



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

## **Efectos intracelulares del péptido beta-amiloide en la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal**



Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

EDUARDO JAVIER FERNÁNDEZ PÉREZ  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2019

Profesor Guía: Luis Gerardo Aguayo Hernández  
Dpto. de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

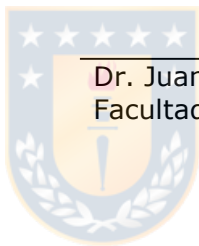
Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr. Luis Aguayo Hernández  
Profesor Guía de Tesis  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dra. Marcela Torrejón  
Facultad de Ciencias Biológicas



---

Dr. Juan Pablo Henríquez  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Marco Fuenzalida  
Profesor Evaluador Externo  
Universidad de Valparaíso

---

Dr. Ariel Castro  
Director  
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

# AGRADECIMIENTOS

*«Una vez por semana, enseña gratis a los otros lo poco o mucho que sabes. Lo que les des, te lo das. Lo que no les des, te lo quitas.»*

Alejandro Jodorowsky.

Quisiera dedicar unas palabras para agradecer a mis padres, hermanos y familia, en especial a Katy, que no sólo me han brindado su apoyo INCONDICIONAL durante el doctorado, sino que en toda mi vida. Agradezco igualmente a mi compañera Camila, que ha estado siempre conmigo en las buenas y en las malas durante este proceso, por su comprensión, sus sabias palabras, su paciencia y amor. A Lupita y Emily Rose y Pascualita, tres de mis más queridos seres en este planeta. Por todos ell@s me siento profundamente agradecido.

Al laboratorio de Neurofisiología, en especial Al Dr. aguayo por recibirme y apoyar la realización de este trabajo que en un inicio "no tenía ni patas ni cabeza". Adicionalmente, agradezco a los miembros y ex-miembros del laboratorio Feña, Luchón, Denisse, Panchex, CF Burgos, Peters, Nico Riffo, Luchito, Panchi, Jessica, por su cariño, apoyo y constante desafío intelectual. Además extendiendo el agradecimiento al equipo técnico que durante todos estos años permitieron el correcto y fluido funcionamiento del mismo: Ixia, Javiera, Alejandra, Dani Nova, César, María Paz, pero en especial a Laurie por su gran calidad humana y por ayudarme además con el continuo perfeccionamiento del inglés.

También quisiera agradecer a los miembros de la comisión por sus contribuciones, opiniones y cuestionamientos, que sin lugar a duda ayudaron a "subirle el pelo" a este trabajo. Adicionalmente le agradezco al Jérôme Epsztein por recibirme durante la pasantía en Francia y a todo su equipo por ayudar en la realización de este trabajo.

Por último agradezco a la Beca Nacional de Doctorado CONICYT, al proyecto FONDECYT 1180752 y la escuela de graduados de la Universidad de Concepción por el apoyo económico recibido para la realización de esta tesis.



# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	5
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	7
<b>LISTA DE ABREVIACIONES</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
1.1. Enfermedad de Alzheimer.....	15
1.2. Toxicidad de A $\beta$ a nivel celular y sináptico .....	15
1.3. Origen y presencia de A $\beta$ en compartimientos intracelulares .....	18
1.4. Importancia de la acumulación intracelular de A $\beta$ .....	20
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	25
2.1. Cultivo neuronal .....	25
2.2. Preparación del péptido beta amiloide .....	25
2.3. Electrofisiología .....	26
2.3.1. Configuración de célula completa ( <i>whole cell</i> ) .....	26
2.3.2. Registro de corrientes sinápticas y evocadas en modo <i>voltage-clamp</i> ( <i>in vitro</i> ) .....	28
2.3.3. Registro de potencial de membrana ( <i>V<sub>m</sub></i> ) en modo <i>current-clamp</i> ( <i>in vitro</i> ) .....	29
2.3.4. Estudios de corrientes sinápticas en modo <i>voltage-clamp</i> en rebanadas de cerebro ( <i>ex vivo</i> ) .....	31
2.3.5. Registros de <i>V<sub>m</sub></i> en modo <i>current-clamp</i> en cerebro de animales anestesiados ( <i>in vivo</i> ).....	32
2.4. <i>Immunogold</i> y Microscopía Electrónica de Transmisión.....	33
2.5. Registros simultáneos de electrofisiología y fluorescencia .....	33
2.6. Análisis de Datos.....	34
<b>3. RESULTADOS</b> .....	36
3.1. Objetivo Específico 1: Estudiar los efectos de diferentes concentraciones de agregados oligoméricos y fibras de A $\beta$ intracelular sobre la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal, determinando su especificidad sobre los dos tipos de neurotransmisión (excitatoria e inhibitoria). .....	36
3.2. Objetivo específico 2. Caracterizar el mecanismo por el cual A $\beta$ intracelular aumenta la transmisión excitatoria AMPAérgica .....	59
3.3. Objetivo específico 3. Caracterizar la naturaleza del mecanismo de señalización retrógrada de una concentración baja de A $\beta$ en la neurona post-sináptica.....	66
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	74
4.1. Efectos globales de iA $\beta$ .....	74
4.2. Efecto post-sináptico de iA $\beta$ .....	75

4.3.	Efecto pre-sináptico de $iA\beta$ : rol de óxido nítrico .....	77
4.4.	Origen post-sináptico de NO .....	78
4.5.	Efectos extra-sinápticos de $iA\beta$ .....	80
4.6.	Implicancias de los efectos pre- y post-sinápticos en la patología: Excitabilidad neuronal en EA .....	82
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>85</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Cascada amiloide. ....	17
Figura 2. Esquema que resume los efectos de $iA\beta$ reportados en la literatura .....	22
Figura 3. Esquema metodológico para el registro en modo célula completa. ....	27
Tabla 1. Concentraciones intra y extracelulares de $Na^+$ , $K^+$ y $Cl^-$ y potencial de reversión (Erev) para cada uno de los iones en las condiciones experimentales utilizadas en los registros electrofisiológicos. ....	30
Figura 4: Técnica de whole cell permite la entrada rápida de $A\beta$ fluorescente al medio intraneuronal. ....	39
Figura 5. $iA\beta_0$ aumentó generación de potenciales de acción evocados por inyección de corriente en neuronas hipocampales in vitro. ....	41
Figura 6. $iA\beta_0$ aumentó la generación de potenciales de acción evocados por inyección de corriente en neuronas hipocampales in vivo. ....	43
Figura 7. $iA\beta_0$ no aumentó el disparo de los potenciales de acción evocados por inyección de corriente en neuronas de ganglio de la raíz dorsal (DRG) in vitro. ....	45
Figura 8. El bloqueo intracelular de los canales de $Na^+$ regulados por voltaje no evita la despolarización transitoria y rápida de la membrana activada por $iA\beta_0$ . ....	47
Figura 9. Efectos de la aplicación intracelular de oligómeros de $A\beta$ ( $A\beta_0$ ) sobre la frecuencia y amplitud de corrientes sinápticas miniatura. ....	50
Figura 10. La pre-incubación de oligómeros de $A\beta$ ( $A\beta_0$ ) con el anticuerpo A11 inhibió el efecto sináptico intracelular. ....	52
Figura 11. $A\beta_0$ intracelular afectó propiedades de corrientes mPSCs mediadas por receptores ionotrópicos de AMPA-R y de GABA (GABAA-R) ( <i>in vitro</i> ). ....	56
Figura 12. $A\beta_0$ intracelular aumentó la frecuencia de las corrientes sinápticas AMPAérgicas y GABAérgicas en neuronas en la región CA1 de rebanadas de hipocampo (ex vivo). ....	57
Figura 13. Efecto de $A\beta_0$ en las corrientes evocadas por aplicación exógena de AMPA y GABA en neuronas hipocampales. ....	58
Figura 14. La inhibición de PKC disminuye el efecto de $A\beta_0$ en las corrientes evocadas por AMPA. ....	61
Figura 15. El efecto de $A\beta_0$ sobre las corrientes sinápticas miniaturas AMPAérgicas es dependiente de PKC. ....	62
Figura 16. Figura 12. Aumento del nivel de $Ca^{2+}$ post-sináptico afecta las acciones intracelulares de $A\beta_0$ en la frecuencia y no en la amplitud de las corrientes sinápticas miniaturas. ....	65

Figura 20. Esquema final de efectos intracelulares de A $\beta$ o sobre la neurotransmisión y la excitabilidad neuronal. .... 81





## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>3xTg</b>	Modelo de EA triple transgénico
<b>aCSF</b>	Fluido cerebroespinal artificial
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
<b>APP</b>	Proteína precursora amiloide
<b>A<math>\beta</math></b>	Péptido $\beta$ -amiloide
<b>A<math>\beta</math>40</b>	Péptido $\beta$ -amiloide 1-40
<b>A<math>\beta</math>42</b>	Péptido $\beta$ -amiloide 1-42
<b>A<math>\beta</math>-FAM</b>	Péptido $\beta$ -amiloide marcado con 5,6-carboxy-fluoresceína
<b>BAPTA</b>	Ácido 1,2-bis-2-aminofenoxietano-N,N,N',N'- tetra acético-acetoximetil éster
<b>CA1</b>	Cornu Ammonis 1
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion Calcio
<b>cGMP</b>	GMP cíclico
<b>CNQX</b>	6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
<b>C-PTIO</b>	2-(4-Carboxifenyl)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido, sal de potasio
<b>DAPV</b>	2-amino-5-fosfonopentanoato
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>eEPSCs</b>	Corrientes post-sinápticas evocadas excitatorias
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
<b>eIPSCs</b>	Corrientes post-sinápticas evocadas inhbitorias
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
<b>Hz</b>	hercios
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>INSERM</b>	Instituto Nacional de Salud e Investigaciones Médicas de Francia
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo
<b>MEM</b>	Medio esencial mínimo
<b>mEPSCs</b>	Corrientes post-sinápticas miniaturas excitatorias
<b>MET</b>	Microscopía de transmisión electrónica
<b>mg</b>	miligramo
<b>min</b>	minutos
<b>mIPSCs</b>	Corrientes post-sinápticas miniaturas inhbitorias
<b>mM</b>	milimolar
<b>mPSCs</b>	Corrientes post-sinápticas miniaturas
<b>ms</b>	milisegundo
<b>mV</b>	milivolts
<b>M<math>\Omega</math></b>	megaohmio
<b>NIH</b>	Instituto de salud de Estados Unidos
<b>NIH</b>	Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos

<b>nM</b>	nanomolar
<b>NMDA</b>	Ácido N-metil-D-aspartico
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintasa neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>pA</b>	picoamperio
<b>PAs</b>	Potenciales de acción
<b>PBS</b>	buffer salino fosfato
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PSEN1</b>	Presinilina 1
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SEN</b>	Solución extrna normal
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TTX</b>	Tetrodotoxina
<b>VGNCs</b>	Canales de sodio dependientes de voltaje
<b>W1400</b>	N-([3-(Aminometil)fenil]metil)etanimidamida dihidrocloruro
<b>µg</b>	microgramo
<b>µL</b>	micrómetro



## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es uno de los trastornos cerebrales más comunes que se caracteriza histopatológicamente por la presencia de estructuras macroscópicas extracelulares a nivel cerebral llamadas placas seniles, que consisten principalmente de agregados del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), el cual oligomeriza, formando diferentes estructuras: oligómeros, protofibras y fibrillas, siendo las primeras las especies más tóxicas reportadas en la literatura.

Adicionalmente, se ha descrito la presencia intracelular del péptido en numerosos compartimentos intraneuronales (mitocondria, retículo endoplásmico (RE), endosomas y lisosomas). Por otra parte, se ha observado que modelos de ratones transgénicos desarrollan una acumulación intraneuronal de  $A\beta$  a los 3-4 meses de edad, un evento temprano en relación a la aparición de  $A\beta$  extracelular, y que es cuando los déficits cognitivos son detectados por primera vez. Sin embargo, los efectos intracelulares de  $A\beta$  han sido mínimamente estudiados, por lo surge la pregunta ¿podrían oligómeros de  $A\beta$  intracelular ( $iA\beta$ ) tener un efecto en la neurotransmisión? Utilizando la técnica de *patch clamp* para aplicar  $iA\beta$  y al mismo tiempo registrar la excitabilidad neuronal y la actividad sináptica, encontramos que aumentaba la **frecuencia (efecto pre-sináptico)** y la **amplitud (efecto post-sináptico)** de las corrientes sinápticas, así como también la generación de potenciales de acción. Este efecto fue específico para especies oligoméricas. La alteración de los niveles globales de  $Ca^{2+}$  intracelular no tuvo un efecto sobre la acción post-sináptica de  $iA\beta$ , pero el efecto pre-sináptico sí se vio disminuido al aumentar el  $Ca^{2+}$  citosólico, lo que sugiere una regulación compleja de los efectos de  $iA\beta$  en la frecuencia de las corrientes sinápticas.

$iA\beta$  afectó tanto la transmisión excitatoria mediada por el receptor post-sináptico de AMPA, como la inhibitoria mediada por  $GABA_A$ , pero el efecto fue más potente en la primera, afectando de manera importante la amplitud de la corriente AMPAérgica, sugiriendo un **mecanismo a nivel post-sináptico**. Por otro lado,  $iA\beta$  también afectó la frecuencia de ambos tipos de neurotransmisión, excitatoria e inhibitoria, sugiriendo un **mecanismo pre-sináptico** que afectaba a ambas. La co-aplicación de un inhibidor

de PKC (Quelerritina) disminuyó tanto la frecuencia como la amplitud de las mPSCs a niveles control, **indicando que los mecanismos pre- y post-sináptico involucraban la participación de esta quinasa.**

El aumento en la frecuencia de las corrientes sinápticas se observó al mismo tiempo que produjo un incremento significativo en la generación de óxido nítrico (NO) tanto en la neurona que contenía  $iA\beta_0$  como en las neuronas aledañas a ésta. La pre-incubación con el inhibidor de NO sintasa L-NAME disminuyó significativamente el efecto de  $iA\beta_0$  sobre la frecuencia de las corrientes sinápticas, así como también en la generación de NO, **sugiriendo que el mecanismo pre-sináptico de  $iA\beta_0$  estaba mediado por NO.**

En conjunto, estos datos sugieren  $iA\beta_0$  aumentó la excitabilidad neuronal sin alterar las propiedades del potencial de acción o las propiedades intrínsecas de la membrana celular, sino que más bien a través de una alteración en las propiedades de la transmisión sináptica de la neurona mediante un mecanismo pre-sináptico dependiente de NO y un mecanismo post-sináptico mediado por el receptor de AMPA, involucrando en ambos la participación de PKC.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common brain disorders that is characterized histopathologically by the presence of extracellular macroscopic structures at the brain level called senile plaques, which consist mainly of aggregates of the  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ), which oligomerizes, forming different structures: oligomers, protofibrils and fibrils, the first being the most toxic species reported in the literature.

Additionally, the intracellular presence of the peptide in numerous intraneuronal compartments (mitochondria, endoplasmic reticulum (ER), endosomes and lysosomes) has been described. On the other hand, it has been observed that models of transgenic mice develop an intraneuronal accumulation of  $A\beta$  at 3-4 months of age, an early event in relation to the appearance of extracellular  $A\beta$ , and that is when cognitive deficits are first detected for the first time. However, the intracellular effects of  $A\beta$  have been minimally studied, so the question arises: could intracellular  $A\beta$  oligomers ( $iA\beta_o$ ) have an effect on neurotransmission? Using the patch clamp technique to apply  $iA\beta_o$  and at the same time register neuronal excitability and synaptic activity, we found that the frequency (pre-synaptic effect) and the amplitude (post-synaptic effect) of synaptic currents were increased, as well as the generation of action potentials. This effect was specific for oligomeric species. The alteration of global intracellular  $Ca^{2+}$  levels did not have an effect on the post-synaptic action of  $iA\beta_o$ , but the pre-synaptic effect was diminished by increasing cytosolic  $Ca^{2+}$ , which suggests a complex regulation of the effects of  $iA\beta_o$  on the frequency of synaptic currents.

$iA\beta_o$  affected both the excitatory transmission mediated by the post-synaptic AMPA receptor, and the inhibitory mediated by  $GABA_A$ , but the effect was greater in the first, significantly affecting the amplitude of the AMPAergic current, suggesting a mechanism at the post-synaptic level. On the other hand,  $iA\beta_o$  also affected the frequency of both types of neurotransmission, excitatory and inhibitory, suggesting a pre-synaptic mechanism that affected both. The co-application of a PKC inhibitor (Chelerythrine) decreased both the frequency and amplitude of mPSCs at control levels, indicating that pre- and post-synaptic mechanisms involved the participation of this kinase.

The increase in the frequency of synaptic currents was observed at the same time that it produced a significant increase in the generation of nitric oxide (NO) both in the neuron containing  $iA\beta_0$  and in the surrounding neurons. Pre-incubation with the NO synthase inhibitor L-NAME significantly decreased the effect of  $iA\beta_0$  on the frequency of synaptic currents, as well as the generation of NO, suggesting that the pre-synaptic mechanism of  $iA\beta_0$  was mediated by NO.

Together, these data suggest that  $iA\beta_0$  increased neuronal excitability without altering the properties of the action potential or the intrinsic properties of the cell membrane, but rather through an alteration in the properties of the synaptic transmission of the neuron through a NO-dependent pre-synaptic mechanism and a post-synaptic mechanism mediated by AMPA receptor, involving both the participation of PKC.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es uno de los desórdenes cerebrales más comunes, caracterizado por alteraciones celulares y moleculares que inducen una disfunción cerebral que se agrava a medida que la enfermedad progresa [1]. La EA es una patología neurodegenerativa progresiva e irreversible que se da más comúnmente en la población de edad avanzada y que conduce a un déficit cognitivo debilitante, capaz de interferir con la capacidad de realizar actividades de la vida diaria [1], [2]. Producto de la manifestación más tardía de la EA, los pacientes experimentan síntomas como pérdida progresiva de la memoria [3], alteraciones cognitivas y trastornos conductuales [4]. Actualmente, los mecanismos moleculares y celulares que conducen a la EA son en gran parte desconocidos, impidiendo el desarrollo de terapias modificadoras del proceso neurodegenerativo y/o para el tratamiento sintomático. Interesantemente, uno de los marcadores histopatológicos más significativos en la EA es la presencia de placas seniles, compuestas por péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), el cual se cree que es uno de los principales agentes patológicos de la enfermedad [5]. Aunque un aumento de  $A\beta$  en el cerebro puede explicar parte de la neurodegeneración detectada en el cerebro con EA, otros mediadores tóxicos, como la hiperfosforilación de tau [6], [7], estrés oxidativo [8] y estrés del retículo endoplásmico [9], disfunción mitocondrial [10] y excitotoxicidad inducida por glutamato [11] también podrían estar contribuyendo a la progresión de la enfermedad.

## 1.2. Toxicidad de $A\beta$ a nivel celular y sináptico

$A\beta$  es un péptido de 39-42 residuos aminoacídicos que se encuentra nativamente en una conformación *random coil*, por lo que carece de una estructura ordenada; se origina directamente del procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP), una glicoproteína transmembrana tipo I, la cual posee sitios de corte para tres enzimas,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas, siendo las dos últimas las responsables de la generación

de A $\beta$  [12]. Las dos formas principales de A $\beta$ , de 40 (A $\beta$ 40) y 42 (A $\beta$ 42) residuos de largo son las más abundantes en el cerebro humano [13], y aunque A $\beta$ 40 se produce en niveles más altos, A $\beta$ 42 es más hidrófobo y propenso a formar agregados tóxicos [14], [15]. Se cree que cuando la formación de A $\beta$  transcurre en el tiempo y bajo condiciones que no están del todo claras, conduce a procesos de agregación [16] que forman una población heteróloga de especies, como: dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, oligómeros solubles, protofibras y fibras de mayor tamaño [17]. En relación a esto, por varios años se aceptó que las fibras de A $\beta$  depositadas en las placas seniles que se observan *post mortem* en cerebros de pacientes con EA, eran las responsables de la enfermedad [18]. Se sabe que los monómeros y los agregados fibrilares, si bien se encuentran en la enfermedad, no aportarían significativamente a la patogénesis de la EA [19], [20]. Es más, la evidencia sugiere que estos depósitos extracelulares anormales no serían la causa de los eventos observados en la EA, dado que no existe una correlación alta entre la carga de placa amiloide en el cerebro de pacientes con esta enfermedad y la severidad de esta demencia senil [1], [21]. Si bien las fibras de A $\beta$  son capaces de generar una toxicidad en el cerebro, son realmente los oligómeros solubles las especies que demuestran una toxicidad importante [22] y se las ha visto implicadas en una serie de hitos celulares denominados "Cascada Amiloide" (**Fig. 1**), que postula a estas especies como la causa de la EA, y en entre los que destacan la **alteración de componentes proteicos, inhibición de la plasticidad sináptica, muerte celular y la disfunción cerebral** [23]–[26]. Además, el grado de demencia en pacientes *pre-mortem* se correlaciona de mejor manera con los niveles de **oligómeros solubles de A $\beta$  (A $\beta$ o)** en cerebros *post-mortem*, especialmente en las regiones del hipocampo y corteza, las cuales están asociadas con los procesos de función cognitiva, aprendizaje y memoria [27]–[29].

Durante los últimos años se ha visto que estas especies son responsables de la toxicidad celular y sináptica que se observa tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* [30]–[35], así como también en pacientes que padecen EA. La toxicidad celular se evidencia por una disminución considerable del número de neuronas en áreas como la corteza o el hipocampo [36], [37], mientras que la toxicidad sináptica implica una alteración de





**Figura 1. Cascada amiloide.** Hipótesis que se basa en la evidencia recaudada en los últimos 25 años en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* y que postula que la acumulación y oligomerización de Aβ es la causa de la EA. En ella se explica que diferentes formas de Aβ, desde agregados insolubles hasta dímeros/oligómeros solubles, serían los responsables de generar una secuencia de eventos citotóxicos entre los cuales se incluye la activación de la respuesta inflamatoria, daño sináptico y estrés oxidativo, ente otros. Estos alterarían la función neuronal y repercutirían directamente en la viabilidad celular, provocando disminución de la masa encefálica, la aparición de placas amiloides, ovillos neurofibrilares y la generación de demencia.

los componentes pre- y post-sinápticos que participan en ella [38]. En los últimos 20 años, un gran cuerpo de evidencia señala que A $\beta$  afecta de manera sustancial a la transmisión glutamatérgica [39]–[42]. Dentro de los componentes de la sinapsis glutamatérgica que se encuentran alterados encontramos a los receptores ionotrópicos de AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) [43], [44], [45], los cuales han jugado un rol preponderante en la modulación de la sinapsis y la consolidación de la memoria [46]–[49]. Resulta interesante mencionar que A $\beta$  se uniría preferente a estos receptores, y que para poder llevar a cabo sus efectos neurotóxicos la remoción de estos receptores desde la sinapsis es crítica [24], [43].

De esta manera, estas propiedades sinaptotóxicas únicas de las especies oligoméricas, junto con la acumulación progresiva en el cerebro de pacientes con EA, establecen al péptido A $\beta$  como una molécula clave en la sinaptotoxicidad observada en el cerebro de una persona que padece EA [50]–[52]. En la actualidad, con el objetivo de aliviar y detener los síntomas de la EA, la mayoría de estudios se han enfocado en tratar de restaurar tardíamente la transmisión sináptica ya alterada y las vías de señalización intracelular afectadas [1], [53], sin comprender en su totalidad cómo es que A $\beta$  afecta estos blancos celulares. Sin embargo, este enfoque para identificar compuestos para la EA no ha sido productivo, ya que una vez que los síntomas son evidentes en la etapa clínica, ya existe un grado significativo de daño cerebral, haciendo ineficaz la reversión del daño sináptico [1], [54]. Por lo tanto, el presente estudio se centró en la identificación de las primeras etapas de la toxicidad inducida por A $\beta$  intracelular, un efecto que encontramos en nuestro laboratorio y que se caracterizó por su rapidez y potencia, afectando la transmisión sináptica a diferentes niveles.

### **1.3. Origen y presencia de A $\beta$ en compartimientos intracelulares**

El dogma actual de la cascada amiloide apoya la conclusión de que las interacciones de A $\beta$  extracelular con componentes extracelulares inician su neurotoxicidad. Sin embargo, el medio extracelular no es la única fuente de A $\beta$ , puesto que no solo se ha descrito la presencia de APP en la membrana extracelular, sino que

también en la mitocondria, la red trans-Golgi, el retículo endoplásmico (RE), endosomas y lisosomas [55], [56]. Las enzimas  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas también han sido reportadas en estos compartimentos sub-celulares. Al respecto, Koo y colaboradores hipotetizan que los endosomas son una fuente intracelular de A $\beta$  debido a su pH ácido y a la co-expresión de las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$ [55], [56]. En ese sentido, un estudio previo ha mostrado que la internalización de APP desde la membrana plasmática hacia los endosomas puede ocurrir vía endocitosis, y que el bloqueo de este proceso conlleva una reducción de los niveles intracelulares de A $\beta$  [57]. Similarmente, la co-expresión de  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas también ocurre en el aparato de Golgi, sugiriendo que las vías de secreción también son sitios potenciales para la generación de A $\beta$  intracelular [56].

Por otra parte, los compartimentos intracelulares no son la única fuente de A $\beta$  intracelular descritos hasta hoy, puesto que hay estudios que indican que A $\beta$  extracelular es recaptado por astrocitos [58] y células gliales [59], y aunque la neurona no es considerada una célula fagocitaria *per se*, existe evidencia que sugiere que puede ocurrir recaptación del *pool* de A $\beta$  extracelular, ya sea por medio de difusión pasiva [60] o por endocitosis [61], [62], contribuyendo así a la acumulación intracelular de este. Otros estudios con diferentes modelos de EA han demostrado también la importancia de las neuritas distales y compartimentos sinápticos en la oligomerización y acumulación intraneuronal de A $\beta$  [63], [64]. A esto se suma otro reporte reciente en cerebros humanos de pacientes con EA, el cual mostró que las placas amiloide también pueden formarse directamente de los cuerpos celulares, sugiriendo que los depósitos extracelulares no son exclusivamente el origen de las placas seniles [65], indicando de esta manera la importancia que tiene este evento en la progresión de la enfermedad, **pues se trataría de un fenómeno que ocurre en etapas tempranas de la patología**. Aún más, estudios utilizando cerebros de pacientes con EA, han evidenciado claramente que los oligómeros de A $\beta$  se acumulan intracelularmente **antes de la deposición de placas extracelulares**, especialmente en regiones vulnerables durante la EA, como el hipocampo [66]. La importancia de estos hallazgos radica en que el A $\beta$  extracelular puede proceder del *pool* intraneuronal y que posiblemente existe un

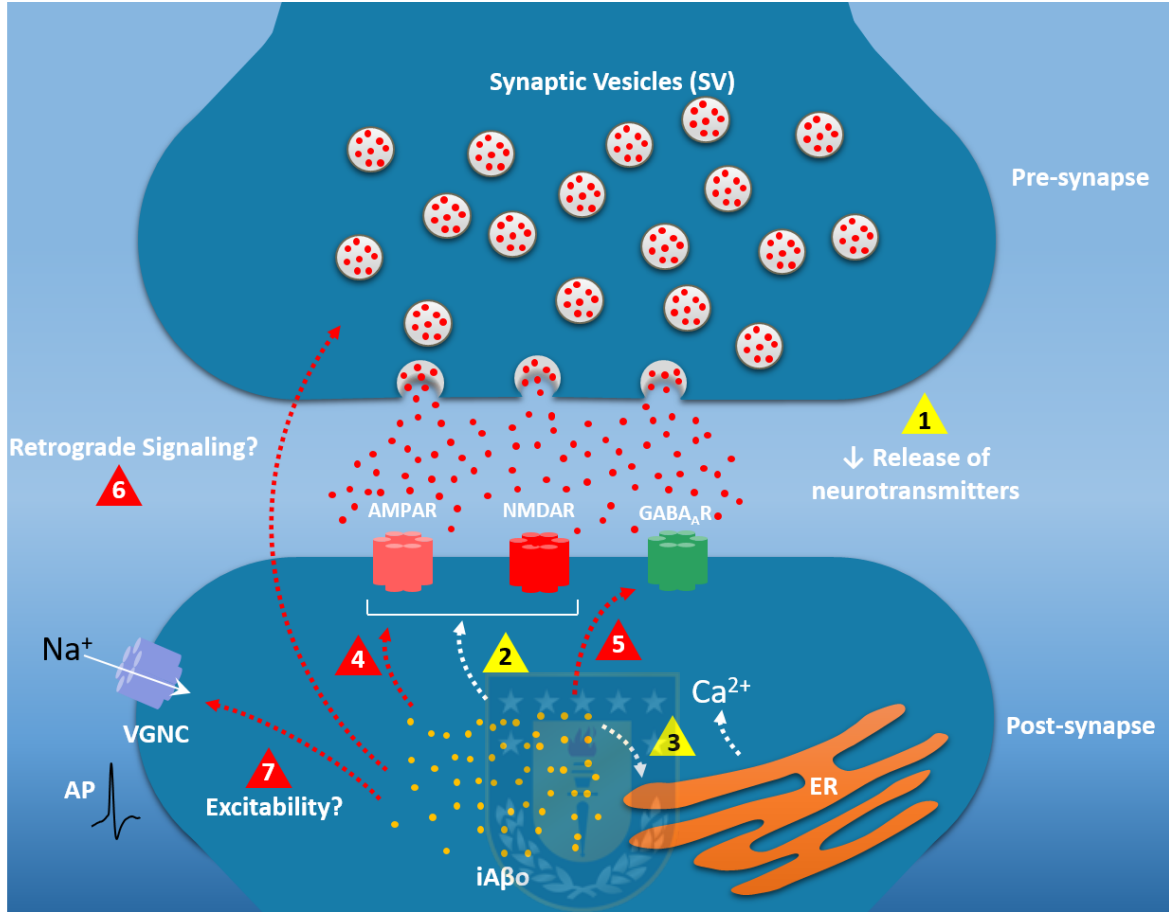
equilibrio dinámico entre los dos, de tal manera que cuando se remueve A $\beta$  extracelular, el *pool* intracelular es desplazado desde la célula.

#### **1.4. Importancia de la acumulación intracelular de A $\beta$**

La presencia de agregados de A $\beta$  intraneuronal se ha correlacionado con la muerte celular neuronal en diferentes modelos de ratones transgénicos para la EA [61], [62], así como con la disfunción sináptica, lo cual podría ser clave en el déficit cognitivo observado en la EA. En ese sentido el ratón triple transgénico (3xTg), con 3 mutaciones: *Swedish* APP (K670N/M671L), PSEN1 (M146V) y tau (P301L) (una proteína asociada a microtúbulos implicada en EA) también desarrolla acumulación intraneuronal de A $\beta$  a los 4 meses de edad, **que es cuando los déficits cognitivos son detectados por primera vez y es una etapa en la que no se observaba presencia de A $\beta$  extracelular** [67]. Interesantemente, la remoción del A $\beta$  intracelular con inmunoterapia restaura la cognición en este modelo [67] y, a medida que la patología reemerge, se observa la reaparición de A $\beta$  intraneuronal primero, seguida por la formación de placas amiloides extracelulares [68]. Cabe destacar que el modelo 3xTg es el más utilizado actualmente en la investigación biomédica de la EA y ha contribuido de una manera importante al conocimiento y entendimiento de esta patología [69], [70]. Adicionalmente, existen otros 5 modelos murinos de EA [71] en los cuales se ha observado la presencia de A $\beta$  intracelular previa a la acumulación extracelular. Basado en estos resultados, una pregunta de investigación interesante es, si la producción de A $\beta$  intracelular ocurre en las etapas iniciales de la patología, **¿Es posible que A $\beta$  intracelular esté afectando la función sináptica?**

Recientemente, y durante los inicios de este trabajo de tesis, se describió por otro grupo que A $\beta$  intracelular disminuía la liberación de neurotransmisores a nivel pre-sináptico, así como también la función de **receptores excitatorios** a nivel post-sináptico en neuronas hipocampales autápticas (cultivo de una neurona en una micro-isla de células gliales y que forma conexiones sinápticas consigo misma) [30]. Sin embargo, los autores de este trabajo no describieron el(los) mecanismo(s) por el(los)

cuál(es) A $\beta$  podría llevar a cabo estos efectos en estos modelos neuronales *in vitro* e *in vivo*. En ese sentido, otro estudio sí mostró que A $\beta$  aplicado intracelularmente en ovocitos de *Xenopus laevis* promueve la **liberación de Ca<sup>2+</sup> a través de la apertura de los receptores de IP3 en el retículo endoplásmico (ER)** que resulta de la producción de inositol trifosfato (IP3) a través de la activación de fosfolipasa C (PLC) [53]. Sin embargo, y dado de que se trataba de un modelo no neuronal, resulta difícil extrapolar las consecuencias que podría tener este aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular en la fisiología neuronal. **Resultados preliminares de nuestro laboratorio, utilizando la técnica de *whole cell* para aplicar A $\beta$  al interior de la neurona, apoyaban la idea que A $\beta$  al ser aplicado intracelularmente aumentaba la neurotransmisión sináptica.** Adicionalmente, observamos que parte de la actividad aumentada podría estar mediada por potenciales de acción, un evento fisiológico relacionado a la excitabilidad de la membrana neuronal [73]. Al respecto, existe evidencia reciente que señala que cambios en la excitabilidad neuronal también podrían jugar un rol clave en los efectos tempranos de A $\beta$ , predisponiendo al desarrollo de la falla sináptica postulada en las primeras etapas de la EA. Por ejemplo, estudios *in vitro* e *in vivo* dan cuenta del aumento en la excitabilidad de neuronas hipocámpales en modelos de EA, desatando actividad epileptiforme [74] y actividad neuronal hipersincrónica en modelos celulares [75], [76], así como también actividad neuronal de tipo convulsiva en modelos murinos [77], [78]. Adicionalmente, se ha descrito una correlación entre epilepsia y EA, lo cual se manifiesta con un mayor riesgo de sufrir convulsiones en pacientes con EA [79], [80]. Estos estudios sugieren una potencial relación entre la EA y la hiperactividad neuronal, justificando la presente investigación y permitiendo el potencial descubrimiento de nuevos mecanismos tempranos que podrían estar ocurriendo en el inicio de la EA. Por este motivo, otra **pregunta relevante para nuestra investigación fue: ¿contribuye A $\beta$  intracelular a la excitabilidad de la membrana neuronal?**



**Figura 2. Esquema que resume los efectos de iAβ reportados en la literatura.** Esquema que describe los efectos intracelulares Aβ (triángulos en amarillo) y plantea algunas preguntas que no han sido respondidas y que fueron abordadas en esta tesis (triángulos en rojo). Por ejemplo, se sabe que la aplicación de iAβ afecta la liberación de neurotransmisores desde la pre-sinapsis (1) y que aumenta la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplásmico (ER) (2). Adicionalmente tiene efectos en la transmisión excitatoria a nivel post-sináptico (3), afectando la función de los receptores de AMPA (rosado) y NMDA (rojo) sin embargo, no se ha descrito las vías intracelulares que podrían estar implicadas en este fenómeno ¿Qué mecanismos podrían estar mediando estos efectos? (4) Además, si el péptido está presente en la post-sinapsis y genera un efecto en receptores sinápticos excitatorios, ¿podría también afectar la función de los receptores inhibitorios GABAérgicos? (en verde) (5). Por otro lado, tampoco se ha descrito cómo es que se afecta la liberación de neurotransmisores a nivel pre-sináptico ¿Pero qué mecanismo media este efecto? ¿Se trata de un mensaje retrógrado trans-sináptico? (6). Por último, estudios *in vitro* e *in vivo* dan cuenta del aumento en la excitabilidad en neuronas hipocámpales en modelos de EA y se ha descrito que Aβ podría estar participando en este fenómeno, pero ¿tiene Aβ intracelular un efecto directo en la generación de potenciales de acción (AP)? ¿Podría afectar la excitabilidad neuronal? (7).

En resumen, y considerando todos los antecedentes disponibles:

1. El dogma actual de la cascada amiloide apoya la conclusión de que las interacciones de A $\beta$  con componentes extracelulares inician su neurotoxicidad [51], [81]–[83]; sin embargo, y a pesar de la existencia de evidencia que soporta la presencia de un *pool* de A $\beta$  que se encuentra y que se origina intracelularmente [55]–[57], **no se ha estudiado en detalle el efecto que A $\beta$  intracelular pudiese tener en las funciones neuronales**. Por este motivo nos preguntamos si **¿Es posible que A $\beta$  intracelular esté afectando la función sináptica? ¿Qué mecanismo utilizaría para producir tales efectos?**

2. Adicionalmente, la presencia de A $\beta$  intracelular precede a A $\beta$  en el medio extracelular y a la formación de placas extracelulares, lo cual sugiere que la **acumulación intracelular es un evento temprano en la progresión de la EA** [65], [67], [68].

3. Evidencia reciente señala que cambios en la **excitabilidad neuronal** también **podrían jugar un rol clave en los efectos tempranos de A $\beta$**  [74]–[78]. Por ende, nos preguntamos si **¿A $\beta$  intracelular contribuye a la excitabilidad de la membrana neuronal?**

4. Resultados preliminares de nuestro laboratorio apoyaban la idea que A $\beta$  es capaz de aumentar la neurotransmisión sináptica. Adicionalmente observamos que parte de la actividad podría corresponder a potenciales de acción.

En el marco de la originalidad de este proyecto se pretendía definir los efectos de A $\beta$  y dilucidar los mecanismos por los cuales A $\beta$  intracelular aumentaría la frecuencia y amplitud de los eventos sinápticos. Basados en el entendimiento de las bases que gobiernan las propiedades de la transmisión sináptica en los modelos utilizados propusimos como hipótesis que: **A $\beta$  aplicado intracelularmente aumenta la neurotransmisión en neuronas hipocampales actuando en dos sitios** [73], [84]–[88]: **Aumentando la transmisión excitatoria a nivel post-sináptico y favoreciendo la liberación de vesículas sinápticas a nivel pre-sináptico.**

Facilitando de esta manera un fenómeno de hiperexcitabilidad de la membrana neuronal y la generación de potenciales de acción.

Fue precisamente lo anterior lo que ha sido evaluado en esta tesis. El objetivo general de este trabajo pretendió **caracterizar los efectos de A $\beta$  intracelular sobre la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal**. Con lo cual, los objetivos específicos fueron:

**a) Objetivo Específico 1: Estudiar los efectos de diferentes concentraciones de agregados oligoméricos y fibras de A $\beta$  intracelular sobre la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal, determinando su especificidad sobre los dos tipos de neurotransmisión (excitatoria e inhibitoria).**

**b) Objetivo específico 2. Caracterizar el mecanismo por el cual A $\beta$  intracelular aumenta la transmisión excitatoria AMPAérgica.**

**c) Objetivo específico 3. Caracterizar la naturaleza del mecanismo de señalización retrógrada de una concentración baja de A $\beta$  en la neurona post-sináptica.**



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Cultivo neuronal

Ratas *Sprague Dawley* se trataron y manipularon de acuerdo a las recomendaciones establecidas por el NIH (Instituto de Salud de EEUU) para el cuidado y uso de animales para experimentación (NIH *guidelines*, EEUU) y aquellos establecidos por el Comité de Ética de la Universidad de Concepción. Ratas preñadas de 18 días se anestesiaron con éter y se sacrificaron por dislocación cervical. Los embriones de 18 días se extrajeron, se decapitaron y los cerebros se removieron rápidamente en solución de disección fría; el cerebro se separó exponiendo el hipocampo, el cual se cortó. Las neuronas se disociaron mecánica y enzimáticamente (Tripsina 0,25%, durante 20 min., Sigma, EEUU) y las células obtenidas se sembraron a una densidad de 200,000 células/mL en cubreobjetos de vidrio de 18 mm previamente cubiertos con poli-L-lisina (0.25% PV, Sigma, EEUU) sobre una placa de cultivo. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> y el medio se cambió cada 3 días. El medio de cultivo contenía 90% MEM (Gibco, EEUU), 5% de suero de caballo (Hyclone, USA), 5% de suero bovino fetal (Hyclone, EEUU) y suplemento neuronal N3 (0,5 %). Las neuronas se dejaron crecer por un mínimo de 10 días antes de ser utilizadas.

Se utilizó esta metodología para los objetivos específicos 1, 2 y 3.

### 2.2. Preparación del péptido beta amiloide

A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 humano se compró de la empresa GeneMedSyn (EEUU). A $\beta$  se disolvió en HFIP (10 mg/mL) y se almacenó en alícuotas a -20 °C. Para la preparación de agregados de A $\beta$  (80  $\mu$ M), se agregaron 137,5  $\mu$ L de agua desionizada (Gibco, EEUU) a alícuotas de 5  $\mu$ L del stock de péptido, y se agitó continuamente con una barra magnética (200 RPM a 37 °C) durante 24-48 horas y se almacenó a 4 °C hasta su utilización. Para la preparación de las fibras amiloides, esta solución se incubó a 37°C por 7 días. Para caracterizar la presencia de oligómeros y fibras de A $\beta$  (A $\beta$ <sub>o</sub>) en las preparaciones utilizadas en todos los experimentos, se utilizó microscopía electrónica de transmisión (MET) acoplada a *immunogold* (anticuerpos asociados a partículas de oro) que mostró la presencia de estructuras esféricas o en forma de disco de A $\beta$  que varían

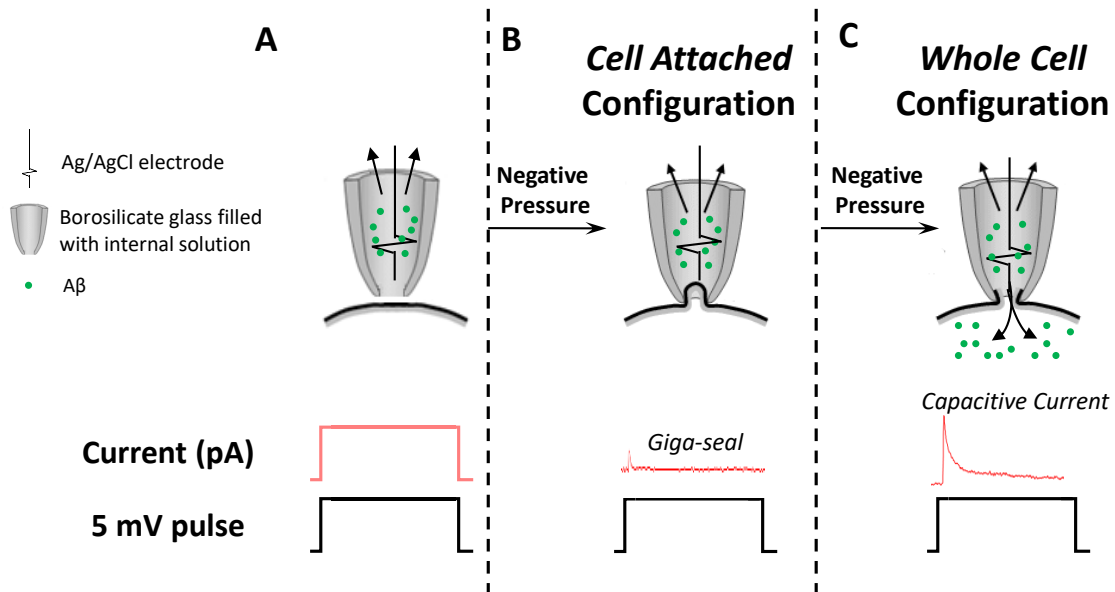
en tamaños de 5 a 25 nm aproximadamente, lo que demuestra la presencia de diferentes tamaños de oligómeros amiloides en las preparaciones utilizadas (detalles en sección 2.4 de materiales y métodos).

Se utilizó esta metodología para los objetivos específicos 1, 2 y 3.

## **2.3. Electrofisiología**

### **2.3.1. Configuración de célula completa (*whole cell*)**

Los registros en este modo se realizaron mediante la utilización de un electrodo de registro (o electrodo indicador  $E_{Ind}$ ) compuesto de un capilar de borosilicato con un filamento de Ag/AgCl y una solución fisiológica (denominada solución interna) en su interior y un electrodo de referencia presente en la solución extracelular de registro (electrodo de referencia  $E_{Ref}$ ) (**Fig. 3A**). La aproximación de  $E_{Ind}$  a la superficie de la membrana celular se monitoreó de acuerdo a la resistencia del mismo, la cual se obtuvo mediante la medición de la corriente transitoria generada por la aplicación de un pulso de 5 mV por 20 ms (**Fig. 3A**). Esto nos permitió monitorear la cercanía del electrodo a la membrana y mediante la aplicación de una presión negativa la membrana celular se introdujo dentro del capilar de borosilicato sin romperse, alcanzando la configuración que recibe el nombre de "*Cell attached*" (**Fig. 3B**). Esta se caracteriza porque existe un sello de alta resistencia entre el electrodo de registro y la membrana de la célula (denominado Giga-sello o "*Giga-seal*"). Aquí se realizó el ajuste para compensar la capacitancia del capilar de borosilicato. Posteriormente y mediante la aplicación de una segunda presión positiva se produce el rompimiento de la membrana celular, alcanzando el modo de *Whole cell* o célula completa (**Fig. 3C**), la cual se caracteriza por la aparición de una corriente transitoria que recibe el nombre de "Corriente Capacitativa" (**Fig. 3C**) y que es producto de la respuesta de la membrana a la aplicación del pulso de 5 mV. De esta manera el contenido presente en el electrodo de registro dializa la célula registrada y se pueden medir los cambios en el voltaje con respecto a un electrodo de referencia presente en la solución extracelular de registro (detalles de su composición más abajo) (**Fig. 3**). Posteriormente se realizaron los ajustes para compensar la capacitancia de la



**Figura 3. Esquema metodológico para el registro en modo célula completa. A,** Se observa el electrodo de registro o electrodo indicador, su composición y su ubicación sobre la célula a registrar. **B,** Aplicación de una presión negativa sobre la membrana celular para alcanzar la configuración de *cell attached*, caracterizada por la aparición de una corriente transitoria o *peak* capacitativo (que es producto de la capacitancia del capilar de borosilicato y se compensa para evitar errores en las mediciones). Al ser un sello de alta resistencia con valores del orden de Giga-Ohms ( $G\Omega$ ) se denomina *Giga-seal*. **C,** Aplicación de una segunda presión negativa para producir el rompimiento de la membrana celular y alcanzar la configuración de *whole cell*. En esta etapa el contenido del electrodo de borosilicato dializa a la célula con la solución interna que contiene. La aparición de una corriente transitoria de mayor amplitud producto de la respuesta de la membrana al pulso de 5 mV se denomina corriente capacitativa. Modificada de <http://www.bem.fi/book/04/fi/0427.gif>

célula, la resistencia en serie ( $R_s$ ) y se procedió a realizar los registros *voltage-clamp* o *current-clamp*.

### **2.3.2. Registro de corrientes sinápticas y evocadas en modo *voltage-clamp* (*in vitro*)**

Durante este estudio se empleó una variante de la técnica de *patch clamp*, que involucró registros en modo "célula completa" o "*whole cell*" [89] para simultáneamente registrar corrientes sinápticas, corrientes evocadas a voltaje constante (modo *voltage-clamp*) y aplicar péptido A $\beta$  intracelularmente a través de la solución interna contenida en el electrodo de registro (**Fig. 3**). Se utilizaron electrodos con una resistencia de 4-5 M $\Omega$  a partir de capilares de borosilicato (WPI, EEUU) en un *puller* horizontal (Sutter Instruments, EEUU). La solución interna en los electrodos utilizada para registrar corrientes sinápticas (solución interna A) contenía (en mM): 120 KCl, 2.0 MgCl<sub>2</sub>, 2 Na<sub>2</sub>ATP, 10 BAPTA, 0.5 NaGTP y 10 HEPES (pH 7.4 ajustado con KOH, 290 mOsm/L). En algunos experimentos se reemplazó el BAPTA (agente quelante de Ca<sup>2+</sup>) de la solución interna por EGTA 5 mM junto con la adición de 0.5 mM de CaCl<sub>2</sub> el día del experimento para aumentar la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular libre. En la condición con BAPTA 10 mM la concentración global de calcio intracelular fue cercano a  $\sim 0$  nM y  $\sim 50$  nM en la condición con EGTA 5 mM [90]. El medio de cultivo del plato se reemplazó por una solución externa normal (SEN) conteniendo (en mM): 150 NaCl, 5.4 KCl, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 HEPES (pH 7.4 ajustado con NaOH, 310 mOsm/L). Para estudiar las corrientes post-sinápticas miniatura (mPSCs) se aplicó TTX (Alomone Labs, Israel) 500 nM en la SEN del pocillo conteniendo las células para inhibir los canales de sodio dependientes de voltaje (VGNCs) e inhibir la generación de potenciales de acción. Para aislar las corrientes AMPAérgicas (mEPSCs), se utilizó: TTX 500 nM en la solución extracelular del pocillo conteniendo las células, y utilizando un sistema de perfusión se aplicaron extracelularmente inhibidores de la transmisión sináptica NMDAérgica (2-amino-5-fosfonopentanoato (DAPV) 20  $\mu$ M), Glicinérgica (estricnina 1  $\mu$ M) y GABAérgica (bicuculina 4  $\mu$ M). Para aislar las corrientes GABAérgicas (mEPSCs) se utilizó la misma aproximación, perfundiendo DAPV 20  $\mu$ M, estricnina 1  $\mu$ M y un inhibidor de transmisión

AMPAérgica (6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona, CNQX 4  $\mu$ M) (todos los inhibidores de transmisión sináptica se compraron en la compañía Tocris, EEUU). Para las corrientes evocadas AMPAérgicas (eEPSCs) y GABAérgicas (eIPSCs) se utilizó 500 nM de TTX en el pocillo de registro, y mediante un sistema de perfusión, se aplicó extracelularmente 100  $\mu$ M de AMPA y GABA, respectivamente. Todos los registros de corrientes (sinápticas y evocadas) se realizaron en el modo *voltaje-clamp* (voltaje constante) ajustando el potencial de membrana a -60 mV, utilizando un amplificador Axopatch-200B (Molecular Devices, EEUU) y un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200-U, Japón). La adquisición se realizó utilizando un computador conectado al sistema de registro mediante una tarjeta de adquisición Digidata 1440A (Molecular Devices, EEUU) y el programa computacional pClamp10 (Molecular Devices, EEUU).

### **2.3.3. Registro de potencial de membrana ( $V_m$ ) en modo *current-clamp* (*in vitro*)**

Para estudiar el potencial de membrana ( $V_m$ ) se realizaron registros en modo *current clamp* como ha sido previamente descrita [91] y se utilizó la siguiente solución interna (solución interna B) (en mM): 114 Gluconato de potasio, 4 KCl, 4 MgCl<sub>2</sub>, 10 BAPTA y 10 HEPES (pH 7.4 ajustado con KOH, 290 mOsm/L). Para evocar potenciales de acción se utilizó una familia de pulsos de corriente aplicados durante 300 ms (pulsos desde -300 pA a +275 pA, incrementando gradualmente la corriente en 25 pA entre cada uno). En algunos experimentos se utilizó el inhibidor intracelular de canales de sodio dependientes de voltaje (QX-314) (Tocris, EEUU). Antes de iniciar el registro de potenciales de acción evocados, se aplicó una pequeña corriente de mantención (-2 a -50 pA) para llevar el potencial de membrana de reposo (RMP) a -70 mV (que corresponde al valor de potencial de membrana de reposo de neuronas hipocámpales).

Es importante considerar que  $V_m$  depende de la diferencia de cargas dentro y fuera de la célula, las cuales están dadas por la concentración de los diferentes iones (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, entre los más importantes) [92]. A su vez, cuando esas concentraciones intra y extracelulares cambian debido al flujo de estos a través de la membrana y se

genera un cambio en el valor de  $V_m$ , el cual se registra mediante esta técnica. Considerando el gradiente electroquímico, para un determinado  $V_m$  existe un determinado flujo de iones, y el valor del potencial en el cual se anula el flujo neto de un determinado ion, se denomina potencial de reversión o de equilibrio ( $E_{rev}$ ). Éste puede ser calculado para cada ion mediante la ecuación de Nernst:

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[ion]_o}{[ion]_i} \quad (1)$$

En donde  $[ion]_o$  y  $[ion]_i$  son las concentraciones extra e intracelulares del ion, respectivamente; R la constante termodinámica de los gases; T la temperatura absoluta; z la valencia del ion (+1 para iones potasio y sodio, -1 para cloruro y +2 para el calcio) y F la constante de Faraday. El factor  $RT/zF$  a temperatura ambiente de los registros ( $\sim 20$  °C), alcanza un valor aproximado de 25 mV. Teniendo esto en consideración, se obtuvieron los valores de  $E_{rev}$  para cada ion tanto para la solución interna utilizada en registros de corrientes sinápticas (solución interna A), como para la solución interna empleada en los registros de potencial de membrana (solución interna B) (Tabla 1).

Ion	$[ion]_i$ (mM)	$[ion]_o$ (mM)	$E_{rev}$ (mV)
<b>Sodio (Na<sup>+</sup>) (solución Interna A y B)</b>	2	150	+108
<b>Potasio (K<sup>+</sup>) (solución Interna A y B)</b>	158	5.4	-84
<b>Cloruro (Cl<sup>-</sup>) (solución Interna A)</b>	124	161.4	-6
<b>Cloruro (Cl<sup>-</sup>) bajo (solución Interna B)</b>	12	161.4	-66

**Tabla 1. Concentraciones intra y extracelulares de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> y potencial de reversión ( $E_{rev}$ ) para cada uno de los iones en las condiciones experimentales utilizadas en los registros electrofisiológicos.** Se detallan las concentraciones utilizadas para el registro en modo *voltage-clamp* de corrientes sinápticas (solución interna A) y de potencial de membrana ( $V_m$ ) en modo *current-clamp* (solución interna B).  $[ion]_i$  e  $[ion]_o$  indican la concentración (en mM) del ion intracelular y extracelular, respectivamente. En ambos tipos de registro se utilizó la misma solución extracelular (solución externa normal).

Dado que el  $E_{rev}$  de Cl<sup>-</sup> en las condiciones para registrar potencial de membrana (-66 mV) está cercano al valor de  $V_m$  en reposo (-70 mV), la contribución de este ion a

este valor de  $V_m$  es prácticamente nula. De esto se extrapola que la mayor contribución a los valores de  $V_m$  en estas condiciones experimentales, está dada por el ion  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (de importancia para la interpretación de la Fig. 8).

Las células se estabilizaron a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de comenzar los experimentos. Después de 1 minutos de alcanzar la configuración de *whole cell* y permitir la diálisis del péptido y de realizar los ajustes necesarios para el registro adecuado, se comenzó a registrar y **este tiempo se consideró como  $t = 1'$** . Los registros se realizaron utilizando un amplificador Axopatch-200B (Molecular Devices, EEUU) y un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200-U, Japón). La adquisición se realizó utilizando un computador conectado al sistema de registro mediante una tarjeta de adquisición Digidata 1440A (Molecular Devices, EEUU) y el programa computacional pClamp10 (Molecular Devices, EEUU).

Se utilizó esta metodología para los objetivos específicos 1, 2 y 3.

#### **2.3.4. Estudios de corrientes sinápticas en modo *voltage-clamp* en rebanadas de cerebro (*ex vivo*)**

Para los registros de corrientes sinápticas en rebanadas de cerebro, se sedaron las ratas con isoflurano y se decapitaron. Se extrajo el cerebro y se realizaron cortes coronales de hipocampo de 300-400  $\mu\text{m}$  de grosor en un vibrátomo VT1200S (Leica, Alemania) en una solución de corte fría conteniendo: 194 Sacarosa, 30 NaCl, 4.5 KCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , 1.2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 10 Glucosa. Una vez obtenidas las rebanadas, se dejaron reposar en una cámara a temperatura ambiente ( $22^\circ\text{C}$ ) por 1 hora en fluido cerebroespinal artificial (aCSF) burbujeando con 95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$  (carbógeno). La solución de aCSF contenía (en mM): 120 NaCl, 3 KCl, 2  $\text{MgSO}_4$ , 2.5  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25  $\text{NaHCO}_3$  y 20 glucosa. Todos los registros de corrientes sinápticas miniaturas se realizaron en el modo *voltage-clamp* (voltaje constante) ajustando el potencial de membrana a  $-60$  mV.

Se utilizó esta metodología para el objetivo específico 1.

### **2.3.5. Registros de Vm en modo current-clamp en cerebro de animales anestesiados (*in vivo*)**

Todos los experimentos en animales *in vivo* fueron aprobados por el Comité Nacional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto Nacional de Salud e Investigaciones Médicas De Francia (INSERM) y de acuerdo con las directivas del Consejo de la Comunidad Europea (2010/63 /UE). Los datos se obtuvieron de ratas *Wistar* macho entre las edades del día 25 postnatal (P25) a P35 (rango de peso, 90-110 g). El día del registro se anestesiaron los animales (inducción: isoflurano 3%; mantenimiento: Xylazina/Ketamina 10/100 mg/Kg, suplementado con ketamina 20 mg/Kg). El nivel de anestesia se evaluó mediante el pinzamiento del pie, la temperatura corporal y la frecuencia respiratoria. La temperatura corporal se mantuvo a 37 ° C con una manta térmica (FHC). Los animales se fijaron en un aparato estereotáxico (SR-6, Narishige, Japón). Se aplicó un analgésico local (lidocaína) como un gel en las barras del sistema estereotáxico para reducir el dolor durante la fijación de la cabeza con las barras del sistema estereotáxico y además se inyectó como líquido debajo de la piel antes de la primera incisión. Se aplicó un gel oftálmico a los ojos para evitar que se secan durante la cirugía, y se cubrieron los ojos con un trozo de cartón para protegerlos de la luz durante la cirugía. Se expuso el cráneo y se perforaron dos craneotomías pequeñas (~1,5 mm de diámetro) sobre ambos hipocampos (-3,5 mm posterior a bregma; 2,5 mm lateral a bregma) para registrar en la zona CA1 (~3 mm de profundidad desde la superficie del cerebro). El Vm de las neuronas de CA1 se registró en el modo de *current clamp*, utilizando técnicas estándar para registros "en ciego" (*blind patch clamp*) de célula completa *in vivo* [93]. Los electrodos de borosilicato utilizados tenían una resistencia de 7-10 M $\Omega$  y contenían una solución interna conteniendo (en mM): 130 KMeSO<sub>4</sub>, 5 KCl, 5 NaCl, 10 HEPES-K, 2.5 MgATP, 0.3 NaGTP, 0.2 EGTA y 0.1 % de biocitina (pH 7.25, ajustado con KOH). La Vm se amplificó mediante un amplificador Axoclamp-700B (Molecular Devices), se filtró a 3 kHz y se digitalizó con un digitalizador Digidata 1440A (Molecular Devices) a 20 kHz. Para el análisis adicional, solo se mantuvieron las células con Vm en reposo bajo -55 mV y resistencia de membrana (R<sub>m</sub>) >100 M $\Omega$ .



Al final de los registros, y para confirmar la zona del registro y la morfología de las neuronas registradas, se les inyectó a los animales una sobredosis de ketamina y se perfundieron transcárdialmente con solución de PBS 1x seguida de paraformaldehído al 4% para fijarlo. Al día siguiente, se cortaron cortes coronales de 70  $\mu\text{m}$  de grosor y se procesaron *post hoc* con el método de estreptavidina asociada al fluoróforo CY3 (Jackson ImmunoResearch, EEUU) para visualizar las neuronas conteniendo biocitina. La morfología de las células registradas se reconstruyó utilizando el software NeuroLucida (MBF Bioscience, EEUU) (ejemplo en Fig. 6).

Se utilizó esta metodología para el objetivo específico 1.

#### **2.4. Inmunogold y Microscopía Electrónica de Transmisión**

Un volumen de 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{A}\beta$ , a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , se aplicó sobre una grilla de Níquel (ORIGEN). Luego de eliminar el exceso, se bloqueó con BSA al 3% en TBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se lavó con TBS y se incubó con el anticuerpo primario de ratón anti- $\text{A}\beta$  (WO2 1:50/TBS 0,1%) (Merck Millipore, Alemania) por 30 minutos. Se lavó nuevamente y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón (1:20) (Abcam, EEUU) conjugado a nanopartículas de oro de 5 nm por 30 minutos. Se fijaron las muestras con glutaraldehído al 2% por 5 minutos. A continuación, se tiñeron los agregados de  $\text{A}\beta$  con 10  $\mu\text{L}$  de ácido fosfotúngstico (PTA) al 0,5 % por un minuto. Después, se retiró el exceso y se lavó con agua destilada 2 veces por 5 minutos. Las grillas se dejaron secando a temperatura ambiente y se observaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200 EX II (Japón).

Se utilizó esta metodología para el objetivo específico 1.

#### **2.5. Registros simultáneos de electrofisiología y fluorescencia**

Estos estudios simultáneos se realizaron utilizando la misma metodología descrita para el registro de corrientes sinápticas en modo *voltage-clamp* (*in vitro*) junto con la fluorescencia bajo las siguientes condiciones para NO. Se incubaron neuronas hipocámpales con la sonda para óxido nítrico DAQ (1,2-aminoantraquinona) (Sigma,

Alemania) a una concentración de 2.5 mg/mL durante 20 min a 37 °C. Las neuronas se lavaron 3 veces con solución externa normal y se montaron en un pocillo en un microscopio invertido (TE200U, Nikon, EE.UU) equipado con una cámara CCD IonXEM de 16 bits (Andor, Japón), un objetivo 20X / 0.4 NA (Nikon, Japón) y una configuración de *Patch Clamp* para estudios *in vitro* (detalles en sección 2.3.1 de materiales y métodos). La señal fluorescente para la sonda de óxido nítrico DAQ se obtuvo excitando con un filtro de pasabanda (528-553 nm) y colectando la fluorescencia con un filtro de emisión de pasabanda (590-650 nm) (Nikon, EEUU). La adquisición de imágenes se realizó con un obturador Lambda 10-B controlado por computadora (Sutter Instruments, EEUU), utilizando el software Imaging Workbench 5.0 (INDEC BioSystems, EEUU) y excitando por un periodo de 900 ms, a intervalos de 2 s durante un período continuo de 20 min. Algunos experimentos involucraron el uso de otras moléculas: L-NAME (inhibidor de sintasas de NO), 1400W (inhibidor de iNOS), SNAP (donante de NO) y CPTIO (molécula que secuestra NO). Se prepararon stocks frescos de todas ellas el mismo día en que se realizó el experimento.

Se utilizó esta metodología para el objetivo específico 3.

## **2.6. Análisis de Datos**

Todos los datos obtenidos se analizaron y graficaron utilizando el programa Origin 8.0 (Origin Labs, EEUU). A menos que se indique lo contrario, los resultados se presentaron como el promedio  $\pm$  SEM. Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo utilizando el test de *Student* o ANOVA seguido de test *post-hoc* (Bonferroni). Un nivel de probabilidad (p) menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Las corrientes sinápticas miniatura (eventos espontáneos registrados en presencia de tetrodotoxina (TTX)) se detectaron utilizando el software Mini Analysis (Synptosoft, EEUU), que identifica las corrientes en función de varios criterios como la amplitud el área bajo la curva y el tiempo de decaimiento de cada evento. Como verificación de rutina, inspeccionamos visualmente todos los eventos detectados por el software y rechazamos cualquiera que no exhibiera la forma general esperada para eventos sinápticos. El ruido

de fondo se midió a partir de secciones carentes de eventos sinápticas, el cual oscilaba en  $\sim 2$  pA. Se utilizó este valor multiplicado por 5 (10 pA), como umbral para detectar las corrientes sinápticas. Los registros de *current clamp* se analizaron el *software* Clampfit 11.0 (Molecular Devices, EEUU) para calcular el umbral, amplitud, duración y frecuencia de los PAs.

Se utilizó esta metodología para los objetivos específicos 1, 2 y 3.

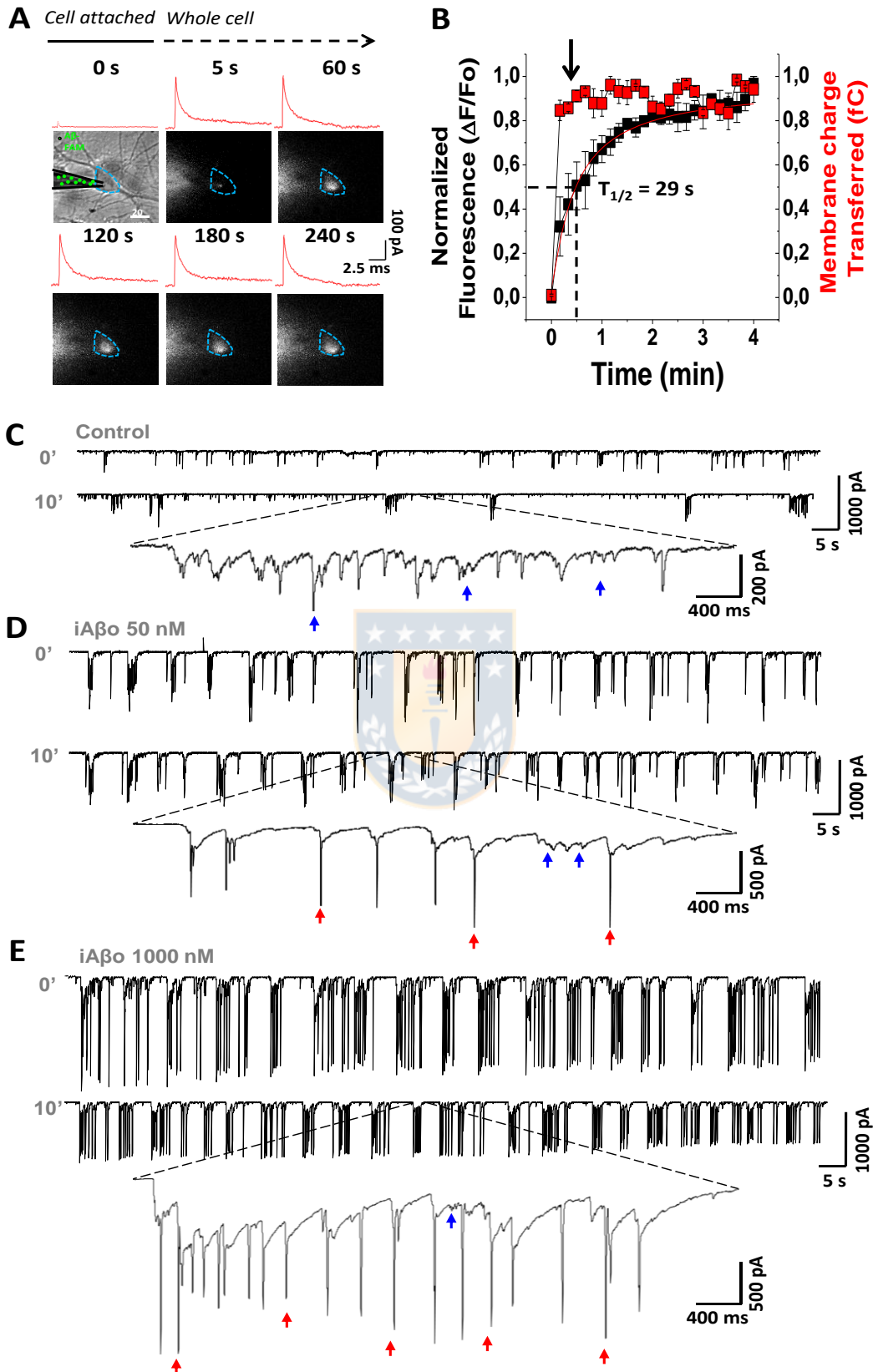


## 3. RESULTADOS

### 3.1. Objetivo Específico 1: Estudiar los efectos de diferentes concentraciones de agregados oligoméricos y fibras de A $\beta$ intracelular sobre la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal, determinando su especificidad sobre los dos tipos de neurotransmisión (excitatoria e inhibitoria).

Utilizando una variante de la técnica de *patch clamp* en modo *whole cell*, se utilizó el electrodo de vidrio para simultáneamente registrar la corriente capacitativa de la neurona en estudio y, a través de la solución interna en el electrodo, se aplicaron oligómeros de A $\beta$  (A $\beta$ ) asociados a un fluoróforo dentro del compartimento intracelular. De esta manera y utilizando microscopía de fluorescencia se monitoreó la diálisis del péptido presente en el electrodo de registro hacia el citoplasma neuronal (**Fig. 4A**), al mismo tiempo en que se registraba la corriente capacitativa de la membrana (la cual se expresó como carga transferida en unidades de fC). Esta última permite asegurar que el registro era en modo célula completa o *whole cell* y nos indicó que en ese momento podíamos acceder al interior de la célula con la solución contenida en el interior del electrodo de vidrio con A $\beta$ . Podemos observar que a 0 s no hay carga transferida (modo *cell attached*), ni aumento en la fluorescencia (**Fig. 4B**). Sin embargo, a los 5 segundos el registro se encontraba en modo *whole cell* (aumentando significativamente la carga transferida), y a medida que transcurrió el tiempo, aumentó la fluorescencia en el citoplasma de manera exponencial, alcanzando su punto máximo alrededor de los 2 minutos ( $t_{1/2} = 29$  s). Una vez que confirmamos que A $\beta$  se dializaba rápidamente al compartimento intracelular, decidimos registrar las corrientes sinápticas totales en neuronas hipocampales, durante aplicación intracelular de A $\beta$  (iA $\beta$ ) a diferentes concentraciones en la pipeta (0, 50 y 1000 nM). En **Fig. 1C** se muestran los registros en modo *voltage-clamp* estabilizados de la actividad sináptica total en modo *whole cell* de corrientes sinápticas a  $t = 0$  y 10 minutos, cuando se realiza con una solución intracelular control (sin A $\beta$ ). Bajo estas condiciones se observó la presencia de eventos sinápticos espontáneos (sin TTX) a frecuencia y amplitud control. Además, se observan

algunos eventos de muy baja amplitud intercalados en el registro, que posiblemente corresponden a corrientes miniatura. Como se aprecia, esto es relativamente estable en un período de 10 minutos. En la presencia de una concentración baja de A $\beta$  en el electrodo (50 nM), se observó un aumento, tanto en la amplitud como en la frecuencia de las corrientes sinápticas, desde el inicio del registro (**Fig. 4D**). Junto con eso, se pueden apreciar una serie de ráfagas de corrientes sinápticas espontáneas intercaladas en el registro (**Fig. 4, flechas en azul**), en donde la célula dispara respuestas en forma repetitiva, las cuales están asociadas a la liberación sincrónica de neurotransmisores. Al aplicar 1  $\mu$ M de A $\beta$  en la pipeta (**Fig. 4E**), el efecto se exacerbó en términos de la amplitud y frecuencia de eventos sinápticos. Es posible observar que mucha de la actividad total esta mediada por potenciales de acción (PAs, o espigas en registro de corriente) (**Fig. 4, flechas en rojo**) y en la condición con iA $\beta$  1  $\mu$ M predomina la alta presencia de estas (**Fig. 4C, flechas en rojo**). Esto pareciera ser un fenómeno concentración-dependiente, dado que hay más ráfagas de actividad sináptica y de mayor amplitud (mayor actividad sináptica) a medida que se aumentó la concentración de A $\beta$ , comparado con el control. De este experimento concluimos que la aplicación de iA $\beta$  causa un efecto importante en la transmisión sináptica de la célula, y que se caracteriza por ser un fenómeno que ocurre de manera rápida ( $\sim$ 1 minuto), aumentando la frecuencia y la amplitud de los eventos sinápticos de manera concentración dependiente. El efecto coincide temporalmente con la diálisis del péptido a la neurona. Adicionalmente, a los 10 minutos se observa una disminución en la amplitud de las espigas de PA. Dado que la amplitud de una espiga de PA depende de la cantidad de iones sodio que permean la membrana, entonces es posible que una fracción de estos canales se estén inhibiendo o endocitando, disminuyendo la amplitud de la respuesta. La presencia intracelular del péptido podría también tener una implicancia en este fenómeno. Además de eso, el registro se realizó a -60 mV, y a ese potencial existe aún una fracción de canales de sodio que están inactivos.



**Figura 4: Técnica de whole cell permite la entrada rápida de A $\beta$  fluorescente al medio intraneuronal.** **A,** Registro simultáneo de *patch clamp* y fluorescencia mostrando el ingreso de péptido A $\beta$ 42 marcado fluorescentemente (fluorocromo 5' FAM) desde el interior del electrodo de registro (o pipeta de patch) al medio intracelular. La región de interés (ROI) en celeste delimita el contorno de la neurona registrada. Dentro de esta región se realizó la cuantificación de fluorescencia y se observó que esta aumenta en el interior de la célula a lo largo del experimento (0-4 min). Junto con esto se observan los trazos de las corrientes capacitativa correspondientes a cada micrografía (en rojo). **B,** Cuantificación de la fluorescencia en el ROI previamente descrito, junto con la carga transferida en la membrana. Esta última refleja que la solución contenida en la pipeta de patch alcanza instantáneamente el compartimento intracelular, mientras que la fluorescencia da cuenta de un ingreso gradual del péptido, alcanzando el 50% del valor total de fluorescencia a los 29 s (T1/2). La flecha en negro indica el tiempo en que se comenzaron a registrar las corrientes sinápticas). **C, D, E,** Se observan registros sinápticos totales al inicio (tiempo = 0') y término del experimento (tiempo = 10'), demostrando un rápido y marcado aumento de la frecuencia y la amplitud de las corrientes sinápticas a medida que se aumenta la concentración de oligómeros de A $\beta$  intracelular (iA $\beta$ ) en la pipeta de 50 nM (D) a 1000 nM (E), comparado con la condición control (**C**). Intercalados en el registro se observan ráfagas de corrientes sinápticas (flechas en azul) y potenciales de acción (PAs, o espigas en registro de corriente) en rojo, las cuales aumentan a medida que se incrementa la concentración de iA $\beta$  en el electrodo de registro. Los gráficos de líneas representan el promedio  $\pm$  SEM. n=18 células de 5 experimentos independientes.

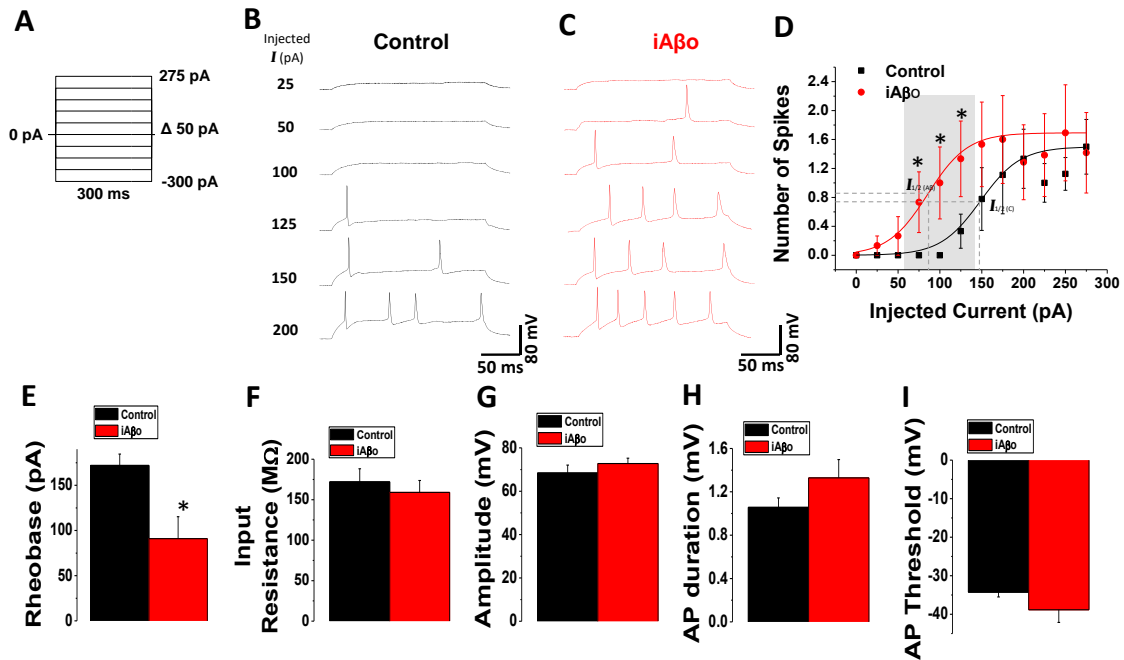
---

Aunque la respuesta es compleja de interpretar, este primer experimento fue informativo en términos del aumento en la frecuencia de eventos sinápticos, lo cual se debe a la presencia intracelular de A $\beta$ , y cuyo efecto es dependiente de la concentración del mismo. Sabemos que para que se registren corrientes sinápticas a nivel post-sináptico debe existir liberación de neurotransmisores a nivel pre-sináptico.

En las condiciones experimentales evaluadas previamente, la liberación sincrónica de neurotransmisores que se observó (**Fig. 4**) es un fenómeno dependiente del potencial de acción [94]. Por ese motivo, se evaluó si el aumento en la transmisión sináptica en presencia de A $\beta$  se debía a un aumento en el disparo de potenciales de acción (excitabilidad neuronal). Para esto se realizaron registros en el modo *current-clamp*, inyectando una familia de pulsos de corriente hiperpolarizante (desde -300 a -25 pA) y depolarizante (de +25 a +275 pA) (**Fig. 5A**) para generar potenciales de acción (PAs). Bajo este protocolo de estimulación se observó en ambas condiciones experimentales ensayadas (control y A $\beta$ ) el aumento progresivo en el disparo de PAs a medida que se incrementó el estímulo de corriente inyectada. La diferencia es que en condiciones control se evocaron PAs por sobre los 100 pA de corriente inyectada (**Fig. 5B**), mientras que la presencia de iA $\beta$ , la célula evocó PAs con pulsos de corriente de menor amplitud (**Fig. 5C**). La cuantificación de este fenómeno se observó al graficar el

número de espigas de PAs v/s la corriente inyectada, mostrando un claro desplazamiento de la curva de respuesta hacia la izquierda (**Fig. 5D**), indicando un aumento de la respuesta a menores estímulos de corriente con  $iA\beta_0$  (Control  $I_{1/2}$ :  $146.8 \pm 12.4$  pA v/s  $iA\beta_0$   $I_{1/2}$ :  $85.3 \pm 16.2$  pA,  $p < 0.05$ , t-test). Esto indica que en presencia de  $iA\beta_0$  la neurona requiere de un estímulo de menor intensidad de corriente para producir la misma respuesta en el voltaje que en la condición control, es decir la célula con  $iA\beta_0$  estaba más excitable. La constante *Rheobase* permite cuantificar este fenómeno y se define como la corriente mínima y de duración ilimitada que se necesita para gatillar el disparo de un PA en una célula excitable [95]. En nuestras condiciones experimentales la *Rheobase* fue estadísticamente diferente cuando comparamos el control con las células tratadas con  $iA\beta_0$  (Control:  $172 \pm 12.6$  pA v/s  $iA\beta_0$ :  $91 \pm 24.21$  pA,  $p < 0.05$ , t-test) (**Fig. 5E**). Adicionalmente, se cuantificó la resistencia de entrada (*input resistance*); cuando se inyecta una cantidad conocida de corriente a la célula (I), se produce un cambio en el voltaje de la membrana (V), y ese cambio en V está relacionado con I mediante la resistencia de la membrana (R) (ley de Ohm:  $V = IR$ ) [92]. Una resistencia mayor, indicaría que la célula requiere menor cantidad de corriente inyectada para producir un cambio en el voltaje de la membrana, algo muy similar a lo que observamos en este experimento: por ejemplo, en las **Fig. 5 B y C**, inyectando 50 pA la célula control no demuestra presencia de PAs en el trazo representativo (en negro) mientras que la célula tratada con  $iA\beta_0$  sí muestra la generación de un PA. Vale decir que, con la misma cantidad de corriente inyectada, la célula con  $iA\beta_0$  sí mostró cambios en el voltaje de la membrana, mientras que la célula control no. Sin embargo, en ambas condiciones los valores calculados para la resistencia de entrada fueron similares (**Fig. 5F**), indicando que los cambios en el voltaje de la membrana no ocurren porque la resistencia de la membrana haya cambiado. Por último, se cuantificaron la amplitud, duración y umbral para los PAs evocados en cada una de las condiciones ensayadas (**Fig. 5G, H e I**), y no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros calculados. En conclusión, estos datos sugieren que la presencia de  $iA\beta_0$  aumentó la excitabilidad de la membrana celular *in vitro*.

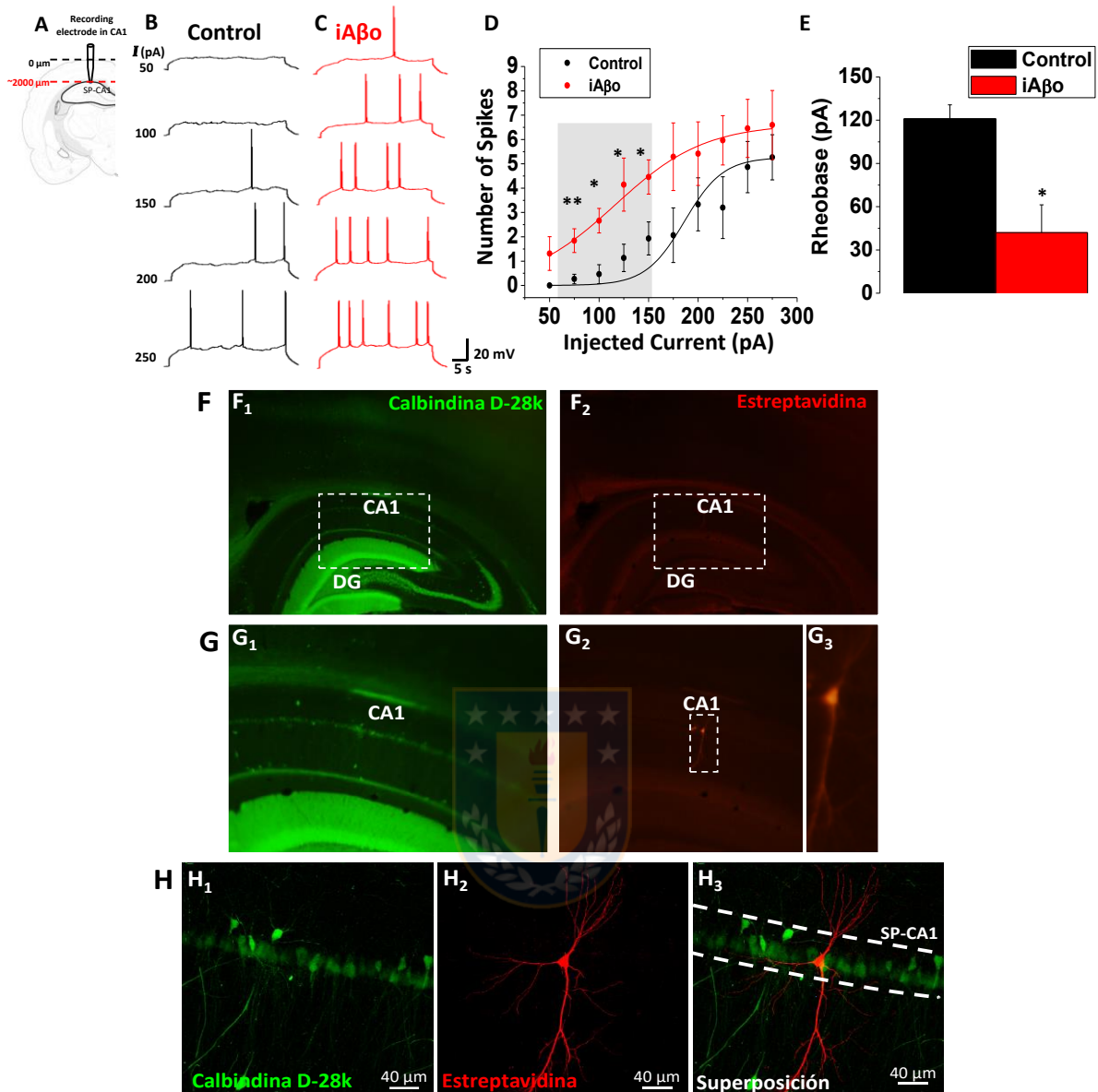




**Figura 5.  $iA\beta_o$  aumentó generación de potenciales de acción evocados por inyección de corriente en neuronas hipocámpales in vitro.** **A, B, C,** Registros de neuronas de hipocampo que muestran las respuestas del potencial de membrana frente a una inyección de una familia de pulsos de corriente de 200 ms que varía de -300 pA a 275 pA en incrementos de 50 pA (**A**), en ausencia (trazos negros) (**B**) y presencia de  $A\beta_{42}$  500  $\mu$ M (trazos rojos) (**C**). **D,** Relación entre el número de potenciales de acción generados y la intensidad de corriente inyectada para las condiciones experimentales descritas en (**B**) y (**C**). **E,** Se muestra la cuantificación de la constante *Rheobase* para ambas condiciones experimentales, observando una disminución en la condición con  $A\beta_o$ . **F, G, H, I,** Cuantificación de la resistencia de entrada y parámetros del potencial de acción: amplitud, duración y umbral, que no muestran diferencias significativas entre las condiciones ensayadas. Los gráficos representan el promedio  $\pm$  SEM. \* denota  $p < 0.05$  (t-test).  $n=12$  de 3 experimentos independientes.

A continuación, quisimos estudiar si  $iA\beta$  tenía el mismo efecto en la excitabilidad neuronal en un modelo *in vivo*. Para esto, se realizaron experimentos de *current clamp* con el mismo protocolo de inyección de corriente previamente utilizado, pero en animales anestesiados, registrando en neuronas hipocampales piramidales en la zona CA1 (**Fig. 6A**). Bajo las mismas condiciones experimentales usadas previamente, se observó que en presencia de  $iA\beta$  se requería de una menor inyección de corriente para gatillar el disparo de PAs, comparado con la condición control (**Fig. 6B y C**). Esto se evidenció de igual manera al graficar el número de espigas de PAs v/s la corriente inyectada, en donde se observa nuevamente que la curva de estímulo-respuesta se desplaza hacia la izquierda, indicando un aumento en la excitabilidad neuronal en presencia de  $iA\beta$  (**Fig. 6D**) y una disminución de la constante *Rheobase* (**Fig. 6E**). Para corroborar que el registro se realizó en la zona CA1 del hipocampo, se realizó una inmunohistoquímica *post-hoc* para identificar la morfología y la ubicación de la célula estudiada. Cabe mencionar que la solución interna del electrodo contenía biocitina 1% (ver Materiales y Métodos sección 2.3.3). De esta manera una vez que se finalizó el registro se procedió a la fijación del animal y posteriormente a la obtención de rebanadas para su tinción con estreptavidina y anticuerpos para calbindina D-28k. Los registros utilizados correspondían a neuronas piramidales de la zona CA1 (**Fig. 6F - H**).

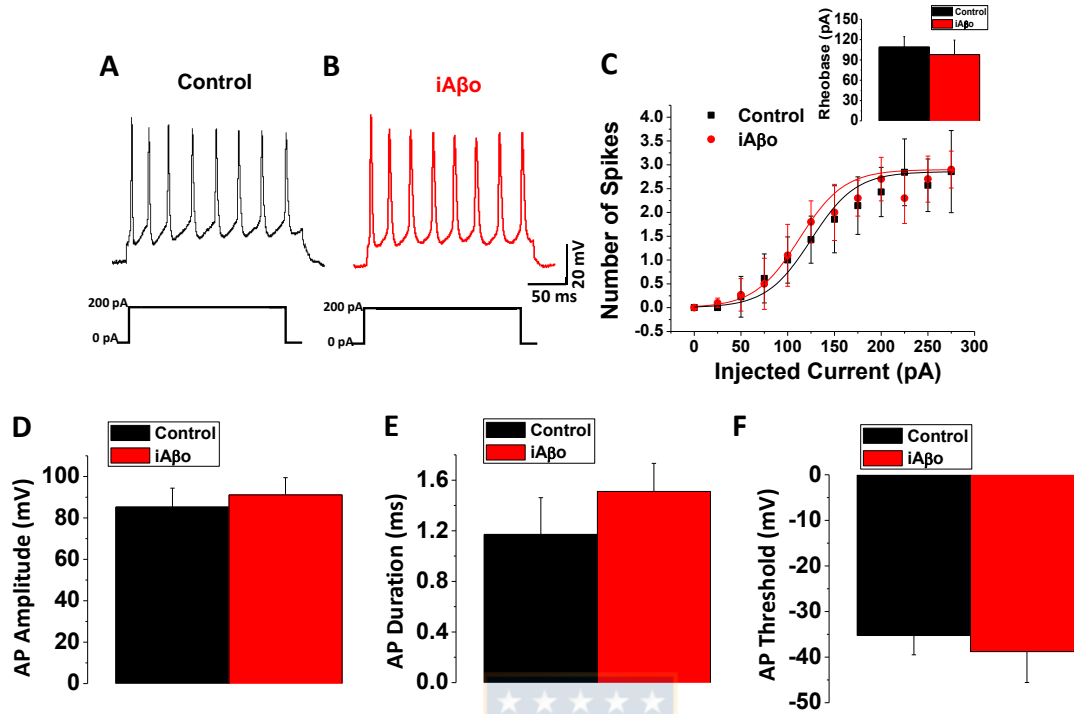
En conclusión, todos estos datos indican que  $iA\beta$  gatilla un fenómeno de excitabilidad neuronal tanto *in vitro* como *in vivo*.



**Figura 6.  $iA\beta o$  aumentó la generación de potenciales de acción evocados por inyección de corriente en neuronas hipocámpicas in vivo.** **A**, Esquema que representa la ubicación del electrodo para registrar los potenciales de acción en la zona *stratum pyramidale* de CA1 del hipocampo (SP-CA1), en donde se encuentran alineados los somas de las neuronas hipocámpicas piramidales. **B**, **C**, Registros de neuronas de hipocampo que muestran las respuestas del potencial de membrana frente a una inyección de una familia de pulsos de corriente de 200 ms que varía de -300 pA a 275 pA en incrementos de 50 pA (**A**), en ausencia (trazos negros) (**B**) y presencia de  $A\beta 42$  500  $\mu M$  (trazos rojos) (**C**). **D**, Relación entre el número de potenciales de acción evocados y la intensidad de corriente inyectada para las condiciones experimentales descritas en (**B**) y (**C**). **E**, Se muestra además la cuantificación de la constante *Rheobase* para ambas condiciones experimentales. **F**, **G**, Cortes coronales obtenidos posterior al registro electrofisiológico, mostrando la tinción para calbindina D-28k (en verde, **F**<sub>1</sub>, **G**<sub>1</sub>) y estreptavidina (en rojo, **F**<sub>2</sub> y **G**<sub>2</sub>), además de las zonas CA1 y giro dentado (DG) de hipocampo. Se observa además la neurona registrada (**G**<sub>3</sub>). **H**, Micrografías confocales, demostrando la presencia de la neurona registrada (en rojo, **H**<sub>2</sub>) dentro del *stratum pyramidale* de la región CA1 de hipocampo (SP-CA1). Los gráficos de barras y de líneas representan el promedio  $\pm$  SEM. \* denota  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  (t-test)  $n=6$  de al menos 5 experimentos independientes.

Posteriormente, nos preguntamos si este aumento en la excitabilidad podría estar mediado por un cambio en las propiedades activas de la membrana (AP). La generación de PAs es un ejemplo de propiedades eléctricas activas de la membrana producidos por la activación de canales dependientes del voltaje. En este caso, el cambio del campo eléctrico a través de la membrana actúa sobre los sensores de voltaje de los canales iónicos dependientes de voltaje, cambiando su conductancia iónica [92]. Por ejemplo, la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje, dará lugar a la entrada de sodio, despolarizando la membrana y generando un potencial de acción. Por otra parte, otro ejemplo de propiedades eléctricas activas es aquella provocada por la activación de canales iónicos producto de la unión a un ligando, donde un neurotransmisor (liberado desde la pre-sinapsis) activará un receptor en la post-sinapsis, alterando transitoriamente su conductancia a determinados iones y permitiendo la generación de potenciales sinápticos. De esta manera, ambos son ejemplos de propiedades activas que pueden contribuir a la excitabilidad neuronal. Sin embargo, la diferencia entre ambas es que la primera puede ocurrir sin la presencia de una sinapsis, mientras que la segunda no, ya que requiere de un componente pre sináptico, que libera estos ligandos y un componente post-sináptico que posee los receptores para estos ligandos. Para poder determinar si el efecto de  $iA\beta_0$  era dependiente de alguna de estas propiedades decidimos utilizar un cultivo de neuronas de ganglio de la raíz dorsal (DRG). En esta preparación *in vitro*, las neuronas tienen la particularidad de que no presentan sinapsis, es decir con este modelo se puede aislar ambos componentes activos y evaluar cuál de ellos está siendo afectado por la presencia de  $iA\beta_0$ .

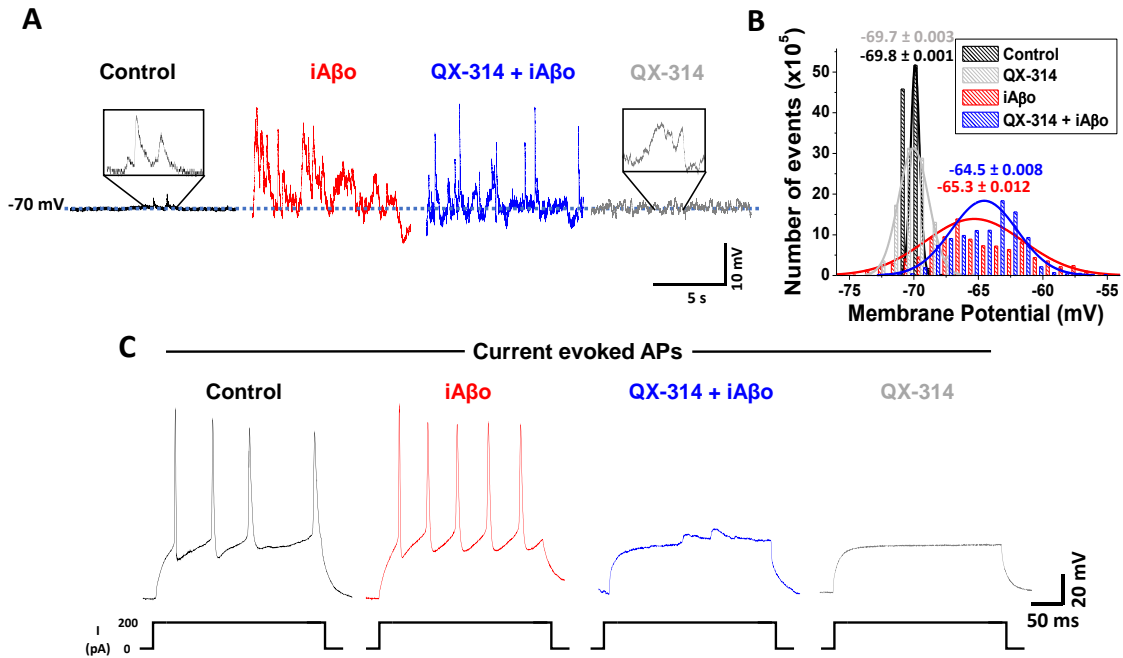
Nuestros resultados mostraron que en estas preparaciones la presencia de  $iA\beta_0$  no afecta las propiedades del potencial de acción, y las células se comportan de la misma manera que en la condición control. Esto se puede apreciar porque el número de espigas de PAs v/s el estímulo aplicado no varía en ambas condiciones (**Fig. 7A y B**). La curva de número de espigas v/s corriente tampoco mostró cambios significativos entre ambas condiciones, así como tampoco la constante *Rheobase* (**Fig. 7C**), contrario a los resultados encontrados en neuronas hipocámpales (**Fig. 5A - E**). Adicionalmente, y de la misma manera que en neuronas hipocámpales (**Fig. 5G - I**), no se encontraron



**Figura 7. iAβ0 no aumentó el disparo de los potenciales de acción evocados por inyección de corriente en neuronas de ganglio de la raíz dorsal (DRG) in vitro.** **A, B,** Registros representativos que muestran las respuestas del potencial de membrana frente a una inyección de una familia de pulsos de corriente de 200 ms que varía de -300 pA a 275 pA en incrementos de 50 pA (**A**), en ausencia (trazos negros) (**B**) y presencia de Aβ42 500 μM (trazos rojos) (**C**). **C,** Relación entre el número de potenciales de acción evocados y la intensidad de corriente inyectada para las condiciones experimentales descritas en (**A**) y (**B**). Se muestra además la cuantificación de la constante *Rheobase* para ambas condiciones experimentales. **D, E, F,** Cuantificación de los parámetros del potencial de acción: amplitud, duración y umbral. Los gráficos de barras y de líneas representan el promedio ± SEM. n=10 de 3 experimentos independientes.

diferencias significativas en los parámetros calculados para los PAs evocados en este experimento, como amplitud, duración y umbral (**Fig. 7D, E y F**).

En conclusión, los resultados sugieren que, en ausencia de un *input* sináptico,  $iA\beta_0$  no afecta la excitabilidad de la membrana. Teniendo esto en consideración, y a pesar de que son tipos celulares distintos, se procedió a evaluar los efectos de  $iA\beta_0$  sobre el potencial de membrana de neuronas hipocampales (que sí desarrollan conexiones sinápticas *in vitro*) en presencia y ausencia de un bloqueador de canales de sodio voltaje dependientes (QX-314). Al estar inhibidos los canales de sodio voltaje dependientes, no se producirán PAs. Cabe mencionar que este inhibidor fue aplicado intracelularmente mediante el electrodo de *patch*, de manera que sólo se inhibió el PA en la neurona registrada. Además, se inyectó una corriente basal para mantener el potencial de reposo a -70 mV en todas las condiciones ensayadas. De esta manera, se evaluó la fluctuación del potencial de membrana (Vm). Esas fluctuaciones del potencial de membrana ocurren por la presencia de eventos sinápticos que generan una población de potenciales sinápticos locales que están variando entre -70 y -65 mV (con un promedio de  $-69.8 \pm 0.001$  mV) en la condición control (**Fig. 8A, en negro**) y que se presentan como despolarizaciones transitorias locales en la neurona post-sináptica que fue registrada (se observan con más detalle en el recuadro sobre el trazo representativo) (**Fig. 8A, en negro**); sabemos que son despolarizaciones, pues son eventos hacia valores positivos del potencial fijado a  $\sim -70$  mV por la inyección de corriente (detalles en sección 2.3.2 de materiales y métodos). De esta manera, se construyó un histograma de todos los puntos con cada uno de los valores del potencial de membrana obtenidos durante el registro para determinar su fluctuación (**Fig. 8A y B, en negro**). Al aplicar  $iA\beta_0$  se produce un aumento significativo en el número y en la amplitud de estos eventos despolarizantes (**Fig. 8A, en rojo**), los cuales varían entre -70 y -45 mV. Este aumento en la fluctuación del Vm es la que hace que el promedio en esta condición sea  $-65.3 \pm 0.012$  mV, lo cual se evidenció en el desplazamiento de la curva gaussiana del histograma hacia valores positivos indicando que en estas condiciones el valor del potencial de membrana presenta más variación hacia valores despolarizantes (**Fig. 8B, en rojo**). Es interesante observar que al co-aplicar  $iA\beta_0$  y QX-314 dentro de la célula,



**Figura 8. El bloqueo intracelular de los canales de Na<sup>+</sup> regulados por voltaje no evita la despolarización transitoria y rápida de la membrana activada por iAβo.** **A**, Registros representativos que muestran las fluctuaciones del potencial de membrana (Vm) sin la inyección de corriente bajo las diferentes condiciones ensayadas. En negro (control) se observan pequeñas variaciones en el valor de Vm, las cuales se exacerban en presencia de Aβo intracelular (trazo en rojo). La aplicación intracelular de QX-314 no provocó diferencias en el efecto intracelular de Aβo sobre Vm. **B**, Histograma que muestra la distribución normal de los valores de Vm en las diferentes condiciones experimentales mostradas en (A). **C**, Experimentos de inyección de corriente que demuestran que muestran la inhibición de la generación de potenciales de acción al aplicar intracelularmente el inhibidor del canal de Na<sup>+</sup> regulado por voltaje de QX-314. El histograma representa valores promedio ± SEM. n=10 de 3 experimentos independientes.

no se observan mayores diferencias ni en las fluctuaciones ni en el valor promedio de  $V_m$  ( $-64.5 \pm 0.008$  mV) (**Fig. 8A y B, en azul**), con respecto a la condición en donde se aplicó  $iA\beta_o$  en ausencia de QX-314, en donde los valores promedio de  $V_m$  fueron muy similares ( $-65.3 \pm 0.012$  mV). En presencia de QX-314 observamos que el registrado se comporta de manera muy similar a la condición control (**Fig. 8A y B, en gris**) con un promedio en el valor de  $V_m$  de  $-69.7 \pm 0.003$  mV. Adicionalmente, y en las mismas condiciones experimentales ensayadas con y sin QX-314, se evaluó la generación de PAs cuando se estimuló con un pulso de corriente despolarizante (**Fig. 8C**). Se observó que en presencia de QX-314 no se evocaron PAs (**Fig. 8C, en gris y azul**), a diferencia de las otras dos condiciones en ausencia del inhibidor (**Fig. 8C, en negro y rojo**). Esto datos indican que  $iA\beta_o$  co-aplicado con QX-314 aún ejerce un efecto en la despolarización de la membrana post-sináptica, sugiriendo que este efecto no depende de la presencia de PAs ni de los canales voltaje dependientes asociados a éste.

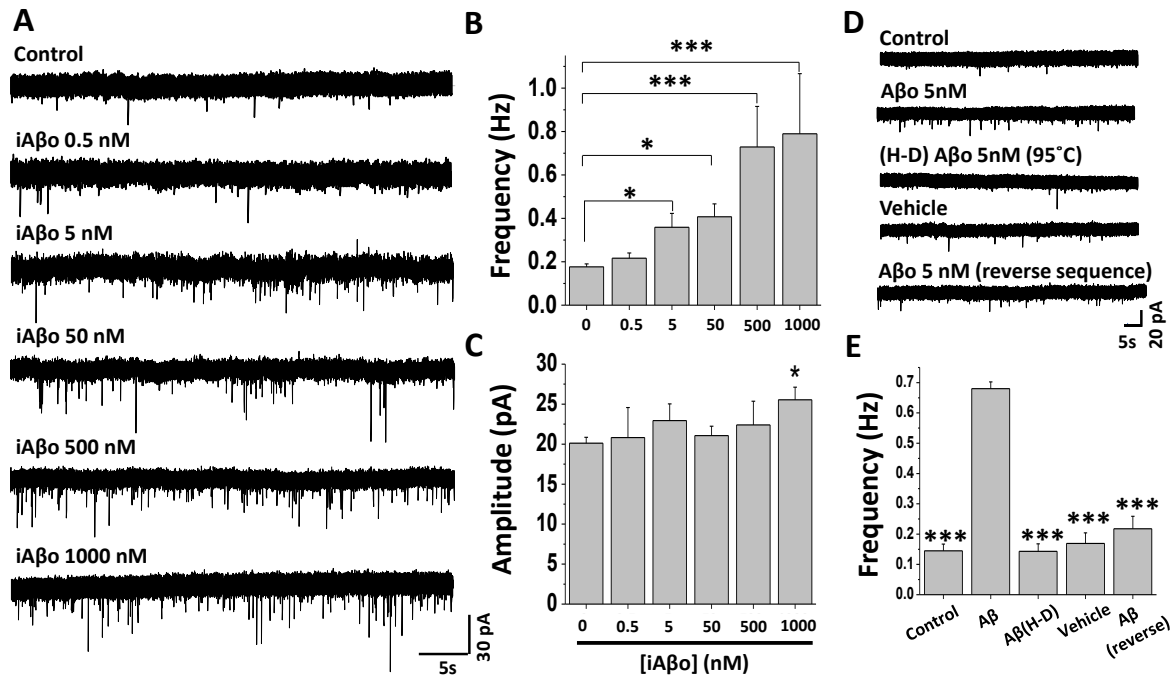
Así, al estar bloqueado el canal de  $Na^+$  regulado por voltaje, y considerando que las despolarizaciones transitorias que se observan en estos registros se deben principalmente a la entrada de  $Na^+$  a la célula (detalles de potencial de reversión de iones en sección 2.3.2 de materiales y métodos), los datos sugieren fuertemente que hay aumento de una conductancia adicional, que seguramente corresponde a la de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, los cuales son permeables a  $Na^+$ . En las condiciones evaluadas la única conductancia de  $Na^+$  que podría estar activa sería la mediada por el receptor de AMPA (ya que el receptor de NMDA en estos voltajes estaría inactivo). Así, el aumento en la conductancia de  $Na^+$  estaría siendo activada directa o indirectamente por la presencia de  $iA\beta_o$ .

En resumen: ¿por qué se producen más despolarizaciones y más potenciales de acción con  $iA\beta_o$ ? Porque existe conductancia adicional que está despolarizando la membrana (**Fig. 8**) y facilitando que los valores de  $V_m$  se acerquen al umbral para poder generar un potencial de acción (que fue justamente lo que se observó previamente tanto *in vitro* como *in vivo*) (**Fig. 5 y 6**).



Por tanto, los datos indicaron que  $iA\beta$  no estaba ejerciendo un efecto en las propiedades intrínsecas de la membrana, tanto en las pasivas (como resistencia de entrada) como en las activas (umbral, amplitud y duración del PA), sino que más bien podría estar alterando las propiedades sinápticas, ya sea afectando la liberación de neurotransmisores a nivel pre-sináptico o la función de los receptores ionotrópicos a nivel post-sináptico, las que a su vez aumentarían la excitabilidad neuronal. Para poder evaluar el efecto de  $iA\beta$  sobre la transmisión sináptica, se realizaron registros en modo **voltage-clamp** de corrientes sinápticas en presencia de TTX extracelular, un inhibidor extracelular de canales de sodio voltaje dependientes (detalles en sección 2.3.1 de materiales y métodos). De esta manera se inhibió la generación de PAs y sólo quedó presente una actividad espontánea de liberación de vesículas sinápticas, conocida como actividad sináptica miniatura o corrientes sinápticas miniaturas (mPSCs) y que son independientes del PA [96].

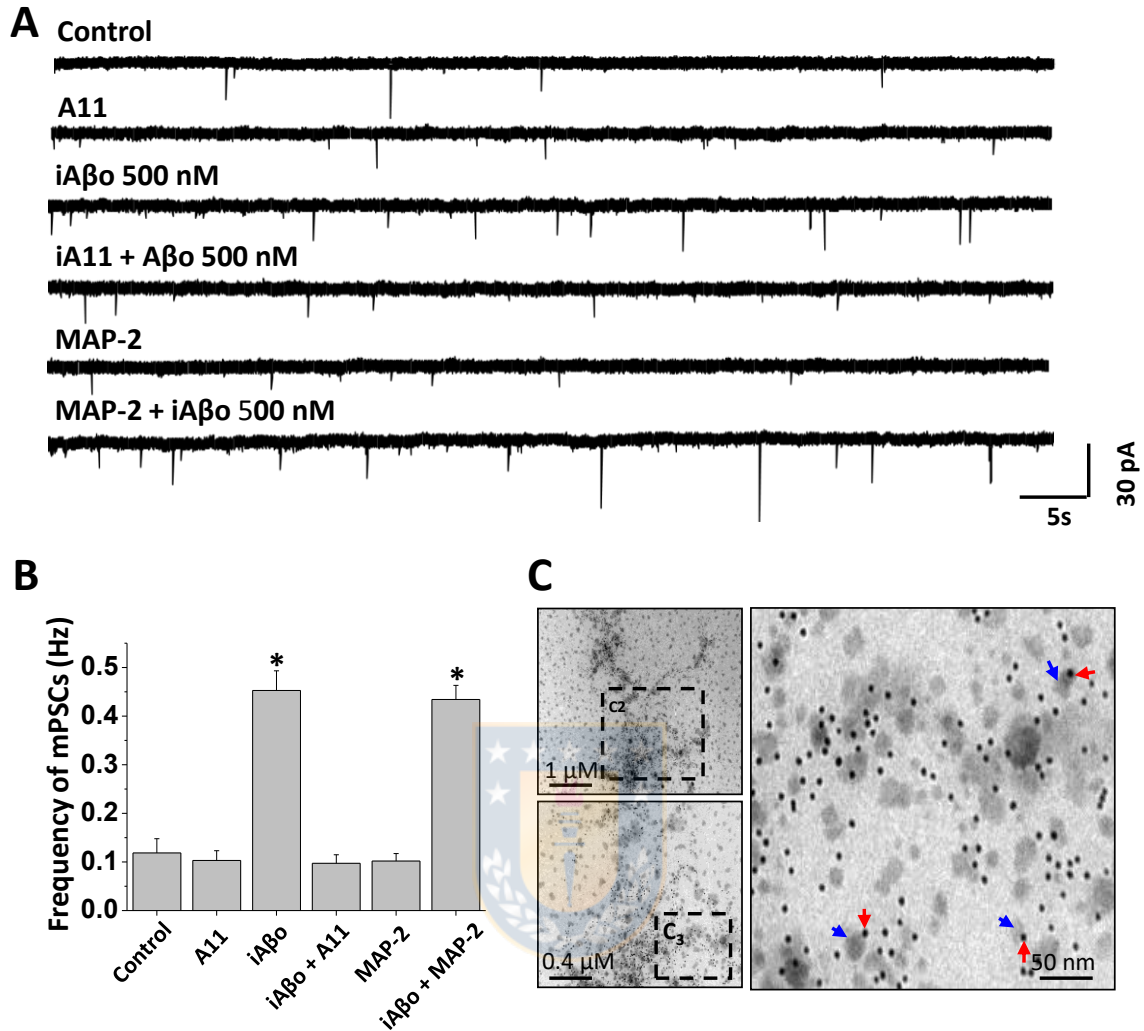
Bajo esta premisa, se ensayó un rango de concentraciones intracelulares de  $A\beta$  (0-1000 nM) y se determinó la frecuencia y la amplitud de estos eventos sinápticos miniatura. En la **Fig. 9A** se observan los diferentes trazos representativos de las mPSCs mostrando un claro efecto en la frecuencia y en la amplitud de las mismas a medida que incrementó la concentración de  $iA\beta$  dentro del electrodo de registro. Estos efectos fueron más importantes en la frecuencia de estos eventos, pues se encontraron diferencias estadísticamente significativas con sólo aplicar una concentración de 5 nM de  $iA\beta$  (**Fig. 9B**), a diferencia del efecto en la amplitud que fue significativo a una concentración 200 veces más alta (1000 nM) (**Fig. 9C**). Al aplicar los oligómeros desnaturalizados por calor o la secuencia reversa de  $A\beta$ , así como el control del vehículo utilizado para disolver el péptido, no encontramos diferencias significativas en la frecuencia y amplitud con respecto a la condición control (**Fig. 9D y E**).



**Figura 9. Efectos de la aplicación intracelular de oligómeros de Aβ (Aβo) sobre la frecuencia y amplitud de corrientes sinápticas miniatura.** **A,** Registros representativos mostrando el incremento en la frecuencia de corrientes sinápticas miniatura, luego de aplicar intracelularmente concentraciones crecientes de Aβ42 (0.5 - 1000 nM). **B, C,** Cuantificación de la frecuencia (**B**) y amplitud (**C**) de las corrientes sinápticas miniaturas descritas en (**A**), mostrando que Aβ intracelular aumenta la frecuencia de las corrientes sinápticas miniatura de una manera concentración dependiente, mientras que en amplitud sólo se alcanza a la concentración máxima utilizada (1000 nM). **D, E,** Corrientes sinápticas miniatura representativas que muestran que los oligómeros desnaturalados por calor, la secuencia reversa y el control de vehículo no exhiben diferencias significativas con respecto al control, sugiriendo que el efecto en la frecuencia depende de la presencia de Aβo intracelular. Los gráficos de barras representan el promedio ± SEM. \* denota  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (*t-test*).  $n=15$  de al menos 3 experimentos independientes.

En general, en la literatura se interpreta que los efectos en la frecuencia de las mPSCs corresponden a la frecuencia de la liberación de neurotransmisores desde la pre-sinapsis al espacio sináptico [96]–[98], considerándolo de esta forma como un reflejo de lo que ocurre a nivel pre-sináptico. Mientras que la amplitud corresponde a una respuesta netamente dada por la función de los receptores post-sinápticos y por tanto nos entrega información de lo que ocurre en este compartimento [99]. En conclusión, la aplicación de iA $\beta$  aumentó la frecuencia y amplitud de los eventos miniatura, sugiriendo un aumento en la liberación de neurotransmisores (efecto pre-sináptico) y un aumento en el número de receptores post-sinápticos o un aumento en la conductancia de los mismos (efecto post-sináptico). De esta manera, iA $\beta$  no cambia las propiedades intrínsecas de la membrana, pero aumenta el número de eventos sinápticos (frecuencia) (**Fig. 9**), lo cual permite que la membrana de la neurona post-sináptica se despolarice más fácilmente y alcance el umbral de generación del PA (**Fig. 5 y 6**), aumentando así la excitabilidad neuronal.

A continuación, realizamos el mismo ensayo de aplicación intracelular de A $\beta$ , pero en ausencia y presencia de un anticuerpo específico que reconoce las formas oligoméricas del mismo, neutralizando su toxicidad [100] (anticuerpo A11). Se observó que la frecuencia de eventos sinápticos mostró un aumento significativo con respecto al control al incluir iA $\beta$  en el electrodo de registro (**Fig. 10A y B**). Sin embargo, la pre-incubación de iA $\beta$  con el anticuerpo A11 disminuyó considerablemente el efecto sobre la actividad sináptica a niveles del control (**Fig. 10A y B**). Adicionalmente, se ensayó otra condición experimental para controlar el experimento, realizando una pre-incubación con otro anticuerpo para otro epítipo no relacionado (aminoácidos 1-300 del N-terminal de la proteína de citoesqueleto neuronal MAP2). Esta pre-incubación no impidió que A $\beta$  ejerciera sus efectos sobre la neurotransmisión (**Fig. 10A y B**). Las diferencias entre las distintas condiciones experimentales se apreciaron claramente al cuantificar la frecuencia de las mPSCs (**Fig. 10B**). La utilización de estos anticuerpos (A11 y anti-MAP2) *per se* en la solución intracelular de registro no mostró efectos significativos en la frecuencia de los eventos sinápticos (**Fig. 10A y B**). Por otra parte la



**Figura 10. La pre-incubación de oligómeros de A $\beta$  (A $\beta$ o) con el anticuerpo A11 inhibió el efecto sináptico intracelular. **A**, Registros representativos mostrando el incremento en la frecuencia de corrientes sinápticas miniatura, luego de aplicar intracelularmente A $\beta$ o 500 nM solo o pre-incubado por 10 min con anticuerpo para oligómeros A11 o con el anticuerpo no relacionado, para la proteína de citoesqueleto neuronal MAP-2. La aplicación intracelular de los anticuerpos no tuvo un efecto *per se* en la frecuencia de las mPSCs. **B**, Cuantificación de la frecuencia de las corrientes sinápticas miniaturas bajo las condiciones descritas en (**A**), mostrando que A $\beta$  intracelular aumenta la frecuencia de las corrientes sinápticas miniatura, pero este efecto se ve disminuido a niveles similares al control cuando se pre-incuba la preparación con anticuerpo A11. No se observan diferencias en el efecto de A $\beta$ o al pre-incubar con un anticuerpo para MAP-2. **C**, Micrografías electrónicas que demuestran la presencia de agregados oligoméricos amiloides (flechas en azul), no fibras, en las preparaciones utilizadas. Junto con eso, se observa la presencia de la nanopartícula de oro del anticuerpo secundario utilizado para la inmunodetección de A $\beta$ . Los gráficos de barras representan el promedio  $\pm$  SEM. \* denota  $p < 0.05$  (*t-test*).  $n=9$  de al menos 3 experimentos independientes.**

observación de las muestras por microscopía electrónica de transmisión, utilizando el método de *Immungold* (detalles en sección 2.4 de materiales y métodos), confirmó la presencia y abundancia de estas especies oligoméricas en las preparaciones utilizadas, sin detectar la presencia de fibras amiloideas (**Fig. 10C**).

En conclusión, estos experimentos muestran que el efecto de oligómeros de A $\beta$  intracelular sobre la neurotransmisión se caracteriza por ser un fenómeno que ocurre de manera rápida ( $\sim 1$  minuto) y que modula principalmente la frecuencia y amplitud de los eventos sinápticos miniatura.

Una vez que se evaluó el efecto global de iA $\beta$  sobre la neurotransmisión decidimos diseccionar cuál o cuáles de los diferentes tipos de neurotransmisión presentes en neuronas hipocámpales estaban afectados [101], enfocándonos principalmente en la transmisión AMPAérgica (excitatoria) y GABAérgica (inhibitoria). Para ello se realizaron registros de corrientes sinápticas miniaturas AMPAérgicas y GABAérgicas, utilizando un cóctel farmacológico para poder aislar correctamente cada una de ellas (ver Materiales y Métodos sección 2.3.1). En presencia de iA $\beta$  encontramos aumento significativo en la frecuencia de las corrientes sinápticas miniaturas excitatorias de tipo AMPAérgico (mEPSCs), así como en la amplitud de las mismas, lo cual se evidencia claramente en los eventos sinápticos promedio (**Fig. 11A y B**). En el caso de la transmisión GABAérgica se encontraron efectos muy similares en cuanto a la frecuencia de las corrientes sinápticas miniaturas inhibitorias (mIPSCs), no así con respecto a la amplitud (**Fig. 11C y D**). La cuantificación de estos parámetros cinéticos (frecuencia y amplitud) se graficaron para evaluar los efectos iA $\beta$  en ambos tipos de neurotransmisión (**Fig. 11E y F**). Junto con esto, también se cuantificó el *rise-time* y tiempo de decaimiento, que entregan información acerca del tiempo que toma el canal en alcanzar la conformación abierta y cerrada, respectivamente, una vez que se activa por el ligando (**Fig. 11E y F**). En el caso del canal de AMPA, encontramos diferencias significativas en cada uno de los parámetros cuantificados (**Fig. 11E, F, G y H**). Interesantemente, en el caso del receptor de GABA<sub>A</sub>, y de manera contraria a lo observado con el canal de AMPA, el evento promedio con iA $\beta$  exhibió un aumento estadísticamente significativo en el tiempo de

decaimiento (*decay-time*), indicando que bajo estas condiciones cuando el canal se abre en respuesta a la liberación pre-sináptica de GABA, este permaneció abierto por más tiempo con respecto al control [102]

En conclusión, estos experimentos sugieren que  $iA\beta$  afecta, diferencialmente y de manera importante, los parámetros sinápticos de la transmisión AMPAérgica (excitatoria) y GABAérgica (inhibitoria).

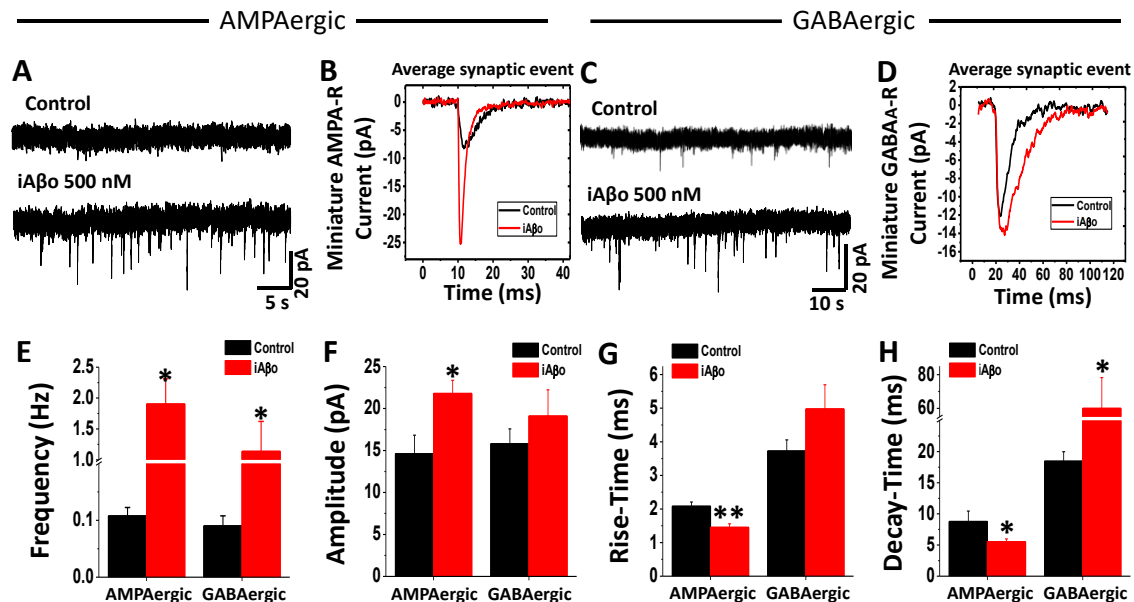
Repetimos este experimento en rebanas de hipocampo de un ratón adulto (*ex vivo*), registrando en la zona SP-CA1, y encontramos que los resultados fueron similares a los encontrados *in vitro*. En este caso, la presencia de  $iA\beta$  aumentó la frecuencia, tanto en las corrientes AMPAérgicas como GABAérgicas y sólo en la amplitud para las primeras (**Fig. 12A, B, C, D**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de *rise-time* y tiempo de decaimiento (datos no mostrados). La explicación a este fenómeno podría estar en el hecho de que en el cultivo celular se registra una población heterogénea de neuronas que provienen de diferentes áreas del hipocampo y por lo tanto podrían exhibir diferentes propiedades sinápticas, además del hecho de que son neuronas aisladas de embriones, mientras que en la rebanada de cerebro se trata de neuronas de ratón adulto y en donde sólo se registró en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo (una población homogénea). A pesar de estas diferencias, se corroboró que el efecto de  $iA\beta$  en la frecuencia y amplitud también ocurrió en una sinapsis madura en la región CA1 del hipocampo en el cerebro de un ratón, lo cual refleja que los efectos de  $iA\beta$  también ocurren en una sinapsis adulta en estado nativo.

Posteriormente, se realizaron estudios de corrientes evocadas. Estos se caracterizan por la aplicación externa de un ligando mediante un sistema de perfusión [103], midiendo la corriente que "evoca" este ligando al activar los receptores post-sinápticos. A diferencia de las corrientes sinápticas, las corrientes evocadas se producen por la activación de los receptores sinápticos como extra-sinápticos (fuera de la sinapsis), mientras que las corrientes sinápticas sólo reflejan la función de los primeros. En este caso se examinaron corrientes evocadas excitatorias AMPAérgicas y corrientes

evocadas inhibitorias GABAérgicas en presencia y ausencia de  $iA\beta_0$ . En el caso de las corrientes evocadas por AMPA, los resultados mostraron que la presencia de  $iA\beta_0$  potenció la respuesta al ligando AMPA (**Fig. 13A**). Esto se evidenció por un aumento significativo en cerca de 2 veces en la amplitud de la corriente evocada (Control I normalizada:  $1.00 \pm 0.06$  v/s  $iA\beta_0$ :  $1.95 \pm 0.22$ ,  $p < 0.001$ , t-test) (**Fig. 13B**). Esto no ocurrió con la aplicación extracelular de GABA, y tanto en el control como en la condición con  $iA\beta_0$ , las neuronas evocaron corrientes de magnitud similares (**Fig. 13C y D**).

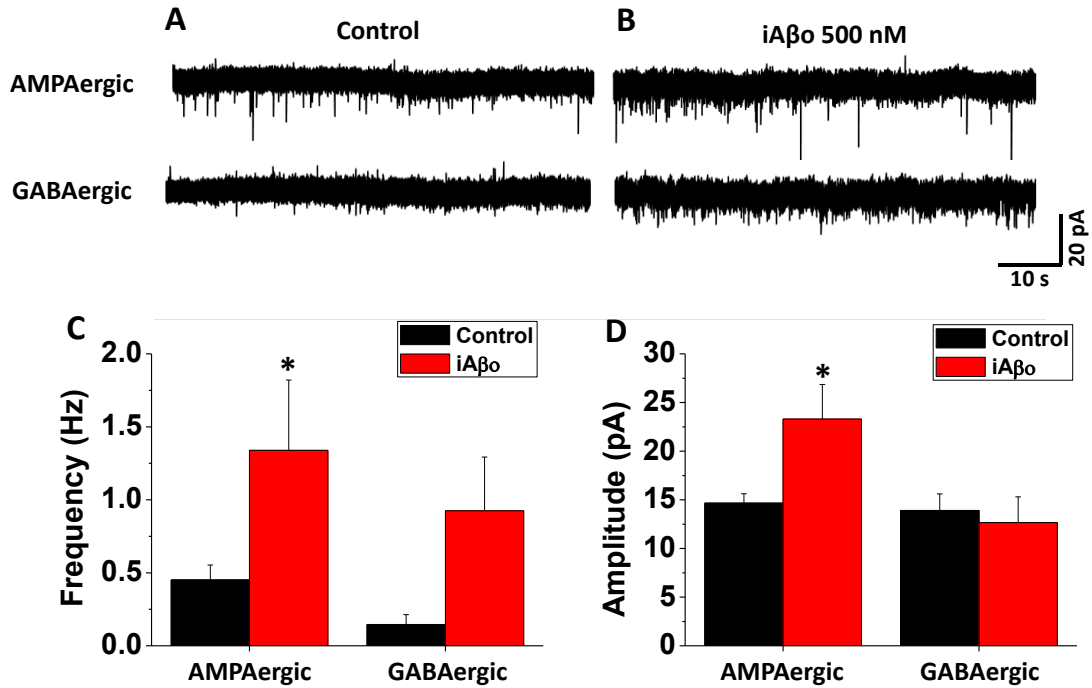
En conclusión, estos resultados demuestran que  $iA\beta_0$  afecta ambos tipos de neurotransmisión, excitatoria e inhibitoria, pero los efectos fueron más significativos en la transmisión AMPAérgica que GABAérgica. Esto nos impulsó a preguntarnos y a investigar en mayor profundidad el(los) mecanismo(s) que podría(n) estar mediando este efecto sobre la transmisión excitatoria AMPAérgica.



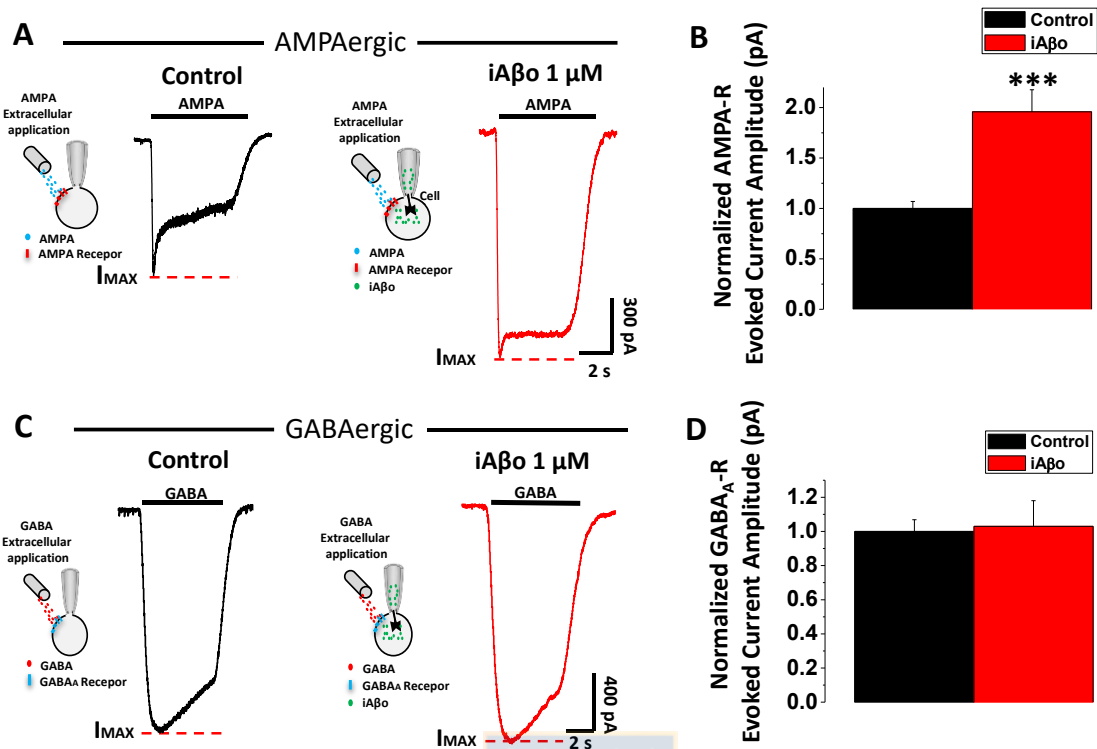


**Figura 11. Aβ intracelular afectó propiedades de corrientes mPSCs mediadas por receptores ionotrópicos de AMPA-R y de GABA (GABAA-R) (*in vitro*).** **A, B, C, D,** Registros sinápticos representativos de corrientes sinápticas miniaturas AMPAérgicas (**A**) y GABAérgicas (**C**) en condición control y con aplicación intracelular de Aβ 500 nM, respectivamente. Al costado de cada registro se observa un evento sináptico promediado (100 eventos sinápticos, **B y D**) de cada una de las condiciones evaluadas en este experimento. **E, F, G, H** Cuantificación de la frecuencia, amplitud, *rise-time* y tiempo de decaimiento de las corrientes miniaturas AMPAérgica y GABAérgicas en las condiciones experimentales descritas previamente. Se observa que en el caso de las corrientes AMPAérgicas todos los parámetros cuantificados cambiaron significativamente con respecto a la condición control, mientras que en las corrientes GABAérgicas sólo aumentó la frecuencia y el tiempo de decaimiento. Los gráficos de barras representan el promedio ± SEM. \* denota  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  (*t-test*).  $n=22$  de 5 experimentos independientes.





**Figura 12. Aβo intracelular aumentó la frecuencia de las corrientes sinápticas AMPAérgicas y GABAérgicas en neuronas en la región CA1 de rebanadas de hipocampo (ex vivo).** **A, B,** Registros sinápticos representativos de corrientes sinápticas miniaturas AMPAérgicas (**A**) y GABAérgicas (**C**) en condición control y con aplicación intracelular de Aβ 500 nM, respectivamente. **C, D,** Cuantificación de la frecuencia (**C**) y amplitud (**D**) de las corrientes miniaturas AMPAérgica y GABAérgicas en las condiciones experimentales descritas previamente. Nota: No se observaron cambios en los parámetros de *rise-time* y tiempo de decaimiento para ninguno de los dos tipos de neurotransmisión (datos nos mostrados). Los gráficos de barras representan el promedio ± SEM. \* denota  $p < 0.05$  (*t-test*).  $n=12$  de al menos 3 experimentos independientes.



**Figura 13. Efecto de Aβ en las corrientes evocadas por aplicación exógena de AMPA y GABA en neuronas hipocámpales.** **A, B,** Registros representativos de corriente post-sinápticas evocadas por aplicación extracelular de AMPA (**A**) y GABA (**B**) (100 μM), respectivamente, en ausencia y presencia de Aβo 1000 nM. Se observa que en presencia de Aβo existe una potenciación de la respuesta del receptor de AMPA. Líneas segmentadas en rojo indican el nivel de la corriente máxima alcanzada ( $I_{MAX}$ ). **C, D,** Cuantificación de la amplitud de la corriente evocada promedio (valor correspondiente a  $I_{MAX}$ ) para el receptor de AMPA (**C**) y GABA (**D**), respectivamente, mostrando un aumento estadísticamente significativo de la corriente de AMPA producto de la aplicación intracelular de Aβ. Los gráficos de barras representan el promedio  $\pm$  SEM. \* denota  $p < 0.05$  (*t-test*).  $n=12$  de 3 experimentos independientes.

### **3.2. Objetivo específico 2. Caracterizar el mecanismo por el cual A $\beta$ intracelular aumenta la transmisión excitatoria AMPAérgica**

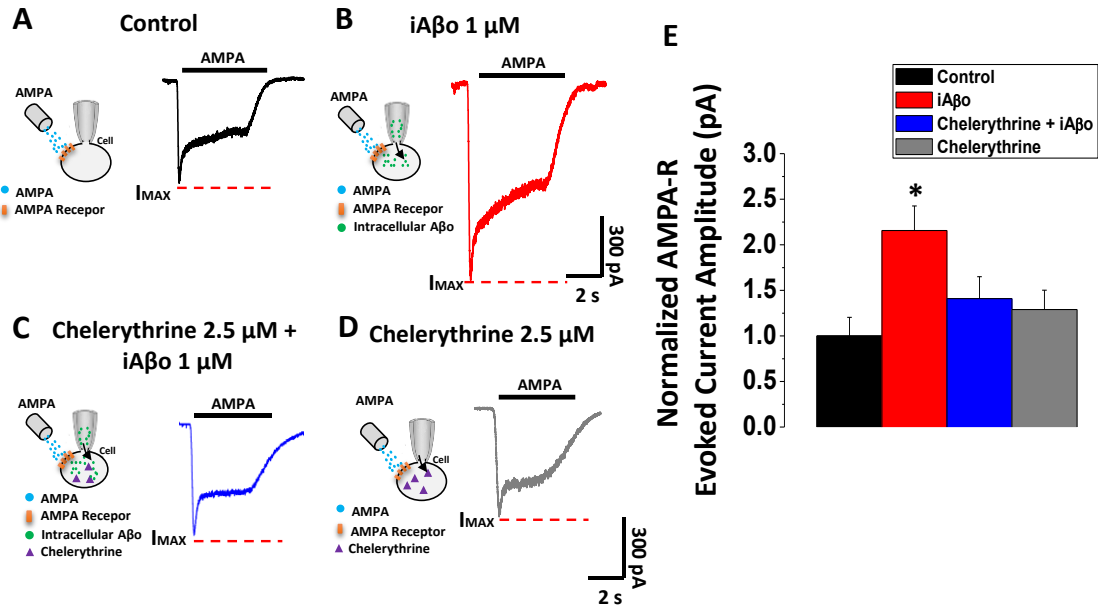
Previamente los resultados más significativos correspondieron al efecto en la frecuencia, amplitud de las corrientes AMPAérgicas en presencia de iA $\beta$ . Nuestra aproximación abordó, en primera instancia, el estudio del efecto sobre la amplitud (que corresponde a un efecto post-sináptico) y que fueron examinados en este objetivo), mientras que el efecto en la frecuencia, que corresponde a un efecto pre-sináptico, se abordó en el objetivo específico número 3.

Un análisis más detallado de la literatura en relación al receptor de AMPA nos permitió determinar los posibles mecanismos por los cuales podría estar siendo modulado por iA $\beta$ . En ella se describe que los receptores de AMPA son responsables de la transmisión excitatoria rápida en el sistema nervioso central y la composición de subunidades del receptor determina sus propiedades y características [47]. Este posee 4 subunidades: GluA1, A2, A3 y A4, que se ensamblan diferencialmente para producir subtipos de receptores específicos [49]. En el dominio intracelular C-terminal, estas subunidades presentan diferentes motivos, entre ellos los más destacados corresponden a dominios de unión (que permiten interaccionar con proteínas de la densidad post-sináptica) y que a su vez regulan su inserción en la sinapsis [48], así como también aminoácidos que constituyen un blanco de quinasas intracelulares [104]. En relación a lo anterior, la fosforilación de canales ionotrópicos juega un papel preponderante en la regulación de la función sináptica [105] y se ha demostrado que la perfusión intracelular de PKCM (una forma constitutivamente activa de PKC) aumenta la respuesta sináptica mediada por el receptor AMPA de manera similar a lo que habíamos observado previamente en nuestros registros con iA $\beta$  [106], [107]. Teniendo en cuenta lo anterior, y considerando que se trata de un efecto rápido, es que se decidió realizar el registro utilizando intracelularmente un inhibidor de PKC (Quelerritrina, 2.5  $\mu$ M) y evaluar si el efecto que iA $\beta$  tenía en las corrientes evocadas por AMPA era dependiente de esta quinasa. Los resultados mostraron que iA $\beta$  aumentó la corriente evocada por AMPA en relación al control (**Fig. 14A y B**), pero en presencia del inhibidor ocurrió una

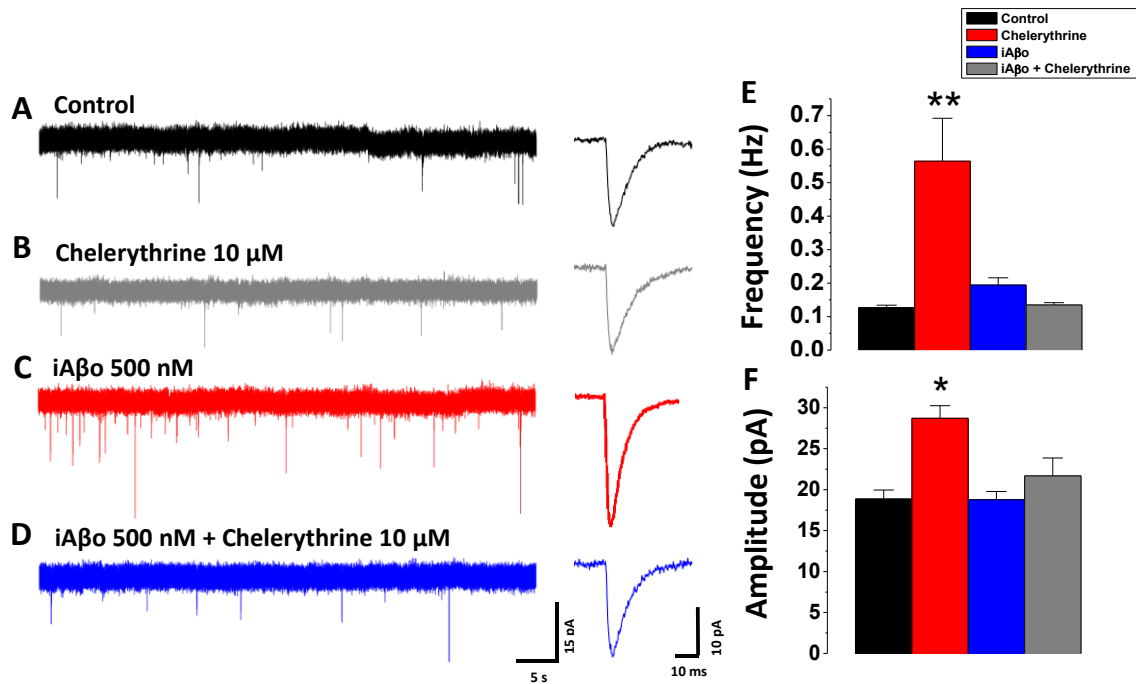
disminución significativa de esta, alcanzando valores similares a los del control en donde sólo se aplicó Queleritrina 2,5  $\mu$ M (**Fig. 14C y D**). La cuantificación de la amplitud (reflejo de lo que ocurre en el compartimiento post-sináptico) de la eEPSC muestra un aumento estadísticamente significativo de  $iA\beta$  con respecto a todas las condiciones ensayadas (**Fig. 14E**). Estos datos sugieren que la vía intracelular de PKC está involucrada en el efecto de  $iA\beta$  a nivel post-sináptico.

Posteriormente, y bajo las mismas condiciones ensayadas en el experimento anterior se midieron las corrientes sinápticas miniaturas AMPAérgicas. En este caso se encontró que el efecto de  $iA\beta$  sobre la frecuencia y amplitud de las mEPSCs estaba disminuido al co-aplicarlo junto con Queleritrina 2,5  $\mu$ M (**Fig. 15A, B, C y D**). El efecto se evidenció de mejor manera al cuantificar ambos parámetros para todas las condiciones experimentales ensayadas con y sin aplicación del inhibidor (**Fig. 15E**). Esto fue interesante, pues demostró que el efecto de  $iA\beta$  sobre la frecuencia y amplitud de las corrientes sinápticas miniaturas AMPAérgicas involucraba la vía de PKC, sugiriendo que el efecto de esta quinasa en la sinapsis excitatoria compromete al compartimiento pre- y post-sináptico.

Ambos experimentos demostraron que la amplitud de la corriente AMPAérgica en presencia de  $iA\beta$  es afectada por una vía de señalización que involucra a PKC. Nuestros datos aportan un punto de vista novedoso para responder por qué  $iA\beta$  tendría un efecto predominantemente sobre la transmisión excitatoria AMPAérgica.



**Figura 14. La inhibición de PKC disminuye el efecto de A $\beta$  en las corrientes evocadas por AMPA.** **A, B, C, D,** Registros representativos de corriente post-sinápticas evocadas por aplicación extracelular de AMPA en ausencia (**A**) y presencia de A $\beta$  1000 nM (**B**). Se observa que en presencia de A $\beta$  existe una potenciación de la respuesta del receptor de AMPA y esta corriente disminuye aniveles control cuando se co-aplica A $\beta$  junto con el inhibidor de PKC (Quelerytrina 2.5  $\mu$ M) dentro del electrodo de registro (**D**). Se observa que el inhibidor por sí solo no afecta la amplitud de la corriente evocada de AMPA (**C**). Las líneas segmentadas en rojo indican el nivel de la corriente máxima alcanzada ( $I_{MAX}$ ). Al costado izquierdo de cada registro se muestra el esquema de cada una de las condiciones ensayadas en el experimento. **E,** Cuantificación de la amplitud de la corriente promedio evocada por AMPA para cada una de las condiciones descritas previamente. Los gráficos de barras representan el promedio  $\pm$  SEM. \* denota  $p < 0.05$  ( $t$ -test).  $n=9$  de al menos 3 experimentos independientes.



**Figura 15. El efecto de Aβo sobre las corrientes sinápticas miniaturas AMPAérgicas es dependiente de PKC. A, B, C, D,** Registros representativos de corrientes post-sinápticas miniaturas AMPAérgicas en ausencia (A) y presencia de Aβo 1000 nM (C). Se observa que en presencia de Aβo existe un aumento de la frecuencia y la amplitud de estas corrientes, y ambos parámetros disminuyen significativamente al co-aplicar Aβo intracelular junto con Queleritrina 2.5 μM (D). Queleritrina no tiene un efecto *per se* en las corrientes sinápticas evaluadas (B). Al costado derecho de cada registro representativo se observa un evento sináptico promediado (100 eventos sinápticos) de cada una de las condiciones evaluadas en este experimento. E, Cuantificación de la amplitud de la corriente promedio evocada por AMPA para cada una de las condiciones descritas previamente. Los gráficos de barras representan el promedio ± SEM. \* denota p < 0.05, \*\* p < 0.005 (*t-test*). n=9 de al menos 3 experimentos independientes.

Se ha descrito que muchos de los efectos mediados por PKC, en especial a nivel post-sináptico, requieren de un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $i[\text{Ca}^{2+}]$ ) [108]. Por este motivo, se evaluaron los efectos de  $i\text{A}\beta_0$  en las corrientes sinápticas miniaturas, utilizando dos quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  diferentes: BAPTA y EGTA. Cuando están presentes en la solución interna del electrodo, ambos unen  $\text{Ca}^{2+}$  con alta selectividad y afinidad, pero el primero es superior en cuanto a velocidad para quelar  $\text{Ca}^{2+}$  y no posee mayores cambios en su capacidad de tamponamiento con cambios de pH [109]. Como resultado de esto, en la condición con EGTA habrá un aumento de la  $i[\text{Ca}^{2+}]$ . Es importante destacar que, hasta estos resultados, todos los registros mostrados anteriormente se obtuvieron en presencia de BAPTA 10 mM (dentro de la pipeta de *patch*) y el objetivo de este experimento es comparar el efecto de  $i\text{A}\beta_0$  en presencia de otro quelante (EGTA).

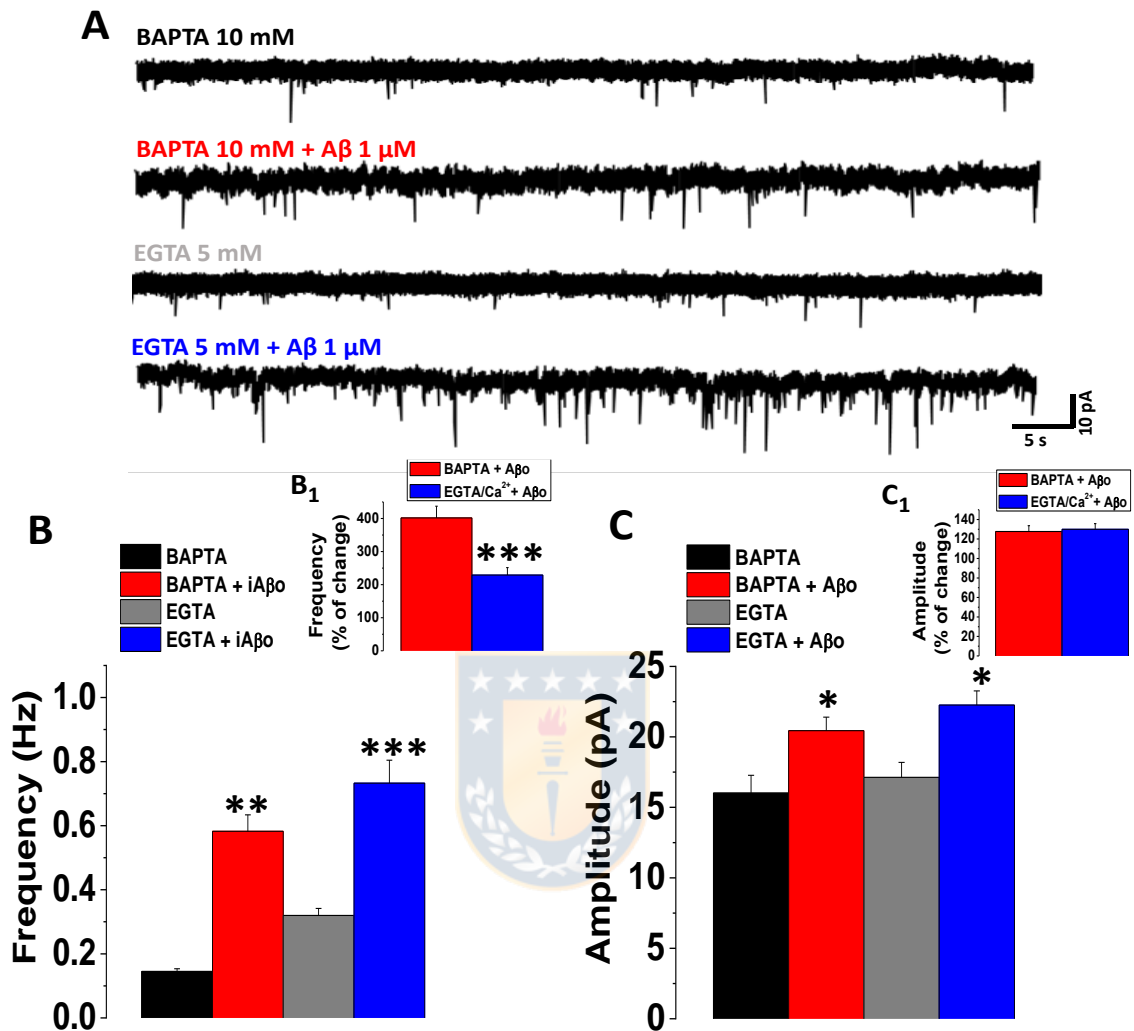
La utilización de ambos quelantes tuvo efectos diferenciales en la frecuencia de las corrientes miniaturas (**Fig. 16 A**): al utilizar BAPTA 10 mM en la solución interna de registro (condición control) la frecuencia alcanzó un valor promedio de  $0.14 \pm 0.01$  Hz (**Fig. 16 B, barra en negro**), y esta aumentó a  $0.58 \pm 0.05$  Hz al aplicar  $i\text{A}\beta_0$  (**Fig. 16 B, barra en rojo**), es decir este parámetro aumentó en cerca de 4 veces con respecto a su control y esto fue lo que se expresó como % de cambio en el gráfico superior (**Fig. 16 B1, barra roja**). Cuando se empleó EGTA 5 mM la frecuencia aumentó de  $0.31 \pm 0.02$  Hz en la condición control (**Fig. 16 B, barra en gris**) a  $0.73 \pm 0.07$  Hz en presencia de  $i\text{A}\beta_0$  (**Fig. 16 B, barra en azul**), aumentando este parámetro en sólo 2.3 veces con respecto al control. Esto también se graficó como % de cambio (**Fig. 16 B1, barra azul**). Entonces al comparar el efecto de  $i\text{A}\beta_0$  en la frecuencia de mPSCs, observamos que al quelar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en casi su totalidad (condición con BAPTA 10 mM) el efecto es mayor que en la condición con EGTA 5 mM, donde existe más  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre. Adicionalmente, se puede observar que existe una diferencia en ambas condiciones controles: por ejemplo, al comparar el control de BAPTA (**Fig. 16 B, barra en negro**) con respecto al control de EGTA (**Fig. 16 B, barra en gris**), se observó que hay un aumento en la frecuencia, lo cual indicó que al aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre en la célula registrada aumentó también la frecuencia de las corrientes sinápticas miniaturas.

No obstante, y como se mencionó previamente, al aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (condición con EGTA) y adicionar  $i\text{A}\beta$  no se observó un aumento tan significativo con respecto a los experimentos con BAPTA, sugiriendo que el efecto de  $i\text{A}\beta$  sobre la frecuencia de las corrientes sinápticas es complejo y es dependiente de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólico hasta cierto punto.

Por otra parte, para la amplitud de las mPSCs no se observaron diferencias en el cambio de la respuesta al aplicar  $i\text{A}\beta$  en presencia de BAPTA o EGTA (**Fig. 16 C**), pues en ambos casos el porcentaje de cambio con respecto al control fue  $\sim 120\%$  (**Fig. 16 C1**), indicando que el efecto de  $i\text{A}\beta$  en la amplitud de las corrientes sinápticas es independiente de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólico.

En conclusión, los experimentos del objetivo específico 2 nos permiten concluir que el efecto de  $i\text{A}\beta$  en la frecuencia de las corrientes sinápticas, y en la amplitud de las corrientes sinápticas y evocadas dependen de PKC. Además, el efecto de  $i\text{A}\beta$  sobre la frecuencia de mPSCs es complejo de interpretar pues existe un porcentaje de cambio mayor al utilizar BAPTA en vez de EGTA (**Fig. 16 C1**). Sin embargo, es interesante notar que BAPTA y EGTA en condiciones control (sin  $i\text{A}\beta$ ) son diferentes, y de hecho con EGTA la frecuencia aumenta a más del doble. De eso, se esperaba que al aplicar  $i\text{A}\beta$ , aumentara aún más la frecuencia de las corrientes sinápticas miniaturas, pero se observó lo contrario (disminuyó). Por tanto la disminución que se observa en el porcentaje de cambio en la condición con EGTA y  $i\text{A}\beta$  podría deberse a que el efecto quizás ya estaba saturado y había mucho  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol. De esto, interpretamos que el efecto  $i\text{A}\beta$  es, hasta cierto punto,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente, pero no depende en su totalidad de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico para poder ejercer su efecto y no podemos descartar de que haya o no un efecto sumativo con calcio adicional. Por otro lado, el efecto en la amplitud es claro y no se muestran diferencias significativas en la amplitud al aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.





**Figura 16. Figura 12. Aumento del nivel de Ca<sup>2+</sup> post-sináptico afecta las acciones intracelulares de Aβ en la frecuencia y no en la amplitud de las corrientes sinápticas miniaturas.** **A**, Registros representativos de corrientes post-sinápticas miniaturas en presencia de 2 agentes quelantes de Ca<sup>2+</sup> diferentes en la solución interna del electrodo: BAPTA 10 mM y EGTA 5 mM. En negro y gris se observan los trazos controles de corrientes mPSCs sin la aplicación de Aβ para BAPTA y EGTA, respectivamente, mientras que en rojo y azul se muestran registros en presencia de Aβ 1μM utilizando una solución interna con BAPTA y EGTA, respectivamente. **B**, **C**, Cuantificación de la frecuencia y amplitud de las mPSCs en las cuatro condiciones ensayadas en el experimento. **B<sub>1</sub>** y **C<sub>2</sub>** corresponden al porcentaje de cambio de la frecuencia y amplitud de mPSCs entre la condición control y la condición con Aβ para los dos quelantes utilizados. Los gráficos de barras representan el promedio ± SEM. \*\* denota p < 0.005, \*\*\* p < 0.001. (*t-test*). n=9 de 3 experimentos independientes.

### **3.3. Objetivo específico 3. Caracterizar la naturaleza del mecanismo de señalización retrógrada de una concentración baja de A $\beta$ en la neurona post-sináptica.**

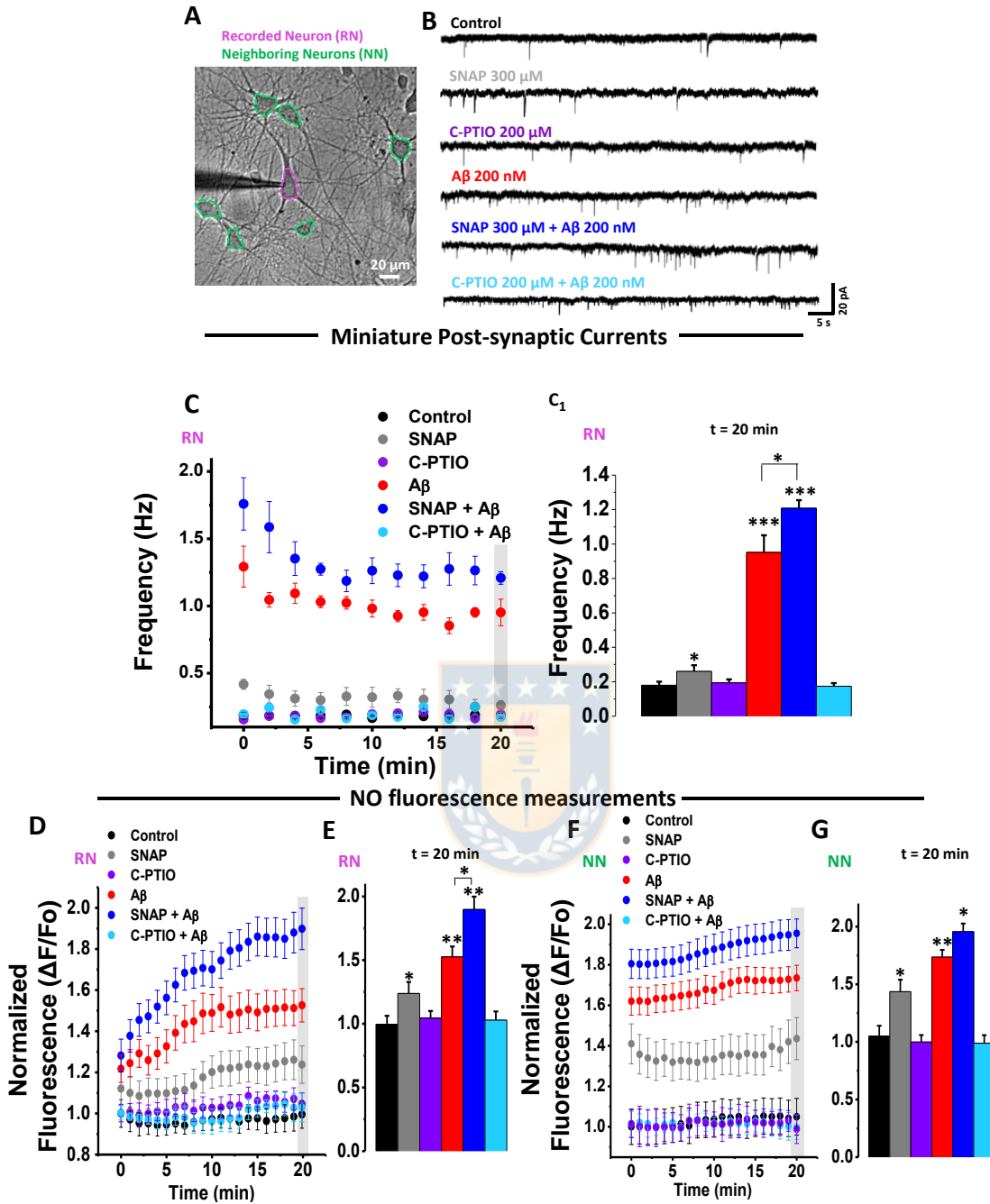
Como se mencionó previamente al inicio del objetivo específico 2, el efecto de A $\beta$  en la frecuencia de las corrientes sinápticas miniatura, que corresponde a un efecto pre-sináptico, se abordó en este objetivo. Los datos previos sugieren la presencia de una señal retrógrada que transmite señales desde la neurona post-sináptica (donde se aplica A $\beta$ ) a los botones pre-sinápticos para aumentar la liberación de neurotransmisores. Considerando la rapidez del efecto y los datos presentes en la literatura, un mensajero retrógrado candidato que está muy involucrado invocado en otros ejemplos de regulación pre-sináptica es el óxido nítrico (NO) [85], [86], [110]–[113]. Es importante considerar que para todos los registros realizados en este objetivo se utilizaron bajas concentraciones de iA $\beta$ , las cuales no afectan la amplitud de las corrientes sinápticas miniaturas, sino que sólo la frecuencia de estas.

En base a esto, se utilizó la siguiente estrategia metodológica: se realizó un registro simultáneo de corrientes sinápticas miniatura (mPSCs) y niveles relativos de NO en neuronas hipocampales. Para la cuantificación de NO se utilizó la sonda fluorescente DAQ (1,2-diaminoantraquinona), la cual ha sido previamente utilizada para este fin [114], [115]. Además, no sólo se cuantificó la fluctuación de los niveles relativos de NO en la célula registrada (RN) (**Fig. 17A, en magenta**), sino que también de las neuronas vecinas (NN) (**Fig. 17A, en verde**). La primera aproximación que se utilizó fue co-aplicar iA $\beta$  junto con una molécula donante (SNAP 300  $\mu$ M, en gris) o sequestrador de NO (C-PTIO 200  $\mu$ M, en púrpura) y cuantificar la frecuencia de las corrientes mPSCs. La aplicación de estas dos moléculas, tuvieron efectos mínimos en la frecuencia de las corrientes mPSCs de la neurona registrada (RN): por un lado SNAP aumentó levemente la frecuencia (**Fig. 17B y C, en gris**), mientras que C-PTIO no tuvo ningún efecto significativo (**Fig. 17B y C, en púrpura**) y se comportó de la misma manera que el control (**Fig. 17B y C, en negro**). De la misma manera, se observó un aumento significativo de los niveles de la fluorescencia asociada a NO en RN al tratar con SNAP

(**Fig. 17D y E, gris**) comparado con el control (**Fig. 17D y E, en negro**), mientras C-PTIO no tuvo ningún efecto significativo (**Fig. 17D y E, en púrpura**). Este patrón se repitió en las neuronas vecinas (NN), puesto que el control presentaba ciertos valores de fluorescencia (**Fig. 17F y G, en negro**), y estos aumentaron significativamente al tratar el pocillo con SNAP (**Fig. 17F y G, en gris**), pero la incubación con C-PTIO no exhibió mayores diferencias con respecto al control (**Fig. 17F y G, en púrpura**).

Por su parte, la presencia intracelular de A $\beta$  aumentó tanto la frecuencia de las corrientes miniaturas (**Fig. 17B y C, en rojo**), así como también los niveles de fluorescencia relativa de NO en RN (**Fig. 17D y E, en rojo**) y en NN (**Fig. 17F y G, en rojo**). Interesantemente, al co-aplicar intracelularmente SNAP junto con A $\beta$  dentro del electrodo de registro, observamos un efecto sinérgico entre ambos, aumentando la frecuencia de las mPSCs (**Fig. 17B y C, en azul**), así como también la generación de NO en RN (**Fig. 17D y E, en azul**). De la misma manera, se observaron aumentos significativos en los niveles de NO producidos en NN (**Fig. 17F y G, en azul**).

Por otro lado, la utilización de C-PTIO tuvo el efecto opuesto. Al aplicar iA $\beta$  en neuronas que habían sido previamente incubadas con C-PTIO se produjo una disminución significativa de la frecuencia de los eventos sinápticos con respecto al pocillo que no recibió tratamiento alguno, lo cual se vio reflejado en la disminución del valor de la frecuencia de las mPSCs (**Fig. 17B y C, en celeste**). Además, el efecto de iA $\beta$  sobre la producción de NO en la neurona RN y las neuronas NN también se vio afectada por la presencia de C-PTIO, disminuyendo significativamente a niveles del control, tanto en la neurona RN (**Fig. 17D y E, en celeste**) como en las NN (**Fig. 17F y G, en celeste**). Estos resultados muestran que iA $\beta$  produce un aumento significativo de los niveles de NO en la neurona registrada así como en las neuronas adyacentes a esta, sugiriendo que NO, mediante su difusión a la pre-sinapsis, estaría aumentando la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico [85], [86], aumentando así la frecuencia de las corrientes sinápticas miniatura.



**Figura 17. Óxido nítrico (NO) participa en el efecto de  $iA\beta$  sobre la frecuencia de las corrientes sinápticas miniaturas.** **A**, Micrografía obtenida en microscopio de epifluorescencia mostrando la zona del cultivo en la cual se examinaron las corrientes sinápticas miniatura de la neurona registrada (RN, en magenta), así como también la fluorescencia de una molécula indicadora de NO de RN y de las células adyacentes a RN (NN) (en verde). **B**, **C**, Registros representativos de corrientes post-sinápticas miniaturas en ausencia (en negro) y presencia de A $\beta$  200 nM (en rojo) junto con la co-aplicación de una molécula donante (SNAP 300  $\mu$ M, en gris) o secuestrador de NO (C-PTIO 200  $\mu$ M, en púrpura). Se observa que SNAP *per se* tiene un efecto en la frecuencia de las corrientes sinápticas, pero al co-aplicarlo con A $\beta$  (en azul) este efecto aumenta considerablemente, incluso sobrepasando el efecto que tiene A $\beta$  por sí solo. Por el contrario, la aplicación de C-PTIO no afectó la frecuencia de las mPSCs, pero si disminuyó a niveles

del control el efecto intracelular de A $\beta$ o en las corrientes sinápticas miniaturas (en celeste). El gráfico de barras en (C<sub>1</sub>) se obtuvo a partir de los datos registrados a tiempo 20' en gráfico C. **D, E, F, G**, Registro de la fluorescencia de DAQ obtenido desde la neurona registrada (RN) (**D y E**) y de las neuronas adyacentes (NN) (**F y G**). Se aprecia que, tanto para la célula RN como para las NN, existe un aumento de NO al aplicar A $\beta$ o intracelular en la neurona RN. Y ese efecto aumenta significativamente cuando se co-aplica A $\beta$ o junto con SNAP. De manera opuesta la co-aplicación de A $\beta$ o con C-PTIO disminuyó a niveles del control la fluorescencia de NO. Los gráficos de barras y de líneas representan el promedio  $\pm$  SEM. \* denota  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (*t-test*).  $n=9$  para RN y  $n>50$  para NN de 3 experimentos independientes. A menos que se especifique, cada comparación estadística se realizó con respecto a su control.

---

Para identificar el origen de NO, decidimos utilizar un inhibidor no selectivo de óxido nítrico sintasa (NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)), nuevamente registrando simultáneamente las corrientes mPSCs junto con la fluorescencia de NO en RN y en NN, de la misma manera que en el experimento anterior. La pre-incubación de neuronas hipocampales con L-NAME no mostró diferencias significativas en la frecuencia de las corrientes miniaturas con respecto al control sin pre-incubación con L-NAME (**Fig. 18A – C, en gris**), pero sí disminuyó significativamente los niveles de NO en la neurona registrada (RN) (**Fig. 18D y E, en gris**) y en las neuronas aledañas a RN (NN) (**Fig. 18F y G, en gris**). Por su parte, iA $\beta$ o tuvo el efecto esperado y aumentó la frecuencia de las mPSCs (**Fig. 18A – C, en rojo**) al mismo tiempo que se incrementaron los niveles de NO en la célula registrada (RN) y en neuronas aledañas (NN) (**Fig. 18D – G, en rojo**). Interesantemente, la pre-incubación del cultivo neuronal con L-NAME 200  $\mu$ M por 20-30 minutos redujo en  $\sim 50\%$  el efecto de iA $\beta$ o en la frecuencia de las mPSCs (iA $\beta$ o:  $0.832 \pm 0.088$  Hz v/s iA $\beta$ o + L-NAME:  $0.407 \pm 0.061$  Hz,  $p < 0.005$ , ANOVA *post-hoc* Bonferroni) (**Fig. 18A – C, en azul**). Esta disminución en la frecuencia de las mPSCs se correlaciona con la disminución de los niveles relativos de NO de la neurona RN y en las neuronas NN (**Fig. 18D – G, en azul**). Estos datos sugieren que al introducir A $\beta$ o en el compartimento intracelular se **produce la activación de una sintasa de NO en la célula post-sináptica registrada**, aumentando de esta manera los niveles de NO, los cuales pueden activar la liberación de neurotransmisores a nivel pre-sináptico, aumentando la frecuencia de las mPSCs.

Se sabe que el inhibidor utilizado en el experimento anterior afecta las 3 isoformas de óxido nítrico sintasa (NOS) presentes en neuronas hipocampales: la isoforma neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS) [116]. Por otra

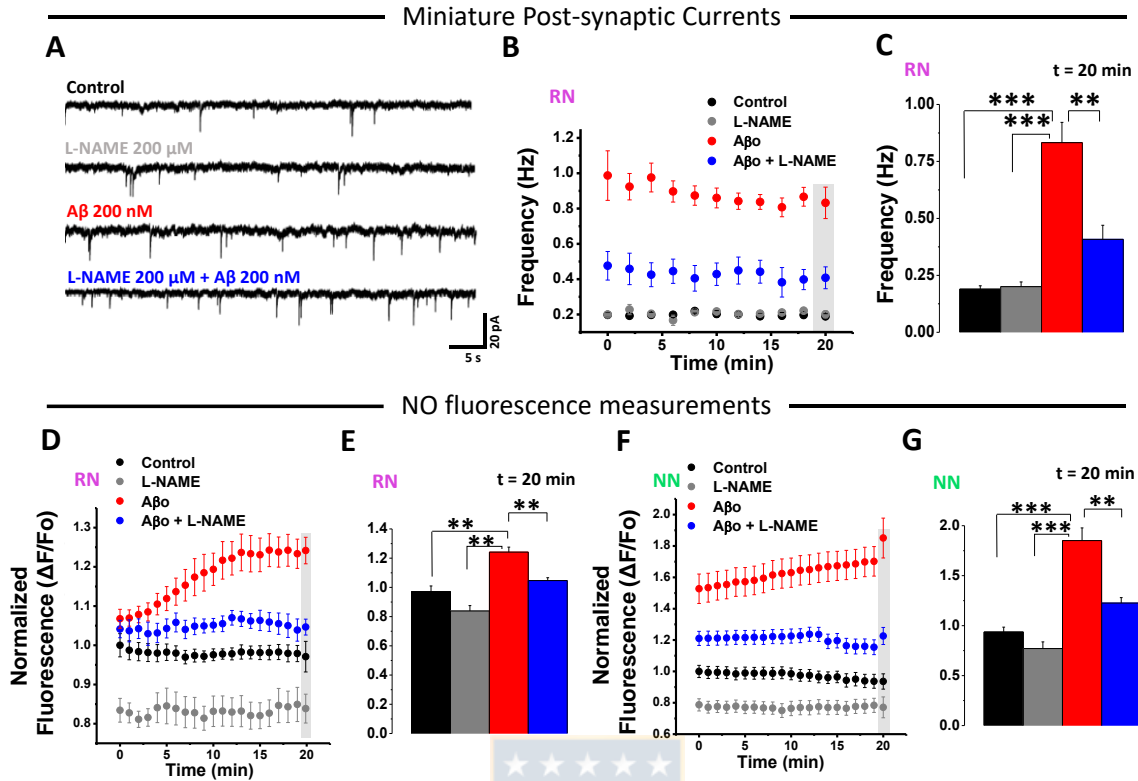
parte, existen antecedentes que demuestran que la inyección intra-cerebral de A $\beta$  participa en procesos de producción de intermediarios reactivos de nitrógenos (RNIs) desde microglia, astrocitos y neuronas, por sí solo o en combinación con citoquinas; y en este proceso iNOS juega un rol preponderante [110], [117], [118]. Adicionalmente, estudios confirman la inmuno-reactividad de iNOS en neuronas en cerebros de pacientes con EA [111], [112], [119], [120] y la utilización de inhibidores selectivos de iNOS reducen significativamente los efectos de A $\beta$  extracelular sobre la sinapsis [121].

Estos antecedentes, junto con los datos obtenidos hasta ese momento nos permitieron postular que la isoforma inducible de la NOS (iNOS) podrían estar involucrada en los efectos pre-sinápticos de iA $\beta$ . Por estos motivos y para poder complementar la información obtenida hasta ese momento, se realizó un experimento en condiciones muy similares a las previas, pero utilizando un inhibidor específico de la isoforma iNOS (1400W). La pre-incubación con 1400W 200  $\mu$ M por 24 horas [122] no produjo diferencias significativas en la frecuencia de las mPSCs con respecto al control sin esta molécula (**Fig. 19A – C, en negro y gris**), indicando que por sí sola no tiene mayores efectos en la transmisión sináptica, ni en la producción de NO en las neuronas RN o NN (**Fig. 19D – G, en negro y gris**). Sin embargo, al aplicar iA $\beta$  en un cultivo que ha sido pre-incubado con 1400W, no encontramos diferencias significativas en la frecuencia de actividad sináptica (**Fig. 19A – C, en azul**) con respecto al cultivo que no fue pre-incubado con este inhibidor (**Fig. 19A – C, en rojo**), ni tampoco en los niveles de NO en las neuronas RN y NN (**Fig. 19D – G, en rojo y azul**). Estos resultados nos permiten concluir que la isoforma iNOS no estaría involucrada en los efectos de A $\beta$  sobre la neurotransmisión.

Esto nos sugirió que, si A $\beta$  estaba aumentando la síntesis de NO, debía hacerlo a través de las otras dos isoformas presentes en neuronas, eNOS y nNOS [116], [123]. No obstante, la presencia de Ca<sup>2+</sup> es requisito fundamental para la función de esta última. Considerando que realizamos estos registros en presencia del quelante BAPTA y que L-NAME es un inhibidor que posee grados de inhibición similar para ambas isoformas

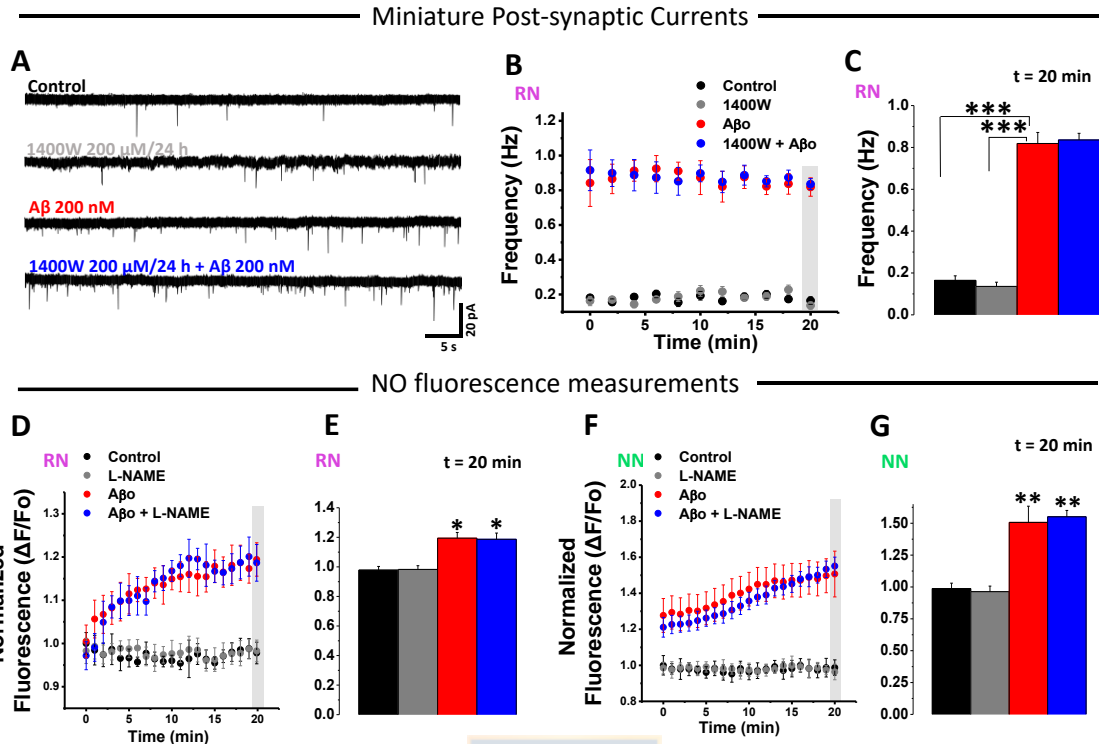
[124], [125], es que excluimos a la nNOS en el efecto de  $iA\beta_0$  sobre la producción de NO, por lo cual los datos sugieren que es eNOS la enzima involucrada.





**Figura 18. La sintasa de óxido nítrico media los efectos de iA $\beta$  en la frecuencia de las corrientes sinápticas miniaturas.** **A, B, C,** Registros representativos y cuantificación de la frecuencia de corrientes post-sinápticas miniaturas en ausencia (en negro) y presencia de A $\beta$  200 nM (en rojo), junto con la pre-incubación de un inhibidor de sintasas de óxido nítrico (L-NAME) 200  $\mu$ M por 20-30 min. Se observa que L-NAME *per se* (en gris) no tiene un efecto en la frecuencia de las corrientes sinápticas. Por otra parte, al pre-incubar el cultivo con L-NAME y aplicar A $\beta$  intracelular (en azul), este efecto disminuye en ~60 %. El gráfico de barras en (C) se obtuvo a partir de los datos registrados a tiempo 20' en C. **D, E, F, G,** Registro de la fluorescencia de DAQ obtenido desde la neurona registrada (RN) (D y E) y de las neuronas adyacentes (NN) (F y G). Se aprecia que, tanto para la célula RN como para las NN, se observa un aumento de NO al aplicar A $\beta$  intracelular en la neurona RN, y ese efecto cambia significativamente cuando se aplica A $\beta$  en un cultivo que ha sido pre-incubado con L-NAME. Los gráficos de líneas y de barras representan el promedio  $\pm$  SEM. \*\* denota  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (ANOVA).  $n=9$  para RN y  $n>50$  para NN de 3 experimentos independientes. Al menos que se especifique, cada comparación estadística se realizó con respecto a su control.





**Figura 19. Inhibidor de iNOS 1400W no afecta las acciones A $\beta$  sobre la frecuencia de las corrientes sinápticas.** **A, B, C,** Registros representativos y cuantificación de la frecuencia de corrientes post-sinápticas miniaturas en ausencia (en negro) y presencia de A $\beta$  200 nM (en rojo) (**C**), junto con la co-aplicación de un inhibidor de iNOS (1400W) 200  $\mu$ M por 24 horas. Se observa que 1400W *per se* (en gris) no tiene un efecto en la frecuencia de las corrientes sinápticas. Por otra parte, al pre-incubar el cultivo con 1400W y aplicar A $\beta$  intracelular (en azul), no cambia el efecto de este sobre la frecuencia de las mPSCs. El gráfico de barras en (**C**) se obtuvo a partir de los datos registrados a tiempo 20'. **D, E, F, G,** Registro de la fluorescencia de DAQ obtenido desde la neurona registrada (RN) (**D y E**) y de las neuronas adyacentes (NN) (**F y G**). Se aprecia que, tanto para la célula RN como para las NN, se observa un aumento de NO al aplicar A $\beta$  intracelular en la neurona RN, y ese efecto no cambia significativamente cuando se aplica A $\beta$  en un cultivo que ha sido pre-incubado con el inhibidor de iNOS. Los gráficos de líneas y de barras representan el promedio  $\pm$  SEM. \* denota  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . (*t-test*).  $n=9$  para RN y  $n>50$  para NN de 3 experimentos independientes. A menos que se especifique, cada comparación estadística se realizó con respecto a su control.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Efectos globales de iA $\beta$

Nuestros resultados mostraron que A $\beta$  intracelular produjo efectos importantes a nivel de la neurotransmisión, a través de mecanismos que involucran la participación de componentes pre-y post-sinápticos, alterando de esta manera la función neuronal. Este efecto fue dependiente de la conformación de iA $\beta$ , ya que al pre-incubarlo con un anticuerpo específico para especies oligoméricas, inactivó el efecto sobre la neurotransmisión. Adicionalmente, la aplicación de iA $\beta$  denaturado o la secuencia reversa tampoco mostraron efectos sobre las mPSCs. Por otra parte, los datos sugieren que estos efectos serían tempranos, pues ocurren casi instantáneamente cuando introducimos A $\beta$  en el citoplasma neuronal. De esta forma, la presencia intracelular de A $\beta$  corresponde a un evento que podría tener una importancia en las etapas iniciales de la enfermedad. De hecho, la presencia de A $\beta$  intracelular ha sido ampliamente descrita en varios modelos murinos de EA y resulta interesante mencionar que en 3 de los modelos más utilizados, y en otros también, se ha visto una acumulación intracelular de A $\beta$  previo al establecimiento de los déficits sinápticos ya bastante caracterizados [67], [71]. De especial interés para esta tesis es el modelo murino APPE693 $\Delta$  o mutación Osaka; esta variante de APP genera un A $\beta$  mutante que presenta una deleción del residuo de ácido glutámico en la posición 22 (A $\beta$  E22 $\Delta$ ), no forma fibras amiloides *in vitro* y los pacientes con la mutación carecen de depósitos de placas amiloides en el parénquima cerebral [126]. Estos ratones exhiben acumulaciones intracelulares de A $\beta$  de manera muy rápida, y la patología es más acelerada que en otros modelos murinos [127]. Aún más, el péptido A $\beta$  E22 $\Delta$  forma fácilmente oligómeros *in vitro* [126] y existe una acumulación exacerbada de esta especie dentro de células que han sido transfectadas con un constructo conteniendo este gen mutado [128]. Además la presencia de iA $\beta$  se correlaciona directamente con el daño severo de la plasticidad sináptica a la forma de LTP [127], y con la disminución de proteínas importantes para la función sináptica [127].

En nuestros resultados no encontramos déficits sinápticos, sino que al contrario, vimos un aumento en la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria, pero con efectos más marcados en la primera. Esto es interesante y plantea la pregunta de ¿cómo A $\beta$  intracelular llega finalmente a producir una patología sináptica en primer lugar? Al respecto, se ha visto que A $\beta$  inicialmente induce un incremento en la función de la neurotransmisión [26]; el problema es que este efecto no se puede mantener en el tiempo e hipotetizamos que la función neuronal comienza a decaer a consecuencia de un agotamiento de la maquinaria celular para mantener este funcionamiento acelerado por tiempos **más prolongados** [129]–[131] y por excitotoxicidad [11], [132], [133], agotando las vesículas sinápticas y provocando una severa disfunción de la neurotransmisión. Esto es lo que ha sido ampliamente descrito en la literatura en modelos murinos de EA y que está presente antes del inicio de los déficits cognitivos [5], [134].

#### **4.2. Efecto post-sináptico de iA $\beta$**

Los datos obtenidos muestran que iA $\beta$  causa una potenciación post-sináptica a través del aumento de la corriente mediada por los receptores de AMPA. Este efecto fue considerablemente atenuado en presencia de un inhibidor de PKC (Quelertina), dado que redujo significativamente la amplitud de las corrientes AMPAérgicas evocadas y miniaturas a niveles similares al control. Adicionalmente a PKC, se ha descrito que otras quinasas presentes en neuronas de hipocampo, dentro de las cuales destacan PKA (Proteína quinasa A) y CAMKII (Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina Proteína quinasa II) pueden tener efectos similares. Por ejemplo, CAMKII puede aumentar la conductancia del receptor de AMPA [104] y además aumentar el número de contactos físicos sinápticos, mejorando estructuralmente la conectividad que media la transmisión excitatoria [135]. Por otra parte, PKA puede aumentar el número de AMPAR en la sinapsis [136], así como también aumentar la liberación de neurotransmisores a nivel pre-sináptico [137]. Adicionalmente y, durante el desarrollo de esta tesis, se publicó que iA $\beta$  aumenta la amplitud de la corriente mediada por el receptor de AMPA en respuesta a la presencia de iA $\beta$  en rebanadas de hipocampo [138]. Sin embargo, estos datos difieren de los nuestros en

que este efecto requería de más tiempo, era dependiente de calcio y además no era mediado por PKC, sino que por PKA. Esto puede deberse a diferencias en la preparación de los oligómeros o que simplemente PKC a tiempos más prolongados no posee un rol preponderante, y es PKA la quinasa que predomina en ese intervalo de tiempo. Nuestra observación de que el efecto se inhibe en presencia de Queleritina descarta un rol significativo o específico de otra quinasa y apoya la idea de que el aumento en la corriente del receptor de AMPA representa el mecanismo principal por el cual  $iA\beta_0$  podría aumentar la despolarización a nivel post-sináptico a través de PKC.

Por otra parte, la familia de quinasas PKC serina/treonina participa en diferentes procesos a nivel de la neurotransmisión, como por ejemplo, en la inducción y mantenimiento de un fenómeno conocido como potenciación a largo plazo (LTP, *Long Term Potentiation*), una forma de plasticidad sináptica que involucra un aumento estable de la neurotransmisión y es considerada como un correlato de procesos de memoria y aprendizaje a nivel molecular [139]. Por tanto, esta forma de plasticidad y la formación de la memoria son altamente dependientes de la actividad de PKC [140], [141]. Generalmente la fosforilación de PKC requiere tanto de  $Ca^{2+}$  como diacilglicerol para la activación, aunque también existen isoformas atípicas de PKC (como PKM $\zeta$ ), las cuales no requieren de estos determinantes moleculares para su activación [108]. De hecho, PKM $\zeta$  constitutivamente activa ha sido objeto de una investigación exhaustiva y se la ha apodado como "molécula de la memoria", ya que se propone que es necesaria y suficiente para mantener el LTP, sin necesidad de que haya un aumento en el  $Ca^{+2}$  intracelular [142], [143]. Específicamente, se observó que la perfusión intracelular de PKM $\zeta$  a través del electrodo de registro es suficiente para producir LTP en rebanadas de hipocampo [142] y que la inhibición de PKM $\zeta$  afecta considerablemente la memoria y revierte el fenómeno de LTP *in vivo* [144]. Interesantemente la isoforma PKM $\zeta$  también aumenta la transmisión sináptica excitatoria mediante la potenciación de la corriente AMPAérgica en la membrana post-sináptica [145], un efecto  $Ca^{+2}$ -independiente muy similar al que encontramos en este estudio. De esta manera, nuestros resultados se correlacionan con datos ya publicados en la literatura y apoyan la idea de que los **efectos**

**intracelulares de A $\beta$  sobre la potenciación de AMPA, mediante la vía de PKC, son relevantes para la función neuronal.**

#### **4.3. Efecto pre-sináptico de iA $\beta$ : rol de óxido nítrico**

Por otra parte, PKC no sólo está involucrada en la función neuronal a nivel post-sináptico. De hecho, las mismas quinasas involucradas en el aumento de las corrientes AMPAérgicas descritas previamente (PKC, PKA, CAMKII), participan también en mecanismos pre-sinápticos mediados por el neuromodulador gaseoso NO (óxido nítrico) [146]–[148], y que son importantes para la función neuronal. De hecho, es interesante mencionar que en nuestros registros de corrientes miniatura con Queleritina, no sólo se observó una disminución significativa de la amplitud de corrientes AMPAérgicas, sino que también en la frecuencia a niveles similares del control. Esto da cuenta de que PKC también podría estar participando de los efectos pre-sinápticos de iA $\beta$  (**Fig. 20**).

De esta manera, NO tiene un rol preponderante en la homeostasis sináptica, tanto a nivel pre- como post-sináptico. Nuestros datos sugieren que el NO estaría implicado en los efectos pre-sinápticos de iA $\beta$  en la transmisión sináptica, puesto que en un rango amplio de concentraciones A $\beta$  aumentó la frecuencia de corrientes miniatura, lo cual refleja un aumento en la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico. Esto se correlaciona con otros estudios que han mostrado que NO también aumenta la liberación de neurotransmisores desde la pre-sinapsis. Por ejemplo, un estudio previo con una molécula donadora de NO resultó en una mayor frecuencia de corrientes sinápticas inhibitorias espontáneas y miniaturas (sIPSC y mIPSC, respectivamente) y por ende aumentando la transmisión sináptica GABAérgica en neuronas de hipocampo cultivadas, sin aumentar la amplitud [149], lo cual se asemeja a lo encontrado en nuestra investigación. También, se ha mostrado que esta liberación sería independiente de la presencia de Ca<sup>2+</sup> citosólico [150], lo cual se correlaciona directamente con los datos de corrientes miniatura obtenidos en presencia de BAPTA en nuestro estudio.

Es interesante mencionar que nuestros datos no sólo se correlacionan con estudios en sinapsis inhibitoria, sino que también con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación que han estudiado el efecto de NO en la sinapsis excitatoria, encontrando que NO también puede aumentar la liberación de neurotransmisores hacia el espacio sináptico [151]–[153]. Más aún, en la sinapsis glutamatérgica también se ha observado que, tras la activación de receptores ionotrópicos excitatorios post-sinápticos, se produce la liberación de NO desde la post-sinapsis, y que a su vez este difunde a la pre-sinapsis, provocando una liberación exacerbada de glutamato y un aumento estable de la neurotransmisión, fenómeno previamente mencionado y conocido como LTP [139]. Por lo tanto, tanto la evidencia presente en la literatura, como la obtenida en este trabajo de tesis, sugieren que el mecanismo trans-sináptico de óxido nítrico **no es selectivo para un determinado tipo de neurotransmisión sináptica, y que ocurre tanto en la sinapsis excitatoria como en la inhibitoria (Fig. 20).**

#### **4.4. Origen post-sináptico de NO**

De manera complementaria, nuestros resultados con el inhibidor de NO sintasa (L-NAME) descartan en que otras señales retrógradas estén mediando el efecto pre-sináptico de  $iA\beta_o$  de manera importante. Específicamente, la participación de la isoforma inducible de NO sintasa (iNOS) fue descartada por nuestros resultados al utilizar un inhibidor específico. Sin embargo, en las condiciones experimentales ensayadas las isoformas endoteliales y neuronales (eNOS y nNOS, respectivamente) sí podrían estar participando en la generación de NO a partir de la neurona post-sináptica para activar la pre-sinapsis. Al respecto se sabe que nNOS requiere de la presencia de  $Ca^{2+}$  para sintetizar NO [154], mientras que en el caso de eNOS se ha visto que tanto en presencia como en ausencia de  $Ca^{2+}$  puede llevar a cabo su función [155]. Considerando este antecedente, y el hecho de que L-NAME es un inhibidor más específico para nNOS y eNOS que para iNOS, y que en nuestros resultados el efecto de  $iA\beta_o$  es independiente de  $Ca^{2+}$ , entonces es altamente probable que el aumento en frecuencia de corrientes sinápticas que vemos sea principalmente dependiente de eNOS. Previamente se ha observado que eNOS puede funcionar en ausencia de  $Ca^{2+}$  en el sistema vascular, y

aunque también se ha reportado su presencia y función a nivel neuronal [123], [156], a nuestro entender este es el primer reporte que sugiere que eNOS aumenta la liberación de NO y aumenta el vaciamiento de vesículas sinápticas independiente de  $Ca^{2+}$ . Adicionalmente, otros antecedentes indican que el fenómeno de LTP en hipocampo todavía ocurre en ratones *knock-out* (KO) para nNOS [156]–[158], así como también para modelos KO de eNOS [157]; sin embargo, este **no ocurre** en modelos KO en los cuales **AMBAS sintasas** han sido inactivadas [156], [157], indicando que al menos la presencia de una de ellas es necesaria para generar LTP. Esto es interesante para nuestros resultados, ya que combinando esto con el antecedente de que el efecto es independiente de  $Ca^{2+}$ , no deja otra alternativa más que para que eNOS esté mediando el efecto pre-sináptico de  $iA\beta$ . Los mecanismos por los cuales  $A\beta$  podría estar aumentando la producción de NO sin aumentar el  $Ca^{2+}$  intracelular global en la post-sinapsis son aún desconocidos, pero otra posibilidad involucra una interacción directa con la sintasa [159], [160]. Sin embargo, se requieren más estudios para comprender completamente los mecanismos específicos por los cuales  $iA\beta$  provoca un aumento sostenido de NO en neuronas hipocampales.

En nuestros resultados observamos el efecto de NO a niveles somáticos y de cierta forma emulando lo que podría estar ocurriendo en etapas tempranas de la enfermedad, cuando comienzan a observarse las primeras acumulaciones intracelulares de  $A\beta$ . Sin embargo, durante el desarrollo de la patología, la señalización de NO se altera a través de diferentes mecanismos: por ejemplo, existe un aumento de las sintasas de NO (NOS) en modelos de EA y en cerebros humanos [119], [161]. Interesantemente, en ratones 3xTg pre-sintomáticos, estas alteraciones (que favorecen la síntesis de NO) ocurren al mismo tiempo en los que comienza la patología sináptica [161]. De hecho, en el modelos de EA denominado APPSwDI (que posee 3 mutaciones en APP: K760N/M671L, E693Q, D694N), se ha visto que NO exhibe propiedades neuroprotectoras, y parece ser particularmente importante en la reducción de muerte celular [162], [163]. Sin embargo, podemos pensar que cuando la liberación de NO se sostiene en el tiempo puede tener consecuencias negativas para la función neuronal, con efectos opuestos a los descritos en esta tesis, agotando las vesículas sinápticas y

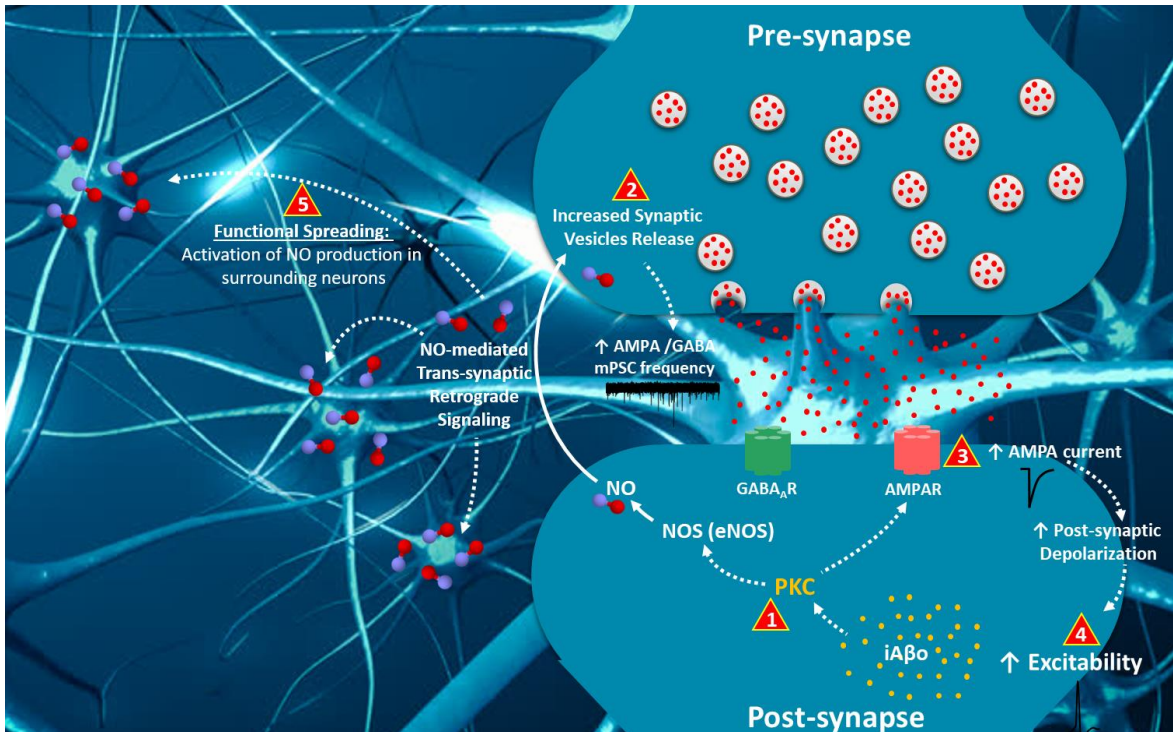
provocando una severa disfunción de la neurotransmisión. Esto es lo que ha sido ampliamente descrito en la literatura en modelos murinos de EA y que está presente antes del inicio de los déficits cognitivos, y se presenta como un aumento de la depresión sináptica, denominada depresión a largo plazo (LTD, **L**ong **T**erm **D**epression), fenómeno opuesto al LTP [5], [134] y que ocurre producto de la neurotoxicidad mediada por A $\beta$  [164], [165]. Aún más, a nivel celular la liberación prolongada de NO también podría causar estrés metabólico, oxidativo y disfunción en organelos como la mitocondria y el RE, llevando finalmente a la muerte neuronal, eventos que también han sido reportados en la literatura [166]–[170]. Por lo tanto, la actividad de NOS debe estar estrictamente regulada para mantener la homeostasis celular y prevenir el daño sináptico y celular a futuro.

#### **4.5. Efectos extra-sinápticos de iA $\beta$**

Por otra parte, nuestros estudios con registros electrofisiológicos asociados a fluorescencia mostraron que no sólo se producía NO en la neurona registrada que contenía A $\beta$ , sino que también en neuronas adyacentes, sin que este se encontrara en el compartimento citosólico de estas células. Esto sugiere que existe un fenómeno en el cual el efecto funcional de A $\beta$  se extiende hacia otras neuronas. Vale decir que, por mecanismos aún desconocidos, A $\beta$  altera la función de neuronas hipocampales más de allá de dónde se encuentra presente (**Fig. 20**). Aquí ya no hablamos solamente de efectos sinápticos propiamente tal, sino que de acciones extra-sinápticas, ya que A $\beta$  está afectando la actividad sináptica no sólo de la célula en la cual se encuentra, sino que también está aumentando la función en otras células que forman parte de esa misma red neuronal.

Es importante notar que estos efectos se observaron tanto para las moléculas donadora como secuestradoras de NO, indicando que el NO presente en la neurona registrada podría ser la molécula señalizadora para que las neuronas vecinas aumenten también la producción de NO. De hecho, se ha descrito que NO es un gas que posee un alto coeficiente de difusión ( $\sim 3300 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) [171] y que es capaz de difundir desde la célula que lo produce a una distancia de entre 150-300  $\mu\text{m}$  [172] y que el radio de





**Figura 20. Esquema final de efectos intracelulares de Aβ sobre la neurotransmisión y la excitabilidad neuronal.** Resumen esquemático de los efectos de iAβ a nivel pre- y post-sináptico. Al estar presente en el compartimento post-sináptico activa a PKC (1), la que a su vez media la activación de óxido nítrico sintasa (NOS) (muy seguramente su forma endotelial, eNOS). Esto gatilla la producción de NO a nivel post-sináptico, el cual a través de un mecanismo retrógrado, activa un aumento en la liberación de neurotransmisores desde el compartimento pre-sináptico (2). Estos activan los receptores post-sinápticos GABA (en verde) y AMPAR (rosado), lo cual se evidenció como un aumento en la frecuencia de las mPSCs GABAérgicas y AMPAérgicas, respectivamente. Adicionalmente, PKC presente en la post-sinapsis aumenta la corriente del receptor de AMPA (3), y sumado a los efectos anteriores, se produce un aumento en la despolarización post-sináptica, facilitando que los valores del potencial de membrana ( $V_m$ ) se acerquen al umbral para poder generar con mayor facilidad un potencial de acción. Esto repercute directamente en la función neuronal, aumentando la excitabilidad de la célula (4). Por último el óxido nítrico liberado desde la post-sinapsis en la cual se encuentra iAβ no fue la única fuente de NO, sino que también iAβ, seguramente mediante ese mismo NO producido, fue capaz de aumentar la producción de NO en neuronas aledañas, un fenómeno que denominamos expansión funcional del efecto de iAβ.

difusión de una fuente puntual (por ejemplo, en nuestro caso, una sólo célula neuronal) que genera NO por 1-10 s corresponde a volumen que contiene ~2 millones de sinapsis [173]. Por lo tanto, la posibilidad de proponer al NO como la misma molécula señalizadora del efecto funcional de A $\beta$  hacia las otras neuronas de la red neuronal es muy plausible. Sin embargo, más estudios son necesarios para confirmar o no la participación de NO en el efecto de expansión funcional de A $\beta$  intracelular (**Fig. 20**).

Este fenómeno de expansión de efectos funcionales a células vecinas, se asemeja bastante al efecto de priones del sistema nervoso, incluidos PrP (proteína Prion) y A $\beta$ , los cuales se han demostrado que pueden extenderse de una célula a la siguiente alterando el plegamiento de otros péptidos, esparciendo la patología a través del cerebro [174], [175]. La diferencia es que en nuestro caso no existiría transmisión de la proteína *per se*, sino que de los efectos funcionales que produce. Por ende, hemos adoptado el término “**esparcimiento funcional**” para referirnos a este fenómeno.

#### **4.6. Implicancias de los efectos pre- y post-sinápticos en la patología:**

##### **Excitabilidad neuronal en EA**

Las consecuencias del aumento de NO en células vecinas son variadas, pero entre ellas la más interesante para este estudio es que debido a que existe un número mayor de células produciendo NO, existe una mayor probabilidad de aumentar la descarga de neurotransmisores en zonas próximas, aumentando así la **despolarización sináptica y posiblemente también la excitabilidad de la red neuronal**. De hecho, el aumento en la liberación de aminoácidos excitatorios, como glutamato, está asociado también a la aparición de convulsiones y neurotoxicidad [176]–[178]. Esto ha llevado a especular que la producción excesiva de NO en la red neuronal podría estar implicada en epilepsia, la cual se caracteriza por un aumento importante en la actividad neuronal, aumentando la frecuencia de disparos PAs e incrementando la excitabilidad de la red neuronal [179], [180]. Esto fue justamente lo que encontramos en nuestros estudios, y apoya la idea de que el NO generado por la presencia de iA $\beta$ o, podría estar contribuyendo a la excitabilidad neuronal observada en nuestros experimentos. De esta manera no

podemos descartar que A $\beta$  de manera intracelular pudiese estar contribuyendo a la actividad epileptiforme que exhiben los modelos murinos de AD y pacientes de EA [77], [78], [79], [80].

A nivel post-sináptico se ha visto que los receptores ionotrópicos pueden ser importantes modulares de la excitabilidad. Por ejemplo, se ha descrito que el receptor de NMDA [181] o de acetilcolina ( $\alpha$ -7n-AChR) [182], son algunos de los varios blancos moleculares que, al ser activados post-sinápticamente, pueden contribuir a la **hiperexcitación neuronal**. En esta tesis se muestra que el receptor de AMPA estaría mediando un efecto muy similar. Al respecto se ha visto que el aumento en la función de este receptor podría estar participando en fenómenos de excitabilidad neuronal [183], [184]. Por ejemplo, algunos años luego del descubrimiento de bloqueadores selectivos de AMPA [185], se demostró que estos antagonistas reducen o anulan de manera significativa la actividad epileptiforme en neuronas de hipocampo [186], [187]. Esto sugiere la existencia de un rol para este tipo de receptores de glutamato ionotrópicos en la mediación de la actividad epileptiforme, y en especial, un requisito crítico para los receptores de AMPA en la generación de descargas epilépticas. La conclusión de que los receptores AMPA son de importancia primordial para iniciar descargas epileptiformes fue confirmada por estudios en otras regiones cerebrales relevantes para la epilepsia, como la neocorteza o la corteza entorrinal [188]–[190].

Con respecto a lo anterior, existen varios reportes que muestran el rol que podría estar jugando la actividad epileptiforme en modelos murinos de EA, así como en pacientes que padecen la patología. En específico, se ha visto que la acumulación intracelular de A $\beta$  aumenta la duración de los PAs evocados por inyección de corriente y por ende la duración de la despolarización y la excitabilidad de estas células [191], [192]. En contraste, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que el aumento en la excitabilidad no depende de cambios en las propiedades del potencial de acción, como el umbral, la amplitud o duración del mismo, sino que más bien de una alteración en las propiedades de la neurotransmisión de la neurona a nivel pre- y post-sináptico. Independiente del mecanismo que esté modulando la excitabilidad, se trata de una

alteración que puede tener consecuencias devastadoras en el cerebro de una persona que padece EA.

De esta manera la modulación de la neurotransmisión por  $iA\beta$  a través de PKC, generando una potenciación del receptor de AMPA y un aumento en la liberación de neurotransmisores mediante NO, podría estar íntimamente relacionada con los cambios estructurales que ocurren a largo plazo, y además podrían proveer de un mecanismo para explicar lo que podría estar ocurriendo en etapas tempranas de la enfermedad a nivel sináptico. Precisamente porque la reversibilidad del daño sináptico en **etapas iniciales** puede ser potencialmente un blanco terapéutico en la EA, la contribución de esta tesis se refleja en el estudio de nuevos mecanismos que podrían explicar los efectos tempranos de  $A\beta$  intracelular en la actividad sináptica. Esto es relevante para entender y desarrollar estrategias farmacológicas que permitan revertir parcial o totalmente los mecanismos moleculares por los cuales el péptido gatilla inicialmente la falla sináptica observada en los pacientes con EA.



## 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. Mucke and D. J. Selkoe, "Neurotoxicity of amyloid beta-protein: synaptic and network dysfunction," *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 2, no. 7, p. a006338, 2012.
- [2] J. Hardy and D. J. Selkoe, "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.," *Science*, vol. 297, no. 5580, pp. 353–6, Jul. 2002.
- [3] T. L. Spires and B. T. Hyman, "Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals," *NeuroRx*, vol. 2, no. 3, pp. 423–437, 2005.
- [4] K. Faber-Langendoen, J. C. Morris, J. W. Knesevich, E. LaBarge, J. P. Miller, and L. Berg, "Aphasia in senile dementia of the Alzheimer type," *Ann Neurol*, vol. 23, no. 4, pp. 365–370, 1988.
- [5] D. J. Selkoe, "Alzheimer's disease is a synaptic failure," *Science (80-. )*, vol. 298, no. 5594, pp. 789–791, 2002.
- [6] L. I. Binder, A. L. Guillozet-Bongaarts, F. Garcia-Sierra, and R. W. Berry, "Tau, tangles, and Alzheimer's disease," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2005.
- [7] A. De Calignon *et al.*, "Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease," *Neuron*, 2012.
- [8] A. Tramutola, C. Lanzillotta, M. Perluigi, and D. A. Butterfield, "Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease," *Brain Research Bulletin*. 2017.
- [9] C. Hetz, E. Chevet, and S. A. Oakes, "Proteostasis control by the unfolded protein response," *Nature Cell Biology*. 2015.
- [10] F. Burté, V. Carelli, P. F. Chinnery, and P. Yu-Wai-Man, "Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders," *Nature Reviews Neurology*. 2015.
- [11] A. Mehta, M. Prabhakar, P. Kumar, R. Deshmukh, and P. L. Sharma, "Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders," *European Journal of Pharmacology*. 2013.
- [12] P. R. Turner, K. O'Connor, W. P. Tate, and W. C. Abraham, "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory," *Prog Neurobiol*, vol. 70, no. 1, pp. 1–32, 2003.
- [13] D. J Selkoe, "Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy," *Physiol. Rev.*, 2001.
- [14] J. T. Jarrett, E. P. Berger, and P. T. Lansbury, "The Carboxy Terminus of the  $\beta$  Amyloid Protein Is Critical for the Seeding of Amyloid Formation: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease," *Biochemistry*, 1993.
- [15] T. Iwatsubo, A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina, and Y. Ihara, "Visualization of A $\beta$ 42(43) and A $\beta$ 40 in senile plaques with end-specific A $\beta$  monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A $\beta$ 42(43)," *Neuron*, 1994.

- [16] M. P. Lambert *et al.*, "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 11, pp. 6448-53, May 1998.
- [17] C. C. Curtain *et al.*, "Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits," *J Biol Chem*, vol. 276, no. 23, pp. 20466-20473, 2001.
- [18] D. H. Small, S. S. Mok, and J. C. Bornstein, "Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom," *Nat Rev Neurosci*, vol. 2, no. 8, pp. 595-598, 2001.
- [19] D. J. Selkoe, "Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior," *Behav Brain Res*, vol. 192, no. 1, pp. 106-113, 2008.
- [20] M. Manna and C. Mukhopadhyay, "Binding, conformational transition and dimerization of amyloid-beta peptide on GM1-containing ternary membrane: insights from molecular dynamics simulation," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e71308, 2013.
- [21] C. L. Masters and D. J. Selkoe, "Biochemistry of amyloid beta-protein and amyloid deposits in Alzheimer disease," *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 2, no. 6, p. a006262, 2012.
- [22] A. Deshpande, E. Mina, C. Glabe, and J. Busciglio, "Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons.," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 22, pp. 6011-8, May 2006.
- [23] E. Tamagno, P. Bardini, M. Guglielmotto, O. Danni, and M. Tabaton, "The various aggregation states of beta-amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression," *Free Radic Biol Med*, vol. 41, no. 2, pp. 202-212, 2006.
- [24] H. Hsieh *et al.*, "AMPA removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss," *Neuron*, vol. 52, no. 5, pp. 831-843, 2006.
- [25] G. M. Shankar, B. L. Bloodgood, M. Townsend, D. M. Walsh, D. J. Selkoe, and B. L. Sabatini, "Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway," *J Neurosci*, vol. 27, no. 11, pp. 2866-2875, 2007.
- [26] J. Parodi, F. J. Sepúlveda, J. Roa, C. Opazo, N. C. Inestrosa, and L. G. Aguayo, "Beta-amyloid causes depletion of synaptic vesicles leading to neurotransmission failure.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 4, pp. 2506-14, Jan. 2010.
- [27] R. D. Terry *et al.*, "Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment," *Ann Neurol*, vol. 30, no. 4, pp. 572-580, 1991.
- [28] C. A. McLean *et al.*, "Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease," *Ann Neurol*, vol. 46, no. 6, pp. 860-866, 1999.
- [29] L. F. Lue *et al.*, "Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease," *Am J Pathol*, vol. 155, no. 3, pp. 853-



862, 1999.

- [30] B. Mroczko, M. Groblewska, A. Litman-Zawadzka, J. Kornhuber, and P. Lewczuk, "Amyloid  $\beta$  oligomers (A $\beta$ Os) in Alzheimer's disease," *Journal of Neural Transmission*. 2018.
- [31] C. Peters, E. Fernandez-Perez, J. Fuentealba, and L. G. Aguayo, *Neurotoxicity of a $\beta$  explained by its association to plasma membranes*. 2015.
- [32] B. J. Gilbert, "The role of amyloid  $\beta$  in the pathogenesis of Alzheimer's disease.," *J. Clin. Pathol.*, vol. 66, no. 5, pp. 362–6, May 2013.
- [33] S. M. Chafekar, F. Baas, and W. Scheper, "Oligomer-specific Abeta toxicity in cell models is mediated by selective uptake.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1782, no. 9, pp. 523–31, Sep. 2008.
- [34] C. G. Glabe, "Structural classification of toxic amyloid oligomers.," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 44, pp. 29639–43, Oct. 2008.
- [35] D. M. Walsh *et al.*, "Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo," *Nature*, 2002.
- [36] P. N. Lacor *et al.*, "Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease.," *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 4, pp. 796–807, Jan. 2007.
- [37] R. J. Mark, Z. Pang, J. W. Geddes, K. Uchida, and M. P. Mattson, "Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation.," *J. Neurosci.*, vol. 17, no. 3, pp. 1046–54, Feb. 1997.
- [38] L. Crews and E. Masliah, "Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 19, no. R1, pp. R12–20, Apr. 2010.
- [39] D. Wang, E. Y. Yuen, Y. Zhou, Z. Yan, and Y. K. Xiang, "Amyloid beta peptide-(1-42) induces internalization and degradation of beta2 adrenergic receptors in prefrontal cortical neurons.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 36, pp. 31852–63, Sep. 2011.
- [40] R. Sultana and D. A. Butterfield, "Alterations of some membrane transport proteins in Alzheimer's disease: role of amyloid beta-peptide.," *Mol. Biosyst.*, vol. 4, no. 1, pp. 36–41, Jan. 2008.
- [41] K. Parameshwaran, M. Dhanasekaran, and V. Suppiramaniam, "Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation," *Exp Neurol*, vol. 210, no. 1, pp. 7–13, 2008.
- [42] C. Ripoli *et al.*, "Intracellular accumulation of amyloid-beta (Abeta) protein plays a major role in Abeta-induced alterations of glutamatergic synaptic transmission and plasticity," *J Neurosci*, vol. 34, no. 38, pp. 12893–12903, 2014.
- [43] W. Q. Zhao *et al.*, "Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid  $\beta$  oligomer-induced synaptic disruption," *J. Biol. Chem.*, 2010.
- [44] G. Whitehead, P. Regan, D. J. Whitcomb, and K. Cho, "Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptor: A new perspective on amyloid-beta mediated pathophysiology of Alzheimer's disease," *Neuropharmacology*. 2017.

- [45] S. Guntupalli, J. Widagdo, and V. Anggono, "Amyloid-  $\beta$  -Induced Dysregulation of AMPA Receptor Trafficking," *Neural Plasticity*. 2016.
- [46] P. K. Y. Chang, D. Verbich, and R. A. McKinney, "AMPA receptors as drug targets in neurological disease - advantages, caveats, and future outlook," *Eur. J. Neurosci.*, 2012.
- [47] V. A. Derkach, M. C. Oh, E. S. Guire, and T. R. Soderling, "Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity," *Nature Reviews Neuroscience*. 2007.
- [48] V. Anggono and R. L. Huganir, "Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity," *Current Opinion in Neurobiology*. 2012.
- [49] D. Zamanillo *et al.*, "Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning," *Science (80-. )*., 1999.
- [50] J. P. Cleary *et al.*, "Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function," *Nat Neurosci*, vol. 8, no. 1, pp. 79–84, 2005.
- [51] H. W. Kessels, S. Nabavi, and R. Malinow, "Metabotropic NMDA receptor function is required for beta-amyloid-induced synaptic depression," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, no. 10, pp. 4033–4038, 2013.
- [52] W. Wei, L. N. Nguyen, H. W. Kessels, H. Hagiwara, S. Sisodia, and R. Malinow, "Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity," *Nat Neurosci*, vol. 13, no. 2, pp. 190–196, 2010.
- [53] A. Demuro, I. Parker, and G. E. Stutzmann, "Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease," *J Biol Chem*, vol. 285, no. 17, pp. 12463–12468, 2010.
- [54] D. Schenk, G. S. Basji, and M. N. Pangalos, "Treatment strategies targeting amyloid beta-protein," *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 2, no. 9, p. a006387, 2012.
- [55] E. H. Koo and S. L. Squazzo, "Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway," *J Biol Chem*, vol. 269, no. 26, pp. 17386–17389, 1994.
- [56] L. Rajendran and W. Annaert, "Membrane trafficking pathways in Alzheimer's disease," *Traffic*, vol. 13, no. 6, pp. 759–770, 2012.
- [57] B. L. Tang, "Neuronal protein trafficking associated with Alzheimer disease: from APP and BACE1 to glutamate receptors," *Cell Adh Migr*, vol. 3, no. 1, pp. 118–128, 2009.
- [58] W. Matsunaga, T. Shirokawa, and K. Isobe, "Specific uptake of Abeta1-40 in rat brain occurs in astrocyte, but not in microglia," *Neurosci Lett*, vol. 342, no. 1–2, pp. 129–131, 2003.
- [59] S. Mandrekar, Q. Jiang, C. Y. Lee, J. Koenigsknecht-Talboo, D. M. Holtzman, and G. E. Landreth, "Microglia mediate the clearance of soluble Abeta through fluid phase macropinocytosis," *J Neurosci*, vol. 29, no. 13, pp. 4252–4262, 2009.
- [60] K. K. Kandimalla, O. G. Scott, S. Fulzele, M. W. Davidson, and J. F. Poduslo, "Mechanism of neuronal versus endothelial cell uptake of Alzheimer's disease amyloid beta protein.," *PLoS One*, vol. 4, no. 2, p. e4627, Jan. 2009.



- [61] F. M. LaFerla, K. N. Green, and S. Oddo, "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 8, no. 7, pp. 499–509, Jul. 2007.
- [62] T. A. Bayer and O. Wirths, "Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease," *Front Aging Neurosci*, vol. 2, p. 8, 2010.
- [63] R. H. Takahashi, E. Capetillo-Zarate, M. T. Lin, T. A. Milner, and G. K. Gouras, "Co-occurrence of Alzheimer's disease ss-amyloid and tau pathologies at synapses," *Neurobiol Aging*, vol. 31, no. 7, pp. 1145–1152, 2010.
- [64] E. Capetillo-Zarate *et al.*, "High-resolution 3D reconstruction reveals intra-synaptic amyloid fibrils," *Am J Pathol*, vol. 179, no. 5, pp. 2551–2558, 2011.
- [65] A. Pensalfini *et al.*, "Intracellular amyloid and the neuronal origin of Alzheimer neuritic plaques," *Neurobiol Dis*, vol. 71, pp. 53–61, 2014.
- [66] L. A. Welikovitch *et al.*, "Evidence of intraneuronal A $\beta$  accumulation preceding tau pathology in the entorhinal cortex," *Acta Neuropathol.*, vol. 136, no. 6, pp. 901–917, Dec. 2018.
- [67] L. M. Billings, S. Oddo, K. N. Green, J. L. McLaugh, and F. M. LaFerla, "Intraneuronal A $\beta$  causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice," *Neuron*, vol. 45, no. 5, pp. 675–688, 2005.
- [68] S. Oddo, A. Caccamo, I. F. Smith, K. N. Green, and F. M. LaFerla, "A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of A $\beta$ ," *Am J Pathol*, vol. 168, no. 1, pp. 184–194, 2006.
- [69] S. Oddo *et al.*, "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction.," *Neuron*, vol. 39, no. 3, pp. 409–21, Jul. 2003.
- [70] A. Bilkei-Gorzo, "Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease," *Pharmacol. Ther.*, vol. 142, no. 2, pp. 244–257, May 2014.
- [71] O. Wirths and T. A. Bayer, "Neuron loss in transgenic mouse models of Alzheimer's disease.," *Int. J. Alzheimers. Dis.*, vol. 2010, Aug. 2010.
- [72] C. L. Russell, S. Semerdjieva, R. M. Empson, B. M. Austen, P. W. Beesley, and P. Alifragis, "Amyloid-beta acts as a regulator of neurotransmitter release disrupting the interaction between synaptophysin and VAMP2," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e43201, 2012.
- [73] B. P. Bean, "The action potential in mammalian central neurons," *Nature Reviews Neuroscience*. 2007.
- [74] M. E. Cuevas *et al.*, "Soluble A $\beta$ (1-40) peptide increases excitatory neurotransmission and induces epileptiform activity in hippocampal neurons," *J Alzheimers Dis*, vol. 23, no. 4, pp. 673–687, 2011.
- [75] H. A. Born *et al.*, "Genetic suppression of transgenic APP rescues Hypersynchronous network activity in a mouse model of Alzheimer's disease," *J Neurosci*, vol. 34, no. 11, pp. 3826–3840, 2014.
- [76] J. T. Brown, J. Chin, S. C. Leiser, M. N. Pangalos, and A. D. Randall, "Altered intrinsic neuronal excitability and reduced Na<sup>+</sup> currents in a mouse model of

- Alzheimer's disease," *Neurobiol. Aging*, vol. 32, no. 11, p. 2109 e1-14, 2011.
- [77] R. Minkeviciene *et al.*, "Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy," *J Neurosci*, vol. 29, no. 11, pp. 3453–3462, 2009.
- [78] K. E. Davis, S. Fox, and J. Gigg, "Increased hippocampal excitability in the 3xTgAD mouse model for Alzheimer's disease in vivo," *PLoS One*, vol. 9, no. 3, p. e91203, 2014.
- [79] C. Hommet, K. Mondon, V. Camus, B. De Toffol, and T. Constans, "Epilepsy and dementia in the elderly," *Dement Geriatr Cogn Disord*, vol. 25, no. 4, pp. 293–300, 2008.
- [80] J. C. Amatniek *et al.*, "Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease," *Epilepsia*, vol. 47, no. 5, pp. 867–872, 2006.
- [81] S. Hong *et al.*, "Soluble Aβ oligomers are rapidly sequestered from brain ISF in vivo and bind GM1 ganglioside on cellular membranes," *Neuron*, vol. 82, no. 2, pp. 308–319, 2014.
- [82] C. Di Scala, J. D. Troadec, C. Lelievre, N. Garmy, J. Fantini, and H. Chahinian, "Mechanism of cholesterol-assisted oligomeric channel formation by a short Alzheimer beta-amyloid peptide," *J Neurochem*, vol. 128, no. 1, pp. 186–195, 2014.
- [83] H. Lin and N. J. Arispe, "Single-cell screening of cytosolic [Ca(2+)] reveals cell-selective action by the Alzheimer's Aβ peptide ion channel," *Cell Stress Chaperones*, vol. 20, no. 2, pp. 333–342, 2015.
- [84] T. V. P. Bliss and G. L. Collingridge, "A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus," *Nature*. 1993.
- [85] N. Hardingham, J. Dachtler, and K. Fox, "The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis," *Front. Cell. Neurosci.*, 2013.
- [86] O. Arancio *et al.*, "Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons," *Cell*, vol. 87, no. 6, pp. 1025–35, Dec. 1996.
- [87] W. A. Catterall and A. P. Few, "Calcium Channel Regulation and Presynaptic Plasticity," *Neuron*. 2008.
- [88] R. Jahn and D. Fasshauer, "Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles," *Nature*. 2012.
- [89] O. P. Hamill and B. Sakmann, "Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells," *Nature*, 1981.
- [90] D. M. Bers, C. W. Patton, and R. Nuccitelli, *A practical guide to the preparation of Ca<sup>2+</sup> buffers*. 2010.
- [91] B. Förster, B. Muñoz, M. K. Lobo, R. Chandra, D. M. Lovinger, and L. G. Aguayo, "Presence of ethanol-sensitive glycine receptors in medium spiny neurons in the mouse nucleus accumbens," *J. Physiol.*, 2017.
- [92] D. Purves, *Neuroscience Third Edition*. 2004.
- [93] T. W. Margrie, M. Brecht, and B. Sakmann, "In vivo, low-resistance, whole-cell

recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, 2002.

- [94] E. T. Kavalali, "The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release," *Nature Reviews Neuroscience*. 2015.
- [95] W. Irnich, "The terms 'chronaxie' and 'rheobase' are 100 years old," *PACE - Pacing and Clinical Electrophysiology*. 2010.
- [96] B. Katz and R. Miledi, "A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses," *J. Physiol.*, 1967.
- [97] J. A. Simpson, "THE RELEASE OF NEURAL TRANSMITTER SUBSTANCES," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2008.
- [98] B. Katz, "Quantal mechanism of neural transmitter release," *Science (80-. )*, 1971.
- [99] N. Tian, T. N. Hwang, and D. R. Copenhagen, "Analysis of Excitatory and Inhibitory Spontaneous Synaptic Activity in Mouse Retinal Ganglion Cells," *J. Neurophysiol.*, 2017.
- [100] Y. Yoshiike, R. Kaye, S. C. Milton, A. Takashima, and C. G. Glabe, "Pore-forming proteins share structural and functional homology with amyloid oligomers," *NeuroMolecular Med.*, 2007.
- [101] E. S. Vizi and J. P. Kiss, "Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: Synaptic and nonsynaptic interactions," *Hippocampus*, 1998.
- [102] C. J. Rogers, R. E. Twyman, and R. L. Macdonald, "Benzodiazepine and beta-carboline regulation of single GABAA receptor channels of mouse spinal neurones in culture," *J. Physiol.*, 1994.
- [103] J. Von Wegerer, "Practical electrophysiological methods," *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 2003.
- [104] H. K. Lee, M. Barbarosie, K. Kameyama, M. F. Bear, and R. L. Huganir, "Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity," *Nature*, 2000.
- [105] L. A. Raymond, C. D. Blackstone, and R. L. Huganir, "Phosphorylation of amino acid neurotransmitter receptors in synaptic plasticity," *Trends in Neurosciences*. 1993.
- [106] E. McGlade-McCulloh, H. Yamamoto, S. E. Tan, D. A. Brickey, and T. R. Soderling, "Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II," *Nature*, 1993.
- [107] L. Y. Wang, E. M. Dudek, M. D. Browning, and J. F. MacDonald, "Modulation of AMPA/kainate receptors in cultured murine hippocampal neurones by protein kinase C," *J. Physiol.*, 1994.
- [108] S. Ohno and Y. Nishizuka, "Protein Kinase C Isozymes and Their Specific Functions: Prologue," *J Biochem*, 2002.
- [109] R. Y. Tsien, "New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity Against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype

Structures," *Biochemistry*, 1980.

- [110] K. Ishii *et al.*, "Subacute NO generation induced by Alzheimer's .beta.-amyloid in the living brain: reversal by inhibition of the inducible NO synthase.," *FASEB J.* 2000.
- [111] S. C. Lee, M. L. Zhao, A. Hirano, and D. W. Dickson, "Inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in the Alzheimer disease hippocampus: Association with Hirano bodies, neurofibrillary tangles, and senile plaques," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1999.
- [112] P. Fernández-Vizarra *et al.*, "Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease," *Neurobiol. Dis.*, 2004.
- [113] R. D. Hawkins, H. Son, and O. Arancio, "Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus," *Prog Brain Res*, vol. 118, pp. 155-172, 1998.
- [114] S. Schuchmann, D. Albrecht, U. Heinemann, and O. Von Bohlen und Halbach, "Nitric oxide modulates low-Mg<sup>2+</sup>-induced epileptiform activity in rat hippocampal-entorhinal cortex slices," *Neurobiol. Dis.*, 2002.
- [115] P. Heiduschka and S. Thanos, "NO production during neuronal cell death can be directly assessed by a chemical reaction in vivo.," *Neuroreport*, 1998.
- [116] U. Förstermann and W. C. Sessa, "Nitric oxide synthases: Regulation and function," *European Heart Journal*. 2012.
- [117] F. Rossi and E. Bianchini, "Synergistic induction of nitric oxide by  $\beta$ -amyloid and cytokines in astrocytes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996.
- [118] S. W. Barger and A. D. Harmon, "Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E," *Nature*, 1997.
- [119] H. J. Lüth, G. Münch, and T. Arendt, "Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation," *Brain Res.*, 2002.
- [120] Y. Vodovotz, "Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease," *J. Exp. Med.*, 2004.
- [121] Q. Wang, " -Amyloid-Mediated Inhibition of NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation Induction Involves Activation of Microglia and Stimulation of Inducible Nitric Oxide Synthase and Superoxide," *J. Neurosci.*, 2004.
- [122] E. P. Garvey *et al.*, "1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo," *J. Biol. Chem.*, 1997.
- [123] D. B. Kantor *et al.*, "A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus- mediated inhibition and rescue," *Science (80-. )*, 1996.
- [124] E. S. Furfine, M. F. Harmon, J. E. Paith, and E. P. Garvey, "Selective Inhibition of Constitutive Nitric Oxide Synthase by l-NG-Nitroarginine," *Biochemistry*, 1993.
- [125] H. Q. Zhang, W. Fast, M. A. Marletta, P. Martasek, and R. B. Silverman, "Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N( $\omega$ )-propyl-L-arginine," *J. Med. Chem.*, 1997.

- [126] T. Tomiyama *et al.*, "A new amyloid  $\beta$  variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia," *Ann. Neurol.*, vol. 63, no. 3, pp. 377–387, Mar. 2008.
- [127] T. Tomiyama *et al.*, "A Mouse Model of Amyloid  $\beta$  Oligomers: Their Contribution to Synaptic Alteration, Abnormal Tau Phosphorylation, Glial Activation, and Neuronal Loss &em>In Vivo&/em>," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 14, p. 4845 LP-4856, Apr. 2010.
- [128] K. Nishitsuji *et al.*, "The E693Delta mutation in amyloid precursor protein increases intracellular accumulation of amyloid beta oligomers and causes endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in cultured cells," *Am. J. Pathol.*, vol. 174, no. 3, pp. 957–69, Mar. 2009.
- [129] A. K. Reeve, K. J. Krishnan, M. R. Duchen, and D. M. Turnbull, *Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders*. 2012.
- [130] D. C. Wallace, M. T. Lott, and V. Procaccio, "Mitochondrial Medicine: The Mitochondrial Biology and Genetics of Metabolic and Degenerative Diseases, Cancer, and Aging," in *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*, 2013.
- [131] S. Fong *et al.*, "Energy crisis precedes global metabolic failure in a novel *Caenorhabditis elegans* Alzheimer Disease model," *Sci. Rep.*, 2016.
- [132] J. Olloquequi *et al.*, "Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications," *Journal of Psychopharmacology*. 2018.
- [133] T. Harkany *et al.*, "Beta-Amyloid Neurotoxicity Is Mediated By a Glutamate-Triggered Excitotoxic Cascade in Rat Nucleus Basalis," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 12, no. 8, pp. 2735–45, Aug. 2000.
- [134] M. Knobloch and I. M. Mansuy, "Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease," *Molecular Neurobiology*. 2008.
- [135] K. G. Pratt, A. J. Watt, L. C. Griffith, S. B. Nelson, and G. G. Turrigiano, "Activity-dependent remodeling of presynaptic inputs by postsynaptic expression of activated CaMKII," *Neuron*, 2003.
- [136] J. A. Esteban, S. H. Shi, C. Wilson, M. Nuriya, R. L. Huganir, and R. Malinow, "PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity," *Nat. Neurosci.*, 2003.
- [137] R. C. Carroll, R. A. Nicoll, and R. C. Malenka, "Effects of PKA and PKC on miniature excitatory postsynaptic currents in CA1 pyramidal cells," *J. Neurophysiol.*, 1998.
- [138] D. J. Whitcomb *et al.*, "Intracellular oligomeric amyloid-beta rapidly regulates GluA1 subunit of AMPA receptor in the hippocampus," *Sci. Rep.*, 2015.
- [139] E. S. Rosenzweig and C. A. Barnes, "Impact of aging on hippocampal function: Plasticity, network dynamics, and cognition," *Progress in Neurobiology*. 2003.
- [140] P. A. Colley, F. S. Sheu, and A. Routtenberg, "Inhibition of protein kinase C blocks two components of LTP persistence, leaving initial potentiation intact," *J. Neurosci.*, 1990.

- [141] D. M. Lovinger and A. Routtenberg, "Synapse-specific protein kinase C activation enhances maintenance of long-term potentiation in rat hippocampus.," *J. Physiol.*, 1988.
- [142] D. S. F. Ling *et al.*, "Protein kinase M $\zeta$  is necessary and sufficient for LTP maintenance," *Nat. Neurosci.*, 2002.
- [143] T. C. Sacktor, "Chapter 2 PKM $\zeta$ , LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage," *Progress in Brain Research*. 2008.
- [144] R. Shema, T. C. Sacktor, and Y. Dudai, "Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM $\zeta$ ," *Science (80-. )*, 2007.
- [145] D. S. F. Ling, L. S. Benardo, and T. C. Sacktor, "Protein kinase M $\zeta$  enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors," *Hippocampus*, 2006.
- [146] T. Song *et al.*, "Nitric oxide-mediated modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II," *Biochem. J.*, 2008.
- [147] P. Ping *et al.*, "Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: A signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia-induced preconditioning," *Circ. Res.*, 1999.
- [148] T. Leppänen, R. K. Tuominen, and E. Moilanen, "Protein kinase C and its inhibitors in the regulation of inflammation: Inducible nitric oxide synthase as an example," *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2014.
- [149] S. Zanelli, M. Naylor, and J. Kapur, "Nitric oxide alters GABAergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurons," *Brain Res.*, 2009.
- [150] M. Sciancalepore, N. Savić, J. Györi, and E. Cherubini, "Facilitation of Miniature GABAergic Currents by Ruthenium Red in Neonatal Rat Hippocampal Neurons," *J. Neurophysiol.*, 2017.
- [151] K. S. P. McNaught and G. C. Brown, "Nitric Oxide Causes Glutamate Release from Brain Synaptosomes," *J. Neurochem.*, 2002.
- [152] H. Prast and A. Philippu, "Nitric oxide as modulator of neuronal function," *Progress in Neurobiology*. 2001.
- [153] G. Lonart, J. Wang, and K. M. Johnson, "Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices," *Eur. J. Pharmacol.*, 1992.
- [154] L. Zhou and D. Y. Zhu, "Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications," *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. 2009.
- [155] I. Fleming and R. Busse, "Signal transduction of eNOS activation," *Cardiovascular Research*. 1999.
- [156] T. J. O'Dell *et al.*, "Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS," *Science (80-. )*, 1994.
- [157] H. Son *et al.*, "Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase," *Cell*, 1996.
- [158] R. I. Wilson, J. Yanovsky, A. Godecke, J. Stevens, J. Schrader, and H. L. Haas,



- "Endothelial nitric oxide synthase and LTP [15]," *Nature*. 1997.
- [159] E. Padayachee, N. Ngqwala, and C. G. Whiteley, "Association of  $\beta$ -amyloid peptide fragments with neuronal nitric oxide synthase: Implications in the etiology of Alzheimers disease," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2012.
- [160] E. R. Padayachee and C. G. Whiteley, "Spectrofluorimetric analysis of the interaction of amyloid peptides with neuronal nitric oxide synthase: Implications in Alzheimer's disease," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 2011.
- [161] D. Shilling *et al.*, "Suppression of InsP3 Receptor-Mediated Ca<sup>2+</sup> Signaling Alleviates Mutant Presenilin-Linked Familial Alzheimer's Disease Pathogenesis," *J. Neurosci.*, 2014.
- [162] C. A. Colton, D. M. Wilcock, D. A. Wink, J. Davis, W. E. Van Nostrand, and M. P. Vitek, "The effects of NOS2 gene deletion on mice expressing mutated human A $\beta$ PP," *Journal of Alzheimer's Disease*. 2008.
- [163] D. M. Wilcock *et al.*, "Progression of Amyloid Pathology to Alzheimer's Disease Pathology in an Amyloid Precursor Protein Transgenic Mouse Model by Removal of Nitric Oxide Synthase 2," *J. Neurosci.*, 2008.
- [164] H. W. Wang *et al.*, "Soluble oligomers of  $\beta$  amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus," *Brain Res.*, 2002.
- [165] D. M. Walsh and D. J. Selkoe, "A beta oligomers - a decade of discovery.," *J. Neurochem.*, vol. 101, no. 5, pp. 1172-84, Jun. 2007.
- [166] J. K. Andersen, "Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence?," *Nat. Rev. Neurosci.*, 2004.
- [167] L. M. Sayre, G. Perry, and M. A. Smith, "Oxidative stress and neurotoxicity," *Chemical Research in Toxicology*. 2008.
- [168] J. R. Steinert, T. Chernova, and I. D. Forsythe, "Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia," *Neuroscientist*. 2010.
- [169] S. Moncada and E. A. Higgs, "Nitric oxide and the vascular endothelium," *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2006.
- [170] S. Moncada and J. P. Bolaños, "Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration," *Journal of Neurochemistry*. 2006.
- [171] T. Malinski, Z. Taha, S. Grunfeld, S. Patton, M. Kapturczak, and P. Tomboulian, "Diffusion of nitric oxide in the aorta wall. Monitored in situ by porphyrinic microsensors," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993.
- [172] J. R. Lancaster, "A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide," *Nitric Oxide - Biol. Chem.*, 1997.
- [173] J. Wood and J. Garthwaite, "Models of the diffusional spread of nitric oxide: Implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties," *Neuropharmacology*, 1994.
- [174] P. E. Fraser, "Prions and prion-like proteins," *Journal of Biological Chemistry*. 2014.

- [175] J. Domert *et al.*, "Spreading of amyloid- $\beta$  peptides via neuritic cell-to-cell transfer is dependent on insufficient cellular clearance," *Neurobiol. Dis.*, 2014.
- [176] N. M. Rowley, K. K. Madsen, A. Schousboe, and H. Steve White, "Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control," *Neurochem. Int.*, 2012.
- [177] B. S. Meldrum, "The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders.," *Neurology*, 1994.
- [178] D. W. Choi and S. M. Rothman, "The Role of Glutamate Neurotoxicity in Hypoxic-Ischemic Neuronal Death," *Annu. Rev. Neurosci.*, 2003.
- [179] J. R. Steinert, S. W. Robinson, H. Tong, M. D. Haustein, C. Kopp-Scheinflug, and I. D. Forsythe, "Nitric Oxide Is an Activity-Dependent Regulator of Target Neuron Intrinsic Excitability," *Neuron*, 2011.
- [180] R. Balez and L. Ooi, "Getting to NO Alzheimer's disease: Neuroprotection versus neurotoxicity mediated by nitric oxide," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016.
- [181] F. X. Soriano, "Preconditioning Doses of NMDA Promote Neuroprotection by Enhancing Neuronal Excitability," *J. Neurosci.*, 2006.
- [182] Q. Liu, X. Xie, R. J. Lukas, P. A. St. John, and J. Wu, "A Novel Nicotinic Mechanism Underlies  $\beta$ -Amyloid-Induced Neuronal Hyperexcitation," *J. Neurosci.*, 2013.
- [183] D.-P. Li, H. S. Byan, and H.-L. Pan, "Switch to Glutamate Receptor 2-Lacking AMPA Receptors Increases Neuronal Excitability in Hypothalamus and Sympathetic Drive in Hypertension," *J. Neurosci.*, 2012.
- [184] I. van Welie, J. A. van Hooft, and W. J. Wadman, "Homeostatic scaling of neuronal excitability by synaptic modulation of somatic hyperpolarization-activated Ih channels," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004.
- [185] T. Honoré *et al.*, "Quinoxalinediones: Potent competitive Non-NMDA glutamate receptor antagonists," *Science (80-. )*, 1988.
- [186] C. J. McBain, P. Boden, and R. G. Hill, "The kainate/quisqualate receptor antagonist, CNQX, blocks the fast component of spontaneous epileptiform activity in organotypic cultures of rat hippocampus," *Neurosci. Lett.*, 1988.
- [187] R. S. Neuman, Y. Ben-Ari, and E. Cherubini, "Antagonism of spontaneous and evoked bursts by 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) in the CA3 region of the in vitro hippocampus," *Brain Res.*, 1988.
- [188] G. G. C. Hwa and M. Avoli, "The involvement of excitatory amino acids in neocortical epileptogenesis: NMDA and non-NMDA receptors," *Exp. Brain Res.*, 1991.
- [189] G. G. C. Hwa, M. Avoli, A. Oliver, and J. G. Villemure, "Bicuculline-induced epileptogenesis in the human neocortex maintained in vitro," *Exp. Brain Res.*, 1991.
- [190] R. S. G. Jones and J. D. C. Lambert, "Synchronous discharges in the rat entorhinal cortex in vitro: Site of initiation and the role of excitatory amino acid receptors," *Neuroscience*, 1990.



- [191] F. Scala *et al.*, "Intraneuronal A $\beta$  accumulation induces hippocampal neuron hyperexcitability through A-type K<sup>+</sup> current inhibition mediated by activation of caspases and GSK-3," *Neurobiol. Aging*, 2015.
- [192] K. Yamamoto *et al.*, "Suppression of a Neocortical Potassium Channel Activity by Intracellular Amyloid- and Its Rescue with Homer1a," *J. Neurosci.*, 2011.

