

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



**Efectos de concentraciones nanomolares del
péptido β -amiloide en la actividad sináptica de
neuronas hipocampales en cultivo**



Tesis de Doctorado presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular

Por

Jorge Luis Parodi Rivera

2007

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por reducción de las funciones cognitivas, la cual se explicaría por un aumento de muerte neuronal. Sin embargo, cambios estructurales en particular reducción de sinapsis son descritos actualmente como los mecanismos que causan pérdidas cognitivas. Cerebros de individuos con EA muestran abundante presencia de depósitos proteicos. Los cuales son de dos tipos; 1) depósitos extracelulares denominados placas seniles, los cuales están formados por agregados insolubles del péptido β -amiloide (agregados $A\beta$) y 2) depósitos intracelulares conocidos como ovillos neurofibrilares.

Cambios estructurales, como la reducción de las sinapsis, han sido considerados el mecanismo principal como el péptido $A\beta$ genera pérdida de funciones cognitivas. Recientemente, otros resultados han indicado desconexión sináptica como una explicación de las modificaciones cognitivas en que la EA. Esta idea, esta basada en cambios morfológicos en los botones sinápticos, alteraciones de proteínas sinápticas y depósito de agregados en la sinapsis, causados por agregados del péptido soluble (oligomeros, protofibras y otros). Sin embargo, no existen estudios electrofisiológicos a nivel celular básicos que fundamenten esta idea. Basado en lo anterior, se propone evaluar el efecto, de una mezcla de especies de agregados solubles formadas por estructuras complejas como protofibras, fibras cortas y otras estructuras del péptido $A\beta_{1-40}$, que denominamos como **“agregados $A\beta$ ”** sobre la actividad sináptica de cultivos primarios de hipocampo de ratón. Los cultivos fueron expuestos a concentraciones crecientes de agregados del péptido $A\beta$ (0.05 μM – 10 μM), en condiciones agudas (30 minutos) y crónicas (24 hrs). Nuestros resultados muestran que los agregados $A\beta$ (0.5 μM) no causan alteraciones ni en la morfología, ni en la viabilidad neuronal. Sin embargo, se encontró una disminución de la frecuencia (control: 1.7 ± 0.2 Hz; 0.5 μM $A\beta$: 0.3 ± 0.04 Hz), pero no la amplitud (61 ± 9 pA vs 59 ± 10 pA) de eventos sinápticos espontáneos (GABA_A y AMPA). Esto se acompañó con una disminución en: 1) el número de transitorias de calcio (control: $2.4 \text{ Hz} \times 10^{-3}$; 0.5 μM $A\beta$: $0.9 \text{ Hz} \times 10^{-3}$); 2) el número de puntas fluorescente de SV-2 (un marcador de vesículas sinápticas); 3) el número de sitios activos de liberación de vesículas observados con FM1-43 o AM 1-43; y 4) el número de vesículas por área (control: 50 ± 2.5 Ves/ μm^2 ; 0.5 μM $A\beta$: 21 ± 1.2 Ves/ μm^2). Interesantemente, el análisis del efecto de los agregados $A\beta$ sobre la frecuencia de eventos sinápticos, se ajustaron a una curva del tipo sigmoide (IC_{50} 0.06 ± 0.02 μM). Estos datos sugieren que los efectos de los agregados del péptido $A\beta$ bajo las condiciones estudiadas de concentración y tiempo son de carácter presináptico sin excluir un efecto postsináptico a concentraciones más altas (1-10 μM) o a tiempos más largos de incubación. Concordante con esta idea, al analizar el efecto de los agregados $A\beta$ sobre corrientes evocadas para los receptores postsinápticos, los receptores GABA mostraron un significativo cambio en amplitud de las corrientes (control: 33 ± 3 pA/pF; 0.5 μM $A\beta$: 43 ± 2 pA/pF). Adicionalmente, encontramos que

eventos sinápticos aislados GABA o AMPA, no presentaron cambios significativos en la amplitud, por incubación por 24 hrs con agregados A β .

También estudiamos, los efectos de los agregados A β al ser aplicados agudamente. Nuestros experimentos demostraron que en estas condiciones, los agregados A β aumentan la actividad sináptica (1.7 ± 0.3 a 4.1 ± 1.2 Hz), la frecuencia de transitorias de calcio (control: $2.4 \text{ Hz} \times 10^{-3}$; $0.5 \mu\text{M A}\beta$: $3.2 \text{ Hz} \times 10^{-3}$) y la liberación de vesículas sinápticas. Estos antecedentes sugieren que las alteraciones observadas en la presencia crónica (24 hrs) de los agregados A β serían secundarias a su acción aguda, al alterar el número de vesículas a ser liberadas y por lo tanto la reducción de la actividad sináptica. Interesantemente, encontramos que los cambios agudos y crónicos inducidos por los agregados A β , dependen del calcio extracelular. La ausencia de calcio, bloquea el efecto de los agregados A β en la frecuencia de transitorias de calcio ($0.5 \mu\text{M A}\beta$ /sin calcio, 1.4 ± 0.3 Hz). Además, la incubación con los agregados aumento la concentración del calcio intracelular en las neuronas (control: $\text{Ca}_i^{+2} 600 \pm 24$ nM; $0.5 \mu\text{M A}\beta$: $\text{Ca}_i^{+2} 1620 \pm 35$ nM). Además, al usar inhibidores no específicos de canales de calcio (cadmio o rojo rutenio) los efectos de los agregados A β fueron bloqueados (control: 1.7 ± 0.2 Hz; $0.5 \mu\text{M A}\beta$: 4.2 ± 0.7 Hz; $0.5 \mu\text{M A}\beta/20 \mu\text{M}$ cadmio: 0.9 ± 0.03 Hz; $0.5 \mu\text{M A}\beta/1 \mu\text{M R.R.}$: 1.4 ± 0.4 Hz). Sin embargo, el uso de bloqueadores más específicos de canales de calcio o de receptores ligando, activado como NMDA o AMPA no lograron revertir estos efectos, indicando un mecanismo distinto para la entrada de calcio a las neuronas. Interesantemente, al utilizar un péptido (Na7) diseñado para bloquear cambios en la conductancia de membranas, asociados al poro amiloide, encontramos un completo bloqueo de los efectos de los agregados del péptido β -amilode (control: 1.6 ± 0.1 ; $0.5 \mu\text{M A}\beta$: 0.1 ± 0.04 ; $0.5 \mu\text{M A}\beta/100 \mu\text{M Na7}$: 1.7 ± 0.1 Hz)

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que los agregados A β modifican la transmisión sináptica. La aplicación aguda de péptidos β -amilode, a concentraciones subtóxicas, aumenta la transmisión sináptica y secundariamente la inhibe con aplicaciones prolongadas. El efecto fue principalmente en la transmisión glutamatergica (AMPA), a través de un mecanismo presináptico. Los efectos tempranos y tardíos fueron dependientes de la entrada de calcio, por un mecanismo que sugiere la interacción de los agregados A β con la membrana neuronal. Así, estos resultados sugieren que las alteraciones de la conectividad neuronal, secundarios a la alteración de la actividad sináptica espontánea podrían ser responsables de las alteraciones cognitivas en pacientes con la enfermedad de Alzheimer.