresión de receptores nicotínicos en la membrana del ovocito.

A modo de control, y basándonos en la bibliografía pre-existente (Quik, Geertsen et al. 1987), (Xiu, Nordberg et al. 2005) utilizamos mecamilamina (Meca) como antagonista no competitivo de los receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos. Las concentraciones usadas por otros autores, (Quik, Geertsen et al. 1987), nos sirvieron para establecer nuestras concentraciones de mecamilamina durante las pre-incubaciones.

Así pues, trabajamos con tres grupos experimentales:

1. Ovocitos control
2. Ovocitos pre-tratados 48h. con $A\beta_{25-35}$ $1 \mu M$
3. Ovocitos pre-tratados 48h. con Meca $1 \mu M$

Los resultados que obtuvimos se muestran en la **Figura 9**, y en ella se comparan los resultados obtenidos paralelamente en tres grupos de tratamiento:

Cómo se puede ver en el diagrama de barras (**Figura 9**), en este caso, las I_{ACh} en el grupo tratado con Meca resultaron inhibidas en un $28,88 \pm 7,41\%$ respecto al grupo de ovocitos no tratado.

Si comparamos el efecto producido por la incubación con Meca, con el efecto producido por la incubación con $A\beta_{25-35}$, son completamente opuestos, lo que nos lleva a pensar que, si el $A\beta_{25-35}$ está modulando el receptor nicotínico, desde luego, no lo hace desde el sitio de unión de la ACh.

En lo que concierne a los pulsos de ACh con una perfusión previa de $A\beta_{25-35}$, cabe decir que los ovocitos que habían sido incubados con Meca, no sufrieron una disminución significativa de la I_{ACh} , lo cual podría darnos algunas pistas de dónde se está uniendo el $A\beta_{25-35}$.

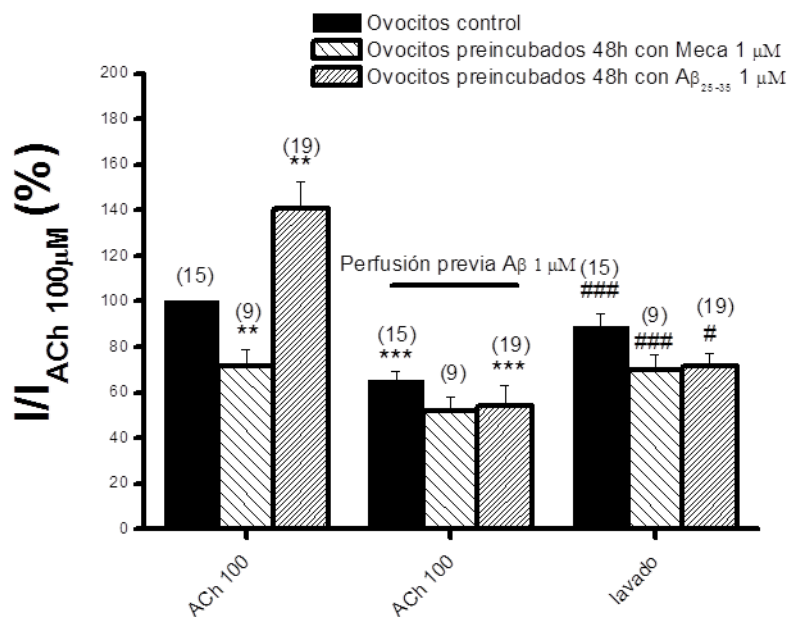
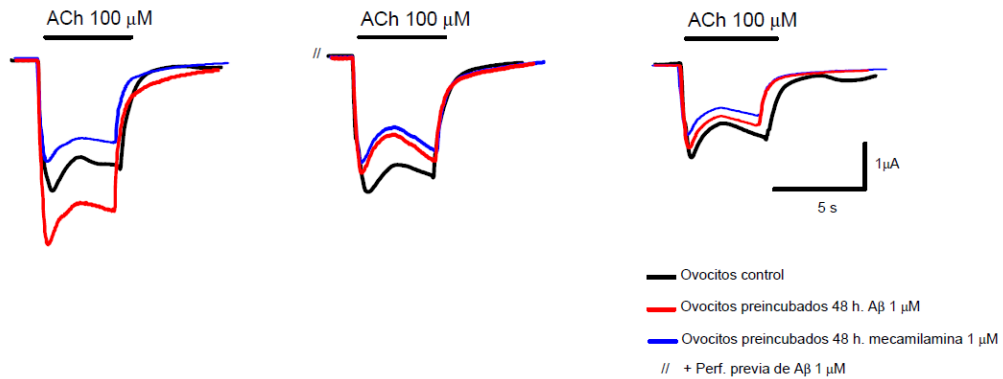


Figura 9. Se muestran en el **Panel superior** los registros originales de la I_{ACh} evocada por 100 μM de ACh en ovocitos control (negro), ovocitos pre-incubados 48h. con 1 μM de $A\beta_{25-35}$, y ovocitos pre-incubados 48h. con Meca 1 μM . En el **Panel inferior**, se presenta un diagrama de barras en el que se muestran los valores medios de todas las células empleadas en cada experimento. Los datos fueron normalizados respecto a su control de ACh 100 $\mu M \pm EEM$ (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; # $p < 0,5$ y ### $p < 0,001$). La barra horizontal representa las células que fueron sometidas a perfusión previa del péptido $A\beta$. Entre paréntesis se indica el número de datos obtenidos para cada grupo.

4.1.4 Efecto del lavado del péptido amiloide β sobre los ovocitos expresando receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos.

Continuando con la hipótesis de que el $A\beta_{25-35}$ estaba modulando el receptor nicotínico en los tratamientos crónicos, y con el fin de dilucidar, si era debido a su unión a algún sitio del receptor y no a un efecto de sensibilización del receptor, abordamos la estrategia del *lavado*. Este lavado consistía en quitar del medio de cultivo el $A\beta_{25-35}$, y “lavar” así el péptido de la superficie de los ovocitos, durante 24 horas. Nuestro objetivo en este caso era determinar si, tras “quitar” el $A\beta_{25-35}$ del medio de cultivo, el efecto modulador del péptido era mantenido en el tiempo.

Los resultados se presentan en la **Figura 10**, y en ellos se observa cómo la diferencia en el valor de la I_{ACh} entre el grupo de ovocitos control y el grupo de ovocitos pre-tratados+lavados fue de $23,44 \pm 9,86\%$. Por tanto, los valores netos de I_{ACh} seguían siendo más elevados en el grupo de ovocitos que habían sido sometidos a una pre-incubación con $A\beta_{25-35}$ y posteriormente a un lavado.

En lo que respecta al protocolo de pre-aplicación, la perfusión previa, al pulso del agonista, de $A\beta_{25-35}$ produjo una disminución de $22,46 \pm 8,73 \%$ en los ovocitos que habían sido pre-incubados+lavados. Este valor de inhibición es menor que el conseguido a 48 horas de incubación con $A\beta_{25-35}$ (**Figura 8**), lo cual nos viene a confirmar una vez más que durante el tratamiento crónico, el $A\beta_{25-35}$ se une de alguna forma al receptor nicotínico, pre-sensibilizándolo frente a la posterior presencia del mismo en pre-aplicación.

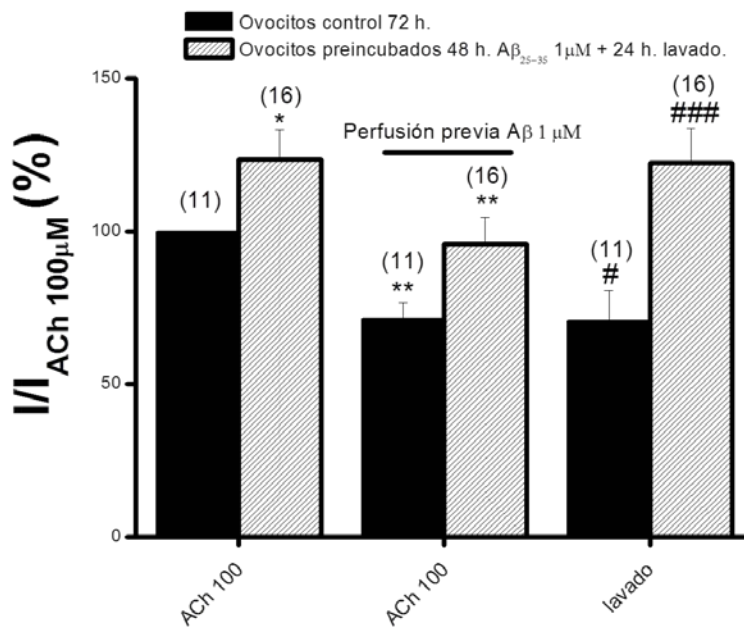
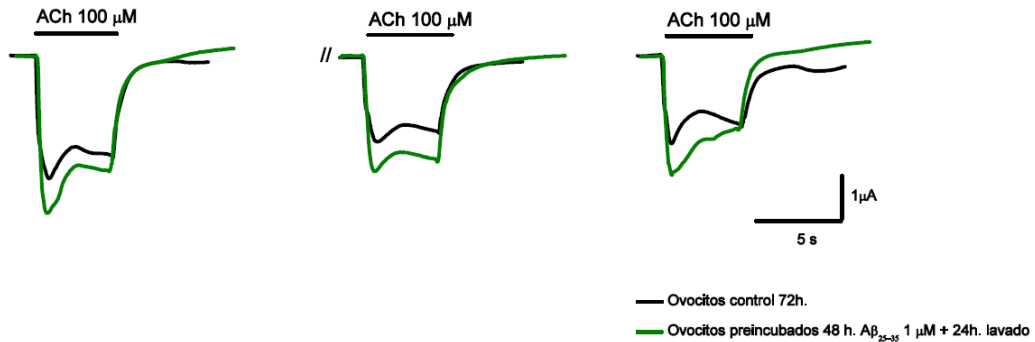


Figura 10. Diagrama de barras en el que se muestran los valores medios de todas las células empleadas en cada grupo de tratamiento (ovocitos control vs ovocitos pre-incubados 48 h. con $A\beta_{25-35}$). Los datos fueron normalizados respecto a su control de ACh 100 μ M \pm EEM (* p <0,05; ** p < 0,01; # p <0,5 y ### p <0,001). La barra horizontal representa las células que fueron sometidas a perfusión previa del péptido $A\beta$. Entre paréntesis se indica el número de datos obtenidos para cada grupo.

4.1.5 Efecto de dializar el péptido amiloide β en los ovocitos expresando receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos.

Finalmente, nos planteamos el abordaje de la dialización del $A\beta_{25-35}$ en el interior de capilar de registro con el que se impala el ovocito. Así pues, preparamos

una solución de KCl 3M + $A\beta_{25-35}$ 1 μ M y la usamos como solución intracelular durante el registro de las corrientes.

La dialización del $A\beta_{25-35}$ se realizó tanto sobre el grupo de ovocitos control, como sobre los ovocitos pre-tratados 48h. con $A\beta_{25-35}$ 1 μ M.

Los datos obtenidos se muestran en la **Figura 11** y aunque los resultados obtenidos tras dializar los ovocitos no son estadísticamente significativos, si pueden considerarse significativos a nivel biológico. Se observa que la dialización con $A\beta_{25-35}$ produce un aumento neto de las corrientes tanto en los ovocitos control como en los ovocitos pre-tratados 48 horas con $A\beta_{25-35}$ 1 μ M.

Una posible observación a estos resultados sería que el péptido está actuando desde dentro del ovocito, es decir, a nivel intracelular. Bien podría estar haciéndolo uniéndose a la parte intracelular del receptor y provocando cambios conformacionales en él o bien abriendo poros en la membrana del ovocito (a este respecto debe decirse que la fuga de los ovocitos presentados en este experimento siempre se mantuvieron por debajo de 0,5 μ A, que está dentro de los márgenes aceptados por los autores que trabajan con este sistema de expresión heterólogo).

Si de esta gráfica cabe destacar otro dato es la el hecho de que en el grupo de ovocitos control dializados que fueron sometidos a una pre-aplicación con $A\beta_{25-35}$ 1 μ M, sus I_{ACh} no fueron bloqueadas en el grado en el lo hacían sus controles. Por tanto podríamos inclinarnos mas por la hipótesis de que el $A\beta_{25-35}$ 1 μ M esté provocando un cambio conformacional en el receptor nicotínico desde dentro y, por ende, cuando se perfunde el $A\beta_{25-35}$ 1 μ M, éste ya no es capaz de unirse al receptor, bloqueando su respuesta.

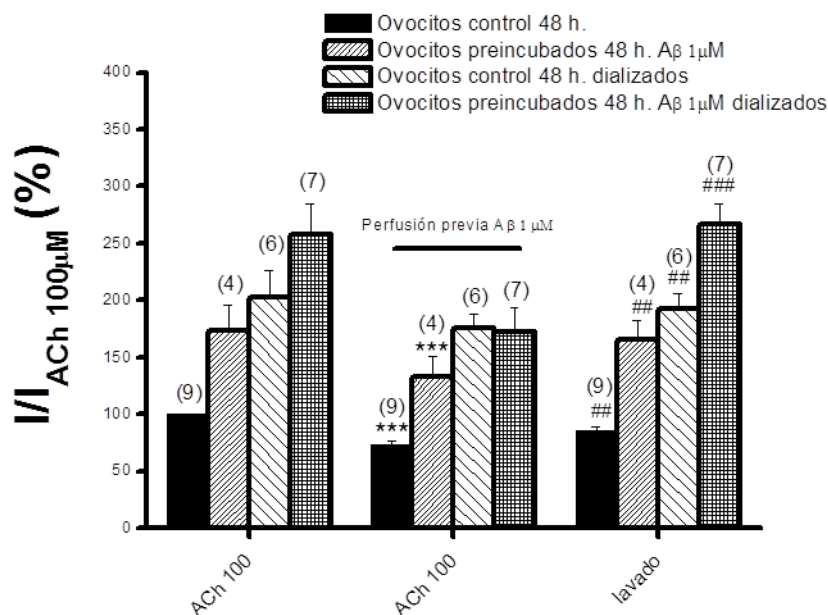


Figura 11. Diagrama de barras en el que se muestran los valores medios de todas las células empleadas en cada grupo de tratamiento (ovocitos control vs ovocitos dializados. con Aβ₂₅₋₃₅ 1 µM y ovocitos pre-incubados 48 h. con Aβ₂₅₋₃₅ 1 µM vs. ovocitos pre-incubados 48 h. con Aβ₂₅₋₃₅ 1 µM dializados Aβ₂₅₋₃₅ 1 µM). Los datos fueron normalizados respecto a su control de ACh 100 µM ± EEM (**p<0,001; ##p<0,01 y ###p<0,001). La barra horizontal representa las células que fueron sometidas a perfusión previa del péptido Aβ. Entre paréntesis se indica el número de datos obtenidos para cada grupo.

4.2 EFECTO DEL PÉPTIDO AMILOIDE β SOBRE RECEPTORES α7 EXPRESADOS EN OVOCITOS DE XENOPUS.

Las neuronas hipocámpales y las proyecciones colinérgicas desde el cerebro basal hacia el hipocampo son ricas en nAChRs α7 siendo precisamente estas áreas las más afectadas durante la EA. Los primeros trabajos que se realizaron a este respecto señalaban que el receptor nicotínico α7 y el Aβ interactuaban de alguna manera, pero lo cierto es, que a día de hoy, se desconoce la naturaleza exacta de esta interacción.

Son diversos los estudios y efectos observados por distintos autores, en relación al efecto que produce la interacción de α7- Aβ. Wang y col. describieron cómo el α7 co-inmunoprecipitaba junto a Aβ₁₋₄₂ en cerebros en estado post-mortem de

pacientes de EA (Wang, Lee et al. 2000) & (Wang, Lee et al. 2000). También se presentaron resultados donde se mostraba que pre-incubaciones con $A\beta_{1-42}$ antagonizaba la activación de los nAChRs en neuronas hipocampales, así como la inhibición de las mismas en cultivo (Liu, Kawai et al. 2001) y en rodajas (Pettit, Shao et al. 2001). Igualmente se ha descrito que la unión de $A\beta_{1-42}$ al receptor nicotínico $\alpha 7$, facilita la internalización del $A\beta$ al interior de la célula (Nagele, D'Andrea et al. 2002).

Así pues, conociendo los antecedentes que se circunscriben a la naturaleza de esta interacción, deseamos averiguar si $A\beta_{25-35}$ tendría algún efecto sobre los nAChRs $\alpha 7$ bovinos. En caso de resultar afirmativo, nos plantearíamos averiguar la naturaleza de ese efecto, reproduciendo la misma batería de procedimientos experimentales que habíamos llevado a cabo sobre $\alpha 3\beta 4$.

Inicialmente, y al igual que hiciéramos para el receptor $\alpha 3\beta 4$ bovino, construimos una curva concentración-respuesta de ACh para $\alpha 7$ bovino (**Figura 12**). Para ello, seguimos el protocolo de pulsos de ACh de 2 segundos de duración a intervalos de 2 minutos.

Los resultados muestran un efecto concentración-dependiente para la ACh realizándose una regresión no lineal con los datos y ajustándolos a un Modelo de Hill. Se obtuvo una curva sigmoideal a partir de la cual calculamos que la EC_{50} para ACh en receptores nicotínicos bovinos $\alpha 7$ era de 72,05 μM .

4.2.1 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos en un protocolo de aplicación aguda.

4.2.1.1 Protocolo en co-aplicación.

Para explorar el efecto de $A\beta_{25-35}$ en $\alpha 7$ bovino, nos basamos en protocolos llevados a cabo previamente por Pym y col. (Pym, Kemp et al. 2005) donde observaron los efectos producidos por $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ sobre corrientes nicotínicas humanas en $\alpha 7$.

En nuestro caso, nos planteamos averiguar qué efecto tendría la co-aplicación de ACh y A β_{25-35} , en un mismo pulso.

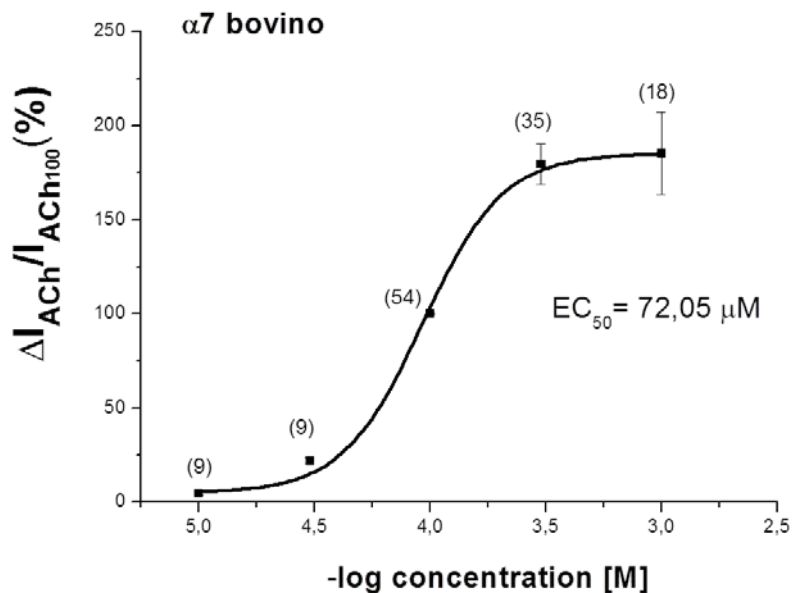
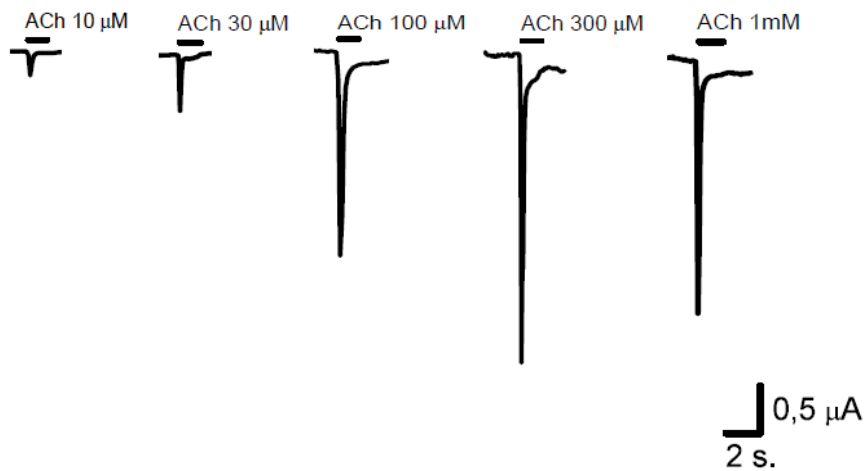


Figura 12. Curva concentración-respuesta para acetilcolina sobre receptores nicotínicos bovinos $\alpha 7$. Los ovocitos expresando receptores $\alpha 7$ se han perfundido con acetilcolina a diferentes concentraciones durante 2 segundos cada 2 minutos. (**Panel superior**) Trazados originales de las distintas concentraciones de ACh. Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación del agonista. (**Panel inferior**) Ajuste Dosis-Respuesta sobre la curva concentración-respuesta original. El número de ovocitos empleados en cada experimento se encuentra indicado entre paréntesis.

Como protocolo experimental, se dieron pulsos de ACh + A β_{25-35} durante 2 segundos, aplicado a intervalos de 2 minutos. Así pues, llevamos a cabo la construcción de dos curvas concentración-respuesta. Cada una de estas curvas consistía en concentraciones crecientes de ACh a las que añadimos:

- 0,1 μ M de A β_{25-35} (inicialmente usamos 0,1 μ M de A β_{25-35} debido a que algunos autores citaban que el A β_{25-35} se une con gran afinidad al receptor nicotínico $\alpha 7$ (Wang, Lee et al. 2000) ó

- 1 μ M de A β_{25-35} .

Todos los experimentos se realizaron en presencia del ión Ba²⁺ como ión transportador de carga.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 13**, donde se representa de color negro la curva control para ACh y debajo de ésta, en verde oliva, una curva concentración-respuesta para ACh + A β_{25-35} 0,1 μ M. Los datos obtenidos para pulsos de ACh + A β_{25-35} 0,1 μ M muestran que las corrientes nicotínicas evocadas por el agonista fueron inhibidas en un $41,53 \pm 9,87$ a la concentración de 100 μ M de ACh y de $35,13 \pm 9,42$ y $11,47 \pm 19,82$ para ACh 300 y 1000 μ M, respectivamente. Tal y cómo se muestra en la **Figura 13**, la EC₅₀ aumentó hasta situarse en 103,91 μ M.

Respecto a los resultados obtenidos en la construcción de la curva de ACh + A β_{25-35} 1 μ M (de color rojo en la **Figura 13**) cabe destacar que la inhibición fue mucho mas significativa, llegando a alcanzar valores de bloqueo de $56,46 \pm 5,47\%$ a la concentración de ACh 100 μ M y de $54,73 \pm 9,32\%$ y $29,11 \pm 10,51$ para ACh 300 y 1000 μ M, respectivamente. Las EC₅₀ también aumentó en este caso hasta 172, 42 μ M.

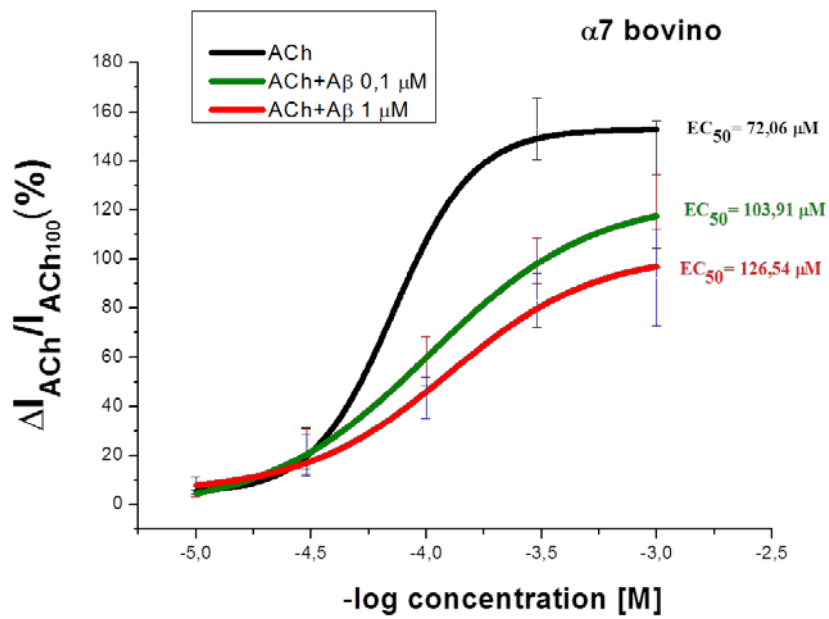
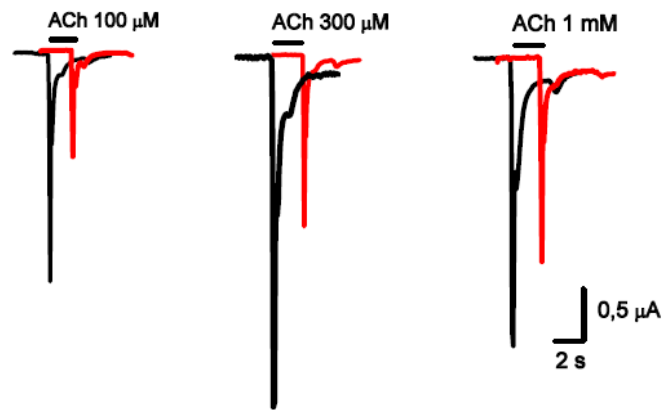
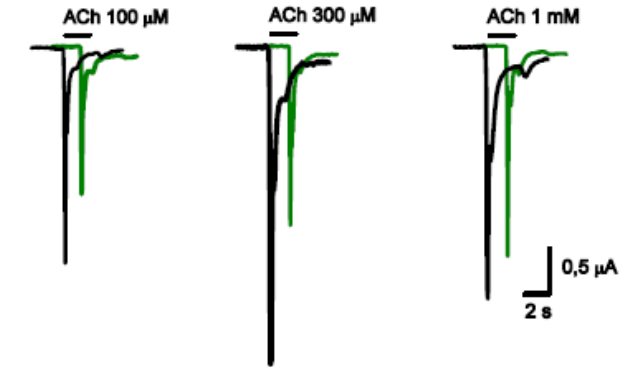


Figura 13. Curva concentración-respuesta para acetilcolina y $A\beta_{25-35}$ sobre receptores nicotínicos bovinos $\alpha 7$. (**Panel superior**) Trazos originales de las distintas concentraciones de ACh + 0,1 (verde)/1 (rojo) μM de $A\beta_{25-35}$. Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación del agonista. (**Panel inferior**) Ajuste según modelo Dosis-Respuesta de los resultados. La curva control de acetilcolina es representada de color negro, la curva de ACh + $A\beta$ 0,1 μM se representa en color verde y la curva para ACh + $A\beta$ 1 μM pertenece al color rojo. Los ovocitos expresando receptores $\alpha 7$ se han perfundido con ACh o ACh + $A\beta_{25-35}$ a diferentes concentraciones durante 2 segundos cada 2 minutos.

4.2.1.2 Protocolo en pre-aplicación.

En base a los resultados obtenidos en el apartado anterior, probamos determinar qué efecto tendría la pre-aplicación de $A\beta_{25-35}$ 1 μM sobre la respuesta evocada por pulsos del agonista ACh.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 14**. Cómo se observa, el $\%_{\text{bloqueo}}$ fue de $71,83 \pm 0,89\%$, a la concentración de ACh 100 μM .

Cabe citar que, durante los pulsos de lavado, los ovocitos sometidos a la pre-aplicación de $A\beta_{25-35}$ no consiguieron revertir totalmente la respuesta, sufriendo una pérdida significativa de corriente.

Este mismo protocolo fue llevado a cabo con ACh 300 μM y el $\%_{\text{bloqueo}}$ fue de $72,16 \pm 1,45\%$. Nuevamente, durante el lavado, los pulsos no revocaron la respuesta inicial.

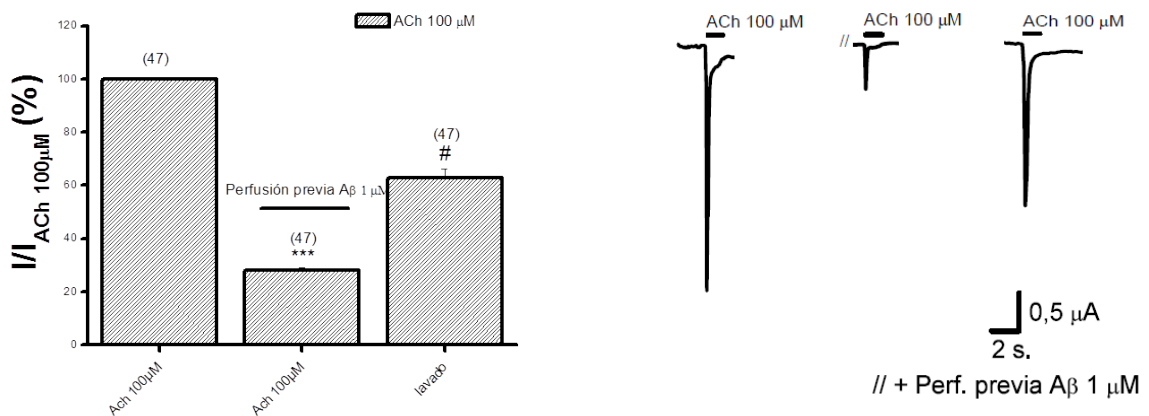


Figura 14. En el **Panel A** se muestran los trazos originales: el pulso control de ACh 100 μ M (trazo negro) y la I_{ACh} resultante de la pre-aplicación de 5 segundos de perfusión (//) del péptido $A\beta_{25-35}$ 1 μ M previa al pulso de ACh 100 μ M (trazo en color gris). En el **Panel B** están representadas los valores medios de todas las células empleadas en el experimento, normalizadas respecto a 100 μ M ACh \pm EEM (** $p < 0,001$ y # $p < 0,5$). Entre paréntesis se indica el número de datos obtenidos para cada grupo.

Nótese que, igual que $\alpha\beta_4$, las concentraciones que se usaron para caracterizar el efecto de $A\beta_{25-35}$ sobre el nAChR α_7 bovino serán ACh 100 μ M y ACh 300 μ M. Las razones son también que: 1) sobre ambas concentraciones el $A\beta_{25-35}$, ejerce su mayor grado de inhibición y 2) porque a concentraciones de ACh 1000 μ M, puede que estemos viendo desensibilización de la I_{ACh} y, por tanto, erraríamos al calcular el grado de bloqueo del $A\beta_{25-35}$.

4.2.2 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha\beta_4$ bovinos en un protocolo de aplicación crónica.

A continuación nos planteamos dilucidar cómo afectaría una exposición crónica del receptor α_7 bovino a la presencia de $A\beta_{25-35}$.

Para realizar este protocolo experimental creamos dos grupos de tratamiento, uno compuesto por ovocitos que no eran expuestos a $A\beta_{25-35}$ (de ahora en adelante, *ovocitos control*), y otro compuesto por ovocitos a cuyo medio de mantenimiento L-15 se le añadía el péptido $A\beta_{25-35}$ (de ahora en adelante, *ovocitos pre-tratados*).

Así pues, realizamos pre-incubaciones de los ovocitos que expresaban el subtipo nicotínico α_7 con 1 μ M de $A\beta_{25-35}$ durante 72 horas y comparamos los resultados con las I_{ACh} que se obtuvieron para los ovocitos control.

Los resultados se muestran en la **Figura 15**, donde se puede observar que la incubación crónica con $A\beta_{25-35}$ no afectó, en este caso, al valor neto de la I_{ACh} en los ovocitos pre-tratados, resultando la misma en todo caso disminuida, aunque no de forma significativa (% $_{\text{bloqueo}} = 11,13 \pm 6,12$).

En lo que concierne a la perfusión de 5 s. de $A\beta_{25-35}$ 1 μM previa al pulso de ACh 100 μM hay que decir que el grado de bloqueo de la corriente nicotínica obtenido ($\%_{\text{bloqueo}} = 73,41 \pm 3,68\%$) fue similar al que se encontró en los ovocitos control de 72 h. ($\%_{\text{bloqueo}} = 77,75 \pm 6,23\%$).

Hay que destacar que los ovocitos pre-tratados durante 72 h. consiguieron revertir totalmente la corriente de ACh durante los pulsos de lavado.

Estos mismos experimentos se llevaron a cabo usando ACh 300 μM , y los resultados obtenidos fueron muy similares: 1) Los valores netos de I_{ACh} no se vieron afectados significativamente con la pre-incubación ($\Delta I_{\text{ACh}} = 14,14 \pm 10,785$); 2) La pre-aplicación de $A\beta_{25-35}$ 1 μM previa al pulso de ACh 300 μM inhibió $73,89 \pm 5,36$ la I_{ACh} .

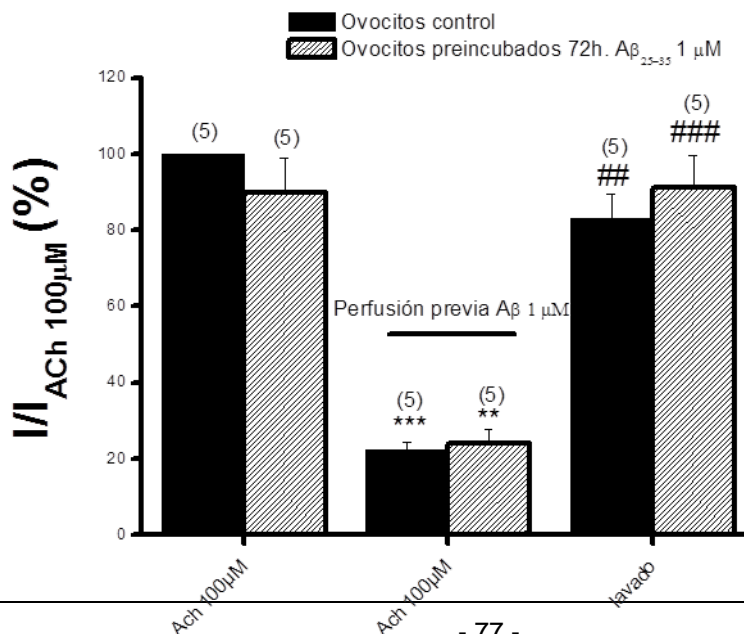
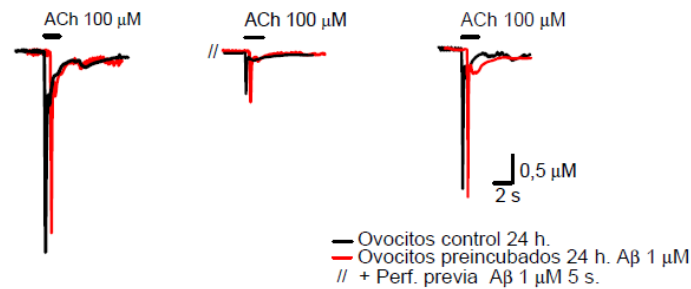


Figura 15. Diagrama de barras en el que se muestran los valores medios de todas las células empleadas para el tratamiento de 72 h. de incubación con 1 μM de $\text{A}\beta_{25-35}$, los datos fueron normalizados respecto a su control de ACh 100 $\mu\text{M} \pm \text{EEM}$ (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$). La barra horizontal representa las células que fueron sometidas a perfusión previa del péptido $\text{A}\beta$. Entre paréntesis se indica el número de datos obtenidos para cada grupo.

4.2.3 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos en un protocolo de incubación crónica con antagonistas nicotínicos.

En busca de mimetizar un efecto antagonizador con un antagonista, incubamos un grupo de ovocitos con un antagonista competitivo selectivo para $\alpha 7$, como es la Metilicacnitina (MLA). Nuestro objetivo era explorar si, la presencia del antagonista, afectaría al bloqueo ejercido por $\text{A}\beta_{25-35}$ sobre las I_{ACh} en $\alpha 7$.

Así pues se separaron tres grupos de tratamiento:

1. ovocitos control
2. ovocitos pre-tratados 72 h. con $\text{A}\beta_{25-35}$ 1 μM
3. ovocitos pre-tratados 72 h. con MLA 10 nM

Los resultados se muestran en la **Figura 16** y en ellos se observa cómo tanto la pre-incubación con $\text{A}\beta_{25-35}$ 1 μM , como la pre-incubación con MLA 10 nM, no produjo cambios significativos en la I_{ACh} de los ovocitos.

Por otro lado, la pre-aplicación de 5 s. de $\text{A}\beta_{25-35}$ 1 μM antes del pulso de ACh 100 μM , consiguió inhibir también, en el grupo tratado con MLA, la I_{ACh} un $76,32 \pm 6,84\%$.

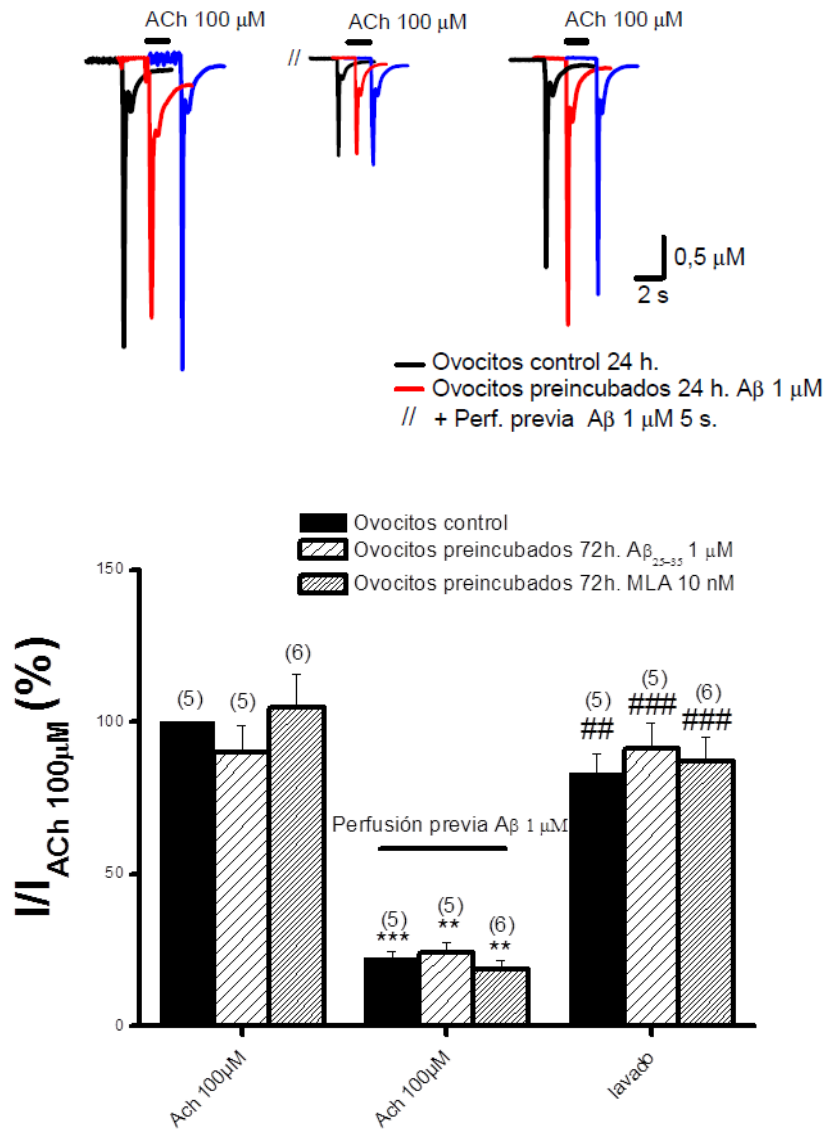


Figura 16. En el **Panel superior** se muestran los registros originales de la I_{ACh} evocada por 100 μM de ACh en ovocitos control (negro), ovocitos pre-incubados 48h. con 1 μM de Aβ₂₅₋₃₅, y ovocitos pre-incubados 48h. con MLA 10 nM. En el **Panel inferior**, se presenta un diagrama de barras en el que se muestran los valores medios de todas las células empleadas en cada experimento. Los datos fueron normalizados respecto a su control de ACh 100 μM ± EEM (**p<0,01; ***p<0,001; ##p<0,01 y ###p<0,001). La barra horizontal representa las células que fueron sometidas a perfusión previa del péptido Aβ₂₅₋₃₅. Entre paréntesis se indica el número de datos obtenidos para cada grupo.

No se hallaron diferencias significativas entre la inhibición ejercida por la pre-aplicación de $A\beta_{25-35}$ 1 μ M entre ninguno de los tres grupos.

Este mismo protocolo fue llevado a cabo con pulsos de ACh 300 μ M, no encontrándose diferencias significativas para los valores obtenidos con ACh 100 μ M.

4.2.4 Efecto del péptido amiloide β sobre receptores $\alpha 3\beta 4$ bovino con el uso de otros agonistas nicotínicos.

Finalmente, y tras testar el efecto de $A\beta_{25-35}$ junto al agonista ACh, nos planteamos el uso de otro agonista selectivo para $\alpha 7$ como es la colina (Cho).

Nuestro objetivo en este caso era explorar mejor el posible sitio de unión del $A\beta_{25-35}$ al receptor nicotínico $\alpha 7$. De esta forma podríamos ver si el $A\beta_{25-35}$ compite por el sitio de unión de la ACh o, si por el contrario, está modulando la respuesta del receptor nicotínico uniéndose a otro sitio.

Para llevar a cabo este protocolo, usamos nuevamente ovocitos de *Xenopus laevis* que expresaban en su membrana el receptor nicotínico $\alpha 7$ e hicimos tres grupos de tratamiento:

1. ovocitos control
2. ovocitos pre-tratados 72 h. con $A\beta_{25-35}$ 1 μ M
3. ovocitos pre-tratados 72 h. con MLA 10 nM

Cómo se observa en la **Figura 17**, el uso de Cho para evocar la respuesta en este subtipo nicotínico, no produjo ninguna diferencia significativa respecto a los resultados obtenidos para ACh.

Tanto en las pre-incubaciones con $A\beta_{25-35}$, como en el protocolo de pre-aplicación de $A\beta_{25-35}$, se obtuvieron los mismos grados de inhibición de la I_{ACh} por parte de $A\beta_{25-35}$.

Igualmente, las pre-incubaciones con el antagonista selectivo MLA no afectaron en los grados de bloqueo por $A\beta_{25-35}$.

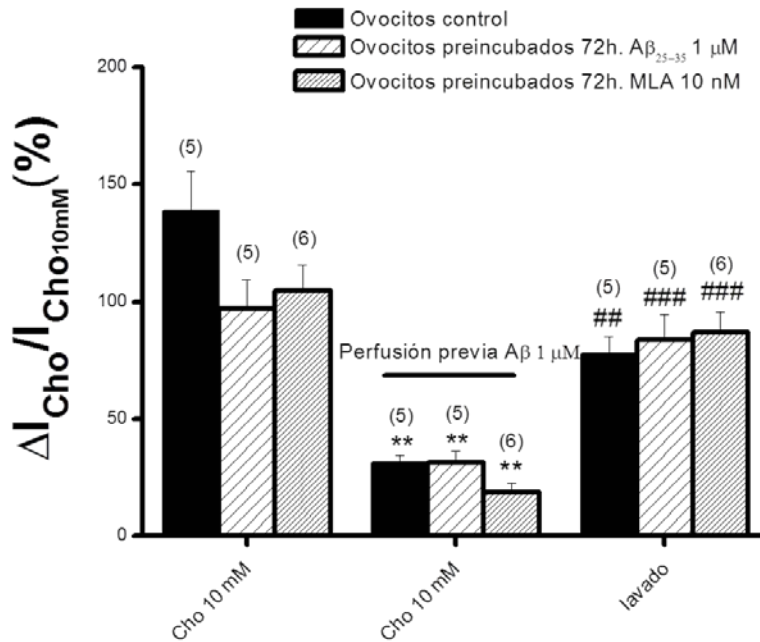


Figura 17. En el **Panel superior** se muestran los registros originales de la I_{ACh} evocada por 10 mM de Cho en ovocitos control (negro), ovocitos pre-incubados 48h. con 1 μ M de $A\beta_{25-35}$, y ovocitos pre-incubados 48h. con MLA 10 nM. En el **Panel inferior**, se presenta un diagrama de barras en el que se muestran los valores medios de todas las células empleadas en cada experimento. Los datos fueron normalizados respecto a su control de ACh 100 μ M \pm EEM (** p <0,01; ## p <0,01 y #### p <0,001). La barra horizontal representa las células que fueron sometidas a perfusión previa del péptido $A\beta$. Entre paréntesis se indica el número de datos obtenidos para cada grupo.

DISCUSION

Desde hace tiempo se sabe que existe una conexión entre la EA y el déficit colinérgico en la neurotransmisión. Ya, a finales de los 70, varios estudios demostraron que una característica muy importante de la patología de la EA era una pérdida muy significativa de neuronas colinérgicas (Davies and Maloney 1976); (Perry, Tomlinson et al. 1978) (Perry, Perry et al. 1987);(Quirion, Martel et al. 1986); (Fabian-Fine, Skehel et al. 2001). Dada la implicación de la ACh en importantes funciones cognitivas, tales como aprendizaje y la memoria, la interrupción de la transmisión colinérgica se reconoció inmediatamente como una posible causa de deterioro cognitivo en pacientes con EA (Smith and Swash 1978).

Como consecuencia, los esfuerzos se enfocaron en el desarrollo de agentes terapéuticamente potenciales para combatir la EA basados en restablecer el funcionamiento normal de la transmisión colinérgica. Esto condujo a la introducción y aplicación clínica de varios inhibidores de la acetilcolinesterasa. A pesar de su modesta eficacia, estos inhibidores son todavía ampliamente usados en el tratamiento de la EA (Nordberg 1993);(Nordberg and Svensson 1998); (Krall, Sramek et al. 1999); (Munoz-Torrero 2008).

Aunque la pérdida de neuronas colinérgicas proporciona una clara indicación de la participación del sistema colinérgico en la patogénesis de la EA, la muerte neuronal se cree que ocurre sólo en etapas más avanzadas de la enfermedad, mucho después de la aparición del deterioro de la memoria (Klein 2006). Por tanto, la pérdida de memoria en las etapas iniciales de la EA podría estar mas relacionado con otros dos aspectos de la transmisión colinérgica, como son, cambios en los niveles de nAChRs y la desregulación de la función de los nAChRs resultante de las interacciones moleculares de A β con éstos. Así pues entender los mecanismos moleculares que subyacen a esta vulnerabilidad colinérgica selectiva por A β aportaría grandes avances para el tratamiento de la EA.

Por otro lado, el hecho de que las poblaciones de neuronas más vulnerables sean aquellas que son más ricas en nAChRs puede que nos esté dando pistas sobre las claves del proceso.

Como ya se ha descrito, en las regiones del cerebro afectadas por la EA, corteza cerebral e hipocampo principalmente, se observan tempranas y marcadas reducciones en los niveles de los nAChRs (Kellar, Whitehouse et al. 1987) (Wevers and Schroder 1999; Perry, Martin-Ruiz et al. 2000). Durante el envejecimiento normal, el cerebro ya presenta, en cierta medida, una reducción en los niveles de estos receptores. Sin embargo, esta reducción es mucho más acusada en pacientes con EA. Por ejemplo, los niveles de la subunidad $\alpha 4$ se encontraron disminuidos en un 80% si lo comparamos con los niveles encontrados en cerebros controles sin demencia (Perry, Martin-Ruiz et al. 2000). Aparentemente, la reducción de los niveles de nAChRs en la EA no se debe a una disminución en la expresión de ARN mensajero. Como ya ha sido descrito, los niveles de diferentes subunidades (medidos por hibridación in situ o RT-PCR cuantitativa) no son muy diferentes entre los medidos con EA y los medidos en controles sanos, llegando incluso en el caso de la subunidad $\alpha 7$ a ser mayores en cerebros con EA (Terzano, Court et al. 1998); (Mousavi, Hellstrom-Lindahl et al. 2003).

Todo esto sugiere que un componente importante en la patogénesis de la EA podría ser la pérdida de nAChRs pre-existentes, posiblemente debido a alteraciones en el tráfico de receptores o bien en alteraciones a nivel del control de la transcripción.

En los últimos años se han acumulado una considerable cantidad de evidencias respecto a las interacciones moleculares entre A β y nAChRs (Dineley 2007). Los primeros trabajos de Wang y col. demostraron que, en la EA, el A β se unía con una alta afinidad (en el intervalo de picomolar) a $\alpha 7$ nAChR, en las regiones cerebrales corticales y en el hipocampo (Wang, Lee et al. 2000). Por otro lado, un estudio describió que βA_{1-42} ejerce, en concentraciones picomolares, efectos estimulantes sobre los nAChRs $\alpha 7$ (Puzzo, Privitera et al. 2008). Haciendo uso de fagos, Magdesian y col. describieron que el A β_{1-40} soluble se une con alta afinidad, en

el rango nanomolar, a los diversos subtipos de nAChRs, incluyendo $\alpha 7$ (Magdesian, Nery et al. 2005).

Dado que la unión con tan altas afinidades implica interacciones moleculares relativamente fuertes, se podría predecir que los cambios conformacionales inducidos en los nAChRs por la unión A β , daría lugar a alteraciones en la actividad del receptor.

Nuestro grupo, usando el modelo de expresión heteróloga de ovocitos de *Xenopus laevis*, ha demostrado que el A β bloquea las respuestas evocadas por ACh en los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ bovinos (**Figura 2 y Figura 13**). Este bloqueo era mas efectivo, cuanto mayor era la concentración de ACh utilizada. Además de confirmar una interacción nAChRs- A β , estos resultados apuntaban que el A β estaba ejerciendo un posible antagonismo no competitivo sobre ambos subtipos de nAChR.

Este posible antagonismo no competitivo se confirmó nuevamente durante el protocolo de pre-aplicación del A β (**Figura 3 y Figura 14**). Si bien en el caso de $\alpha 3\beta 4$, el grado de inhibición fue menor que para $\alpha 7$, en ambos nAChRs, el A β ejercía un bloqueo efectivo de las I_{ACh} . En nuestro caso, el A β parecía unirse con mucha mas afinidad al nAChR $\alpha 7$ que al nAChR $\alpha 3\beta 4$, lo cual ~~va~~na confirmar lo que muchos autores ya han descrito, y es que el A β , se une con una gran afinidad a $\alpha 7$ (Wang, Lee et al. 2000); (Magdesian, Nery et al. 2005).

Se estima que el contenido de A β en cerebros no dementes ronda los pM, sin embargo se cree que esta cantidad aumenta hasta varios cientos de nM en cerebros con EA (Xie, Litsersky et al. 1998); (Oddo, Caccamo et al. 2005); (Kihara, Shimohama et al. 2001). Varios estudios han descrito que exposiciones prolongadas de los nAChRs a concentraciones nM de A β acaban en un bloqueo significativo de la ~~función~~ del receptor (Grassi, Palma et al. 2003); (Pym, Kemp et al. 2005); (Pettit, Shao et al. 2001); (Lamb, Melton et al. 2005); (Liu, Kawai et al. 2001); (Cleary, Walsh et al. 2005). Esto sugiere que, bajo condiciones de enfermedad, la interacción nAChR- A β interferiría con el funcionamiento normal de estos receptores

La activación de los nAChRs causa la despolarización de la membrana directa o indirectamente, aumentando el calcio intracelular. Cuando los nAChRs se expresan

sobre terminales pre-sinápticos, su activación aumenta la posibilidad de liberación de los neurotransmisores. Cuando se expresan sobre terminales post-sinápticos, su activación desencadena un aumento del calcio intracelular y una cascada de señales que contribuyen a la homeostasis de la neurona, plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria (McKay, Placzek et al. 2007). Mientras que varios estudios han demostrado que la activación de los nAChRs atenúa la toxicidad por A β , no está claro porqué estos receptores disminuyen selectivamente en las áreas de proyección colinérgica cortical durante la progresión de la enfermedad.

Una posibilidad para la acumulación de A β durante la EA es que, a medida que la concentración de A β aumenta, la función neuroprotectora de los nAChRs comienza a ser bloqueada por el efecto antagonista que ejerce el A β . Aunque también debe considerarse que la interacción que sucede entre nAChRs- A β , bajo condiciones de enfermedad, contribuya a la neurotoxicidad.

Las evidencias de que los nAChRs juegan un papel neuroprotector es una larga historia y, porqué no, algo enigmática. Algunos estudios epidemiológicos han demostrado una correlación negativa entre ser fumador y la posibilidad de padecer EA.

Dada la gran cantidad de evidencias del papel neuroprotector que juegan los nAChRs, la interacción nAChR- A β bajo condiciones de gran cantidad de A β , podría exacerbar la toxicidad de A β al disminuir la señal neuroprotectora efectuada por estos receptores.

Así la literatura indica que, bajo “altas cantidades de A β ” podría suceder:

- 1) Alteración y desregulación de los mecanismos de transducción de señales implicados en la homeostasis y plasticidad sináptica.
- 2) Internalización del complejo péptido-receptor
- 3) Toxicidad celular
- 4) Formación de placas

Si la neuroprotección *in vivo* es mediada a través de PI3K, la mediada *in vitro* es a través de los nAChRs. Estudios *in vitro* para determinar la protección frente a A β

en neuronas en cultivo demostraron que los nAChRs $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ mediaron el efecto neuroprotector de la nicotina (Kihara, Shimohama et al. 1997). Por otro lado, otros autores demostraron que la protección frente a β As proporcional al número de receptores $\alpha 7$ que hay expresados en cultivo (Jonnala and Buccafusco 2001). Otros autores, han demostrado como una exposición crónica a $A\beta_{1-42}$, *in vitro*, condujo a un up-regulation de los nAChRs de manera similar a los efectos de un tratamiento crónico con nicotina (Dineley, Westerman et al. 2001) (Dineley, Xia et al. 2002).

Nuestro grupo exploró los efectos de exposiciones crónicas de los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ a $A\beta$. Los efectos encontrados fueron distintos. En el caso de exposiciones crónicas sobre los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ (**Figura 8**), estos receptores parecieron aumentar en número, sobre la membrana del ovocito. Este dato viene confirmado por el aumento de los valores netos de corriente para ACh. Así se observa que, a medida que se aumentaron las concentraciones de $A\beta$ y los tiempos de incubación, la cantidad de corriente observada aumentaba proporcionalmente (**Figura 6, Figura 7 y Figura 8**).

En esta línea, e intentando descartar una pre-sensibilización del receptor por las exposiciones crónicas a un posible antagonista, realizamos lavados del $A\beta$ sobre el receptor. Los resultados muestran (**Figura 10**) que las corrientes permanecían aumentadas respecto a sus controles tras este lavado, lo cual nos venía a confirmar una vez mas que el $A\beta$ estaba modulando, de alguna manera, la expresión de $\alpha 3\beta 4$ sobre la membrana del ovocito.

El grupo de Xiu apoya la idea de que el up-regulation de los nAChRs ocurre durante la enfermedad: exposiciones crónicas “in vitro” de cultivos primarios de astrocitos a concentraciones pM-nM de $A\beta_{1-42}$ durante 48h. resultaron en un up-regulation tanto del ARNm $\alpha 7$ como de la proteína (mediante cuantificación de ARNm y de proteína total, con RT-PCR e inmunoblot, respectivamente) (Xiu, Nordberg et al. 2005). Este up-regulation se observó también para las subunidades $\alpha 4\beta 2$, pero no así para la subunidad $\beta 3$, que permaneció sin cambios.

Respecto a los resultados obtenidos para las exposiciones crónicas de $A\beta$ sobre los nAChRs $\alpha 7$ (**Figura 15**) hay que decir que nuestro grupo no encontró

diferencias significativas entre el grupo que era pre-incubado y el grupo control. Resulta curioso que si en el caso de la aplicación aguda del β (**Figura 13 y Figura 14**) se obtuvieron bloqueos muy significativos sobre $\alpha 7$, las exposiciones crónicas a $A\beta$ no ejercieran ningún efecto a este respecto. Para encontrar una posible explicación a estos resultados, quizás hubiese sido interesante ver el efecto del $A\beta$ a nivel intracelular, pues puede ser que las acciones del $A\beta$ sobre los distintos subtipos de nAChRs dependan de su unión a nivel extracelular o intracelular.

En esta línea, los resultados de dializar el $A\beta$ intracelularmente en los ovocitos que expresaban nAChRs $\alpha 3\beta 4$ (**Figura 11**), resultaron en un aumento de la I_{ACh} tanto en el grupo de ovocitos control como en el grupo de ovocitos pre-tratados. Si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas, consideramos este hallazgo muy interesante. Para este hecho, encontramos dos posibles explicaciones, una en la que el $A\beta$ esté uniéndose a la parte intracelular del nAChR activándolo desde el interior, y la otra, en la que $A\beta$ está provocando la apertura de micro -poros en la membrana del ovocito, resultando por tanto en un aumento de la I_{ACh} a causa de un efecto tóxico. Debido a que la fuga en estos ovocitos se mantuvo estable, nos decantaríamos preferentemente por la primera posible explicación, aunque no se puede descartar ninguna otra alternativa.

Algunos autores admiten que el $A\beta$ intracelular puede jugar un papel crítico en el proceso patológico. En una serie de publicaciones llevadas a cabo por Nagele, D'Andrea y col, se describió como neuronas localizadas en cerebros con EA, acumulaban gran cantidad de $A\beta_{1-42}$ y que, además, estas neuronas eran muy ricas en nAChRs $\alpha 7$ (Nagele, D'Andrea et al. 2002); (Nagele, D'Andrea et al. 2003); (Wang, D'Andrea et al. 2002). Otros autores describieron cómo células de neuroblastoma, transfectadas con cDNA para nAChRs $\alpha 7$, exhibían una rápida unión, internalización y acumulación de $A\beta_{1-42}$ exógeno, pero no así para $A\beta_{1-40}$. Esta internalización fue relacionada con el nivel de expresión de $\alpha 7$ nAChR (Nagele, D'Andrea et al. 2002). Además el antagonista α -Bgtx, previno esta internalización. Estos resultados sugieren que $\alpha 7$ facilita la internalización en neuronas y podría conferir vulnerabilidad selectiva para los efectos tóxicos a nivel intracelular, por $A\beta_{1-42}$. De ahí que, en futuros

experimentos, nos gustaría explorar el efecto intracelular de A β a nivel de los nAChRs $\alpha 7$ en nuestro modelo celular.

Nagale y col llevaron esta consideración un paso mas allá sugiriendo que la interacción nAChR- A β y su internalización podría conducir a la formación de placas y que, cuando la célula que alberga este A β muere, su contenido intracelular se deposita en el parénquima cerebral (Nagele, D'Andrea et al. 2003); (Nagele, Wegiel et al. 2004).

Nuestro grupo utilizó antagonistas competitivos y no competitivos en combinación con el A β para intentar dilucidar mejor su mecanismo de acción. En el caso de los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ (**Figura 9**), el uso de incubaciones crónicas con el antagonista no selectivo Meca, no introdujo cambios significativos en los resultados obtenidos para A β . Esto podría estar indicando que el sitio de unión del A β al nAChR $\alpha 3\beta 4$ no es el mismo que para la Meca, pues la pre-aplicación del A β sobre los ovocitos que habían sido pre-tratados con Meca, resultó en el mismo grado de bloqueo que para el resto de ovocitos.

Para el caso de los nAChRs $\alpha 7$, el tratamiento con el antagonista selectivo MLA, actuó en modo paralelo a como lo hizo el A β , es decir, bloqueando las I_{ACh} de forma efectiva. Es durante la pre-aplicación de A β , cuando el grupo de ovocitos pre-tratados con MLA, resultaron sus I_{ACh} mas inhibidas que el resto, aunque sin diferencias estadísticas.

En el caso de $\alpha 7$, varios autores encontraron que A β ejerce de antagonista sobre este subtipo de receptor y confirma previos estudios que describían que el A β reducía las corrientes evocadas por ACh en $\alpha 7$, de forma no competitiva. En esta línea se describió que pre-incubaciones con A β_{1-42} antagonizaban la activación de los nAChRs $\alpha 7$ en neuronas hipocampales, así como la inhibición de las mismas en cultivo (Liu, Kawai et al. 2001) y en rodajas (Pettit, Shao et al. 2001) .Igualmente se ha descrito que la unión de $\alpha 7$ a A β_{1-42} facilita la internalización del A β (Nagele, D'Andrea et al. 2002).

De hecho, y curiosamente, se ha demostrado que A β tiene capacidad tanto de activar como de inhibir los nAChRs, dependiendo del subtipo de receptor, de las

concentración de A β , del tipo de preparación (es decir, monómeros, oligómeros solubles o fibrillas), y de los tiempos de incubación. En conclusión, a pesar de la cantidad de datos importantes que indican que las interacciones entre A β y nAChRs afectan a la función del receptor, estos efectos parecen muy dependientes del subtipo de receptor y de las condiciones experimentales, y no existe aún un consenso general sobre el impacto que A β tiene en la transmisión colinérgica vía activación o inhibición del receptor.

Por otra parte, A β sí altera la función de los nAChRs, lo que lleva a nuevas posibilidades para el diseño de fármacos terapéuticos. Los agonistas nicotínicos inducen rápidamente la desensibilización del receptor, y por lo tanto, su eficacia terapéutica puede ser limitada. Sin embargo, compuestos que bloqueen la unión de A β a los nAChRs no deberían sufrir de esta limitación. Un ejemplo interesante a este respecto son los péptidos descritos por Magdesian y col., los cuales bloqueaban la inhibición de la función de nAChRs mediada por A β “*in vitro*” (Magdesian, Nery et al. 2005). Los autores también demostraron que el A β se unía a los nAChRs cerca del sitio de unión de la nicotina, pavimentando el camino para el diseño de inhibidores de A β basados en su estructura vinculante.

Curiosamente, los efectos que hay descritos del A β sobre la plasticidad sináptica, parecen depender estrictamente de las concentraciones de A β . Ya Dineley y col. demostraron que el efecto de A β sobre la actividad de los nAChR α 7 tiene forma de “U invertida”, es decir, mientras que las concentraciones bajas (en el rango picomolar fisiológico) activan el receptor, la exposición prolongada a concentraciones más altas (parecido a estados patológicos) bloquean de forma muy efectiva las corrientes (Dineley, Bell et al. 2002).

Este hecho coincide con un interesante estudio que muestra que las concentraciones picomolares de A β desempeñan un papel positivo en la plasticidad sináptica, facilitando la LTP (*Long Term Potentiation*) a través de un mecanismo dependiente de α 7 (Puzzo, Privitera et al. 2008). Estos autores demostraron que 200 pM de A β oligomérico mejora la LTP “*in vitro*” a través de un aumento de la liberación de neurotransmisores en presencia de la toxina tetánica y facilita el

rendimiento en las pruebas de memoria “*in vivo*”. Ambos efectos no se manifiestan en ratones nulos para $\alpha 7$, lo que sugiere el papel ~~funcional~~ de la activación de este receptor sobre la plasticidad. En conjunto, estos resultados sugieren que el aumento en la liberación de neurotransmisores a través de la activación de nAChRs pre-sinápticos puede ser el mecanismo por el cual, el A β , en concentraciones muy bajas, ejerza su papel fisiológico. Una vez que las concentraciones de A β alcanzan niveles patológicos, aparecerían otros tipos de efectos, tales como la desensibilización de los nAChRs $\alpha 7$, pudiendo ser la base para la interrupción de la plasticidad sináptica.

La reversión del fracaso sináptico inducido por A β sería un paso fundamental para detener los síntomas de la EA.

Así pues los nAChRs son dianas terapéuticas potencialmente importantes en la EA, ya que están implicados en la regulación de la plasticidad sináptica y se sabe que su número disminuye durante la EA.

Si A β ejerce acciones subtipo específicas sobre $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ y otros nAChRs, sugiriendo que los efectos dependen de la composición en subunidades, esto debería ser tenido en cuenta para los efectos descritos en distintos modelos celulares.

Las diferencias entre autores (en los que para unos, el A β inhibe y para otros potencia) pueden ser debidas al modelo celular elegido (ovocitos, células SH-EP1, neuronas...) ó también podría ser debido a diferencias entre especies. Por ejemplo, los modelos de ratón transgénicos que emulan la EA son ampliamente usados para investigar los efectos de A β *in vivo* y sus resultados aportan algunas luces a este problema aún sin resolver. Pero las posibles diferencias entre especies en la acción final del A β sobre los nAChRs requiere de profundas investigaciones, pues aparecen grandes implicaciones a la hora de interpretar los resultados obtenidos en modelos animales durante los ensayos de nuevos fármacos.

Así pues, las diferencias encontradas en nuestro modelo celular, entre $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ podrían ser debidas a que cada subtipo de receptor establece diferentes tipos de interacciones con el A β , suponiendo que tienen distintos sitios de interacción y que ambos, $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$, juegan distintos papeles en la respuesta neuronal a A β durante la

EA. Por ejemplo, (Pym, Kemp et al. 2005) no encontró ningún efecto de $A\beta$ sobre $\alpha 3\beta 4$ pero sí para $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$, concluyendo que el sitio de interacción de $A\beta$ con el nAChR estaba ausente en $\alpha 3\beta 4$. En nuestro caso, ambos subtipos de nAChRs son susceptibles a la presencia de $A\beta$, por lo que puede ser que ambos subtipos nicotínicos tengan un sitio común de unión para $A\beta$. Estudios de *western-blot* y de secuenciación aminoacídica, y posteriores estudios comparativos inter nAChRs y entre especies, podrían ayudarnos a determinar la composición y localización exacta de este supuesto sitio de unión. Si bien en nuestro caso, este posible sitio de unión de $A\beta$ en el nAChR $\alpha 7$, parece ser de gran afinidad.

Podría decirse que esta acción inhibitoria del péptido $A\beta$ sobre los nAChRs puede representar el mecanismo que subyace al deterioro cognitivo durante la EA.

Y, mientras hay un consenso general de que el exceso de $A\beta$, es el principal evento neurotóxico durante la EA, existen varias líneas abiertas indicando que son los oligómeros, formas solubles de $A\beta$ y no las placas amiloides, las que inician los déficits cognitivos característicos de la enfermedad (Glabe and Kaye 2006); (Hardy and Selkoe 2002). Sería interesante determinar, a este respecto, si no son solo las concentraciones de $A\beta$ las que ejercen neurotoxicidad, sino también el tipo de estructura y agregados del péptido.

Dado que la interacción nAChR- $A\beta$ se da también bajo condiciones fisiológicas normales, la interrupción profiláctica de esta interacción no parece ser una idea muy prudente. Sin embargo sería interesante desarrollar estrategias para interrumpir la interacción cuando los niveles de $A\beta$ vuelvan patológicos, acumulándose intracelularmente o induciendo toxicidad. Así el desarrollo de sustancias que unas este $A\beta$, evitando la interacción nAChR- $A\beta$ ó la modulación directa de los nAChRs sí podrían ser estrategias alternativas. Sin embargo, esto requiere un sólido conocimiento de la relación funcional nAChR- $A\beta$, y de porqué los niveles de $A\beta$ aumentan exacerbadamente sin explicación alguna aparente. Sin embargo, mientras se avanza mucho en el entendimiento de la interacción nAChR- $A\beta$, la naturaleza compleja de esta relación necesita de estudios mucho mas profundos, antes de decidir cuál es la mejor estrategia, vía nAChR, para tratar la EA.

APÉNDICE I- MATERIAL BIOLÓGICO: XENOPUS

1- INTRODUCCIÓN

El sapo africano *Xenopus laevis* es miembro de la familia Pipidae y de la Subfamilia Xenopidae. Estos sapos con garras se caracterizan por su capacidad de iniciar ciclos sexuales en cualquier época del año, presentando una ovulación asincrónica de los ovocitos, por lo que en los ovarios de un mismo individuo podemos encontrar ovocitos en diferentes estadios embrionarios.

Dentro de esta subfamilia, encontramos 6 especies, pero la única que se utiliza en el laboratorio es la especie *Xenopus laevis*. Estos anfibios se caracterizan por la presencia de tres dedos con uñas en las patas traseras. Existen 4 subespecies de *Xenopus laevis*, como son *Xenopus laevis laevis*, *petersi*, *victorianus* y *borealis*. Estas subespecies se caracterizan por ser sapos acuáticos, no necesitando ninguna base en la que apoyarse. Además, son muy sensibles a la desecación, y pueden morir fácilmente por la falta de agua.

Los *Xenopus* se han utilizado a lo largo de la historia para realizar pruebas de embarazo en la denominada “prueba de la rana” (Bellerby 1934; Shapiro y Zwarenstein 1934), ya que si en la orina de la paciente aparecían cantidades suficientes de la hormona gonadotropina (la hormona que aumenta drásticamente en los tres primeros meses de la gestación), ésta hormona era capaz de provocar en el sapo una puesta ovulatoria, lo que era indicativo de un posible embarazo. Sin embargo esta estimación ha quedado en desuso por la aparición de otras técnicas más sensibles y rápidas. Actualmente los *Xenopus* se han convertido en un popular sistema de expresión heteróloga de proteínas así como para el estudio de teratotoxicidad.

La primera observación de que un ARN exógeno inyectado en ovocitos podía traducirse a proteína fue realizada a principios de los años 70 por (Gurdon, Lane et al. 1971); a partir de entonces, este sistema fue pionero en la expresión de receptores y canales iónicos (Gundersen, Miledi et al. 1983; Miledi, Parker et al. 1983) con tal éxito,

que en la actualidad es un método indispensable en muchos laboratorios para la expresión y estudio de receptores, canales y transportadores de membrana.

2- MANTENIMIENTO DE LOS SAPOS

Los sapos son extremadamente sensibles a la temperatura aún cuando puedan llegar a soportar un amplio rango. Es por ello, por lo que debe extremarse la precaución en el mantenimiento de los mismos. Estos estarán estabulados en tanques con una circulación de agua sin cloro constante, a una temperatura ideal entre 15-20 °C. Cada tanque contiene como máximo 10 sapos. Debido a que estos animales son sensibles al cloro y los derivados presentes en el agua potable, es necesario eliminar estos derivados clorados. Será suficiente con exponer ésta al aire 48 horas antes de que se ponga en contacto con el sapo.

Además tendrán un periodo de luz de 12 horas al día, en habitaciones climatizadas a una temperatura afín a la del agua. Con ello conseguiremos que no se afecten por los cambios típicos de las diferentes estaciones climáticas, en beneficio de una buena calidad de los ovocitos.

3- ALIMENTACIÓN

Los sapos se alimentan una vez al día. Aunque son animales carnívoros, en la actualidad se alimentan con piensos compuestos, que les proporcionan los nutrientes necesarios para su mantenimiento. Además se les añade un complejo multivitamínico (Protovit®) para evitar carencias. Estos alimentos se añaden al agua una vez al día, y no es necesario cambiar el agua una vez que se han alimentado.

4- IDENTIFICACIÓN Y MARCAJE DE LOS SAPOS

Una vez que un sapo se ha operado, es necesario un periodo de recuperación y cicatrización de la sutura de, al menos, 3 meses. Con ello conseguimos una buena calidad de los ovocitos, ya que se ha descrito que la calidad de los huevos disminuye considerablemente cuando el animal es operado sin suficientes periodos de recuperación. Para identificar qué sapo ha sido o no operado, y cuándo fue operado, es necesario hacer una identificación de los mismos. Para una buena identificación es conveniente marcarlos. Para ello se pueden usar diferentes métodos, siendo el mejor de ellos el tatuaje. El método consiste en numerar los animales en la espalda con diferentes soluciones. Una de las más utilizadas es la solución del ácido clorídrico a altas concentraciones. También se pueden usar soluciones que contengan un 0,5 % de negro de amida diluido en ácido acético al 7%. En nuestro caso, hemos utilizado nitrógeno líquido para numerar los sapos. El marcaje consiste en anestesiarse los sapos de la manera habitual, y situar sobre su espalda durante 1-2 minutos un número simbolizado en acero que previamente hemos mantenido en nitrógeno líquido. De esta manera, el número queda marcado por quemadura en la piel. El proceso no es doloroso y los animales se recuperan perfectamente. De esta forma los sapos quedan controlados en cuanto a su identificación.

5- LOS OVOCITOS

El ovario de un sapo contiene las células germinales femeninas. Este ovario está constituido por lobulillos o sacos ováricos unidos entre sí por tejido conectivo. Las células germinales entran en meiosis cuando el sapo está en el estadio larvario tardío, pero la meiosis queda interrumpida en la primera profase y es cuando a las células germinales femeninas se les puede denominar ovocitos u ovocitos inmaduros.

Cuando el sapo se hace sexualmente adulto, los ovocitos comienzan a crecer y pasan a diferenciarse por diferentes estadios, de manera asincrónica, de ahí que en el ovario de un *Xenopus* podamos encontrar ovocitos en diferentes estadios de desarrollo.

5.1- Estadios embrionarios del ovocito

El tamaño de los ovocitos aumenta con su desarrollo y maduración. Estos estadios embrionarios pueden ser distinguidos macroscópicamente por la presencia de características morfológicas que los diferencian, que nos van a permitir distinguir entre un estadio u otro a simple vista. Así, podemos clasificar los ovocitos de los estadios I al VI, con las siguientes características:

- **Estadio embrionario I:** Se caracteriza porque a la lupa tienen un aspecto transparente, un núcleo visible y no somos capaces de diferenciar los polos animal o vegetal característicos de estas células germinales. Otra de las características propias de este estadio es la ausencia de una de las membranas que envuelve al ovocito, la membrana vitelina. En el resto de los estadios, esta membrana está presente.
- **Estadio embrionario II:** Su aspecto es parecido al estadio previo, si bien su núcleo deja de ser visible bajo la lupa.
- **Estadio embrionario III:** Continúa sin diferenciarse bien el polo animal del vegetal, si bien comienzan a aparecer gránulos pigmentados en la superficie del ovocito.
- **Estadio embrionario IV:** Presenta un polo animal y vegetal bien diferenciados, y es patente la presencia de pigmentación en el polo animal.
- **Estadio embrionario V:** El polo animal y vegetal están bien definidos aunque no existe una banda marginal o ecuador que los divida.
- **Estadio embrionario VI:** En este estadio aparece un ecuador muy bien marcado que divide a ambos polos.

Aunque en principio cualquier estadio del ovocito podría ser utilizado en la expresión de receptores y su posterior estudio, la elección del estado embrionario de los ovocitos condiciona la metodología a emplear. Los ovocitos más pequeños permiten una mejor fijación del voltaje y carecen (o son muy escasos) de canales endógenos que puedan alterar el estudio. Sin embargo, presentan el inconveniente de

que su tamaño es muy pequeño lo que dificulta su manejo, y dificulta la inyección citoplasmática del mensajero, aumentando la mortalidad de los mismos. Debido a su pequeño tamaño, se hace necesario el uso de capilares sumamente pequeños, con lo que la probabilidad de obstrucción del capilar durante la inyección es alta, lo que hace que todo el proceso sea más engorroso. Por todo ello los estadios que se vienen utilizando para la expresión de receptores en su membrana son los estadios IV, V y VI (Dumont 1972), esencialmente por su mayor tamaño.

5.2- Histología de un ovocito

En los estados embrionarios IV-VI, los ovocitos tienen un tamaño de 1,2 a 1,5 mm y su superficie se encuentra recubierta por un gran número de membranas y microvellosidades. Se caracteriza por tener dos mitades o hemisferios bien diferenciados, separados entre si por una banda central de tonalidad más clara denominada ecuador. Esta banda separa el polo vegetal, de tonalidad más clara, del polo animal, de un color más parduzco.

5.2.1 Hemisferio o polo vegetal

Es de color amarillento, y se caracteriza por no presentar (o ser muy escasa) la presencia de vesículas con vitelo, para el mantenimiento del ovocito una vez fecundado. Además, presenta más cantidad de ARN mensajero con respecto al polo animal, lo que le confiere una polaridad funcional, que se traduce en una distribución espacial irregular de los canales y receptores de membrana nativos.

5.2.2- Hemisferio o polo animal

Presenta un color marrón oscuro debido a la presencia debajo de su membrana de gran contenido de vesículas que contienen melanina (melanosomas). Este hemisferio contiene el núcleo y la vesícula germinal. Es el sitio por donde se produce la fecundación del huevo, cuando éste está maduro. Esto es debido, en parte, a la

gran movilidad de los lípidos de esta zona de la membrana, lo que facilita la penetración del espermatozoide.

5.2.3- Membranas externas del ovocito

El ovocito no es una estructura aislada indefensa, sino que, por el contrario, tanto cuando forma parte del folículo ovárico, como cuando está aislado, presenta una serie de envolturas con una función mecánica de protección. Aún con la presencia de estas membranas, el ovocito se encuentra en estrecho contacto con el medio que lo rodea. Así, tal y como se muestra en la figura A, podemos diferenciar las siguientes membranas, ordenadas del interior al exterior:

- **Membrana vitelina:** Es una capa acelular fibrosa que recubre todo el huevo y está íntimamente unida a la membrana plasmática del ovocito.
- **Capa folicular:** Esta membrana está formada por células con núcleo y gran número de nucleolos. Está en contacto con el resto de las membranas del ovocito, y en concreto con la membrana plasmática, a través de uniones intracelulares, lo que permite el paso de moléculas de hasta 1 kDa, y la conexión eléctrica del ovocito. Estas uniones se controlan hormonalmente, incrementando su número y permeabilidad de las mismas cuando la célula entra en meiosis, con un estímulo con hormona luteinizante o gonadotropina coriónica (Browne, Wiley et al. 1979; Browne and Werner 1984). Estas células foliculares presentan gran número de receptores y canales en su membrana, por lo que las uniones intracelulares permiten el paso de la información y de los segundos mensajeros evocados por la activación de estos receptores foliculares hacia el interior del ovocito.
- **Teca:** Es una capa formada por colágeno, fibroblastos, células musculares lisas, vasos sanguíneos y fibras nerviosas.

- **Capa epitelial o tejido ovárico interno:** Esta capa, continuación del epitelio ovárico que constituye el lóbulo ovárico, se sitúa en contacto con el medio extracelular, envolviendo todas las capas anteriores (Dumont, 1972).

La existencia de estas capas que protegen al ovocito, supone un problema para el estudio de canales o receptores expresados heterológicamente, ya que dificulta la aplicación de las técnicas de registro electrofisiológico, además de contaminar los resultados debido a la presencia de sus receptores o canales en la membrana. Por ello se utilizan diferentes estrategias a fin de eliminar o desacoplar estas envolturas, como pueden ser métodos enzimáticos (tratamiento de los ovocitos con colagenasa), mecánicos u osmóticos. De esta manera conseguimos aislar al ovocito del resto de membranas envolventes, pudiendo llevar a cabo el estudio electrofisiológico deseado con fiabilidad.

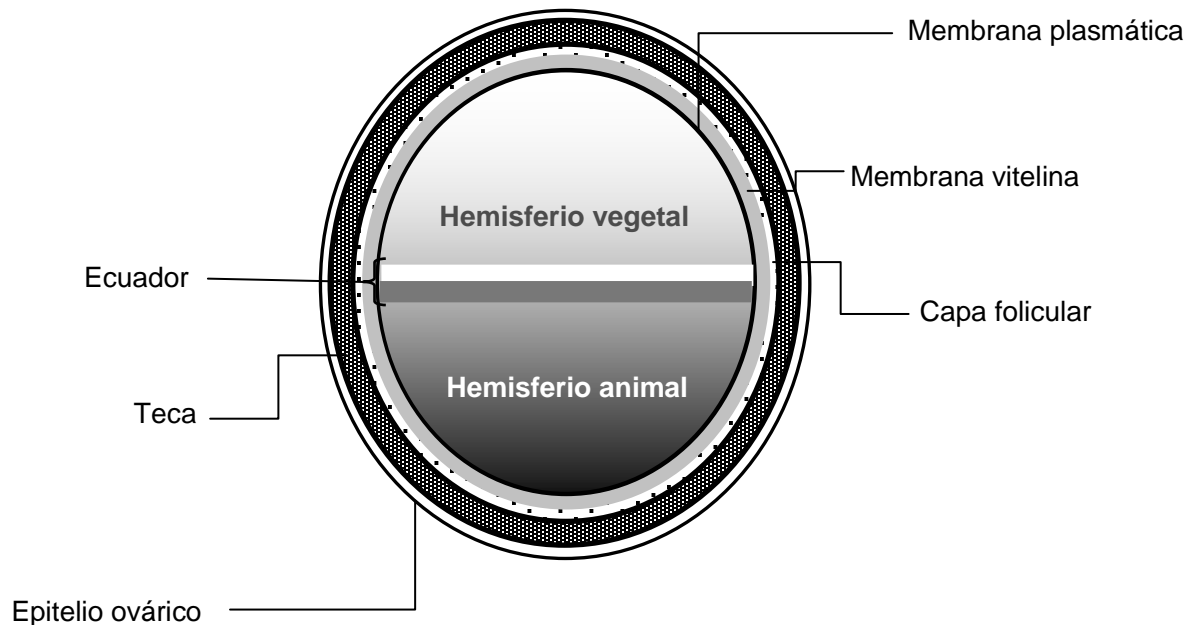


Figura A. **Morfología de un ovocito.** Un ovocito presenta una estructura esférica con dos polos bien definidos, animal (color parduzco) y vegetal (color blanco amarillento), separados por una banda central o ecuador.

6- VENTAJAS DEL OVOCITO COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA

Dentro de las características más relevantes del ovocito como sistema de expresión de proteínas es la posibilidad de obtener cientos de estas células de cada donador, sin necesidad de sacrificar al sapo en cada operación. Por lo tanto, un mismo donante puede ser utilizado varias veces. Como ya se ha mencionado anteriormente, la recuperación del animal no requiere de grandes cuidados, y la calidad de los ovocitos será constante siempre que se mantenga el periodo mínimo de recuperación.

El cultivo de estas células es sencillo, sin grandes requerimientos nutricionales en el medio. Basta con revisarlos diariamente, y transferir los ovocitos sanos a un medio de cultivo fresco. Además, una vez en cultivo, su mantenimiento es sencillo, por lo que facilita la expresión y posterior estudio de proteínas que requieran largos periodos para su expresión en la membrana.

El hecho de que sean células de gran tamaño (1,2-1,5 mm de diámetro) facilita la inyección de la información genética (ADN o ARN), que va a ser transcrita, traducido a proteína y posteriormente ensamblado para formar receptores funcionales expresados en su membrana. Se puede realizar coexpresión de diferentes subunidades, lo que facilita el estudio de receptores heteroméricos (□□□□□□□□□□). Asimismo, el gran tamaño celular permite introducir varios electrodos a través de su membrana, lo que facilita el estudio electrofisiológico de doble electrodo.

La presencia de pocos canales endógenos elimina artefactos y simplifica el posterior análisis de los resultados obtenidos. Sin embargo, sí que hay que considerar el canal de cloruro activado por calcio como el canal endógeno más importante del ovocito, ya que la activación de este canal, cuando se trabaja en un medio que contiene el ión calcio, podría distorsionar los resultados. Aún así, es un canal muy útil cuando lo que se pretende es amplificar la respuesta de un canal o receptor cuya señal sería difícil de medir.

7- DESVENTAJAS DEL OVOCITO COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA

Debido al gran tamaño del ovocito, las medidas electrofisiológicas con la configuración “célula completa” de la técnica de “patch-clamp” no son viables, ya que resulta imposible mantener fijo el potencial de membrana de una superficie tan grande con un solo electrodo. Este problema se soluciona mediante el registro de corrientes por fijación de voltaje de doble electrodo.

Esta técnica permite la medida de corrientes totales obteniendo magnitudes de medida del orden de microamperios; sin embargo no permite la diálisis del interior celular, con los consiguientes impedimentos a la hora de aplicar protocolos.

Los canales endógenos pueden interferir si se quieren realizar medidas pequeñas y precisas, por lo que habrá que modificar los protocolos a aplicar.

Otra desventaja a tener en cuenta al utilizar ovocitos como sistema de expresión es su estabilidad a un rango de temperatura bajo y estrecho; así, en algunos laboratorios donde los animales carecen de habitáculos climatizados, la obtención de ovocitos de buena calidad y de manera repetitiva se hace difícil. Esto es debido a que los sapos son susceptibles a los cambios climáticos dependiendo de la época del año (generalmente los cambios de estación invierno-primavera y verano-otoño son muy acusados en estos sistemas biológicos). Además, esta estricta tolerancia a las variaciones de temperatura hace que los registros electrofisiológicos se realicen a una temperatura ambiente entre 18-20 °C; temperaturas superiores a las indicadas conllevan a un deterioro rápido del ovocito. Muchas veces las proteínas a estudiar son de mamíferos, y requieren para su procesamiento, o su correcto funcionamiento de temperaturas superiores semejantes a las de estos organismos, por lo que el uso de este sistema de expresión heteróloga no sería el más indicado para realizar este estudio.

8- CORRIENTES ENDÓGENAS DEL OVOCITO

Aunque las corrientes endógenas detectadas en los ovocitos carecen de relevancia, sí que hay que tener en cuenta las condiciones en las que se trabaja, ya que la activación o la contribución de estas corrientes podrían estar distorsionando los resultados obtenidos. Muchas veces, estas corrientes

pueden ser silenciadas trabajando en condiciones no favorables para su activación o bloqueadas con diferentes antagonistas o bloqueantes. Brevemente, se describen a continuación estos canales o receptores nativos.

8.1- Canales de cloruro activados por calcio

Es la corriente más importante del ovocito. Su potencial de reversión en una solución de 1,8 mM de Ca^{2+} es de -25 mV (Barish, 1983). Estudios realizados por (Takahashi, Neher et al. 1987) mediante análisis de ruido en parches con la configuración “dentro-fuera” muestran que su conductancia es de 3 pS. Un incremento del Ca^{2+} citosólico incrementa la probabilidad de apertura del canal (P_o). La entrada de Ca^{2+} activa las corrientes de cloruro, desplazando el potencial de inversión hacia potenciales más negativos (Miledi et al., 1983; Barish, 1983). Existen diferentes estrategias para intentar eliminar esta contaminación. Una de ellas es la sustitución del ión Ca^{2+} por otro ión de carga que permee a través del receptor en estudio (Ba^{2+} , Sr^{2+}) sin que active esta corriente. Esto es útil siempre que el protocolo lo permita. Sin embargo, es frecuente que esta opción no pueda utilizarse, cuando se realizan estudios de modulación por iones calcio o de permeabilidades relativas a estos cationes. Una alternativa es la inyección citoplasmática de una solución con quelantes de cationes Ca^{2+} como puede ser el BAPTA o el EGTA (Miledi and Parker 1984); Vulfius et al., 1998). La inyección se realiza de la misma manera que la inyección del ARN mensajero. El secuestro del Ca^{2+} por el BAPTA no altera la desensibilización de los receptores nicotínicos de células cromafines de rata (Khiroug, Giniatullin et al. 1997), pero puede influir aumentando la velocidad de recuperación tras la desensibilización. Otra manera de eliminar esta corriente es mediante su bloqueo con soluciones extracelulares que contengan ácido niflúmico o ácido flufenámico (White and Aylwin 1990). Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos bloqueantes del canal de Cl^- no estén afectando a

los receptores que hayamos expresado en la membrana del ovocito. En este sentido, (Lerma and Martin del Rio 1992) demostraron que el ácido niflúmico bloquea de manera dependiente de la dosis y específicamente los receptores de glutamato del subtipo NMDA, actuando como antagonistas no competitivos. Otra de las alternativas más utilizadas para la eliminación de las corrientes de Cl^- , sobre todo en el estudio de permeabilidad a Ca^{2+} del receptor nicotínico, es la incubación de los ovocitos en un medio carente de iones cloruro (Francis and Papke 1996; Papke, Bencherif et al. 1996) el uso de sales del ácido metanosulfónico (AMSA). Con este procedimiento, los registros que se realizan se contaminan con la salida de iones cloro, por lo que los resultados son más fiables.

8.2- Canales de calcio activados por voltaje

Son corrientes muy pequeñas, del orden de 1 nA del total de la corriente detectada en el ovocito. Sin embargo se amplifica por la activación de la corriente de cloruro del ovocito (Lory, Rassendren et al. 1990).

8.3- Canales activados por tensión

Son canales que se ponen de manifiesto como consecuencia de la aplicación de presión positiva o negativa a la membrana del ovocito (McBride and Hamill 1992). Son importantes cuando se realizan medidas de corrientes microscópicas, ya que para la realización de un sello en la membrana del ovocito se requiere aplicar presión negativa. Su presencia en los registros de canal aislado depende de la configuración utilizada. Su expresión varía enormemente de un ovocito a otro, dándose el caso de no aparecer, hasta que exista un alto grado de expresión de estos receptores. Son canales no

selectivos, de una conductancia en el medio NFR¹ de 28 pS (Methfessel, Witzemann et al. 1986). La solución es el uso de parches con ausencia de estos canales, lo que puede llegar a ser una labor tediosa, si no imposible, dependiendo del ovocito.

8.4- Canales de sodio

Se trata de una corriente muy poco frecuente en el ovocito, manifestándose lentamente tras despolarizaciones prolongadas de un potencial superior a +20 mV. Sin embargo se desactiva rápidamente por hiperpolarización. Es una corriente sensible a tetrodotoxina.

¹ NFR: (mM): 115 NaCl, 2,5 KCl; 1,8 CaCl₂; 10 HEPES pH 7,2

5 REFERENCIAS

- Adams, D. J., T. M. Dwyer, et al. (1980). "The permeability of endplate channels to monovalent and divalent metal cations." J Gen Physiol **75**(5): 493-510.
- Albuquerque, E. X., E. F. Pereira, et al. (2009). "Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function." Physiol Rev **89**(1): 73-120.
- Arendt, T., V. Bigl, et al. (1983). "Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease." Acta Neuropathol **61**(2): 101-108.
- Arendt, T., V. Bigl, et al. (1984). "Correlation between cortical plaque count and neuronal loss in the nucleus basalis in Alzheimer's disease." Neurosci Lett **48**(1): 81-85.
- Arendt, T., V. Bigl, et al. (1985). "Neuronal loss in different parts of the nucleus basalis is related to neuritic plaque formation in cortical target areas in Alzheimer's disease." Neuroscience **14**(1): 1-14.
- Arias, H. R., V. E. Richards, et al. (2009). "Role of non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors in angiogenesis." Int J Biochem Cell Biol **41**(7): 1441-1451.
- Bartus, R. T., R. L. Dean, 3rd, et al. (1982). "The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction." Science **217**(4558): 408-414.
- Baruch-Suchodolsky, R. and B. Fischer (2009). "Abeta40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems." Biochemistry **48**(20): 4354-4370.
- Bogoyevitch, M. A., I. Boehm, et al. (2004). "Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential." Biochim Biophys Acta **1697**(1-2): 89-101.
- Bohler, S., S. Gay, et al. (2001). "Desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors conferred by N-terminal segments of the beta 2 subunit." Biochemistry **40**(7): 2066-2074.
- Boorman, J. P., M. Beato, et al. (2003). "The effects of beta3 subunit incorporation on the pharmacology and single channel properties of oocyte-expressed human alpha3beta4 neuronal nicotinic receptors." J Biol Chem **278**(45): 44033-44040.
- Bormann, J. and D. E. Clapham (1985). "gamma-Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch-clamp study." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(7): 2168-2172.
- Boulter, J., K. Evans, et al. (1986). "Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit." Nature **319**(6052): 368-374.

- Boulter, J., A. O'Shea-Greenfield, et al. (1990). "Alpha 3, alpha 5, and beta 4: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gene cluster." J Biol Chem **265**(8): 4472-4482.
- Brejč, K., W. J. van Dijk, et al. (2001). "Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors." Nature **411**(6835): 269-276.
- Browne, C. L. and W. Werner (1984). "Intercellular junctions between the follicle cells and oocytes of *Xenopus laevis*." J Exp Zool **230**(1): 105-113.
- Browne, C. L., H. S. Wiley, et al. (1979). "Oocyte-follicle cell gap junctions in *Xenopus laevis* and the effects of gonadotropin on their permeability." Science **203**(4376): 182-183.
- Cachelin, A. B. and R. Jaggi (1991). "Beta subunits determine the time course of desensitization in rat alpha 3 neuronal nicotinic acetylcholine receptors." Pflugers Arch **419**(6): 579-582.
- Castro, E., M. J. Oset-Gasque, et al. (1989). "GABAA and GABAB receptors are functionally active in the regulation of catecholamine secretion by bovine chromaffin cells." J Neurosci Res **23**(3): 290-296.
- Cleary, J. P., D. M. Walsh, et al. (2005). "Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function." Nat Neurosci **8**(1): 79-84.
- Cole, K. S. (1949). "Some physical aspects of bioelectric phenomena." Proc Natl Acad Sci U S A **35**(10): 558-566.
- Corringer, P. J., N. Le Novere, et al. (2000). "Nicotinic receptors at the amino acid level." Annu Rev Pharmacol Toxicol **40**: 431-458.
- Changeux, J. and S. J. Edelman (2001). "Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 369-377.
- Dani, J. A. (2001). "Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system." Biol Psychiatry **49**(3): 166-174.
- Davies, P. and A. J. Maloney (1976). "Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease." Lancet **2**(8000): 1403.
- De Felice, F. G., P. T. Velasco, et al. (2007). "Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine." J Biol Chem **282**(15): 11590-11601.
- De Felice, F. G., M. N. Vieira, et al. (2009). "Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(6): 1971-1976.



Instituto
Teófilo Hernando
para la I+D del Medicamento



- De Felice, F. G., D. Wu, et al. (2008). "Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers." Neurobiol Aging **29**(9): 1334-1347.
- De Fusco, M., A. Becchetti, et al. (2000). "The nicotinic receptor beta 2 subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy." Nat. Genet. **26**(3): 275-276.
- Dineley, K. T. (2007). "Beta-amyloid peptide--nicotinic acetylcholine receptor interaction: the two faces of health and disease." Front Biosci **12**: 5030-5038.
- Dineley, K. T., K. A. Bell, et al. (2002). "beta -Amyloid peptide activates alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes." J Biol Chem **277**(28): 25056-25061.
- Dineley, K. T., M. Westerman, et al. (2001). "Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease." J Neurosci **21**(12): 4125-4133.
- Dineley, K. T., X. Xia, et al. (2002). "Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and up-regulation of alpha 7 nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins." J Biol Chem **277**(25): 22768-22780.
- Dougherty, D. A. and H. A. Lester (2001). "Neurobiology. Snails, synapses and smokers." Nature **411**(6835): 252-253, 255.
- Drachman, D. A. (1977). "Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role?" Neurology **27**(8): 783-790.
- Dumont, J. N. (1972). "Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals." J Morphol **136**(2): 153-179.
- Duvoisin, R. M., E. S. Deneris, et al. (1989). "The functional diversity of the neuronal nicotinic acetylcholine receptors is increased by a novel subunit: beta 4." Neuron **3**(4): 487-496.
- Egleton, R. D., K. C. Brown, et al. (2009). "Angiogenic activity of nicotinic acetylcholine receptors: implications in tobacco-related vascular diseases." Pharmacol Ther **121**(2): 205-223.
- Fabian-Fine, R., P. Skehel, et al. (2001). "Ultrastructural distribution of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus." J Neurosci **21**(20): 7993-8003.
- Foster, D. J., C. K. Jones, et al. (2012). "Emerging approaches for treatment of schizophrenia: modulation of cholinergic signaling." Discov Med **14**(79): 413-420.
- Francis, M. M. and R. L. Papke (1996). "Muscle-type nicotinic acetylcholine receptor delta subunit determines sensitivity to noncompetitive inhibitors, while gamma subunit regulates divalent permeability." Neuropharmacology **35**(11): 1547-1556.

- Francis, P. T. and E. K. Perry (2007). "Cholinergic and other neurotransmitter mechanisms in Parkinson's disease, Parkinson's disease dementia, and dementia with Lewy bodies." Mov Disord **22 Suppl 17**: S351-357.
- Fraser, S. P., Y. H. Suh, et al. (1996). "Membrane currents induced in *Xenopus* oocytes by the C-terminal fragment of the beta-amyloid precursor protein." J Neurochem **66**(5): 2034-2040.
- Freedman, S. B., E. A. Harley, et al. (1988). "Relative affinities of drugs acting at cholinceptors in displacing agonist and antagonist radioligands: the NMS/Oxo-M ratio as an index of efficacy at cortical muscarinic receptors." Br J Pharmacol **93**(2): 437-445.
- Fucile, S. (2004). "Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors." Cell Calcium **35**(1): 1-8.
- Fujii, T., Y. Takada-Takatori, et al. (2008). "Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy." J Pharmacol Sci **106**(2): 186-192.
- Gahring, L. C. and S. W. Rogers (2005). "Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells." Aaps J. **7**(4): E885-894.
- Gandía, L. (2006). El receptor nicotínico. La huella nicotínica de la demencia. A. G. Garcia. Madrid, Fundación Teófilo Hernando: 13-28.
- Gerzanich, V., F. Wang, et al. (1998). "alpha 5 Subunit alters desensitization, pharmacology, Ca⁺⁺ permeability and Ca⁺⁺ modulation of human neuronal alpha 3 nicotinic receptors." J Pharmacol Exp Ther **286**(1): 311-320.
- Glabe, C. G. and R. Kaye (2006). "Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis." Neurology **66**(2 Suppl 1): S74-78.
- Goldgaber, D., M. I. Lerman, et al. (1987). "Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease." Science **235**(4791): 877-880.
- Gotti, C. and F. Clementi (2004). "Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology." Prog Neurobiol **74**(6): 363-396.
- Gotti, C., F. Clementi, et al. (2009). "Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors." Biochem Pharmacol **78**(7): 703-711.
- Gotti, C., M. Zoli, et al. (2006). "Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance." Trends Pharmacol Sci **27**(9): 482-491.
- Gralle, M. and S. T. Ferreira (2007). "Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts." Prog Neurobiol **82**(1): 11-32.

- Grassi, F., E. Palma, et al. (2003). "Amyloid beta(1-42) peptide alters the gating of human and mouse alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors." J Physiol **547**(Pt 1): 147-157.
- Greenlee, W., J. Clader, et al. (2001). "Muscarinic agonists and antagonists in the treatment of Alzheimer's disease." Farmacologia **56**(4): 247-250.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, et al. (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(13): 4913-4917.
- Gundersen, C. B., R. Miledi, et al. (1983). "Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus* oocytes." Proc R Soc Lond B Biol Sci **219**(1214): 103-109.
- Gurdon, J. B., C. D. Lane, et al. (1971). "Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells." Nature **233**(5316): 177-182.
- Gutala, R., J. Wang, et al. (2006). "Nicotine modulates expression of amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 in mouse brain and in SH-SY5Y neuroblastoma cells." Brain Res **1093**(1): 12-19.
- Gwilt, C. R., L. E. Donnelly, et al. (2007). "The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation?" Pharmacol Ther **115**(2): 208-222.
- Haass, C. and D. J. Selkoe (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 101-112.
- Hardy, J., M. C. Chartier-Harlin, et al. (1992). "Alzheimer disease: the new agenda." Am J Hum Genet **50**(3): 648-651.
- Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**(5580): 353-356.
- Harvey, S. C. and C. W. Luetje (1996). "Determinants of competitive antagonist sensitivity on neuronal nicotinic receptor beta subunits." J Neurosci **16**(12): 3798-3806.
- Hebert, L. E., J. Weuve, et al. (2013). "Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census." Neurology.
- Hernandez, C. M. and K. T. Dineley (2012). "alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease: neuroprotective, neurotrophic or both?" Curr Drug Targets **13**(5): 613-622.
- Hodgkin, A. L., A. F. Huxley, et al. (1952). "Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*." J Physiol **116**(4): 424-448.
- Hurst, R., H. Rollema, et al. (2013). "Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics." Pharmacol Ther **137**(1): 22-54.



Instituto
Teófilo Hernando
para la I+D del Medicamento



- Igbavboa, U., G. Y. Sun, et al. (2009). "Amyloid beta-protein stimulates trafficking of cholesterol and caveolin-1 from the plasma membrane to the Golgi complex in mouse primary astrocytes." Neuroscience **162**(2): 328-338.
- Imoto, K., C. Busch, et al. (1988). "Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance." Nature **335**(6191): 645-648.
- Imoto, K., C. Methfessel, et al. (1986). "Location of a delta-subunit region determining ion transport through the acetylcholine receptor channel." Nature **324**(6098): 670-674.
- Iqbal, K. and I. Grundke-Iqbal (2008). "Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention." J Cell Mol Med **12**(1): 38-55.
- Jagger, D. J., C. B. Griesinger, et al. (2000). "Calcium signalling mediated by the 9 acetylcholine receptor in a cochlear cell line from the immortomouse." J Physiol **527 Pt 1**: 49-54.
- Jones, S., S. Sudweeks, et al. (1999). "Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function." Trends Neurosci **22**(12): 555-561.
- Jonnala, R. R. and J. J. Buccafusco (2001). "Relationship between the increased cell surface alpha7 nicotinic receptor expression and neuroprotection induced by several nicotinic receptor agonists." J Neurosci Res **66**(4): 565-572.
- Jurgensen, S. and S. T. Ferreira (2010). "Nicotinic receptors, amyloid-beta, and synaptic failure in Alzheimer's disease." J Mol Neurosci **40**(1-2): 221-229.
- Kaneko, S., T. Maeda, et al. (1997). "Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via alpha7-neuronal receptors and neuronal CNS receptors." Brain Res **765**(1): 135-140.
- Karlin, A. (2002). "Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors." Nat Rev Neurosci **3**(2): 102-114.
- Karlin, A. and M. H. Akabas (1995). "Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins." Neuron **15**(6): 1231-1244.
- Katz, E., M. Verbitsky, et al. (2000). "High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor." Hear Res **141**(1-2): 117-128.
- Kawamata, J. and S. Shimohama (2011). "Stimulating nicotinic receptors trigger multiple pathways attenuating cytotoxicity in models of Alzheimer's and Parkinson's diseases." J Alzheimers Dis **24 Suppl 2**: 95-109.
- Kawamata, J., S. Suzuki, et al. (2011). "Enhancement of nicotinic receptors alleviates cytotoxicity in neurological disease models." Ther Adv Chronic Dis **2**(3): 197-208.
- Kawashima, K. and T. Fujii (2008). "Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance." J Pharmacol Sci **106**(2): 167-173.

- Kayed, R., E. Head, et al. (2003). "Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis." Science **300**(5618): 486-489.
- Kellar, K. J., P. J. Whitehouse, et al. (1987). "Muscarinic and nicotinic cholinergic binding sites in Alzheimer's disease cerebral cortex." Brain Res **436**(1): 62-68.
- Khiroug, L., R. Giniatullin, et al. (1997). "Imaging of intracellular calcium during desensitization of nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells." Br J Pharmacol **122**(7): 1323-1332.
- Kihara, T., S. Shimohama, et al. (2001). "alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity." J Biol Chem **276**(17): 13541-13546.
- Kihara, T., S. Shimohama, et al. (1997). "Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity." Ann Neurol **42**(2): 159-163.
- Kim, S. H., Y. K. Kim, et al. (1997). "Enhanced release of secreted form of Alzheimer's amyloid precursor protein from PC12 cells by nicotine." Mol Pharmacol **52**(3): 430-436.
- Kistler, J., R. M. Stroud, et al. (1982). "Structure and function of an acetylcholine receptor." Biophys J **37**(1): 371-383.
- Klein, W. L. (2006). "Synaptic targeting by A beta oligomers (ADDLS) as a basis for memory loss in early Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **2**(1): 43-55.
- Krall, W. J., J. J. Sramek, et al. (1999). "Cholinesterase inhibitors: a therapeutic strategy for Alzheimer disease." Ann Pharmacother **33**(4): 441-450.
- Krause, R. M., B. Buisson, et al. (1998). "Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor." Mol Pharmacol **53**(2): 283-294.
- Kuhar, M. J., V. H. Sethy, et al. (1973). "Choline: selective accumulation by central cholinergic neurons." J Neurochem **20**(2): 581-593.
- Kuryatov, A., J. Onksen, et al. (2008). "Roles of accessory subunits in alpha4beta2(*) nicotinic receptors." Mol Pharmacol **74**(1): 132-143.
- Lacor, P. N., M. C. Buniel, et al. (2007). "Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease." J Neurosci **27**(4): 796-807.
- Lain, E., B. Penke, et al. (2005). "Effects of Abeta1-42 fibrils and of the tetrapeptide Pr-IIIGL on the phosphorylation state of the tau-protein and on the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in vitro." Eur J Neurosci **21**(4): 879-888.
- Lamb, P. W., M. A. Melton, et al. (2005). "Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes by beta-amyloid1-42 peptide." J Mol Neurosci **27**(1): 13-21.

- Lambert, M. P., A. K. Barlow, et al. (1998). "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6448-6453.
- Lerma, J. and R. Martin del Rio (1992). "Chloride transport blockers prevent N-methyl-D-aspartate receptor-channel complex activation." Mol Pharmacol **41**(2): 217-222.
- Lewis, C. A. (1979). "Ion-concentration dependence of the reversal potential and the single channel conductance of ion channels at the frog neuromuscular junction." J Physiol **286**: 417-445.
- Lindstrom, J., R. Anand, et al. (1995). "Neuronal nicotinic receptor subtypes." Ann N Y Acad Sci **757**: 100-116.
- Liu, Q., H. Kawai, et al. (2001). "beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4734-4739.
- Liu, Q., J. Zhang, et al. (2007). "Dissecting the signaling pathway of nicotine-mediated neuroprotection in a mouse Alzheimer disease model." FASEB J **21**(1): 61-73.
- Liu, Y., J. Hu, et al. (2012). "alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against dopaminergic neuron loss in an MPTP mouse model via inhibition of astrocyte activation." J Neuroinflammation **9**: 98.
- Lory, P., F. A. Rassendren, et al. (1990). "Characterization of voltage-dependent calcium channels expressed in Xenopus oocytes injected with mRNA from rat heart." J Physiol **429**: 95-112.
- Luetje, C. W. and J. Patrick (1991). "Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors." J Neurosci **11**(3): 837-845.
- Magdesian, M. H., A. A. Nery, et al. (2005). "Peptide blockers of the inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by amyloid beta." J Biol Chem **280**(35): 31085-31090.
- Marmont, G. (1949). "Studies on the axon membrane; a new method." J Cell Physiol **34**(3): 351-382.
- Marubio, L. M., A. M. Gardier, et al. (2003). "Effects of nicotine in the dopaminergic system of mice lacking the alpha4 subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors." Eur J Neurosci **17**(7): 1329-1337.
- Mattson, M. P., B. Cheng, et al. (1992). "beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity." J Neurosci **12**(2): 376-389.
- McBride, D. W., Jr. and O. P. Hamill (1992). "Pressure-clamp: a method for rapid step perturbation of mechanosensitive channels." Pflugers Arch **421**(6): 606-612.

- McGehee, D. S. and L. W. Role (1995). "Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons." *Annu Rev Physiol* **57**: 521-546.
- McKay, B. E., A. N. Placzek, et al. (2007). "Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors." *Biochem Pharmacol* **74**(8): 1120-1133.
- Methfessel, C., V. Witzemann, et al. (1986). "Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels." *Pflugers Arch* **407**(6): 577-588.
- Miledi, R. and I. Parker (1984). "Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes." *J Physiol* **357**: 173-183.
- Miledi, R., I. Parker, et al. (1983). "Recording of single gamma-aminobutyrate- and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in *Xenopus* oocytes." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **218**(1213): 481-484.
- Miranda-Ferreira, R., R. Pascual, et al. (2007). "Single-Vesicle Catecholamine Release Has Greater Quantal Content and Faster Kinetics in Chromaffin Cells from Hypertensive, as Compared to Normotensive Rats." *J Pharmacol Exp Ther*.
- Misiak, B., M. Cialkowska-Kuzminska, et al. (2013). "European studies on the prevalence of dementia in the elderly: time for a step towards a methodological consensus." *Int J Geriatr Psychiatry*.
- Miyazawa, A., Y. Fujiyoshi, et al. (1999). "Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall." *J Mol Biol* **288**(4): 765-786.
- Miyazawa, A., Y. Fujiyoshi, et al. (2003). "Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore." *Nature* **423**(6943): 949-955.
- Mousavi, M. and E. Hellstrom-Lindahl (2009). "Nicotinic receptor agonists and antagonists increase sAPP α secretion and decrease A β levels in vitro." *Neurochem Int* **54**(3-4): 237-244.
- Mousavi, M., E. Hellstrom-Lindahl, et al. (2003). "Protein and mRNA levels of nicotinic receptors in brain of tobacco using controls and patients with Alzheimer's disease." *Neuroscience* **122**(2): 515-520.
- Mulle, C., D. Choquet, et al. (1992). "Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation." *Neuron* **8**(1): 135-143.
- Munoz-Torrero, D. (2008). "Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease." *Curr Med Chem* **15**(24): 2433-2455.
- Nagele, R. G., M. R. D'Andrea, et al. (2002). "Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease." *Neuroscience* **110**(2): 199-211.

- Nagele, R. G., M. R. D'Andrea, et al. (2003). "Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains." Brain Res **971**(2): 197-209.
- Nagele, R. G., J. Wegiel, et al. (2004). "Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **25**(5): 663-674.
- Neher, E. and B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.
- Nie, H. Z., S. Shi, et al. (2010). "Activation of alpha7 nicotinic receptor affects APP processing by regulating secretase activity in SH-EP1-alpha7 nAChR-hAPP695 cells." Brain Res **1356**: 112-120.
- Noda, M., Y. Furutani, et al. (1983). "Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding alpha-subunit precursor of muscle acetylcholine receptor." Nature **305**(5937): 818-823.
- Noda, M., H. Takahashi, et al. (1982). "Primary structure of alpha-subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence." Nature **299**(5886): 793-797.
- Noda, M., H. Takahashi, et al. (1983). "Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences." Nature **301**(5897): 251-255.
- Nordberg, A. (1993). "Effect of long-term treatment with tacrine (THA) in Alzheimer's disease as visualized by PET." Acta Neurol Scand Suppl **149**: 62-65.
- Nordberg, A. and A. L. Svensson (1998). "Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology." Drug Saf **19**(6): 465-480.
- Oddo, S., A. Caccamo, et al. (2005). "Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 3046-3051.
- Ortells, M. O. and G. G. Lunt (1995). "Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors." Trends Neurosci **18**(3): 121-127.
- Papke, R. L., M. Bencherif, et al. (1996). "An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha 7 subtype." Neurosci Lett **213**(3): 201-204.
- Papke, R. L. and S. F. Heinemann (1991). "The role of the beta 4-subunit in determining the kinetic properties of rat neuronal nicotinic acetylcholine alpha 3-receptors." J Physiol **440**: 95-112.
- Parker, M. J., A. Beck, et al. (1998). "Neuronal nicotinic receptor beta2 and beta4 subunits confer large differences in agonist binding affinity." Mol Pharmacol **54**(6): 1132-1139.

- Parri, R. H. and T. K. Dineley (2010). "Nicotinic acetylcholine receptor interaction with beta-amyloid: molecular, cellular, and physiological consequences." Curr Alzheimer Res **7**(1): 27-39.
- Paterson, D. and A. Nordberg (2000). "Neuronal nicotinic receptors in the human brain." Prog Neurobiol **61**(1): 75-111.
- Perry, E., C. Martin-Ruiz, et al. (2000). "Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing, Alzheimer and Lewy body diseases." Eur J Pharmacol **393**(1-3): 215-222.
- Perry, E. K., R. H. Perry, et al. (1987). "Nicotinic receptor abnormalities in Alzheimer's and Parkinson's diseases." J Neurol Neurosurg Psychiatry **50**(6): 806-809.
- Perry, E. K., B. E. Tomlinson, et al. (1978). "Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia." Br Med J **2**(6150): 1457-1459.
- Petersen, R. C. (1977). "Scopolamine induced learning failures in man." Psychopharmacology (Berl) **52**(3): 283-289.
- Pettit, D. L., Z. Shao, et al. (2001). "beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice." J Neurosci **21**(1): RC120.
- Picciotto, M. R., M. Zoli, et al. (1998). "Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine." Nature **391**(6663): 173-177.
- Pike, C. J., D. Burdick, et al. (1993). "Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state." J Neurosci **13**(4): 1676-1687.
- Pike, C. J., A. J. Walencewicz-Wasserman, et al. (1995). "Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity." J Neurochem **64**(1): 253-265.
- Puzzo, D., L. Privitera, et al. (2008). "Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus." J Neurosci **28**(53): 14537-14545.
- Pym, L., M. Kemp, et al. (2005). "Subtype-specific actions of beta-amyloid peptides on recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors (alpha7, alpha4beta2, alpha3beta4) expressed in *Xenopus laevis* oocytes." Br J Pharmacol **146**(7): 964-971.
- Quik, M., S. Geertsens, et al. (1987). "Marked up-regulation of the beta-bungarotoxin site in adrenal chromaffin cells by specific nicotinic antagonists." Mol Pharmacol **31**(4): 385-391.
- Quirion, R., J. C. Martel, et al. (1986). "Neurotransmitter and receptor deficits in senile dementia of the Alzheimer type." Can J Neurol Sci **13**(4 Suppl): 503-510.

- Rafferty, M. A., R. L. Vandlen, et al. (1976). "Characterization of Torpedo californica acetylcholine receptor: its subunit composition and ligand-binding properties." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **40**: 193-202.
- Ramirez-Latorre, J., C. R. Yu, et al. (1996). "Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels." Nature **380**(6572): 347-351.
- Rathouz, M. M. and D. K. Berg (1994). "Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms." J Neurosci **14**(11 Pt 2): 6935-6945.
- Rogers, M. and J. A. Dani (1995). "Comparison of quantitative calcium flux through NMDA, ATP, and ACh receptor channels." Biophys J **68**(2): 501-506.
- Rushforth, S. L., C. Allison, et al. (2010). "Subtype-selective nicotinic agonists enhance olfactory working memory in normal rats: a novel use of the odour span task." Neurosci Lett **471**(2): 114-118.
- Sargent, P. B. (1993). "The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors." Annu Rev Neurosci **16**: 403-443.
- Scerri, C., C. A. Stewart, et al. (2012). "Nicotine modifies in vivo and in vitro rat hippocampal amyloid precursor protein processing in young but not old rats." Neurosci Lett **514**(1): 22-26.
- Selkoe, D. J. (1998). "The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease." Trends Cell Biol **8**(11): 447-453.
- Selkoe, D. J. and M. B. Podlisny (2002). "Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease." Annu Rev Genomics Hum Genet **3**: 67-99.
- Selkoe, D. J., T. Yamazaki, et al. (1996). "The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein." Ann N Y Acad Sci **777**: 57-64.
- Shankar, G. M., S. Li, et al. (2008). "Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory." Nat Med **14**(8): 837-842.
- Shimohama, S., A. Akaike, et al. (1996). "Nicotine-induced protection against glutamate cytotoxicity. Nicotinic cholinergic receptor-mediated inhibition of nitric oxide formation." Ann N Y Acad Sci **777**: 356-361.
- Sine, S. M. (1993). "Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of residues that determine curare selectivity." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9436-9440.
- Sine, S. M. and P. Taylor (1980). "The relationship between agonist occupation and the permeability response of the cholinergic receptor revealed by bound cobra alpha-toxin." J Biol Chem **255**(21): 10144-10156.

- Sivilotti, L. G., D. K. McNeil, et al. (1997). "Recombinant nicotinic receptors, expressed in *Xenopus* oocytes, do not resemble native rat sympathetic ganglion receptors in single-channel behaviour." J Physiol **500** (Pt 1): 123-138.
- Smith, C. M. and M. Swash (1978). "Possible biochemical basis of memory disorder in Alzheimer disease." Ann Neurol **3**(6): 471-473.
- Soscia, S. J., J. E. Kirby, et al. (2010). "The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide." PLoS One **5**(3): e9505.
- Steinlein, O. K. (2007). "Genetic disorders caused by mutated acetylcholine receptors." Life Sci **80**(24-25): 2186-2190.
- Stuhmer, W. (1992). "Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes." Methods Enzymol **207**: 319-339.
- Stuhmer, W. (1998). "Electrophysiologic recordings from *Xenopus* oocytes." Methods Enzymol **293**: 280-300.
- Tabaton, M., X. Zhu, et al. (2010). "Signaling effect of amyloid-beta(42) on the processing of A β PP." Exp Neurol **221**(1): 18-25.
- Takahashi, T., E. Neher, et al. (1987). "Rat brain serotonin receptors in *Xenopus* oocytes are coupled by intracellular calcium to endogenous channels." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(14): 5063-5067.
- Terry, A. V., Jr. and J. J. Buccafusco (2003). "The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development." J Pharmacol Exp Ther **306**(3): 821-827.
- Terzano, S., J. A. Court, et al. (1998). "Expression of the alpha3 nicotinic receptor subunit mRNA in aging and Alzheimer's disease." Brain Res Mol Brain Res **63**(1): 72-78.
- Unwin, N. (1993). "Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution." J Mol Biol **229**(4): 1101-1124.
- Unwin, N. (1995). "Acetylcholine receptor channel imaged in the open state." Nature **373**(6509): 37-43.
- Unwin, N. (1996). "Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the alpha subunits." J Mol Biol **257**(3): 586-596.
- Unwin, N. (2005). "Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution." J Mol Biol **346**(4): 967-989.
- Unwin, N. and Y. Fujiyoshi (2012). "Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing." J Mol Biol **422**(5): 617-634.
- Vernino, S., M. Amador, et al. (1992). "Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors." Neuron **8**(1): 127-134.



Instituto
Teófilo Hernando
para la I+D del Medicamento



- Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002). "Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition." Biochem Soc Trans **30**(4): 552-557.
- Wallace, T. L. and D. Bertrand (2013). "Alpha7 neuronal nicotinic receptors as a drug target in schizophrenia." Expert Opin Ther Targets **17**(2): 139-155.
- Wang, F., V. Gerzanich, et al. (1996). "Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits." J Biol Chem **271**(30): 17656-17665.
- Wang, H. Y., M. R. D'Andrea, et al. (2002). "Cerebellar diffuse amyloid plaques are derived from dendritic Abeta42 accumulations in Purkinje cells." Neurobiol Aging **23**(2): 213-223.
- Wang, H. Y., D. H. Lee, et al. (2000). "beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology." J Biol Chem **275**(8): 5626-5632.
- Wang, H. Y., D. H. Lee, et al. (2000). "Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors." J Neurochem **75**(3): 1155-1161.
- Wevers, A. and H. Schroder (1999). "Nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **1**(4-5): 207-219.
- White, M. M. and M. Aylwin (1990). "Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca2(+)-activated Cl- channels in Xenopus oocytes." Mol Pharmacol **37**(5): 720-724.
- Whitehouse, P. J., D. L. Price, et al. (1981). "Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis." Ann Neurol **10**(2): 122-126.
- Williams, D. K., J. Wang, et al. (2011). "Positive allosteric modulators as an approach to nicotinic acetylcholine receptor-targeted therapeutics: advantages and limitations." Biochem Pharmacol **82**(8): 915-930.
- Wimo, A., L. Jonsson, et al. (2013). "The worldwide economic impact of dementia 2010." Alzheimers Dement **9**(1): 1-11 e13.
- Wonnacott, S. (1997). "Presynaptic nicotinic ACh receptors." Trends Neurosci **20**(2): 92-98.
- Wortmann, M. (2012). "Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and World Health Organization report." Alzheimers Res Ther **4**(5): 40.
- Wu, J., Q. Liu, et al. (2006). "Roles of nicotinic acetylcholine receptor beta subunits in function of human alpha4-containing nicotinic receptors." J Physiol **576**(Pt 1): 103-118.
- Xie, H., J. M. Litersky, et al. (1998). "The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association." Brain Res **798**(1-2): 173-183.
- Xiu, J., A. Nordberg, et al. (2005). "Expression of nicotinic receptors on primary cultures of rat astrocytes and up-regulation of the alpha7, alpha4 and beta2

- subunits in response to nanomolar concentrations of the beta-amyloid peptide(1-42)." Neurochem Int **47**(4): 281-290.
- Yankner, B. A., L. K. Duffy, et al. (1990). "Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides." Science **250**(4978): 279-282.
- Yao, Z. X. and V. Papadopoulos (2002). "Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity." FASEB J **16**(12): 1677-1679.
- Zanardi, A., G. Leo, et al. (2002). "Nicotine and neurodegeneration in ageing." Toxicol Lett **127**(1-3): 207-215.
- Zilka, N. and M. Novak (2006). "The tangled story of Alois Alzheimer." Bratisl Lek Listy **107**(9-10): 343-345.
- Zou, K., J. S. Gong, et al. (2002). "A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage." J Neurosci **22**(12): 4833-4841.