

**“PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES NO Y NGF LIBERADOS POR LA
ASTROGLIA EN LA DEGENERACIÓN DE NEURONAS DE HIPOCAMPO:
SU POSIBLE IMPLICANCIA EN LA ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER”**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular Y
Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

Tania Emilce Estefanía Saez Lancellotti

Enero, 2006

Director de Tesis Dr. Ricardo B. Maccioni

Co-Director Dr. Luis Barbeito

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Tania Emilce Estefanía Saez Lancellotti

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día.....19.....de.....DICIEMBRE.....de 200..5..

Director de Tesis:

Dr. Ricardo B. Maccioni

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Julio Alcayaga

Dr. Gonzalo Bustos

Dr. Ariel Orellana

Dr. Patricio Vélez

DEDICATORIA

A quienes me enseñaron a "APREHENDER",

porque así aprendí a CREAR,

y sólo creando finalmente pude CREER..

Va por esos pocos, que hicieron tanto.

A papá y mamá, por formarme.

A mis dos amores (Matías y Valentino), por deformarme.

A mis hermanos y sobrinos, por ser parte de este maravilloso equilibrio.

RESUMEN BIOGRÁFICO



Tania Emilce Estefanía Saez Lancellotti (25/10/1977, Mendoza, Argentina), bachiller en Ciencias (segundo promedio), Profesora de Lengua y Literatura inglesa (primer promedio), Licenciada en Biología Molecular, Universidad Nacional de San Luis (2001, Medalla de oro y Diploma de Honor). Participación en 8 proyectos de Investigación Científica básica y aplicada en laboratorios de Sudamérica: Becaria de la Universidad de San Luis, dos años consecutivos del Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron (San Pablo, Brasil), Instituto Milenio de Estudios Avanzados para estudios de Postgrado (Santiago de Chile) y beca IBRO (Montevideo, Uruguay). Conocimiento de 6 idiomas. 14 cursos de formación superior (Postgrado). Presentaciones en 9 Congresos nacionales e internacionales, un trabajo científico publicado y uno en vías de publicación.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue desarrollada gracias a FONDECYT, y el Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología (CBB), en colaboración con el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Montevideo, Uruguay). Proyecto P99-031F.

ÍNDICE DE MATERIAS

1. LISTA DE FIGURAS

2. LISTA DE ABREVIATURAS

3. RESUMEN

4. ABSTRACT

5. INTRODUCCION

5.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

5.1.1. Agregados proteicos extra e intracelulares en EA

5.2. LOS ASTROCITOS

5.2.1 Activación astrocitaria en respuesta al daño tisular y neurodegeneración.

5.2.2. Patología astrocitaria en EA

5.3. NEUROTROFINAS

5.3.1. NGF

5.3.2. Receptores NGF

5.3.3. Apoptosis por p75NTR

5.3.4. Potencial rol de la señalización dependiente de NGF/p75NTR en EA.

5.4. CONTRIBUCIÓN DE NO

5.4.1. NO en EA

5.5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

5.5.1. Los astrositos participan en la degeneración neuronal en la EA.

5.6. HIPÓTESIS

5.7. OBJETIVOS

5.7.1. Objetivos Específicos

6. MATERIALES Y MÉTODOS

7. RESULTADOS

7.1. ACTIVACIÓN ASTROCITARIA POR EL PÉPTIDO A β .

7.1.1. Cambio morfológico y expresión de GFAP en astrocitos reactivos por A β

7.1.2. Astrocitos reactivos por A β alteran la expresión y liberación de diversos factores al medio.

7.1.3. Producción de NGF.

7.1.4. Liberación de NO.

7.2. ASTROCITOS REACTIVOS POR A β AFECTAN A NEURONAS DE HIPOCAMPO EN CO-CULTIVO.

7.2.1. Astrocitos reactivos inducen la hiperfosforilación de tau en neuronas de hipocampo en co-cultivo.

7.2.1.1. La hiperfosforilación de tau es dependiente del NO astrocitario.

7.2.2. Expresión de receptores de NGF

7.2.2.2. En la hiperfosforilación de tau participa la vía NGF/p75.

7.2.3. Astrocitos reactivos inducen muerte a neuronas de hipocampo en co-cultivo.

7.2.3.1. Las neuronas de hipocampo mueren por apoptosis dependiente de p75.

7.2.3.2. El NO participa en la muerte neuronal.

7.2.4. NO y NGF intervienen en la neurotoxicidad inducida por A β .

7.2.5. NO neuronal.

7.3. EL MEDIO CONDICIONADO DE ASTROCITOS MEDIA NEUROTOXICIDAD.

7.3.1. Inducción de p75 y de hiperfosforilación de tau neuronal.

7.3.2. Muerte neuronal.

7.4. NO Y NGF INDUCEN FENOTIPOS NEUROTÓXICOS EN NEURONAS DE HIPOCAMPO

7.4.1. NO exógenamente adicionado a los cultivos produce neurotoxicidad

7.4.2. NGF imita la neurotoxicidad inducida por astrocitos reactivos.

7.4.3. NO y NGF en la neurotoxicidad inducida por A β

7.5 EXPRESIÓN DE LA QUINASA CDK5 EN NEURONAS DE HIPOCAMPO DEPENDIENTE DE NO Y NGF

8. DISCUSIÓN

8.1. RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS AL A β

8.1.1. Producción de NGF y óxido nítrico por astrocitos reactivos.

8.2. EXPRESIÓN DE NGF EN TG2576

8.3. NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR ASTROCITOS REACTIVOS

8.3.1. Formación de ONF.

8.3.2. Muerte celular.

8.4. EL MEDIO DE CULTIVO DE ASTROCITOS REACTIVOS ES INDUCTOR DE TOXICIDAD.

8.5. NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR NGF Y NO.

9. CONCLUSIONES

10. FIGURAS

11. BIBLIOGRAFÍA

2. LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. A β 25-35 induce la activación de astrocitos de hipocampo en cultivo.

FIGURA 2. A β 25-35 induce cambios morfológicos en astrocitos de hipocampo en cultivo.

FIGURA 3. A β 25-35 induce la liberación de NGF al medio de cultivo por astrocitos de hipocampo (curva dosis-respuesta).

FIGURA 4. Astrocitos de hipocampo reactivos por A β 25-35 inducen la liberación de NGF al medio de cultivo.

FIGURA 5. A β 25-35 en distintas concentraciones induce la expresión de mRNA NGF en astrocitos de hipocampo en cultivo.

FIGURA 6. Astrocitos de hipocampo activados con A β 25-35 inducen la expresión de mRNA NGF en el tiempo.

FIGURA 7. Astrocitos de hipocampo estimulados con A β 25-35 inducen la liberación al medio de cultivo de formas precursoras de NGF.

FIGURA 8. Astrocitos reactivos de Tg2576 coinciden con la marca de NGF rodeando los depósitos amiloides en la región del hipocampo.

FIGURA 9. Astrocitos de hipocampo estimulados con distintas concentraciones de A β 25-35 inducen la producción de NO.

FIGURA 10. Astrocitos reactivos estimulados con A β 25-35 inducen la liberación de NO al medio de cultivo en el tiempo.

FIGURA 11. A β 25-35 induce la expresión de mRNA de iNOS en astrocitos de hipocampo.

FIGURA 12. Astrocitos de hipocampo estimulados con distintas concentraciones de A β 25-35 aumentan la expresión de mRNA de iNOS.

FIGURA 13. Astrocitos estimulados con A β 25-35 inducen la expresión de isoformas de NOS.

FIGURA 14. Astrocitos reactivos con A β 25-35 inducen la expresión de iNOS.

FIGURA 15. Esquema del co-cultivo.

FIGURA 16. Astrocitos reactivos con A β 25-35 inducen la hiperfosforilación de tau en neuronas de hipocampo en co-cultivo.

FIGURA 17. Astrocitos reactivos con A β 25-35 y no con A β 35-25 inducen la hiperfosforilación de tau en neuronas de hipocampo.

FIGURA 18. Astrocitos reactivos inducen la hiperfosforilación de tau dependiente de NO en neuronas en co-cultivo.

FIGURA 19. Astrocitos reactivos con A β 25-35 inducen la expresión de p75 dependiente de NGF en neuronas hipocampales en co-cultivo.

FIGURA 20. Astrocitos reactivos con A β 25-35 inducen la expresión de p75 en neuronas de hipocampo en co-cultivo.

FIGURA 21. Astrocitos reactivos inducen la hiperfosforilación de tau dependiente de p75 en neuronas de hipocampo en co-cultivo.

FIGURA 22. Astrocitos reactivos con A β 25-35 inducen hiperfosforilación de la proteína tau y muerte neuronal dependiente de p75.

FIGURA 23. Astrocitos reactivos con A β 25-35 inducen la muerte retardada de neuronas hipocampales en co-cultivo celular.

FIGURA 24. Astrocitos reactivos inducen muerte neuronal por apoptosis dependiente de p75 en neuronas de hipocampo en co-cultivo.

FIGURA 25. Astrocitos reactivos inducen muerte neuronal dependiente de NO y NGF en neuronas de hipocampo en co-cultivo.

FIGURA 26. La hiperfosforilación de tau en neuronas de hipocampo en co-cultivo con astrocitos depende de NO y NGF.

FIGURA 27. Astrocitos reactivos inducen la expresión de iNOS y nNOS en neuronas hipocampales en co-cultivo.

FIGURA 28. El medio condicionado de astrocitos reactivos induce en neuronas la hiperfosforilación de tau y la expresión de p75.

FIGURA 29. El medio condicionado de astrocitos reactivos induce la hiperfosforilación de tau y la activación de la vía de las caspasas.

FIGURA 30. El medio condicionado de astrocitos reactivos induce muerte neuronal.

FIGURA 31. El óxido nítrico induce la hiperfosforilación de tau en neuronas de

hipocampo en cultivo.

FIGURA 32. Viabilidad de neuronas de hipocampo expuestas a un flujo continuo de NO.

FIGURA 33. NGF media la muerte neuronal en co-cultivo de astrocitos no estimulados y neuronas hipocampales.

FIGURA 34. Hiperfosforilación de tau en neuronas de hipocampo expuestas a NGF y flujo continuo de NO.

FIGURA 35. Sobrevida de neuronas hipocampales expuestas a NGF y NO.

FIGURA 36. NGF y NO inducen aumento de nNOS en neuronas de hipocampo en cultivo.

FIGURA 37. NGF y NO inducen aumento de iNOS en neuronas de hipocampo en cultivo.

FIGURA 38. La adición exógena de NGF y NO inducen aumento en la expresión de p75 en neuronas de hipocampo en cultivo.

FIGURA 39. Expresión de cdk5 en neuronas de hipocampo dependiente de NGF y NO.

4. LISTA DE ABREVIATURAS

Aβ	Péptido Amiloide Abeta
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
APP	Proteína amiloide Abeta
cGK	Quinasa de GMPc
EA	Enfermedad de Alzheimer
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
GMPC	Guanosina monofosfato cíclico
IL1-β	Interleuquina 1 beta
JNK	Quinasa N-terminal jun
MAP	Proteína asociada a microtúbulos
MT	Microtúbulos
NFκB	Factor nuclear kappa b
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
NT	Neurotrofina
ONF	Ovillo neurofibrilar
PDE	Fosfodiesterasa
PS	Placa senil
SNC	Sistema nervioso central
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRK	Tirosina quinasa

3. RESUMEN

Esta tesis está orientada a estudiar cómo precursores de NGF y óxido nítrico (NO) por astrositos reactivos afectan el proceso de degeneración neuronal, y la dependencia de dicho fenómeno de la función del receptor p75NTR en modelos biológicos de la enfermedad de Alzheimer. Los astrocitos proveen soporte trófico y estructural a las neuronas y participan en la neurotransmisión. En respuesta al daño, aumentan en la expresión de GFAP, mediadores inflamatorios y factores neurotróficos. En la enfermedad de Alzheimer (EA) se acumula A β en las placas seniles, las cuales están rodeadas de astrocitos y microglia reactivos y neuronas dañadas. NGF tiene un papel central en el soporte trófico de neuronas a través de la señalización por el receptor TrkA. Sin embargo NGF, y particularmente su precursor proNGF, aumentan en condiciones patológicas como la EA acompañadas de astrocitosis. El proNGF es un agonista del receptor de baja afinidad de neurotrofinas, p75NTR, el cual induce apoptosis. Nuestros resultados indican que A β induce gliosis en astrocitos de hipocampo, aumentando la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) en sus isoformas neuronal e inducible. Además, estas células liberan al medio una mayor cantidad de NO y NGF, mayormente en forma de su precursor proNGF. Este cambio en el ambiente celular influye marcadamente sobre las neuronas de hipocampo. Así,

encontramos que los astrocitos estimulados con el péptido inducen toxicidad neuronal a través de la hiperfosforilación de la proteína de unión a microtúbulos tau y del incremento de la expresión de isoformas de NOS neuronales (iNOS y nNOS). Además, hemos visto el aumento de la expresión del receptor p75NTR y muerte en neuronas hipocampales en cocultivo por apoptosis. Los mismos resultados fueron obtenidos con el medio de cultivo extraído de astrocitos reactivos por el péptido y con el agregado exógeno de NGF y NO a cultivos de neuronas. Estos eventos celulares son dependientes de la presencia de NGF, p75 y NO, ya que el uso de anticuerpos bloqueadores de la actividad de NGF y p75NTR, así como inhibidores de la síntesis de NO revierten parcial o totalmente el efecto. Finalmente, los hallazgos obtenidos en cultivo celular se correlacionaron con el aumento de la expresión de NGF obtenida en el ratón transgénico Tg2576, con el mutante *Swedish* humano que sobre-expresa la proteína APP.

4. ABSTRACT

Astrocytes are structural and trophic support for neuronal cells, and participate in neurotransmission. As damage response, they increase GFAP expression, inflammatory mediators and neurotrophic factors. In Alzheimer Disease (AD) A β accumulates in senile plaques, which are surrounded by reactive glia and damaged neurons. NGF has a main role in neuronal trophic support through TrkA receptor signaling. However NGF, and particularly its precursor proNGF, increase in pathological conditions as AD. proNGF is an agonist of the neurotrophin low affinity receptor p75NTR, which induces apoptosis. Our own results show that A β peptide induce gliosis in hippocampal astrocytes, increasing NOS expression in its iNOS and nNOS isoforms. Moreover, these cells release large quantities of NO and NGF to the culture media, predominantly in proNGF form. This change in the cellular environment markedly affected hippocampal neurons. We found that reactive astrocytes induce neuronal toxicity by hyperphosphorylation of a microtubule associated protein, tau and the increase in neuronal iNOS and nNOS levels. We have also seen an increase in the expression of p75NTR and delayed death of hippocampal neurons in co-culture by apoptosis. Same results were obtained with culture media extracted from reactive astrocytes and with exogenous NGF and NO over hippocampal neurons. These cellular events were

dependent of the presence of NGF, p75 and NO, because blocking antibodies to NGF and p75NTR, and NO synthesis inhibitor were capable of reversing the effect. Finally findings in cellular culture were correlated with rising NGF expression in Tg2576, transgenic mouse with human *Swedish* mutation that overexpress APP protein.

5. INTRODUCCIÓN

5.1 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en personas mayores de 65 años (Maccioni y col., 2001b). La EA es un problema psicosocial de gran relevancia y es una de las enfermedades más costosas en las sociedades modernas, constituyendo un grave problema de salud pública por su impacto negativo en la economía de los países. Es por ello que se ha impulsado de manera notable el desarrollo de la investigación científica que permita explicar su etiopatogénesis. Uno de los principales factores de riesgo es la edad de los pacientes, y en este contexto la esperanza de vida, aún en países en vías de desarrollo, ha incrementado considerablemente en las últimas décadas, logro de bajo mérito de no preservarse la calidad de la misma. Además de la edad, numerosos factores de riesgo han sido descritos para explicar la etiología de la EA, incluyendo los efectos inflamatorios del péptido beta amiloide, superproducción de citoquinas secretadas por la glía, óxido nítrico (NO), etc. Sin embargo ninguno por sí solo es capaz de dar cuenta del proceso neurodegenerativo en su totalidad.

La EA está caracterizada por una serie de anomalías cerebrales que afectan de forma selectiva a regiones específicas, entre ellas la neocorteza, el área entorrinal, el hipocampo, núcleo amigdalino, núcleo basal, tálamo anterior y varios núcleos monoaminérgicos del tronco encefálico. En particular, dentro del hipocampo las células más afectadas son neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3. Así mismo, las principales vías colinérgicas hacia el hipocampo, las neuronas colinérgicas del núcleo basal, núcleo septal interno y la banda diagonal de Broca, se encuentran destruidas. Estas lesiones tienen profundas consecuencias clínicas. Las anomalías en corteza entorrinal e hipocampo (primeras zonas en presentar degeneración) son factores decisivos para la pérdida de memoria en EA (Whitehouse y col., 1982; Kilt y col., 1984). Otras manifestaciones tempranas son afasia, agnosia, apraxia y alteraciones conductuales en general.

5.1.1. Agregados proteicos extra e intracelulares en EA

Numerosos trastornos neurodegenerativos involucran procesos de agregación de proteínas, tal como ocurre en las enfermedades de Huntington (Deckel., 2001; Sayre y col., 2001), esclerosis lateral amiotrófica ó ELA (Estévez y col., 1999), Parkinson (Goedert, 2001), demencia frontotemporal y EA (Smith y col., 2000; Maccioni y col., 2001 a, b). Histopatológicamente la EA se caracteriza por presentar formaciones de agregados proteicos tanto a nivel intra como extraneuronal, alteraciones conocidas como ovillos neurofibrilares (ONF) y placas seniles (PS) respectivamente (Figura A).

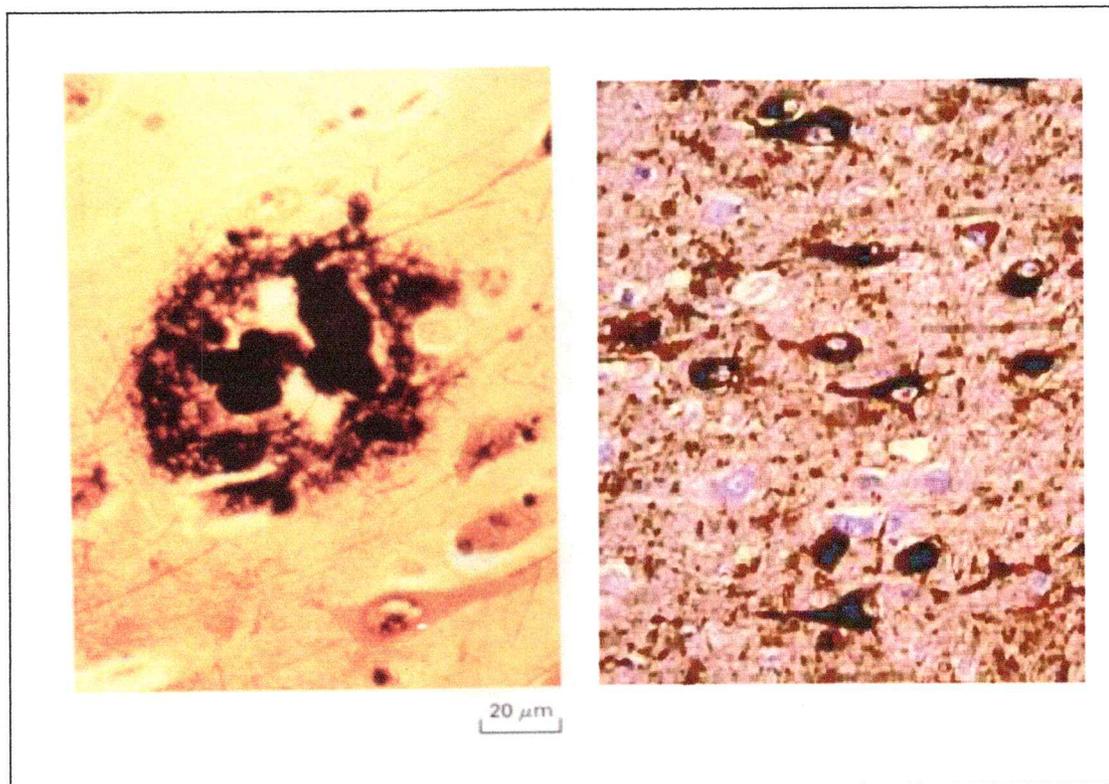


FIGURA A. PATOLOGÍA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: placas seniles extracelulares (izquierda) y ovillos neurofibrilares intracelulares (derecha).

Las PS están compuestas principalmente de fibras de péptido β -*amiloide* ($A\beta$) (Dickson, 1997; Cummings y col., 1998), que se originan por la agregación anómala de un péptido derivado de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP), la cual es una glicoproteína de la membrana plasmática de prácticamente todas las células de un organismo y, particularmente, de las neuronas (Georgopoulou y col., 2001). *Amiloide* es el nombre histológico que reciben los péptidos fibrilares en conformación de hoja beta (β) plegada que forman agregados doblemente refractarios cuando se tiñen con rojo Congo (ó tioflavina) y se observan con luz polarizada para fluorescencia. La proteína APP está codificada por un gen del brazo

largo del cromosoma 21 en humanos, y existen tres isoformas principales de 695, 751 y 770 aminoácidos, todos las cuales contienen la secuencia del A β . El APP se sintetiza en retículo endoplásmico rugoso, es glicosilada en el aparato de Golgi y destinada a la membrana celular como proteína integral de membrana. Las funciones de APP neuronal se desconocen, pero se sabe que algunas moléculas son proteolizadas dentro de la secuencia del A β previniendo la formación del péptido. El péptido A β se produce por rupturas secuenciales del APP, en las que participan enzimas proteolíticas como α , β y γ -secretasas. La ruptura del APP por la β y γ -secretasa genera dos fragmentos del péptido A β , uno de 40 residuos de aminoácidos que es más soluble y no se agrega, formando sólo un depósito inmaduro o difuso, y otro de 42 ó 43 aminoácidos que se agraga más y constituye propiamente las placas seniles. Por otra parte, la α -secretasa rompe al APP en un sitio que no genera fragmentos insolubles (Coughlan y col., 2000). Los eventos que promueven la activación de una u otra secretasa se desconocen, aunque recientemente se ha propuesto el papel de una proteína, la presenilina 1, como reguladora de este proceso (Yu y col., 2001).

La agregación del péptido A β puede aumentar los niveles de moléculas oxidantes así como la concentración de aminoácidos que participan como neurotransmisores excitadores como el glutamato y promover así la muerte neuronal (Arias y col., 1995; Maccioni y col., 2001).

La presencia de niveles elevados de PS por sí sola parece ser insuficiente para producir neurodegeneración y posteriormente la EA; sin embargo, otros factores relacionados con el proceso de envejecimiento (como el incremento de moléculas

oxidantes) puede estar disminuyendo la resistencia de las neuronas al daño provocado por el A β (Funato y col., 1998). Probablemente eventos previos al depósito del A β en agregados insolubles, esto es formas tempranas oligoméricas, sean responsables del daño crónico neuronal y sináptico (Walsh y col., 2002).

En los casos familiares de EA, los cuales se inician a edad más temprana en los individuos afectados (40 años), se han caracterizado mutaciones en los genes de las proteínas denominadas presenilinas 1 y 2. Estas proteínas se encuentran distribuidas en todo el sistema nervioso y se localizan en el retículo endoplásmico liso. Las presenilinas pueden aumentar la concentración del A β al regular el metabolismo del APP, además de alterar la concentración intracelular de iones como el calcio y activar programas de muerte celular (Mattson y Guo, 1997).

La agregación del A β puede también estar modulada por la presencia de la apolipoproteína E4 (apoE4) involucrada en el metabolismo del colesterol, la cual es considerada como un factor de riesgo. Además, aumenta la severidad de la EA (Holtzman y col., 2000).

Tanto los péptidos de A β como formas truncadas del mismo están presentes en el fluido cerebroespinal y en las placas. Sin embargo, en el cerebro de individuos con EA o síndrome de Down los depósitos, así como el péptido en forma soluble, se hallan aumentados. Actualmente existe una controversia en relación a la contribución de las PS a la pérdida de función neuronal, ya que la correlación entre el número de placas y el grado de impedimento cognitivo es baja, y tampoco existe un paralelismo entre la presencia de las mismas y las regiones más afectadas (Berg y col., 1998; McKee y col., 1991; Dickson y col., 1995; Cummings y col., 1996). No se descarta

que la generación de fibrillas de A β es determinante del proceso neurodegenerativo, pero nuevos estudios señalan los niveles del péptido en su forma *soluble* como criterio de severidad (Tabaton y col., 1994; Wang y col., 1999; Lue y col., 1999; McLean y cols., 1999). Los niveles del péptido A β en pacientes con EA muestran gran variabilidad, probablemente debido a la diversidad de técnicas utilizadas para su estudio. Así, mediciones de sub-especies del péptido A β (soluble o insoluble; monómero, dímero u oligómero; protofibrillas y fibrillas) presentes en pacientes con EA realizadas por ensayos de *ELISA* muestran concentraciones de $0.4 \pm 3 \mu\text{g/g}$ (Kuo y cols., 1996); $81.1 \pm 198.9 \mu\text{g/g}$ (Hyman, 1993); $20.6 \pm 11 \mu\text{g/g}$ (McLean y col., 1999); $25.7 \pm 2.8 \mu\text{g/g}$ (Kuo y col., 1998); un estudio que diferencia entre los niveles de A β soluble e insoluble en corteza entorrinal muestra concentraciones de $117 \pm 18.1 \mu\text{g/g}$ y $15.5 \pm 5.9 \mu\text{g/g}$ respectivamente para A β 1-42 (Lue y cols., 1999). Por técnicas de *Dot Blot* se han documentado concentraciones de $260 \pm 220 \mu\text{g/g}$ (Delacourte y col., 1998).

Los ONF son alteraciones filamentosas a nivel del citoesqueleto celular que contienen filamentos helicoidales pareados (FHP). Estas inclusiones, presentes en cuerpo celular, axones, dendritas y terminales axónicos, están formadas principalmente de una proteína perteneciente a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPS) denominada *tau* que se encuentra hiperfosforilada (Maccioni y col., 2001b). Además, se ha sugerido que en EA podrían ocurrir otros cambios sobre tau como la ubiquitinación (Yang y col., 1998), unión a proteoglicanos (Su y col., 1994) y glicación (González y col., 1998), los cuales también contribuirían a la formación de ONF. Los ONF se evidencian tempranamente en la corteza entorrinal,

la cual proyecta hacia el hipocampo, y en estadios tardíos se extiende por todas las zonas afectadas. El citoesqueleto celular, compuesto de microtúbulos (MT), filamentos intermedios y actina, es una estructura esencial para el mantenimiento de la estructura celular así como del tráfico intracelular de proteínas y organelos, incluyendo el transporte a lo largo de axones. Así, los desarreglos en el citoesqueleto impiden el transporte normal a lo largo del axón comprometiendo la función sináptica y, eventualmente, la viabilidad neuronal. La proteína tau es una de las proteínas estabilizadoras de MT. En humanos se encuentra casi exclusivamente en neuronas y posee seis isoformas derivadas de un mismo gen, presente en el brazo largo del cromosoma 17. Las seis isoformas varían entre los 45 y 65 kDa, se expresan diferencialmente durante el desarrollo y pueden encontrarse distribuidas en diferentes subpoblaciones neuronales (Kosik y col., 1989). La región N-terminal, o dominio de proyección, es variable y se “proyecta” desde los MT una vez unida a ellos interactuando con otros elementos del citoesqueleto como filamentos de actina o espectrina (Cross y col., 1993; Farías y col., 2002), o con la membrana plasmática (Brandt y col., 1995). La región C-terminal, de unión a MT, presenta tres ó cuatro dominios de 18 aminoácidos altamente conservados, separados por regiones de alrededor de 13 aminoácidos (Maccioni y col., 1989). Esta región de tau participa en el ensamblaje y estabilización de MT (Mandelkow y col., 1995), y además se ha demostrado asociación con otras proteínas. La proteína tau sufre una serie de modificaciones post-tradicionales, dentro de las cuales la fosforilación juega un rol particularmente importante. La isoforma mayor de tau, tau 42, presenta 79 serinas o treoninas que actúan como potenciales sitios de fosforilación. Debido a ello, la actividad combinada de diferentes proteínas con actividad quinasa y fosfatasa

modulan finamente un estado estructural de tau que en suma define su nivel de actividad. Es interesante destacar que una proteína como tau es crucial para definir la polaridad de las neuronas y los procesos de transporte, generación de conos de crecimiento axonal, etc. Por lo tanto requiere ser regulada por mecanismos muy finos para cumplir de manera controlada su función. Así, cambios en esta regulación pueden modificar su capacidad de unirse a MT, y contribuir a generar condiciones patológicas como las observadas en la neurodegeneración del tipo Alzheimer. En la fosforilación de tau se ha involucrado a las enzimas MARK quinasa, gsk 3 β , sistemas de MAP quinasa y la proteína quinasa dependiente de ciclinas, cdk5. Esta última es ubicua en el organismo y se ha detectado su actividad sólo en neuronas post-mitóticas, debido a la presencia de sus activadores p35 y p39 (Kesavapany y col., 2003). La cdk5 está ligada directamente, entre otros fenómenos, a procesos de diferenciación y desarrollo neuronal (Homayouni y Curran, 2000), y a migración neuronal (Ohshima y col., 1996). Además, se ha demostrado ser clave en mediar la neurodegeneración inducida por A β (Alvarez y col., 1999, 2001). En el caso de la hiperfosforilación de tau, el sistema cdk5/p35 fosforila los residuos Ser 202, Thr 205, Ser 235 y Ser 404, los cuales son independientes de la actividad de otras quinasas. (Mandelkow y col., 1995).

La EA está caracterizada por la pérdida de habilidades intelectuales debido al daño *selectivo* de circuitos neuronales específicos en la neocorteza, hipocampo y cerebro basal anterior. Por lo tanto, un punto crítico en el estudio de los mecanismos patogénicos de la EA es la vulnerabilidad regional selectiva observada en esta enfermedad. Las placas seniles, así como las formas solubles del A β , se encuentran normalmente distribuidas en todo el cerebro, y son por tanto accesibles a todos los

tipos de neuronas. Recientemente, Kim y col. (2003) presentaron evidencias que sugieren que la toxicidad inducida por el péptido A β en forma de oligómero soluble puede ser el reponsable de la neurodegeneración regioespecífica selectiva en la etiología de la EA.

5.2. LOS ASTROCITOS

La neuroglía es el tipo celular predominante en el sistema nervioso central (SNC). Entre los diferentes tipos celulares, los astrocitos representan entre el 20% y 50% del volumen total de la mayoría de las áreas cerebrales (Peters y col., 1991). Típicamente los astrocitos se clasifican en dos grupos en base a su morfología, localización en el SNC, propiedades antigénicas y origen embrionario. Los *astrocitos protoplasmáticos* (tipo 1) se ubican principalmente en la sustancia gris del SNC y presentan numerosos procesos cortos y altamente ramificados con extensiones membranosas y de forma irregular. En el tejido nervioso normal, la gran mayoría de los astrocitos protoplasmáticos no presentan la proteína glial ácida fibrilar (GFAP: *glial fibrillary acidic protein*) una proteína del citoesqueleto de la clase filamentos intermedios tipo II de aproximadamente 9 nm de diámetro. Los *astrocitos fibrosos* (tipo 2) se encuentran principalmente en la sustancia blanca pero también pueden observarse en la sustancia gris periventricular. Éstos se caracterizan por poseer largas prolongaciones delgadas y cilíndricas, GFAP-positivas (Peters y col., 1991). Estos dos tipos astrocitarios se desarrollan a partir de diferentes células precursoras GFAP-negativas. El precursor tipo 1 es capaz de diferenciarse sólo a astrocito tipo 1, mientras que el precursor tipo 2 es bipotencial, siendo capaz de diferenciarse a astrocito tipo 2 o a oligodendrocito; por esta razón a sido denominado progenitor O-

2A (del inglés, *oligodendrocyte-type-2-astrocyte*) (Raff y col, 1983).

Los astrocitos, como las células mesenquimales en los tejidos periféricos, proveen soporte físico a las neuronas vecinas, a las meninges y a la vasculatura. Proporcionan de nutrientes metabólicamente optimizados a las neuronas; mantienen el balance iónico en el espacio extracelular, removiendo agua y aminoácidos que actúan sobre receptores con propiedades excitatorias (Tsacopoulos y Magistretti, 1996). También cumplen importantes funciones reguladoras: inducen uniones íntimas con las células endoteliales y forman parte integral de la barrera hematoencefálica (BHE) (Pekny y col., 1998), participan en la respuesta inflamatoria del SNC mediando la activación de la microglía y monocitos provenientes de la circulación (Schmidtayer y col., 1994) y proveen de numerosos factores tróficos a las neuronas y oligodendrocitos adyacentes, particularmente luego de una lesión (Eddleston y Mucke, 1993; Ridet y col., 1997).

La tabla 1 resume varias funciones de los astrocitos en el sistema nervioso.

5.2.1. Activación astrocitaria en respuesta al daño tisular y neurodegeneración.

En respuesta al daño tisular (traumático, isquémico o inflamatorio), los astrocitos y la microglia responden con cambios fenotípicos característicos (astrocitos o gliosis). Los astrocitos adoptan un “fenotipo reactivo” caracterizado por una hipertrofia del núcleo y del soma celular, proliferación aumentada y elaboración de procesos celulares característicos con un incremento en el contenido de GFAP. Además, los astrocitos reactivos expresan una amplia gama de proteínas, como proteínas del citoesqueleto, de superficie o de matriz, proteasas, y varios factores de crecimiento y citoquinas (Eddleston y Muke, 1993; Ridet y col., 1997).

Tabla 1

Funciones	Referencias
Orientación de la migración neuronal durante el desarrollo embrionario.	Rakic, 1971
Inducen la formación de las uniones herméticas oclusivas entre las células del endotelio capilar, base estructural de la BHE. En especies inferiores los propios procesos astrocitarios conforman la BHE.	Goldstein, 1988 Raub y col., 1992
Principal fuente de proteínas de la matriz extracelular.	Liesi y col., 1983
Secretan factores solubles que regulan la morfología, proliferación, diferenciación y/o supervivencia de diferentes poblaciones neuronales y gliales (incluyendo acciones autócrinas).	Lindsay, 1979 Banker, 1980 Théry y col., 1992 Carroll y col., 1993 Ridet y col., 1997
Aseguran la acción discreta y localizada de terminales sinápticos al envainarlos con sus procesos.	Peters y col., 1991
Censan y corrigen cambios en el microambiente celular producidos por la actividad o metabolismo neuronal: -Regulación del pH del espacio extracelular (EEC). -Regulación del volumen del EEC. -Regulación de la concentración extracelular de iones K^+ . -Recaptación de neurotransmisores (de glutamato casi en exclusividad).	Ransom y Carlini, 1986 Currie y Kelly, 1981 Tsacopoulos y Magistretti, 1996
Neuromodulación. El neurotransmisor liberado en una sinápsis activa puede estimular receptores en los astrocitos provocando la activación de la célula glial, la cual responde liberando de forma regulada neurotransmisores. La neuromodulación puede ser a nivel local o a distancia, si la activación se propaga espacialmente en la red astrocitaria.	Papura y col., 1994 Kang y col., 1998 Newman y Zahs, 1998 Bezzi y Volterra, 2001
Detoxificación del SNC de metales y sustancias neuroactivas de origen endógeno y xenobiótico.	Hof y col., 1999
Durante una respuesta inmune parecen actuar como células presentadoras de antígeno.	Fontana y col., 1984
En casos de lesión del SNC, los astrocitos reaccionan proliferando y/o aumentando su tamaño, para llenar los espacios antes ocupados por las neuronas y sus procesos (cicatriz). La reacción astrocitaria puede expandirse muy lejos del área traumatizada.	Hof y col., 1999 Fawcett y Asher, 1999 McGraw y col., 2001

Diversos fenotipos reactivos pueden ser establecidos por el perfil de proteínas expresadas. Estos fenotipos son en gran medida determinados por el tipo de lesión y la distribución espacial y temporal de los astrocitos.

Dado que la activación astrocitaria ocurre en variadas condiciones como la isquemia cerebral, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la demencia frontotemporal y la enfermedad de Huntington (Schipper, 1996), ha sido considerada como una respuesta inespecífica de las células gliales al daño neuronal. Este concepto ha cambiado en los últimos años y hoy se considera que una activación o defecto primario de los astrocitos podría desencadenar degeneración o muerte neuronal.

5.2.3. Patología astrocitaria en EA

La gliosis es comúnmente observada en muchos desórdenes neurodegenerativos. La gliosis asociada con las placas amiloides es un suceso relativamente temprano de la EA, y algunas citoquinas y mediadores inflamatorios producidos por la glia activada probablemente participen en la patogenia de esta enfermedad. Los depósitos de A β están rodeados por microglía (McGeer y col., 1987), astrocitos reactivos, (Pike y col., 1995) y neuronas en degeneración, constituyendo la "placa neurítica". Se ha observado que el mismo depósito de A β es capaz de activar la glia en cultivo (Bach y col., 2001), iniciando una respuesta inflamatoria. Diversos estudios han demostrado que la estimulación de monocitos, macrófagos y microglía con el péptido A β resulta en la producción de moléculas pro-inflamatorias (Ariga y Yu, 1999; Baeuerle y Henkel, 1994; Klegeris y col., 1994; Klegeris y McGeer, 1997; Lorton y col., 1996; Meda y col., 1995; Smits y col., 1999,

2002; Tjernberg y col., 1999). Los astrocitos activados con A β también aumentan la producción de citoquinas como MCP-1 y RANTES (Johnston y col., 1999). Del mismo modo se ha observado la inducción de IL-1 β y TNF- α en astrocitos corticales (Akama y col., 1998), activación de vías MAPK y aumento del factor NF κ B (Bach y col., 2001), así como el aumento de apoptosis de neuronas hipocampales en cocultivo (Malchiodi-Albedi, 2001). Además, se ha descrito la producción de citoquinas anti-inflamatorias (Szczepanik y col., 2001) con aumento en la expresión de GFAP en astrocitos (Pike y col., 1994), pero sin inducción de muerte glial (Kato y col., 1997). Existen numerosas células gliales rodeando cada placa, cada una residiendo en su propio microambiente y cada una capaz de producir moléculas pro- y anti-inflamatorias. El balance entre éstas en el cerebro de personas con EA puede jugar un rol importante en el proceso neurodegenerativo. Por otra parte, el número de células gliales en las placas neuríticas aumenta considerablemente, por lo que es probable que existan moléculas quimioatrayentes responsables de atraer estas células hacia las placas neuríticas, donde ejercerían un importante rol en el establecimiento de mecanismos inflamatorios. En el modelo propuesto por Johnston (1999), el A β activa la glía induciendo la liberación de quimoquinas, incluyendo MCP-1 y RANTES. Estas moléculas actúan como quimioatrayentes y reclutan la microglía y macrófagos periféricos, los cuales una vez que se hallan en proximidad la región afectada, son activados por el A β liberando más quimoquinas, citoquinas y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Meda y col., 1995b; Yan y col., 1997). Los astrocitos activados también liberan citoquinas inflamatorias como IL-1 β y TNF- α y ROS en respuesta al A β , contribuyendo al proceso inflamatorio y causando la degeneración de neuronas cercanas.

5.3. NEUROTROFINAS

El desarrollo y mantenimiento del SNC está gobernado por una compleja red de factores difusibles y sus correspondientes receptores. Los factores de diferenciación mejor conocidos en mamíferos son las neurotrofinas (NT). Las NT fueron identificadas inicialmente como factores de supervivencia neuronal derivados de células blanco (Purves y col., 1988), pero hoy se conoce que median un amplio rango de respuestas que incluyen la regulación de la proliferación celular del neuroblasto y cresta neural, regulación del crecimiento neurítico, modulación de la sinapsis, mantenimiento de la viabilidad celular, e incluso inducción de apoptosis (Lewin y Barde, 1996; Bibel y Barde, 2000). Además de sus funciones fisiológicas, también han sido implicadas en desórdenes neurodegenerativos incluyendo la EA (Mufson y col., 1989; Phillips y col., 1991), Parkinson (Hyman y col., 1991), epilepsia (Gall e Isaacson, 1989; Isaacson y col., 1991), y cánceres del SNC (Kogner y col., 1993; Segal y col., 1994; Ryden y col., 1996). Es factible que el esclarecimiento de los mecanismos moleculares que controlan la función de las NTs revele objetivos para la intervención farmacológica que benefice el tratamiento de enfermedades del SNC.

Los sistemas de transducción de señal que median las diversas funciones biológicas de las NT se inician a través de su interacción con dos tipos de receptores de superficie: los pertenecientes a la familia de receptores tirosina quinasa, trk (del inglés, *tropomyosin-related kinase*; quinasa relacionada con la tropomiosina) y el receptor p75 para NT (p75NTR) (Figura B). Estos receptores no poseen dominios en común en sus regiones citoplasmáticas así como tampoco en el

sitio de unión al ligando, y además activan diferentes vías de señalización dependiendo de la NT. Por otra parte, en muchos casos no sólo activan vías autónomas sino que son capaces de colaborar para mediar los efectos de las NT.

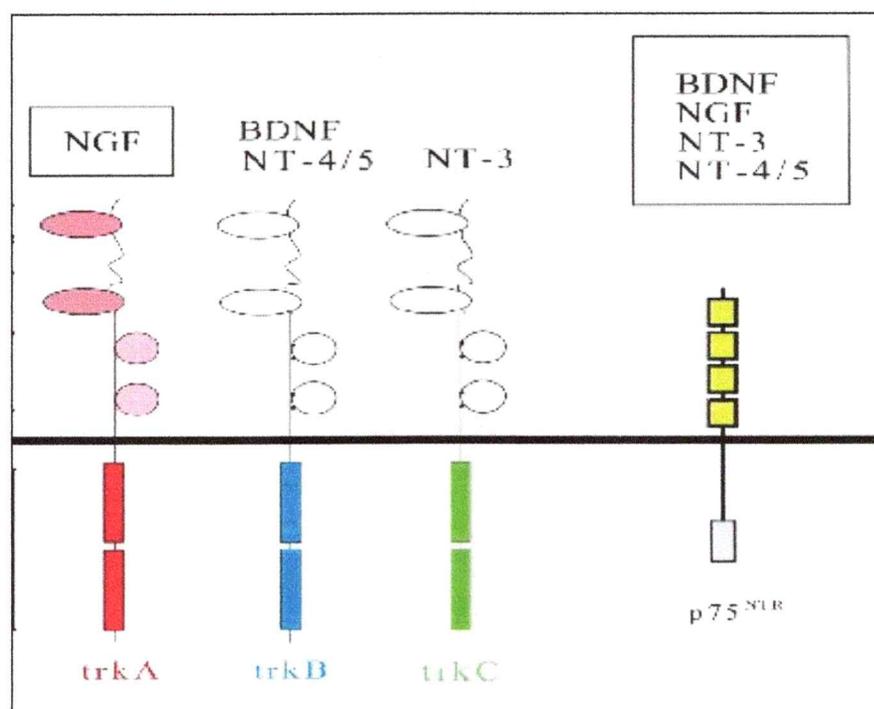


FIGURA B. RECEPTORES DE NEUROTROFINAS.

5.3.1. NGF

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es el miembro mejor caracterizado entre las NT, el primer factor promotor del crecimiento nervioso identificado y pilar de la teoría neurotrófica, participa en las respuestas inflamatorias dentro y fuera del sistema nervioso central, y es considerado como una neuroquina moduladora (Levi-Montalcini, 1996). Al igual que ocurre con todas las NT, su gen codifica un

precursor de aproximadamente 30 kDa que es proteolizado intracelularmente por enzimas de la familia de las convertasas, incluyendo furina y convertasas 1 y 2 (PC1 y PC2) para originar la forma madura de alrededor de 13 kDa. Una vez procesadas, las NTs existen como homodímeros unidos no covalentemente por puentes disulfuro.

Dos de las principales poblaciones de neuronas del SNC identificadas que responden a NGF son las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior y del núcleo estriado (Gnahn y col., 1983; Martínez y col., 1985; Vantini y col., 1989; Li y col., 1995; Fagan y col., 1997). Las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior son neuronas de proyección, cuyos axones se extienden a través del *hipocampo* y la neocorteza, y son importantes para las funciones de atención, aprendizaje y memoria (Coyle y col., 1983; Olton y col., 1991). Diversos estudios han mostrado que ambas poblaciones neuronales expresan *trkA* (Holtzman y col., 1992; Li y col., 1995) y NGF se expresa en las regiones blanco de estas células (Large y col., 1986; Lu y col., 1989).

5.3.2. Receptores NGF

NGF señala específicamente por el receptor *trkA*, miembro de la familia de receptores *trk*. La unión del NGF en forma de homodímero induce la dimerización del receptor, la autofosforilación en residuos de tirosina en la región de activación, seguido por fosforilación de residuos intracelulares adicionales (Jing y col., 1992; Cunningham y col., 1997) que actúan como sitio de anclaje para moléculas de señalización que regulan el crecimiento y supervivencia a través de las vías Ras, fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K) y fosfolipasa C γ (PLC γ) (Segal y Greenberg, 1996; Kaplan y Miller, 2000) (Figura C).

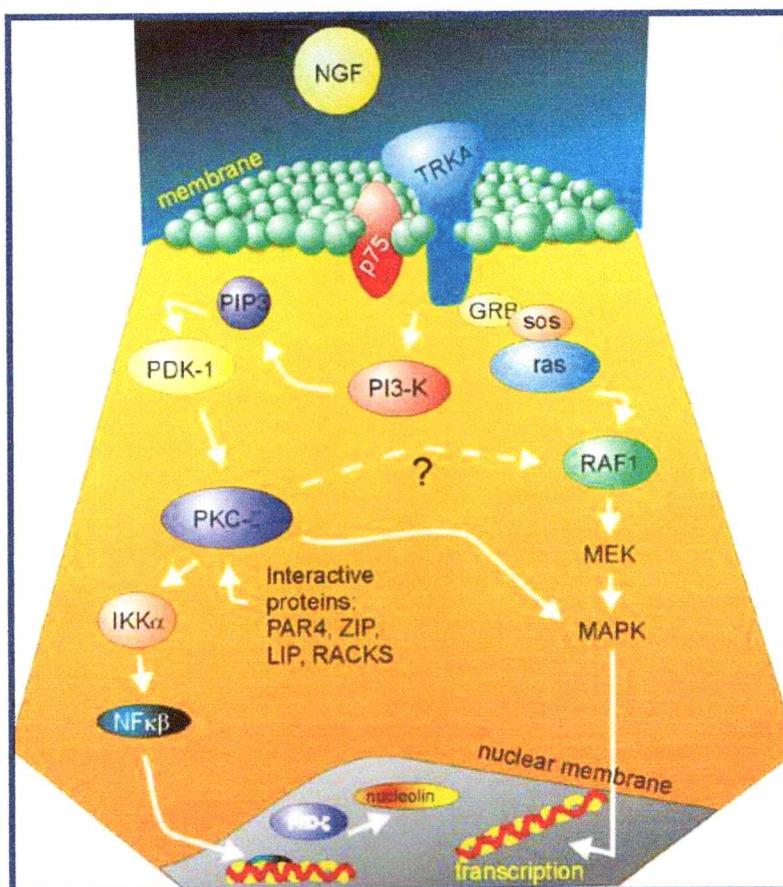


FIGURA C. VIA DE SEÑALIZACIÓN DE NGF POR TRKA.

El receptor p75NTR (que se simplificará como p75) se une a todas las NT con similar afinidad ($Kd 10^{-9}$ M) (Rodríguez-Tebar y col., 1990, 1992; Squinto y col., 1991). Por estudios de unión se conoce que p75 y trkA interactúan independientemente con las NT con una Kd de 10^{-9} M (Rodríguez-Tebar y col., 1990, 1992; Kaplan y col., 1991a; Klein y col., 1991b; Squinto y col., 1991). Pero la co-expresión de p75 y trkA en células produce sitios de unión a NGF de alta afinidad comparado con los anteriores ($Kd 10^{-11}$ M) (Hempstead y col., 1991; Rodríguez-Tebar, 1992; Mahadeo y col., 1994) y aumenta la activación de la vía inducida por trkA mediada por NGF (Barker y Shooter, 1994; Mahadeo y col.,

1994; Verdi y col., 1994). Recientemente Harrington y col. (2004) demostraron que la forma no procesada del NGF (proNGF) se une a p75 con alta afinidad e induce apoptosis dependiente de p75 en neuronas en cultivo. Este hallazgo es particularmente importante ya que el precursor de NGF es la forma predominante en cerebro y se ha comprobado que se acumula en pacientes con EA (Lee y col., 2001b; Fahnstock y col., 2001).

En cuanto a la distribución de receptores para NGF, trkA se encuentra restringido al soma celular mientras que p75 tiene una distribución somato-dendrítica (Tongiorgi y col, 1997, 2000). Los efectos neurotróficos de supervivencia y diferenciación requieren la internalización del complejo ligando-receptor y su transporte retrógrado a través del cuerpo celular (Barrett y col., 1998; Mufson y Kordower, 1999), pero se desconoce los procesos que regulan la internalización y el transporte de neurotrofinas y sus receptores.

El patrón de expresión de p75 es amplio y estrictamente regulado temporal y espacialmente. Durante el desarrollo, p75 se expresa en células neuronales como no neuronales (Buck y col., 1987; Sariola y col., 1991). Los niveles de p75 se reducen en la mayoría de los tejidos post-natalmente, restringiéndose a un escaso número de poblaciones neuronales, entre ellas motoneuronas (Ernfors y col., 1989; Armstrong y col., 1991) y las células de Purkinje del cerebelo (Koh y col., 1989; Cohen-Cory y col., 1991). p75 también se expresa en el sistema nervioso periférico y en tejidos no neuronales adultos, y es importante su inducción por daño celular en poblaciones como motoneuronas (Ernfors y col., 1989; Armstrong y col., 1991), oligodendrocitos (Casha y col., 2001), e hipocampo (Roux y col, 1999; Oh y col., 2000), entre otras.

Su expresión ha sido asociada con algunas enfermedades crónicas, como esclerosis múltiple (Dowling y col., 1999) y Alzheimer (Yaar y col., 1997). El promotor de p75, tanto en humanos como en ratas, carece de elementos TATA y CAAT, y es rico en secuencias GC, semejándose a los promotores de genes de expresión constante (Sehgal y col., 1988; Metsis y col., 1992). Se ha localizado una región conservada caja-E, y han sido identificadas regiones regulatorias tanto positivas como negativas. En caso de estimulación por choque osmótico, la activación de la transcripción ocurre independiente de la síntesis *de novo* de proteína, y requiere la activación de fosfolipasa C (PLC), proteína quinasa C (PKC) y óxido nítrico sintasa (NOS), siendo por lo tanto un efector génico temprano de la vía del óxido nítrico (NO) (Peterson y Bogenmann, 2003).

5.3.3. Apoptosis por p75^{NTR}

El receptor p75 pertenece a la familia de receptores de muerte, pero se distingue de sus miembros por su capacidad de dimerizar más que formar trimeros, por su habilidad de actuar como co-receptor de tirosina quinasas, y porque las NT no se relacionan estructuralmente con sus ligandos. p75 se ha visto implicado en la inducción de apoptosis en diversos tipos celulares tanto *in vivo* como *in vitro*, entre ellos las células de hipocampo (Roux y col., 1999; Park y col., 2000; Friedman y col., 2000). Estudios de pérdida de función indican un rol de p75 en la inducción de apoptosis durante el desarrollo (Frade y Barde, 1999) así como luego de daño celular (Cheema y col., 1996; Ferri y col., 1998, 1999). El mecanismo por el que p75 induce apoptosis no se identifica con ninguna de las dos vías (extrínseca e intrínseca) corrientes; la región intracelular no se une a miembros de la familia del TNF como

TRADD o FADD (Wang y col., 2001), ni tampoco se induce la activación de caspasa 8, aunque sí la de caspasa 9 (Gu y col., 1999; Wang y col., 2001), así como pérdida de integridad mitocondrial. Además, la cascada de JNK (*jun N-terminal kinase*) participa en la apoptosis (Bruckner y col., 2001; Harding y col., 2001) y recientemente se ha demostrado que es necesaria la activación de la GTPasa Rac (Harrington y col., 2002). Paradójicamente, p75 también es capaz de promover supervivencia celular. Incluso en hipocampo, se conoce que la unión de NGF a p75 protege del daño hipoglucémico mediado por calcio (Cheng y col., 1993). También se han reportado funciones de promotor de supervivencia celular en otros tipos celulares (Shimohama y col., 1993; Kume y col., 2000; De Freitas y col., 2001; Hamanoue y col., 1999) mediante mecanismos independientes de trkA y parece involucrar la activación del factor nuclear-Kappa B (NFκB) (Carter y col., 1996; Yoon y col., 1998). p75 parece activar, al igual que los receptores trks, la vía de sobrevivencia PI3K/AKT (Roux y col., 2001).

5.3.4. Potencial rol de la señalización dependiente de NGF/p75NTR en EA.

En la enfermedad de Alzheimer, la expresión tanto de neurotrofinas como de sus receptores se encuentra alterada (Appel, 1981; Lucidi-Phillipi y Gage, 1993; Rylett y Williams, 1994; Connor y col., 1996; Savaskan y col., 2000). En 1995 Mufson y col. propusieron que la neurodegeneración asociada con la EA podría ser causa de fallas en el transporte retrógrado de NGF, debido a un déficit en la producción y/o uso del receptor trkA. Los niveles de NGF se presentan aumentados en varias patologías neurodegenerativas en las cuales se ha observado astrocitosis (Lopez y col., 1989; Gall y col., 1991), incluyendo pacientes con EA ó modelos de la

misma (Crutcher y col., 1993; Fahnestock y col., 1996; Hock y col., 2000; Olivieri y col., 2002), y también se ha observado un aumento en la expresión de p75 (Hu y col., 2002; Olivieri y col., 2002) principalmente en neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert de pacientes con EA (Ernfors y col., 1990; Mufson y Kordower, 1992). Por otro lado, la expresión del receptor trkA no se ve significativamente modificada para Mufson y col. (2002) mientras que otros han documentado una disminución de la misma (Boissiere y col., 1997; Mufson y col., 1997, 2000; Hock y col., 1998, 2000; Marinelli y col., 1999; Savaskan y col., 2000; Friedman, 2000; Dubus y col., 2000; Chu y col., 2001; Olivieri y col., 2002) en neuronas afectadas con EA y modelos de esta patología. Además, se ha visto que A β interactúa directamente con los trk. Yaar y col. (1997, 2002) encontraron que el A β se une a p75 en neuronas corticales de rata y en células fibroblásticas NIH3T3 que expresan p75 establemente. Kuner y col. en 1998 descubrieron que líneas celulares de neuroblastoma humano expuestas a A β entran en apoptosis por un mecanismo que involucra la unión directa de A β al receptor p75 y activación de NF- κ B. En ambos estudios la administración de NGF previno la inducción de apoptosis, presumiblemente por competencia entre NGF y A β por el receptor p75 (Rabizadeh y col., 1994, Yaar y col., 1997; Kuner y col., 1998). Sobre esta base, y dado que el NGF estimula las neuronas colinérgicas, mejora la memoria y previene la degeneración colinérgica en modelos animales de daño neuronal, sobreexpresión de A β y envejecimiento, se esperaría que el NGF aumente en pacientes con EA como factor protector frente al A β . Se ha demostrado que el proNGF es la forma predominante en el cerebro y sufre un aumento en pacientes con EA (Fahnestock y col., 2001). Sin embargo, no existe información acerca del rol del aumento de NGF/proNGF en EA, así como el tipo celular

responsable involucrado en su expresión. El patrón de expresión de proteasas e inhibidores de las mismas involucrados en el procesamiento del NGF se encuentra afectado en la inflamación neuronal (Rosenberg, 2002), y podría ser éste el mecanismo que controla los eventos neurotróficos y neurotóxicos relacionados con el incremento en la producción de proNGF.

5.4. CONTRIBUCIÓN DEL NO

A fines de la década del 70, Murad y col., identificaron el NO como un agente que se libera de la nitroglicerina y otros compuestos vasodilatadores y estimula la producción de GMPc (Katsuki, 1977). Diez años más tarde algunos grupos demostraron que el NO se produce en sistemas biológicos (Ignarro y col., 1987; Palmer y col., 1987). Desde entonces, se conoce que el NO es una molécula gaseosa difusible altamente reactiva, radical inestable que juega un rol muy importante en la regulación de un amplio rango de procesos fisiológicos incluyendo inmunidad celular, angiogénesis, agregación plaquetaria y neurotransmisión. El NO se sintetiza de L-arginina por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa, NOS, en un proceso oxidativo de dos pasos. Existen tres isoformas de la enzima: inducible (iNOS), endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS). Las isoformas eNOS y nNOS se expresan constitutivamente, a diferencia de iNOS, ya que su activación no requiere la síntesis proteica de enzima nueva. Sin embargo, ambas isoformas también son “inducibles” en el sentido que se produce síntesis de proteína bajo condiciones traumáticas o patológicas (Förstermann y col., 1995a y b; Dawson y col., 1998; Harrison y col., 1996; Lüth y col., 2000). El NO libre es una especie transitoria inestable y se descompone en segundos (vida media de alrededor de 5 s),

interactuando con moléculas biológicas como el hierro, tioles, proteínas y especies reactivas de oxígeno. Regula por difusión una variedad de funciones celulares, como la producción de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, ADP-ribosilación de proteínas y estimulación de la enzima guanil ciclasa soluble, la cual aumenta los niveles de GMPc. El GMPc posee tres blancos conocidos: modula la concentración de AMPc activando fosfodiesterasas específicas (PDEs) en varios tipos celulares, abre canales de cationes operados por nucleótidos cíclicos en retina y sistema olfativo, y activa quinasas dependientes de GMPc (cGKs) (Pfeifer y col., 1996; Lohmann y col., 1997). En cerebro, las cGKs parecen regular funciones neuronales discretas que aparentemente no estarían involucradas directamente en la plasticidad sináptica (Zhuo y col., 1994; Lev-Ram y col., 1997; Kleppisch y col., 1999) aunque estudios en *Drosophila* demuestran que estas enzimas regulan procesos complejos del SNC (Osborne y col., 1997).

5.4.1. NO en EA

La toxicidad por A β está asociada al estrés oxidativo (Pacifci y Davies, 1991; del Rio y col., 1992; Benzi y Moretti, 1995; Martin y col., 1996). El óxido nítrico (NO) actúa como molécula difusible de señalización neuronal en condiciones normales, pero en situaciones citotóxicas el incremento de NO promueve la formación de peroxinitrito, mediador de la nitración de proteínas. En EA el NO está incrementado (Akama y col., 1998). Las placas seniles (Wallace y col., 1997), así como las neuronas conteniendo ovillos neurofibrilares en pacientes con EA (Vodovotz y col., 1996) se observan inmunorreactivas para NOS y existen claras evidencias de la participación del NO (ya sea directa o indirectamente) en la muerte

neuronal que ocurre en EA (Norris y col., 1996; de la Monte y Bloch, 1997; de la Monte y col., 2000; Lüth y Arendt, 1998; Lüth y col., 2000; Thorns y col., 1998; Yew y col., 1999). Los efectos neurotóxicos del NO están mediados por daño oxidativo así como también por activación de cascadas de señalización intracelular. Uno de estos mecanismos identificados es la activación de la vía p21 ras (Yun y col., 1998; Lander y col., 1995), la cual se encuentra inducida en EA (Arendt y col., 1995; Gärtner y col., 1995, 1999). Los astrocitos son capaces de liberar NO en condiciones basales así como luego de diversos estímulos patológicos o por daño (Mollace y Nistico, 1995; Murphy, 2000). Como estas células son el tipo celular mayoritario en el SNC, el NO derivado de las mismas es de gran importancia. Los astrocitos en enfermedades neurodegenerativas, incluso EA, aumentan la expresión de isoformas de NOS y la producción de NO (Wallace y col., 1997; Heneka y col., 2001; Lüth y col., 2002). De la misma forma en ratones transgénicos para APP (APP23) se observa un incremento de iNOS y eNOS (Lüth y col., 2001), y el A β estimula la producción de NO en astrocitos en cultivo (Akama y col., 1998). La liberación excesiva de NO por astrocitos causaría la disminución de energía en neuronas vecinas por inducción de una disfunción mitocondrial y posiblemente inhibición de la cadena respiratoria (Stewart y col., 2000), sin afectar la viabilidad astrocitaria pero generando la producción de peróxido y glutamato como resultado de un impedimento de la cadena respiratoria por el NO generado (McNaught y Brown, 1998). Por lo tanto, la evidencia indica que los astrocitos reactivos que expresan iNOS producen un aumento en el flujo de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, acompañado de cambios metabólicos compensatorios. Los flujos elevados de NO, glutamato y peróxido al espacio extracelular probablemente contribuyan a eliminar neuronas

vecinas vulnerables. Existen evidencias en otros tipos celulares (motoneuronas) que la expresión de p75^{NTR} se asocia a degeneración y apoptosis dependiente de NO (Pehar y col., 2004), lo cual podría explicar la muerte de motoneuronas en la ELA.

5.5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del avance que ha experimentado la medicina moderna, en la actualidad aún no se dispone de un tratamiento efectivo para la EA, se carece de técnicas confiables para un diagnóstico precoz, y la etiopatogénesis permanece en gran medida sin conocerse. Para optimizar nuevas vías de diagnóstico y tratar clínicamente al enfermo de Alzheimer es esencial dilucidar la secuencia de los eventos moleculares que determinan la patogenia de esta enfermedad neurodegenerativa. Se conoce que la formación de depósitos de A β es uno de los sucesos que inicia y promueve el proceso neurodegenerativo, al cual se asocian alteraciones morfológicas, como distrofia dendrítica y axonal. Es posible pensar que los mecanismos que inducen la muerte neuronal y la formación de anomalías intracelulares como los ONF forman parte de un proceso integral, en el que uno de los factores inductores es la presencia del péptido amiloide. Un hecho de gran interés en EA, así como en otras patologías neurodegenerativas, es su inicio en regiones cerebrales específicas (internas) del cerebro y su extraordinaria distribución afectando prácticamente toda la corteza en etapas posteriores. Este efecto dominó común a otras enfermedades neurodegenerativas parece un punto clave para limitar el avance de la patología. A propósito de ello, es de gran relevancia la contribución que células gliales, en especial astrocitos, tienen en patologías neurodegenerativas en general, y en la EA en particular. Estas células

son capaces de censar la presencia extracelular anormal del péptido, así como la aparición de neuronas en degeneración, y como se encuentran asociadas por uniones fuertes tipo *gap*, los astrocitos se comunican entre sí llevando mensajes dentro del SNC. Por lo tanto, es razonable pensar que la “red” que estas células forman en el cerebro es la vía de “diseminación informativa” de anomalías presentes en un sitio específico que distribuye la señal más allá de la lesión. En este sentido, es de gran interés estudiar la participación de las células astrogiales en el curso de la EA, para entender el proceso no como un hecho neuronal aislado, sino en su totalidad.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que el A β induce la desregulación de la proteína quinasa cdk5, la cual se ha descrito que hiperfosforila tau (Alvarez y col., 1999; Muñoz y col., 2000). Este aumento en la actividad de cdk5 se asocia con la muerte de neuronas hipocampales en cultivo. Por otro lado, en el laboratorio del Dr. Barbeito se ha establecido que los astrocitos participan activamente en la patogénesis de otra enfermedad neurodegenerativa, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Más aún, factores liberados por astrocitos reactivos tienen importantes consecuencias sobre las motoneuronas (Pehar y col., 2004). Al parecer, el aumento en la liberación de NGF con el crítico incremento de óxido nítrico astrocitario estarían actuando como moléculas de señalización de apoptosis sobre neuronas vulnerables, aquellas que aumentan la expresión del receptor p75. Estos hallazgos nos permiten pensar que éste podría ser un mecanismo conservado de señalización neuronal, y del mismo modo, estos factores liberados por astrocitos reactivos por el péptido A β contribuyen a la neurotoxicidad dependiente de p75NTR en EA. Este trabajo resume la colaboración de los dos grupos de investigación en un proyecto de integración

metodológica y conceptual con el objeto de ampliar el conocimiento de mecanismos moleculares que podrían ser conservados en diversas patologías neurodegenerativas.

5.5.1. Los astrocitos participan en la degeneración neuronal en la EA.

Probablemente la presencia anormal del péptido A β , soluble o en depósitos en forma de placas, perturbe la interacción entre neuronas y astrocitos. En respuesta al daño, las neuronas señalizan a los astrocitos vecinos, los cuales se vuelven reactivos. En un primer momento los astrocitos desarrollan fenotipos de distinto patrón de expresión génica y capacidad secretora que sirven para aislar el sitio donde ha ocurrido el daño. El aumento de factores tróficos promueve la supervivencia de neuronas no afectadas en la región; pero a su vez los astrocitos deben señalar la muerte de neuronas críticamente dañadas. Posiblemente la expresión de p75NTR, que se ve aumentada en muchos tipos neuronales luego de una lesión, imprima cierta “señal” en las neuronas dañadas para promover la muerte celular. Así, debe ser muy importante la expresión temporal como espacial de los distintos factores. Un incremento de la liberación de NO y el aumento en la producción de NGF/proNGF (liberados por la glía en condiciones de activación por el péptido A β), y la expresión simultánea de p75NTR en neuronas de hipocampo afectadas por la EA, podría ser parte del mecanismo que conduce a la degeneración y posterior pérdida neuronal. En un primer momento, las neuronas sufrirían la desregulación de sistemas quinasas que hiperfosforilan la proteína tau, como cdk5/p35 y GSK3 β , determinantes de la neurodegeneración en EA (Maccioni y col., 2001 a, b). Los cambios en neuronas y astrocitos deben ser reversibles y controlados estrictamente evitando la propagación del daño. Este mecanismo estaría crítica y permanentemente alterado en EA.

Las preguntas centrales de este proyecto son el conocer: (i) la posible variación de los niveles de NGF/proNGF y NO liberados por astrocitos reactivos por A β ; (ii) la participación de la vía de señalización NGF/p75 en la desregulación del sistemas quinasa cdk5/p35 que llevan al aumento en la hiperfosforilación de la proteína tau; (iii) la participación de esta vía en la muerte de neuronas; y (iv) la influencia del NO astrocitario sobre la vía NGF/p75 en la inducción de los mecanismos neurotóxicos mencionados.

Durante el envejecimiento y en patologías neurodegenerativas como la EA, las primeras zonas del cerebro en sufrir muerte celular son el hipocampo y la corteza, las cuales generan un particular interés debido a sus funciones en el SNC, pues se relacionan con la conducta emocional, comportamiento, memoria, lenguaje y funciones sensoriales y viscerales. En este contexto, puede ser de mucho interés la utilización de modelos experimentales que consigan reproducir, en mayor o en menor medida, las alteraciones bioquímicas, morfológicas y funcionales típicas de la EA. Es por ello que el cultivo primario de corteza e hipocampo de rata son modelos muy utilizados para realizar estudios de EA. Un modelo muy usado actualmente como aproximación al estudio de células de origen neuronal corresponde a las células derivadas de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Otra aproximación al estudio del efecto del A β sobre el SNC es el ratón transgénico Tg2576, el cual expresa la APP humana mutada en los residuos 670 y 671; esta mutación aumenta la formación y secreción de A β , por favorecerse la actividad de la proteasa α -secretasa. En la actualidad este modelo transgénico es utilizado ampliamente como una herramienta para el estudio de la formación de las PS y su participación en eventos neurodegenerativos. En este sentido los modelos experimentales que se proponen y

que han sido probados exitosamente, son el cultivo primario de neuronas de hipocampo de embriones de rata y el ratón Tg2576. Además, se incorpora el cultivo primario de astrocitos, siguiendo los métodos usados en el laboratorio del Dr. Barbeito, pero derivados del hipocampo de ratas neonatos, para realizar estudios en células aisladas y además trabajar con co-cultivo de neuronas con astrocitos hipocampales. Estas aproximaciones son modelos apropiados para el estudio de la influencia del péptido A β sobre astrocitos y el modo que ello afecta las neuronas en relación al fenotipo neurotóxico estudiado (hiperfosforilación de tau, muerte neuronal), analizando la participación de la vía NGF/p75.

5.6. HIPÓTESIS

En consideración a los antecedentes anteriormente expuestos, se plantea que *un incremento de NO y NGF/proNGF liberados por astrocitos reactivos estimulados por el péptido A β , sumados a la expresión simultánea del receptor p75 en neuronas afectadas, constituye uno de los mecanismos que conduce a la neurodegeneración y posterior pérdida neuronal.*

5.7. OBJETIVO

El OBJETIVO GENERAL es **investigar alteraciones específicas de la interacción entre células astrogliales y neuronas de hipocampo que expliquen la neurodegeneración en el contexto de la patogénesis de la EA.**

5.7.1. Objetivos Específicos

1. *Caracterizar los efectos proinflamatorios del A β en astrocitos de hipocampo.* En particular se estudia la posibilidad que los astrocitos reactivos por A β

secretan al medio NGF y NO en cantidades elevadas respecto de los astrocitos en condiciones control. Para ello, se propone determinar si el A β induce la expresión (mRNA y proteína) de la enzima oxido nítrico sintetasa en sus isoformas iNOS (inducible) y nNOS (neuronal). Realizar mediciones de nitrito y nitrato en el medio de cultivo como evidencia de la producción de NO. Determinar si los astrocitos reactivos por A β secretan al medio NGF y precursores del mismo, y caracterizar las especies moleculares de éste. Por último, realizar curvas dosis-respuesta y de concentración óptima del péptido para ambos casos.

2. *Analizar si los astrocitos estimulados con A β inducen alteraciones en la proteína tau y de proteínas quinasas responsables de su fosforilación a través de la activación de p75^{NTR}.* En particular, investigar alteraciones en los patrones de fosforilación de la proteína tau en neuronas cultivadas con astrocitos reactivos (estimulados con el péptido A β) o con el medio condicionado de éstos. Se estudia si en este efecto interviene la desregulación de sistemas quinasas como cdk5, determinante en la neurodegeneración en EA (Maccioni y col., 2001a,b). Analizar la influencia que ejercen NO, el factor NGF (y su precursor proNGF), y el receptor de baja afinidad p75 en los cambios del estado de fosforilación de tau, mediante el uso de inhibidores de NOS y la utilización de anticuerpos con actividad bloqueadora del receptor p75 o NGF y su potencial neuroprotector. Finalmente, estudiar la expresión de los receptores de alta y de baja afinidad para NGF (trkA y p75), y de las isoformas de la enzima oxido nítrico sintetasa (NOS) en neuronas bajo la influencia de astrocitos estimulados ó mediante la adición del medio condicionado.

3. *Estudiar la capacidad proapoptótica de astrocitos estimulados con $A\beta$ en un modelo de co-cultivo.* Se evalúa si los astrocitos estimulados con $A\beta$ inducen muerte neuronal dependiente de p75NTR y si la misma es por apoptosis. Para ello se utilizan inhibidores de la vía de las caspasas así como inmunomarcación para caspasa 3 proteolizada, última caspasa de la vía apoptótica. Se propone la caracterización del rol de la señalización de NGF/p75NTR en células hipocámpales, en particular el posible efecto neurotóxico. Además, analizar la influencia del NGF y NO sobre la muerte neuronal y la hiperfosforilación de tau mediante la adición exógena de dichos compuestos por separado y juntos. Por último, estudiar el resultado de la utilización de inhibidores de la enzima óxido nítrico sintetasa, así como anticuerpos con efecto de bloqueo para p75 y NGF.

4. *Evaluar la expresión de mediadores astrocitarios en el cerebro de ratones transgénicos para APP (Tg2576).* Analizar la expresión de NGF en relación con la expresión de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), indicadora de astrocitosis en rebanadas de hipocampo provenientes de ratones transgénicos para APP (Tg2576). Finalmente, se analiza si dichas marcas se correlacionan con la tinción de placas amiloides realizada con rojo Congo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. MATERIALES

Material biológico.

Para llevar a cabo los objetivos planteados se utilizarán dos modelos: el primero corresponde a un modelo *in vivo*, el ratón transgénico Tg2576, provisto gentilmente por la Dra. Carola Oth, el cual posee el precursor del péptido β -amiloide humano mutado en dos residuos, para favorecer la formación de A β . El segundo sistema corresponde al modelo *in vitro* de cultivo primario de neuronas y astrocitos de hipocampo de ratas de la cepa *Sprague-Dawley*, el cual es un buen sistema para los estudios de neurotoxicidad.

Reactivos.

De MERCK Química Chilena se obtuvieron: sales, reactivos analíticos, ácidos, bases y alcoholes. De *Invitrogen-GIBCO BRL Life Technologies Inc.*: transcriptasa reversa RNasa H- SUPERSRIPT™ II (200 u/ μ l), Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l), dNTPs (100 mM), 100 pb DNA ladder (1 μ g/ μ l), y Trizol. De la compañía *Sigma Chemical CO*: Nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME), Bromuro de

etidio, BSA, β -mercaptoetanol, SDS, EDTA, polilisina y péptido β -amiloide 25-35/35-25. NGF (2.5S) de ratón fue obtenido de *Harlan*. Las placas para cultivo celular fueron adquiridas en *NUNC*, los medios de cultivo: DMEM, Neurobasal, suero fetal de bovino, suero de caballo, suplemento N2, Tripsina, y los antibióticos estreptomicina y penicilina, fueron adquiridos de *Gibco BRL*. Standard internos QuantumRNA Classic 18S se obtuvo de *Ambion*. Elisa para NGF, NGF Emax ImmunoAssay system kit, de *Promega*. SYBR Gold Nucleic Gel Stain de *Molecular Probes*. El dador de NO (DETA-NONOATO) y los inhibidores DEVD-fmk y VAD-fmk son de *Calbiochem*. Ensayo colorimétrico para determinación de iones nitrito y nitrato de *Cayman*. Los anticuerpos Cdk5 (C9), TrkA y NGF fueron adquiridos de *Santa.Cruz Biotechnology*. Anti-NGF con actividad bloqueadora (AB1526S) y anti-p75 son de *Chemicon*. Los anticuerpos para epitopes de tau tipo Alzheimer, PHF1 fue donación del Dr. Peter Davies, y AT8 de *Immunogenetics*. Anticuerpo dirigido contra predominio de NGF se adquirió de *Pro-Hormone Science*. Los anticuerpos contra iNOS y nNOS son de *Transduction Laboratories*. Anticuerpos primarios para actina y secundarios acoplados a FITC y TRICT fueron adquiridos de *Sigma Chemical CO*. Anticuerpo anti caspasa-3 proteolizada se obtuvo de *Cell Signall*.

6.2. MÉTODOS

Cultivo celular.

Neuronas y astrocitos provienen del *hipocampo* de ratas. Cultivo primario de *astrocitos* preparados de hipocampos de rata P1-2 de acuerdo al procedimiento descrito por Saneto y De Vellis (1987) con algunas modificaciones. Rápidamente los hipocampos son disecados y luego incubados en 0.25% tripsina-EDTA durante

15 min a 37°C, luego de lo cual el tejido es lavado con una solución salina HBSS (del inglés, *Hanks' balanced salt solution*) y disgregado. Los astrocitos se plaquean a una densidad de 2×10^4 células/cm² en placas de Petri de 35 mm y se mantienen en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, HEPES (13,8mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). La pureza de las monocapas de astrocitos se determina por inmunorreactividad a GFAP y ausencia de marcación para OX42 (microglía).

Los cultivos celulares de *neuronas* hipocampales de rata E18 se preparan según Banker y Cowan (1977). Rápidamente los hipocampos son disecados y luego incubados en 0.25% tripsina-EDTA durante 10 min a 37°C luego de lo cual el tejido es lavado con una solución de HBSS y disgregado para ser sembrado sobre poli-L-lisina (0,1-0,5 mg/ml) a una densidad de 5000 células/cm² para inmunofluorescencia y 15000 células/cm² para estudios de *Western blot*. Los cultivos se mantienen en un medio suplementado con 10% suero fetal de bovino durante 3 h, y luego se reemplaza por un medio con suplemento N2, manteniéndose por 4-5 días en cultivo. Para experimentos de co-cultivo, los astrocitos plaqueados sobre cubreobjetos modificados se montan sobre neuronas crecidas en monocapa en placas de Petri de 35 mm precubiertas con poli-L-lisina.

Exposición de monocapas de astrocitos al péptido amiloide (Aβ).

Astrocitos en monocapa confluyente (pureza mayor al 98%) son expuestos a distintas concentraciones del péptido Aβ 25-35 (fragmento reactivo) en su forma soluble (Tabaton y col., 1994; Wang y col., 1999; Lue y col., 1999; McLean y col., 1999) diluido en agua pura estéril a distintas concentraciones en un rango final de 0-20 µM. El medio se cambia previamente a *Neurobasal* suplementado con N2, y el

tratamiento fue por diferentes períodos de tiempo entre 1-72 h. Los cultivos control recibieron el mismo volumen de vehículo (agua destilada desionizada estéril). Luego se recolecta el medio para otros estudios, las células se lavan 3-5 veces con buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4 y posteriormente se procede la extracción de proteínas (buffer RIPA con inhibidores de proteasas) o RNA (Trizol). En caso de co-cultivo los cubreobjetos con astrocitos previamente estimulados se lavan para eliminar el péptido y se montan sobre las neuronas plaqueadas en placas de Petri de 35 mm.

Extractos proteicos.

Las células en cultivo fueron homogenizadas en tampón RIPA (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA 1% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 100 µg/ml PMSF, 2 µg/ml aprotinina, 2 µM leupeptina, y 1 µg/ml pepstatina). Posteriormente los homogenizados fueron centrifugados a 15.000 Xg por 10 min a 4°C. Las proteínas contenidas en el sobrenadante fueron cuantificadas por medio del método de *Bradford* modificado (BioRad). Estos extractos se utilizaron para realizar inmunoprecipitaciones e inmunodetecciones.

Inmunoprecipitación.

Muestras entre 200-500 µg de extractos de proteína fueron incubadas con 5 µl de proteína A o G 50% (Sigma) por 30 min a 4°C, de acuerdo al procedimiento estándar en uso en nuestro laboratorio (Alvarez y cols., 2001). Esta mezcla se centrifugó a 3000 Xg por 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, esta mezcla fue incubada con en anticuerpo primario por toda la noche a 4°C, luego se agregan 5 µl de proteína A o G al 50% por 2 h a 4 °C. Los inmunocomplejos se recuperaron mediante centrifugación a 3000 Xg por 10 min a 4°C, el pellet obtenido fue lavado 3 veces con tampón RIPA. Los lavados consisten

en la adición de 500 μ l de tampón RIPA a los pellet, suave agitación y finalmente centrifugación a 3000 Xg por 10 min a 4°C. Los pellet que contienen los inmunocomplejos se fraccionan en SDS/PAGE.

Separación electroforética de proteínas.

30-40 μ g de proteínas antigénicas se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, 10% y 12% de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970), en el sistema de *Mini Protean^R III de BIO RAD*. El gel separador y espaciador se prepararon a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida 30%:0,8%. El gel separador se preparó a concentraciones finales de 6%, 10% y 12% conteniendo 375 mM Tris (pH 8,8); 0,1% SDS; 0,04% persulfato de amonio y 0,03% TEMED. El gel separador se preparó con una concentración final de poliacrilamida de 3,8% incluyendo 125 mM Tris (pH 6,8); 0,1% SDS; 0,01% persulfato de amonio y 0,04% TEMED. A cada muestra de proteína se le agregó tampón de carga (0,3M Tris pH 6,8; 5% SDS, 0,7 M 2-mercaptoetanol, 20% glicerol y 0,025% azul de bromofenol), luego se calentaron a baño maría con agua de ebullición por 3 minutos. Las muestras se sembraron en el gel junto con un marcador de peso molecular (*BIO RAD*) realizándose la electroforesis a 30 mA (100 V) por 1 h en tampón de corrida (25 mM Tris (pH 8,3), 190 mM glicina y 0,1% SDS). Para determinar la distribución de las proteínas en el gel, se colocó en una solución de fijación (25% isopropanol y 10% ácido acético) por 1 h y posteriormense te tiñó con azul de Cómase (30% metanol y 10% ácido acético) por 3 h. Finalmente el gel fue destañido en una solución 30% metanol y 10% ácido acético. En el caso de realizar análisis por *Western blot* los geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa.

Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.

Finalizada la electroforesis, las muestras se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Hybond C*; 45 μm de poro, *Amersham*) en el sistema de transferencia *Mini Trans Blot^R* (*BIO RAD*). Para ello, sobre una esponja embebida en tampón de transferencia (25 mM Tris (pH 8,3), 190 mM glicina, 0,1% SDS y 20% metanol) se depositó secuencialmente: dos trozos de papel de filtro (Whatman n° 1), la membrana de nitrocelulosa, el gel a transferir y otros trozos de papel filtro. Luego se cubrió con otra esponja embebida en la misma solución. Esto se colocó en en una cámara de electrotransferencia conteniendo el tampón mencionado y se aplicó una intensidad de corriente de 30 mA (100V) por 1 h. Una vez cumplido el tiempo, la membrana se dejó secar a temperatura ambiente. Para verificar el buen resultado de la transferencia, el gel se tiñó según lo descrito en el punto anterior, y la membrana con rojo Ponceau.

Detección inmunológica.

Las membranas se procesaron como ya ha sido descrito por Cross y col., 1993 y 1996. Se incubaron con 10 ml de solución de bloqueo (PBS-0,05% Tween-20 5% BSA o leche descremada) a 37°C por 1 h. Luego se incubaron las membranas con 5 ml de una solución conteniendo los anticuerpos de interés diluidos entre 1:500 - 1:1000 en solución de bloqueo a 4°C con agitación durante toda la noche. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces en PBS-0,05% Tween 20 a temperatura ambiente por 10 min cada lavado. Las membranas se incubaron a temperatura ambiente por 1 h con 5 ml de una solución de anti-IgG de conejo o ratón conjugado con peroxidasa, diluida 1:1000 en solución de bloqueo. Finalmente las membranas se lavaron tres veces en PBS-0,05% Tween 20 a temperatura ambiente

por 10 min cada lavado. El revelado del conjugado se realizó utilizando un método de quimioluminiscencia (ECL, *Amersham*), el cual se basa en la emisión de luz no radiactiva detectando antígenos inmovilizados unidos directa o indirectamente con anticuerpos conjugados con peroxidasa. Los films de exposición obtenidos se digitalizaron y se realizó análisis densitométricos con el programa ROI (*KODAK*). Los datos fueron normalizados con la densitometría de las bandas del inmunoblot de actina o tubulina y graficados como porcentaje en base a los datos del control. A los diferentes tratamientos se les realizó análisis estadísticos adecuados.

Inmunofluorescencia.

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia, las células se tratan de acuerdo a procedimientos en uso en el laboratorio (Capote y Maccioni, 1998). Las células se siembran sobre cubreobjetos, se fijan en 4% de paraformaldehído, 4% sacarosa en PBS a 37°C por 15 min, y son permeabilizadas con 0.1% Triton X-100 por 1 min. Luego se bloquean con PBS-BSA 2% por 1 h y posteriormente se incuban con el anticuerpo primario en solución de bloqueo por 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda o a 4°C por toda la noche. Las células fueron lavadas con PBS 1X, 3 veces por 5 min, y luego incubadas en solución de bloqueo con el anticuerpo secundario acoplado a FITC (fluoresceína) o TRICT (tetrahodamina, *Sigma*), por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente las células fueron lavadas 3 veces en PBS 1X y montadas con FluorSave (*Calbiochem*). Las células fueron analizadas posteriormente por medio de microscopia confocal (LSM 510 META Zeiss). Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa Adobe Photoshop 6.0.

Ensayos de viabilidad.

La viabilidad celular se evaluó mediante conteo directo de células que presentan neuritas intactas mayores a 4 veces el diámetro celular. El conteo se realiza en un área de 2,76 cm² en el centro y cuatro vértices opuestos de la placa de Petri de 35 mm. Excepcionalmente se utilizó el ensayo colorimétrico del 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro; azul de tiazolil (MTT) modificado (Liu y col., 1997), de utilidad en muchos de los estudios en nuestro laboratorio (Alvarez y col., 1999).

Detección de células apoptóticas.

La muerte celular programada se estudia por *Western blot* y ensayos de inmunofluorescencia para caspasa-3 proteolizada (*Cell Signall*), principal producto de la cascada de caspasas en la vía apoptótica. También se analiza la acción de los inhibidores de caspasas VAD-fmk (inhibe caspasas en general) y Z-DEVD-fmk (inhibe caspasa-3).

RT-PCR cuantitativo relativo para mRNA de NGF y NOS.

2 µg de RNA total obtenidos de cultivos celulares utilizando *Trizol* se transcriben de forma reversa. Los niveles de mRNA de NGF/NOS se cuantifican por RT-PCR relativa-cuantitativa. El par de partidores de NGF/NOS se sintetizó junto con los partidores Standard internos QuantumRNA Classic 18S (*Ambion*) que se utilizan en la reacción para amplificar una banda de 189 pb del cDNA de NGF, y otra de 489 pb del cDNA del rRNA 18S. Los partidores para iNOS usados fueron: 5'GGGATCTTGGAGCGAGTTGTGG y 3'TCTGCCTGTGCGTCTCTTCCG. Para nNOS: 5'CCACACCAACGGGAATCAGGAG y 3'TCCTCCAGCACCTCCACCATTG. La reacción de PCR se llevó a cabo en un

volumen de reacción de 50 µl conteniendo 1 µl de cDNA, 20 pmoles de cada partidador NGF/iNOS, 4 µl de de los partidores 18S (razón 2:8 de partidador:competidor), 200 µM de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 U de DNA polimerasa Taq y 1X buffer PCR (*Invitrogen*). Se realizó un número de ciclos que permite la amplificación lineal de mRNA NGF con los parámetros: 94°C, 45 seg; 64°C, 45 seg; 72°C, 45 seg; y de iNOS: 95°C, 30 seg; 56°C, 30 seg; 72°C, 30 seg durante 35 ciclos. Se realizaron controles sin la enzima en cada ensayo. Los productos de amplificación se corrieron en geles de poliacrilamida 6% no desnaturalantes y se tiñeron con SYBR Gold Nucleic Gel Stain (*Molecular Probes*). Análisis densitométricos se realizaron con el programa NIH Image y los niveles de expresión se normalizaron contra los del Standard 18S.

Determinación de los niveles de NGF y pro-NGF.

La concentración proteica de NGF en el medio de cultivo de astrocitos se cuantificó por ELISA (NGF Emax ImmunoAssay system kit, *Promega*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de pro-NGF (y NGF) se derminan por *Western blot*. El medio de cultivo de astrocitos en condiciones libres de suero se concentra con ácido tricloroacético (TCA) o en *CentriconTM filters YM-3* (*Millipore*) aproximadamente 10 veces. Las proteínas se separan en geles de poliacrilamida 12% por SDS-PAGE, se transfieren a membranas de nitrocelulosa y se incuban con anticuerpo contra el pre-prodominio de NGF (1:1000, *Pro-Hormone Science*) usando como segundo anticuerpo anti-rabbit de cabra conjugado con la enzima peroxidasa (1:10000) y sustrato quimiolumincente ECL como ya se mencionó.

Producción e inhibición de óxido nítrico.

Se utilizó el dador de óxido nítrico NOC-18 (DETA-NONOATO, *Calbiochem*), capaz de liberar NO espontáneamente en solución bajo condiciones fisiológicas sin cofactor, con una vida media ($t_{1/2}$) de 3400 min. Se adicionó directamente al medio de cultivo de neuronas de hipocampo de 5 días a una concentración de 10 μ M en NaOH 0,01 M, concentración que no produce la formación de metabolitos secundarios (Hrabie y col., 1993).

Para estudiar la contribución de NO en el mecanismo de degeneración-muerte neuronal inducida por NGF/p75 se evaluó el efecto neuroprotector del inhibidor inespecífico de NOS L-NAME (1 mM), el cual fue adicionado directamente al medio de cultivo inmediatamente luego de establecidos los co-cultivos.

Determinación de los niveles de NO.

Los niveles de NO liberados por la glía bajo estímulo con el péptido A β se evaluaron mediante la medición de la presencia de iones nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-) en el medio de cultivo, productos finales de la reacción del NO con algunas moléculas presentes en los fluidos biológicos. Para ello se usó un kit colorimétrico (*Cayman*) basado en la reacción de Griess, por la reducción de los iones nitrito y nitrato por la enzima nitrato reductasa, y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Alteraciones en los patrones de fosforilación de la proteína tau.

Los niveles de fosforilación se evaluaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos para epitopes tipo Alzheimer: AT8, anticuerpo monoclonal contra S²⁰²/S²⁰⁵; y PHF1, anticuerpo monoclonal contra epitopes T³⁹⁶/S⁴⁰⁴.

Inmunohistoquímica.

La localización de las proteínas GFAP y NGF se analizó en cortes de cerebro incluidos en parafina. Se desparafinan y bloquean los cortes siguiendo el procedimiento descrito por Apelt y Schliebs (2001). Para ello se incubaron los portaobjetos en xilol 2 veces por 3 min, en etanol absoluto 2 veces por 3 min, etanol 95% 2 veces por 3 min y finalmente en agua destilada 2 veces por 3 min. Posteriormente se trataron con citrato de sodio (10 mM, pH 6,0) y fueron sometidos a máxima potencia del microondas por 1 min y luego a 10% de potencia por 10 min. Luego se lavó con agua destilada. La peroxidasa endógena del tejido fue inactivada por incubación con agua oxigenada al 0,3% (peróxido de hidrógeno) en metanol por 5 min a temperatura ambiente. Luego de lavar, los cortes se bloquearon 1 h a 37°C con PBS 1% BSA, 5% leche descremada y 0,3% Tritón X-100. Los cortes fueron incubados toda la noche a 4°C con los diferentes anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo: anti-NGF 1:250; anti-GFAP 1:400. La incubación del segundo anticuerpo y el revelado se realizó por la utilización del sistema *DAKO Quick Staining Kit* HRP. Esta técnica se basa en que las muestras después de ser incubadas con el primer anticuerpo son tratadas con una solución que contiene IgG de conejo/ratón/cabra biotinilados para luego ser incubadas con una solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa. La reacción se completa incubando con un sustrato cromógeno, desarrollándose la reacción de color usando 0,5 mg/ml 3,3-diaminobenzidina (DAB) dando como resultado un precipitado café insoluble en el sitio de unión antígeno-anticuerpo. Finalmente se deshidrataron los cortes usando etanol 80% y 100%, 1 min en cada solución. Luego se incubó 2 veces en xilol por 5 min y se montaron usando Citoseal™ y cubreobjetos, para ser

observados en microscopio Zeiss acoplado a una cámara digital. Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa Adobe Photoshop 6.0. Previo al paso de deshidratación, se tificaron los núcleos con hematoxilina, y posterior a esto se realizó la tinción con rojo Congo para detectar los depósitos de A β .

Tinción de rojo Congo y de hematoxilina.

Después de realizadas las inmunohistoquímicas, y antes de la deshidratación, se efectuó la tinción con hematoxilina de núcleos celulares. Para ello se adicionó a cada corte de tejido una gota de hematoxilina por 10 s y posterior incubación en solución de borato de sodio 1% por 15 s, finalmente se lavó con agua destilada. Posterior a esto se procedió a teñir con rojo Congo los depósitos de A β . Para llevar a cabo esta tinción, se preparó una solución de 1% NaOH, una de 80% etanol saturado en NaCl y una solución saturada de rojo Congo preparada con la solución de 80% etanol saturado en NaCl. Para teñir los depósitos de A β se adicionó a cada corte gotas de solución A (1 ml solución 80% etanol saturado en NaCl más 10 μ l solución 1% NaOH) preparada en el momento, y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se eliminó el exceso y se adicionó a cada corte gotas de solución B (1 ml solución saturada de rojo Congo preparada con la solución 80% etanol saturado en NaCl más 10 μ l solución 1% NaOH) preparada en el momento, y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes se lavaron con agua destilada y se procedió a su deshidratación.

Análisis estadísticos.

Para comparar las medias entre dos variables (control y tratamiento), se utilizó la prueba t de Student no pareada (del software *Sigma Plot*). Múltiples comparaciones entre grupos se estudiaron por análisis de la varianza (ANOVA), de una entrada con repeticiones (*one way repeted measures, RM, GraphPad InStat*), para un factor y de 2 entradas (*two way, GraphPad Prism*) para más de un factor. Se utilizaron post pruebas de contrastes múltiples (*Post-tests*) de *Tukey-Kramer* (1 entrada) y *Bonferrini* (2 entradas) para comparar entre todos los pares de columnas y se analizó la tendencia lineal (*Test for linear trend*) en los casos convenientes. Las curvas de la Figura 35 se analizaron y compararon por Regresión Lineal (*ANCOVA, GraphPad Prism*).

7. RESULTADOS

7.1. ACTIVACIÓN ASTROCITARIA POR EL PÉPTIDO A β .

Los astrocitos juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la supervivencia neuronal mediante la provisión de soporte trófico, regulando la concentración extracelular de iones y removiendo los neurotransmisores como el glutamato. Sin embargo, los astrocitos pueden reaccionar para promover la muerte de neuronas luego de diversos tipos de daño como el isquémico o por trauma. Dado nuestro interés de entender la patogénesis de la EA, adaptamos los estudios que en el laboratorio del Dr. Barbeito se desarrollan acerca de la astrocitosis en la enfermedad esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y los mecanismos de la neurotoxicidad mediada por astrocitos, al modelo de estudio de la EA en nuestro laboratorio, neuronas de hipocampo, utilizando el péptido A β como agente neurotóxico.

7.1.1. Cambio morfológico y expresión de GFAP en astrocitos.

En este estudio investigamos si el fragmento reactivo del péptido A β (A β 25-35), es capaz de inducir la activación de astrocitos de hipocampo de rata en cultivo. En primer lugar estudiamos la morfología de los astrocitos expuestos a distintas

concentraciones del péptido A β , ya que estas células junto con la microglia responden a diversos daños con cambios característicos conocidos como *gliosis* (astrocitos en el caso de astrocitos). Los astrocitos adoptan un “fenotipo reactivo” caracterizado por una hipertrofia del núcleo y del soma celular, aumento en la proliferación y elaboración de procesos celulares característicos con un incremento en el contenido de la proteína GFAP. En el caso particular de la EA, los astrocitos presentan la morfología característica de gliosis, así como el aumento en la expresión de GFAP (Pike y col., 1994), sin inducción de muerte glial (Kato y col., 1997).

Los cultivos de astrocitos empleados fueron de una pureza superior al 98%, determinada por ausencia de inmunorreactividad con el anticuerpo OX42 (CD11b/c), característico de microglía, luego de un proceso de purificación que consta de enérgica agitación por 48h (los astrocitos se mantienen adheridos a las placas, mientras las otras células se desprenden), seguida de incubación con arabinósido de citocina (araC), sustancia capaz de producir muerte a células que se replican (Leeds y col., 2005). Como se parte de una monocapa confluyente de astrocitos, es muy probable que éstos ya no se dupliquen debido a la inhibición de la replicación por contacto (entre las células), y por tanto no son susceptibles de ser eliminados por esta sustancia. Cabe destacar que el medio de los astrocitos se cambia de DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal, donde fueron crecidos, a Neurobasal suplementado con N2, fórmula sin suero creada por Boltenstein y Sato en 1979 (Castillo-Díaz y col., 2005). Esto es debido a dos razones. Primero, se pretende eliminar el suero del medio, que es importante en estudios posteriores donde evitamos interferencias al analizar moléculas liberadas al medio por astrocitos reactivos. Segundo, en ensayos subsecuentes realizamos estudios en co-cultivos con

neuronas de hipocampo mantenidas en el medio ya mencionado, es por ello que procuramos conservar los mismos parámetros, y así poder sacar conclusiones válidas.

Por medio del análisis morfológico bajo el microscopio óptico, encontramos que células astrogiales expuestas al fragmento tóxico del péptido A β (A β 25-35) se vuelven reactivas (Figura 1), presentando la morfología característica observada en casos de astrocitosis por diversos estímulos. A medida que incrementamos la concentración de A β en el medio de cultivo, se hace más evidente el cambio morfológico. Así una concentración de 5 μ M no produce cambios considerables, pero a partir de 10 μ M, las células varían su aspecto regular de "sábana" por el de células con forma de estrella. (Figura 1 A). Además, por inmunofluorescencia advertimos un aumento de marca para la proteína fibrilar ácida GFAP con las tres concentraciones del péptido usadas respecto del control. De la misma forma, al incubar con 10 μ M del péptido por 8, 12 y 24 h, la reactividad astrocitaria aumenta conforme lo hace el tiempo de incubación, aproximándose a la producida por el lipopolisacárido sobre estas células (Figura 1B). Por microscopía confocal (Figura 2) puede verse en detalle la morfología característica adoptada y la elaboración de procesos conteniendo la proteína GFAP. El control ha sido sobreexposto para apreciar esta diferencia (idem Figura 1A), y en el recuadro inferior se observa la expresión real de GFAP en astrocitos no estimulados.

7.1.2. Astrocitos reactivos alteran la expresión y liberación de diversos factores al medio.

La gliosis es comúnmente observada en muchos desórdenes neurodegenerativos. La gliosis asociada con las PS es un evento temprano de la EA,

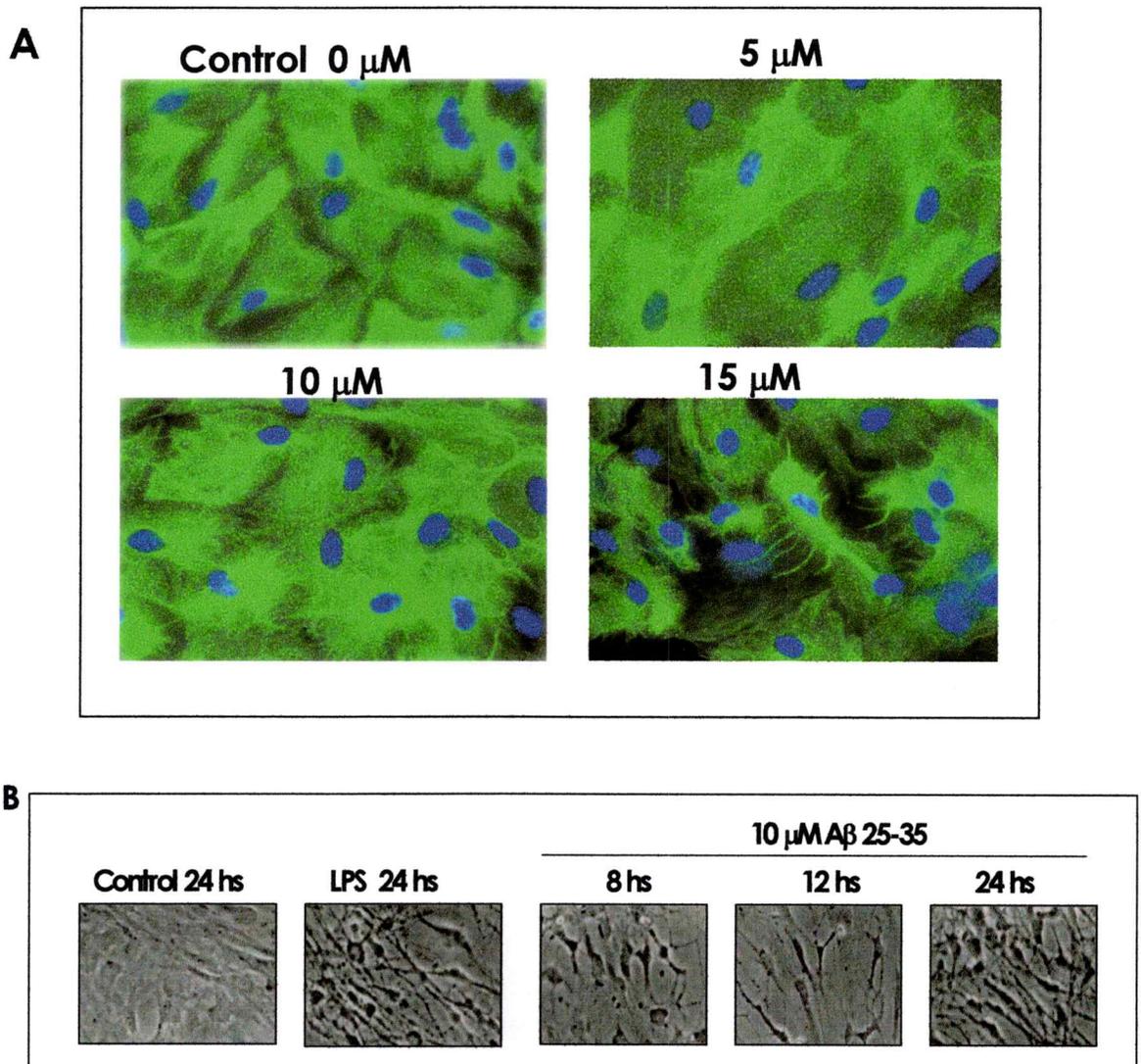


FIGURA 1. A β 25-35 induce la activaci3n de astrocitos de hipocampo en cultivo.

A. Micrografias de fluorescencia mostrando inmunorreactividad para GFAP (verde) en astrocitos hipocampales en monocapa confluyente (pureza ~98%) expuestos a distintas concentraciones del p3ptido A β 25-35 por 24 h. El control ha sido sobre-expuesto para diferenciar la distribuci3n de la prote3na GFAP en la c3lula. Los n3cleos son identificados con Hoeschst (azul). B. Micrografias de contraste de fase de astrocitos de hipocampo expuestos a lipopolisac3rido bacterirno (LPS) 3 10 μM A β 25-35 por diferentes per3odos de tiempo.

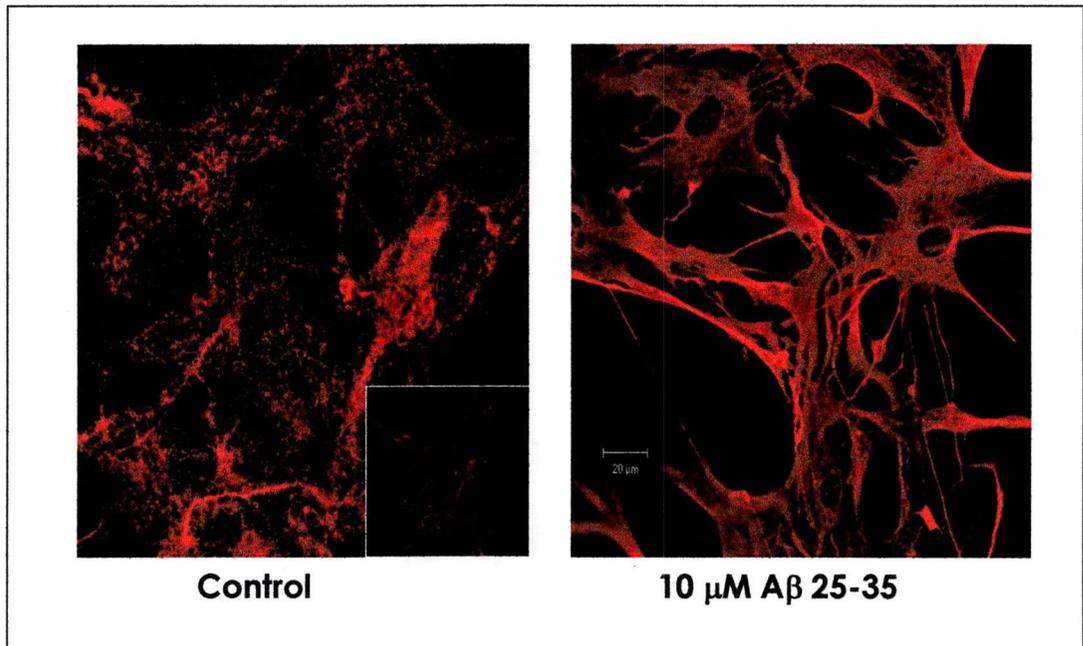


FIGURA 2. A β 25-35 induce cambios morfológicos en astrocitos de hipocampo en cultivo. Micrografías de fluorescencia para GFAP (rojo) en astrocitos de hipocampo con 10 μ M A β 25-35 por 24h visualizado por microscopía confocal. El control ha sido sobre-expuesto para diferenciar la morfología, la expresión real de GFAP en el control puede observarse en el recuadro inferior.

y algunas citoquinas y mediadores inflamatorios producidos por la glia activa participan en la patogenia de esta enfermedad. En el caso de activación astrocitaria por el péptido A β se ha observado la inducción de IL-1 β y TNF α (Akama y col., 1998), activación de vías MAPK y aumento del factor NF κ B (Bach y col., 2001).

Evaluamos si existe variación en los niveles de dos factores liberados por los astrocitos reactivos por A β 25-35: el factor NGF y la producción de óxido nítrico. Analizamos el medio de cultivo de estas células expuestas a distintas concentraciones del péptido en un rango de 1-20 μ M, por diferentes periodos de tiempo de 0 a 72 h

7.1.3. Producción de NGF.

El *NGF*, primer factor promotor del crecimiento nervioso identificado y pilar de la teoría neurotrófica, participa en las respuestas inflamatorias dentro y fuera del sistema nervioso central (Levi-Montalcini, 1996). El NGF ha sido implicado en la EA (Mufson y col., 1998) y actualmente se conoce que su precursor de 30 kDa, proNGF, es la forma predominante en cerebro y aumenta en la EA (Fahnestock, y col., 2001). En nuestros estudios, la activación astrocitaria con el péptido incrementó la secreción de NGF al medio de cultivo en comparación con astrocitos no estimulados (Figura 3). Observamos por estudios de ELISA que variando la concentración de A β sobre astrocitos incubados por 24 h, la secreción de NGF aumenta paralelamente con el aumento de concentración del péptido, siendo significativo el cambio desde una concentración de 10 μ M y llegando a ser aproximadamente 20 veces mayor al control (10.9 ± 2.1 pg / ml) con 20 μ M de A β (Figura 3). Estos estudios fueron completados con una curva de tiempo utilizando concentraciones entre 5 y 10 μ M.

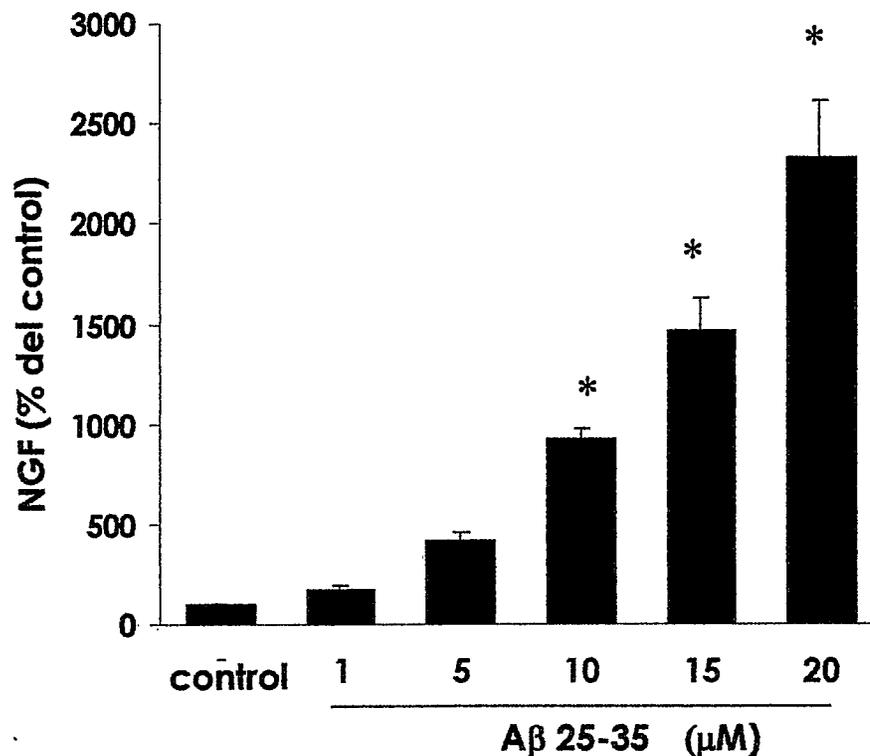


FIGURA 3. Aβ 25-35 induce la liberación de NGF al medio de cultivo por astrocitos de hipocampo. Astrocitos de hipocampo se trataron con Aβ 25-35 en las concentraciones indicadas, y los niveles de NGF en el medio de cultivo se analizaron por ELISA a las 24h de tratamiento. Los datos se expresan como porcentaje del control sin el péptido (10.9 ± 2.1 pg/ml), media \pm SEM de cuatro experimentos independientes ($n=4$). * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$, ANOVA de una entrada con repeticiones). La post-prueba de *tendencia lineal* resultó significativa ($p \leq 0,05$). Todos los tratamientos resultaron diferentes entre sí por la prueba de *Tukey-Kramer*.

Utilizamos este rango por ser, aparentemente, por estudios en la figura 1 y otros que no se muestran, el desencadenante del fenotipo reactivo. En la Figura 4 se observan los resultados con 10 μ M, donde la liberación de NGF aumenta significativamente sobre los valores controles (13.6 pg/ml) desde las 24 h y disminuye hasta dejar de ser significativo a las 48 h. Entre las 24 y 36 h de incubación se produce la mayor liberación de NGF (superando en promedio las 10 veces respecto del control). Además de estudiar el medio de cultivo, analizamos la expresión del mRNA de NGF en la célula. Aislamos el RNA total, y por RT-PCR relativa cuantitativa comprobamos que se incrementa el mRNA de NGF conforme aumenta A β en los cultivos incubados por 24 h, siendo el aumento significativo con la menor concentración de estímulo utilizada (5 μ M, Figura 5) y, en promedio, aumentando progresivamente hasta ser 5 veces mayor al control con 15 μ M del péptido. Una curva de tiempo de la expresión de mRNA de NGF con 10 μ M del péptido resultó, en promedio, en un aumento significativo de su expresión desde las 16 h, llegando a duplicar los valores control a las 24 h (Figura 6), para dejar de ser significativo a las 48 h. Luego de estudiar las curvas de dosis-respuesta y tiempo de liberación del NGF determinamos conveniente fijar el estímulo a 24 h con una concentración de 10 μ M A β 25-35.

Para determinar si el NGF era liberado en forma de pro-neurotrofina, el medio de cultivo fue analizado por inmunodetección utilizando un anticuerpo específico para el pre-prodominio del NGF. Luego de concentrar el medio aproximadamente 10 veces, inmunoprecipitamos el NGF con un anticuerpo específico, y luego inmunodetectamos en las membranas con anticuerpos contra NGF así como con un anticuerpo contra el pre-prodominio del NGF.

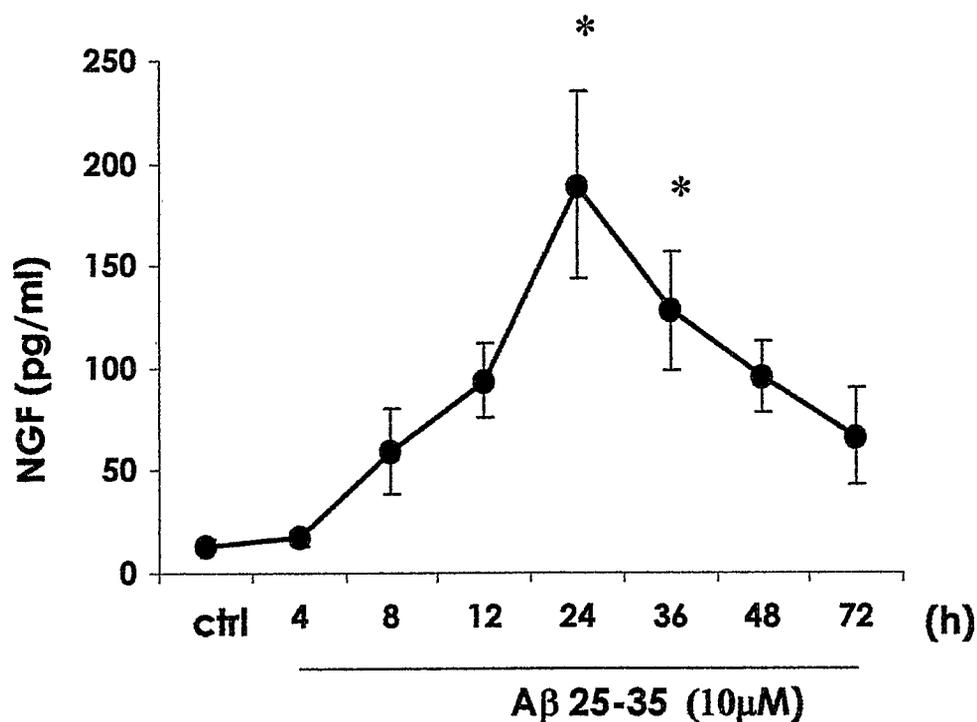


FIGURA 4. Astrocitos de hipocampo reactivos por A β 25-35 inducen la liberación de NGF al medio de cultivo. Curva de tiempo de la secreción de NGF por los astrocitos luego del tratamiento con 10 μ M A β 25-35. Los niveles de NGF en el medio de cultivo se analizaron por ELISA a tiempos indicados. Los datos se expresan en pg/ml (C, 13.67 pg/ml), media \pm SEM de cinco experimentos independientes (n=5). * Significativamente diferente del control. ($p \leq 0,05$ ANOVA de una entrada con repeticiones). Se compararon las distintas horas entre sí (por *Tukey-Kramer*) resultando significativa la diferencia entre el valor a las 24 h del tratamiento y los demás puntos excepto el de 36 h.

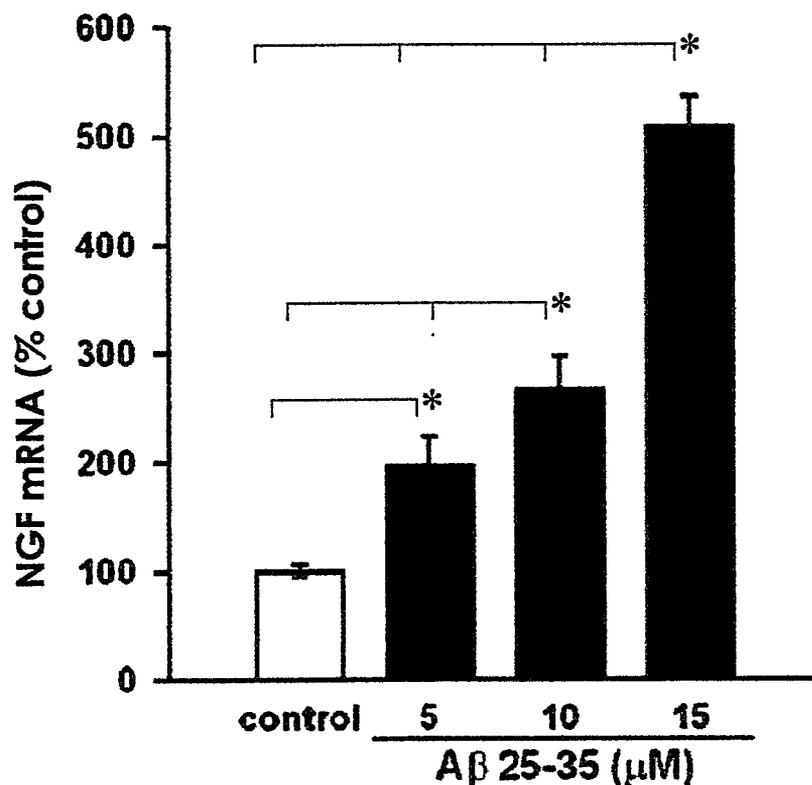


FIGURA 5. Aβ 25-35 en distintas concentraciones induce la expresión de mRNA NGF en astrocitos de hipocampo en cultivo. Inducción de mRNA de NGF ensayada por RT-PCR de RNA total de astrocitos con diferentes concentraciones del péptido Aβ 25-35 incubados 24 h. Los datos se expresan como porcentaje de los niveles de mRNA NGF en el control (sin estimular), media ± SD de 3 experimentos independientes por duplicado (n=3). * Significativamente diferentes entre sí (p≤0,05, ANOVA de una entrada con repeticiones, post-prueba de *Tukey-Kramer*).). La post-prueba de *tendencia linear* resultó significativa (p≤0,05).

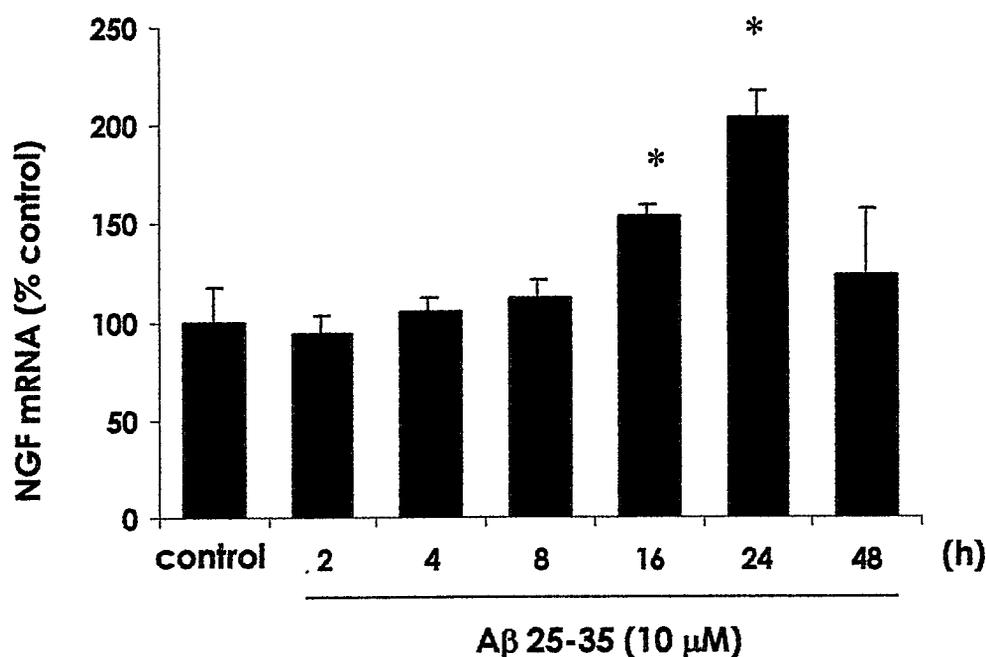


FIGURA 6. astrocitos de hipocampo activados con A β 25-35 inducen la expresión de mRNA NGF en el tiempo. La expresión del RNA mensajero del factor NGF se estudió por RT-PCR del RNA total extraído a los tiempos indicados luego de la exposición a 10 μ M A β 25-35. Los niveles de RNAm de NGF se expresan como porcentaje del control (C). Cada barra corresponde a la media \pm SD de tres determinaciones independientes (n=3) por duplicado.* significativamente diferente del control. (p \leq 0,05 ANOVA de una entrada con repeticiones). Se comparó el efecto de las distintas horas entre sí (por *Tukey-Kramer*) resultando significativa la diferencia entre 16 y 24 h con los tratamientos.

Utilizamos lipopolisacárido bacteriano (LPS) como control positivo de activación astrocitaria, ya que son conocidas sus propiedades de activación de la glía. Otro control utilizado fue NGF puro. La presencia del péptido A β en los cultivos indujo la liberación de varias especies de mayor peso molecular que el NGF, en su mayoría de péptidos entre 26 y 35 kDa (Figura 7), ausentes en el medio obtenido de astrocitos no estimulados. Notablemente, la banda de 13 kDa del NGF no aparece en los tratamientos ni en los controles, sólo se observa en la línea del NGF puro.

Los hallazgos que obtuvimos en cultivo celular los investigamos en el ratón transgénico Tg2576, que sobre-expresa la proteína β -amiloide. Estudiamos por inmunohistoquímica en rebanadas de cerebro la expresión de NGF. A su vez, estudiamos la marcación para la proteína ácida GFAP, para determinar las áreas de astrocitosis, las cuales son evidentes rodeando las placas amiloides (teñidas con rojo Congo) en la zona del hipocampo (Figura 8). Estas inmunodetecciones fueron realizadas en distintos cortes del mismo ratón, por lo que no podemos concluir que las marcas de NGF y GFAP coincidan. Sin embargo, como ambas proteínas se visualizan claramente rodeando las placas amiloides, estos resultados permiten pensar que los astrocitos podrían ser el tipo celular (aún no identificado) responsable del aumento de NGF observado en cerebros de pacientes con EA.

7.1.4. Liberación de óxido nítrico.

La producción basal de NO por astrocitos tiene una función regulatoria en la actividad neuronal. Sin embargo, su producción excesiva media la neurotoxicidad.

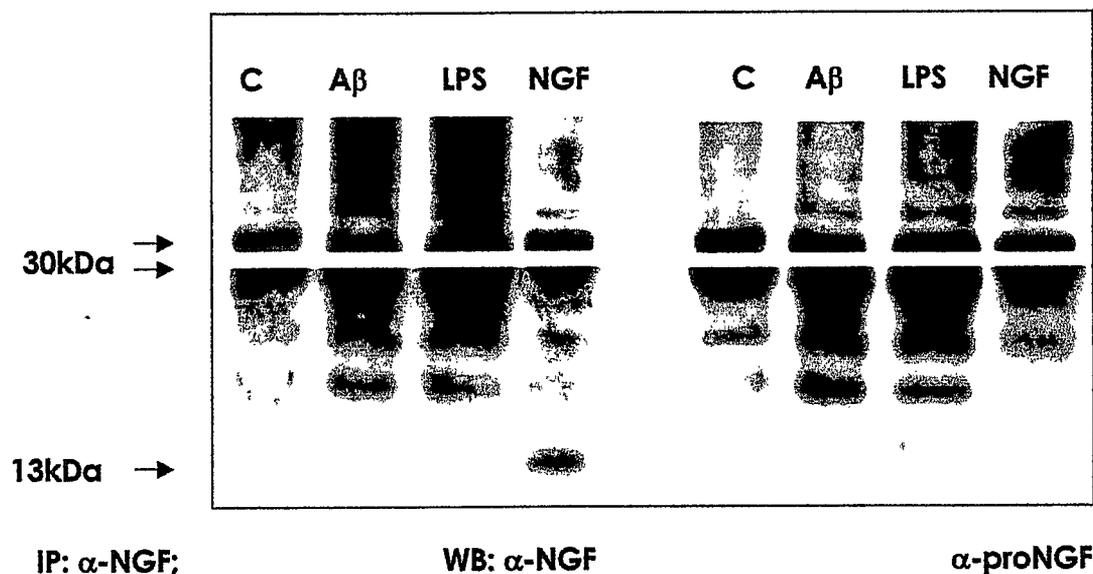


FIGURA 7. Astrocitos de hipocampo estimulados con $A\beta$ 25-35 inducen la liberación al medio de cultivo de formas precursoras de NGF. El medio de cultivo de astrocitos previamente estimulados con $10 \mu\text{M}$ $A\beta$ 25-35 ó LPS (1mg/mL) por 24 h se estudió por inmunoprecipitación con anticuerpo anti-NGF. La presencia de especies precursoras de NGF se detectó por *western blot* con anticuerpos contra NGF y proNGF. La parte superior de la misma membrana fue sobre-expuesta respecto de la inferior con el fin de visualizar todas las bandas. Las flechas indican el sitio de corte realizado a la altura del peso molecular de la inmunoglobulina usada en la inmunoprecipitación. *C*, control. *A β* , $10 \mu\text{M}$ $A\beta$ 25-35, *NGF*, control positivo NGF, *LPS*, lipopolisacárido bacteriano.

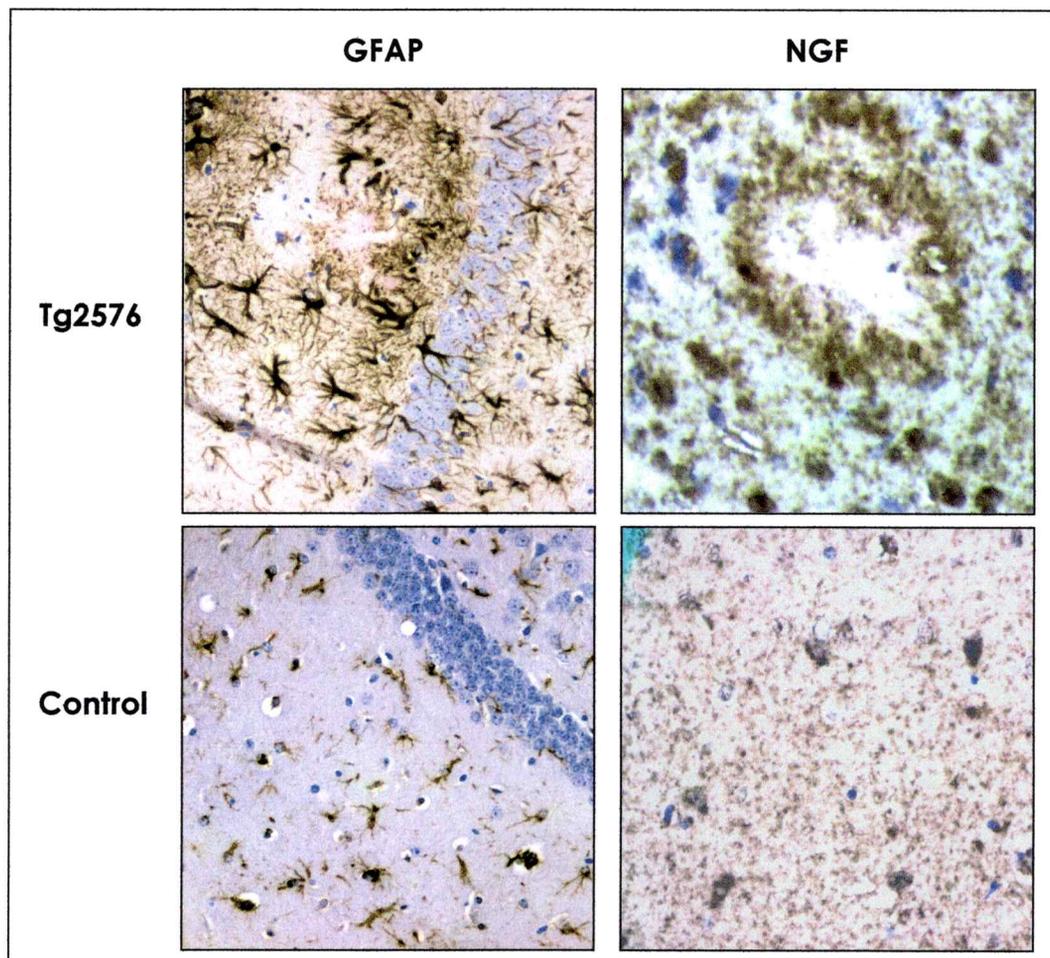


FIGURA 8. Astrocitos reactivos de Tg2576 coinciden con la marca de NGF rodeando los depósitos amiloides en la región del hipocampo. Rebanadas de hipocampo de aproximadamente $5\mu\text{M}$ de espesor de ratones transgénicos para APP Tg 2576 ó controles fueron tratadas por Inmunohistoquímica (tinción con Diaminobencidina, DAB) para detectar la presencia de GFAP y NGF (en diferentes cortes histológicos del mismo ratón). Ambas proteínas se observan principalmente rodeando las placas amiloides (contrateñidas con Rojo Congo) en el ratón transgénico, mientras que se hallan dispersas (y son menos intensas) en el control. La marca para GFAP revela la morfología característica de astrocitos reactivos. En el caso de NGF, se utilizó un kit de amplificación con tiramida para aumentar la señal. Los núcleos celulares se tiñeron con hematoxilina.

Existen evidencias de un aumento de óxido nítrico en la EA (Wallace y col., 1997; Simic y col., 2000; Heneka y col., 2001; de la Monte y col., 2003). Así, el siguiente paso fue analizar si los astrocitos expuestos al péptido A β liberan mayor cantidad de NO al medio que en condiciones control. La técnica utilizada para este estudio fue cuantificar los metabolitos finales de NO en el medio de cultivo. Esta técnica es muy empleada, ya que la efímera vida media de este radical en cultivo dificulta el estudio directo de su producción. El NO interactúa en cuestión de segundos con moléculas del medio, y los metabolitos finales de dichas reacciones son los iones nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻). En este estudio no aplicamos directamente los parámetros de estímulo fijados para el NGF, sino que realizamos curvas de concentración óptima del péptido y de tiempo de incubación. En la Figura 9 se observa que la producción de iones nitrito y nitrato tiende a aumentar en promedio conforme incrementa el péptido en el medio de cultivo de astrocitos incubados por 24 h, siendo el aumento significativo respecto del control a partir de 10 μ M del péptido. Si analizamos en una curva de tiempo con un estímulo de 10 μ M A β 25-35 observamos que en promedio existe una tendencia a aumentar la producción de los iones, siendo el aumento significativo sobre los valores control a partir de las 8 h de tratamiento (Figura 10) y hasta las 24 h, ya que posteriores tiempos no muestran cambio significativo con las 24 h. El estudio de estas curvas nos permiten inferir que los parámetros de estímulo anteriormente fijados elevaban en promedio aproximadamente 6 veces la liberación de NO al medio respecto del control (Saez y col., 2004).

Al igual que con NGF, analizamos en cultivos de astrocitos estimulados con 10 μ M A β 25-35 la expresión del mRNA para la enzima iNOS (inducible). En la

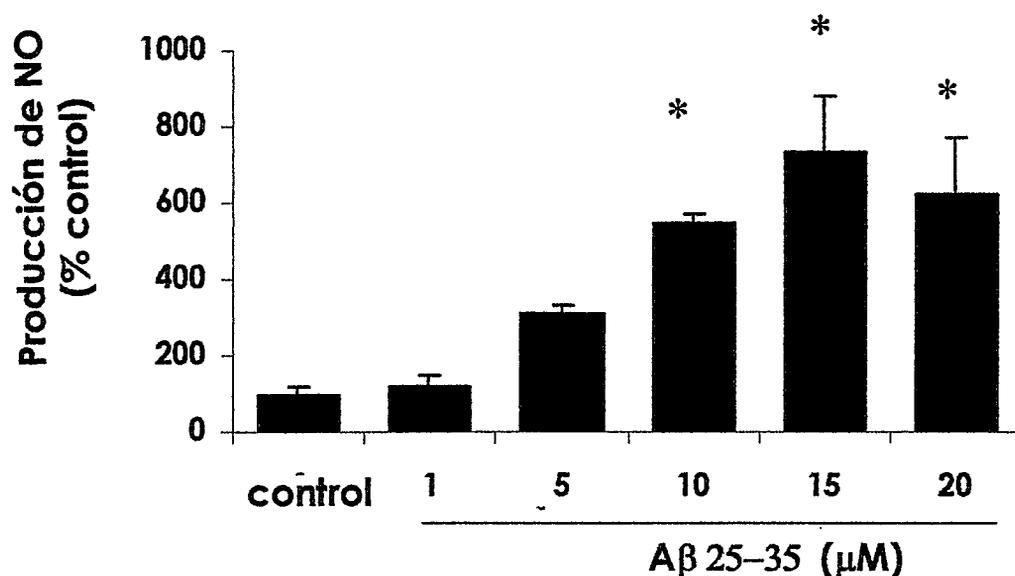


FIGURA 9. Astrocitos de hipocampo estimulados con distintas concentraciones de Aβ 25-35 inducen la producción de NO. Curva de secreción de iones nitrito y nitrato (determinantes de la producción de NO) luego del tratamiento de astrocitos hipocámpales con variables concentraciones del péptido Aβ 25-35 por 24h. Los niveles de nitrito y nitrato en el medio de cultivo fueron determinados por un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Griess. Los datos se expresan como porcentaje de los niveles de los iones en el control, media \pm SD de 3 experimentos independientes por duplicado (n=3). * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$ ANOVA de una entrada con repeticiones, post-prueba de *Tukey-Kramer*) y de las concentraciones menores del péptido. La post-prueba de *tendencia lineal* resultó significativa ($p \leq 0,05$).

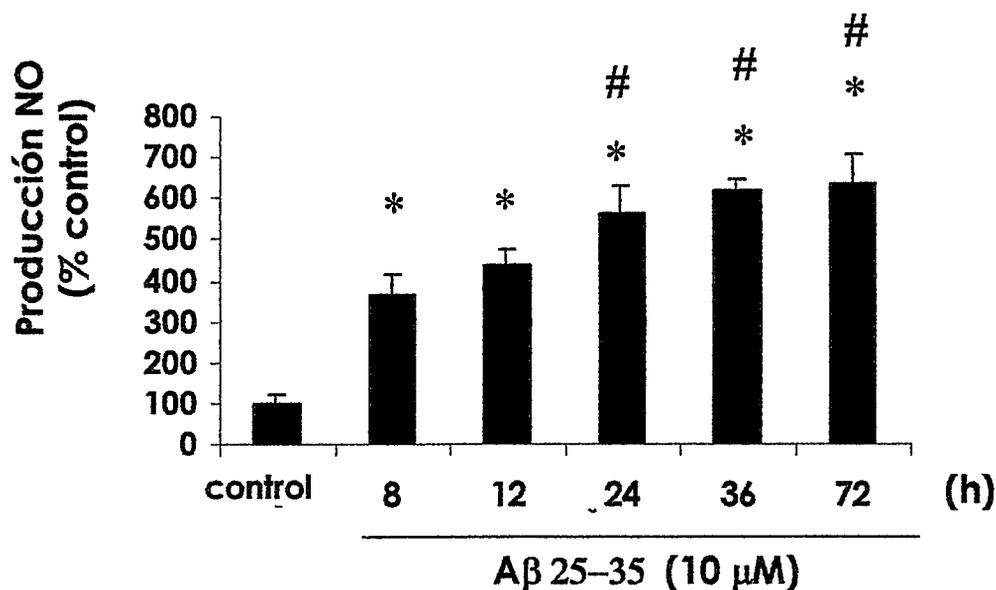


FIGURA 10. Astrocitos reactivos estimulados con A β 25-35 inducen la liberación de NO al medio de cultivo en el tiempo. Astrocitos de hipocampo fueron tratados con 10 μ M del péptido A β 25-35 por los tiempos indicados y los niveles de secreción de iones nitrito y nitrato en el medio de cultivo fueron determinados por un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Griess. Los datos se expresan como porcentaje de los niveles de los iones en el control, media \pm SD de 3 experimentos independientes por duplicado (n=3). * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$, ANOVA de una entrada con repeticiones, post-prueba de *Tukey-Kramer*). #, Significativamente diferente ($p \leq 0,05$) de valores obtenidos a 8 y 12 h. La post-prueba de *tendencia lineal* resultó significativa ($p \leq 0,05$).

Figura 11 se observa una diferencia significativa en la inducción de mensajero iNOS respecto del control a las 24 h de estimulación con el péptido (Saez y col., 2004).

A las 48 h del tratamiento, los niveles de mRNA de la enzima no son distintos significativamente del control. El análisis de mRNA con distintas concentraciones de péptido (Figura 12) determina que en promedio existe un aumento de mRNA iNOS conforme se eleva el péptido en el medio, siendo significativo el aumento a partir de 5 μM A β 25-35 y alcanzando valores 5 veces mayor a los valores control con 15 μM de péptido. Por último estudiamos la expresión de la enzima NOS en sus isoformas iNOS y nNOS en astrocitos estimulados, y vimos por *Western blot* que ambas enzimas se encuentran notablemente inducidas 24 h luego del estímulo (Figura 13; Saez y col., 2004). En la figura 14 se observa un estudio más detallado de la expresión de iNOS, dado por la realización de curvas de expresión en el tiempo y con distintas concentraciones del péptido. En la parte A de la figura 14 puede verse que los astrocitos incrementan de forma significativa la expresión de iNOS respecto del control con 10 y 15 μM A β 25-35 a las 24 h de incubación. Por otro lado, en la parte B se estudió la expresión de iNOS en el tiempo con 10 μM A β 25-35. Se observa que a las 12, 24 y 48 h es significativo el aumento respecto del control.

Así, la presencia de 10 μM A β 25-35 en el medio de cultivo de astrocitos de hipocampo de rata por 24 h produce la activación de la astrogliá, caracterizada morfológicamente y por el incremento de marca para GFAP, y se induce la expresión y liberación de NGF y especies precursoras del mismo, junto con el estímulo de la enzima iNOS, el aumento de expresión de iNOS, nNOS y la superproducción de NO.

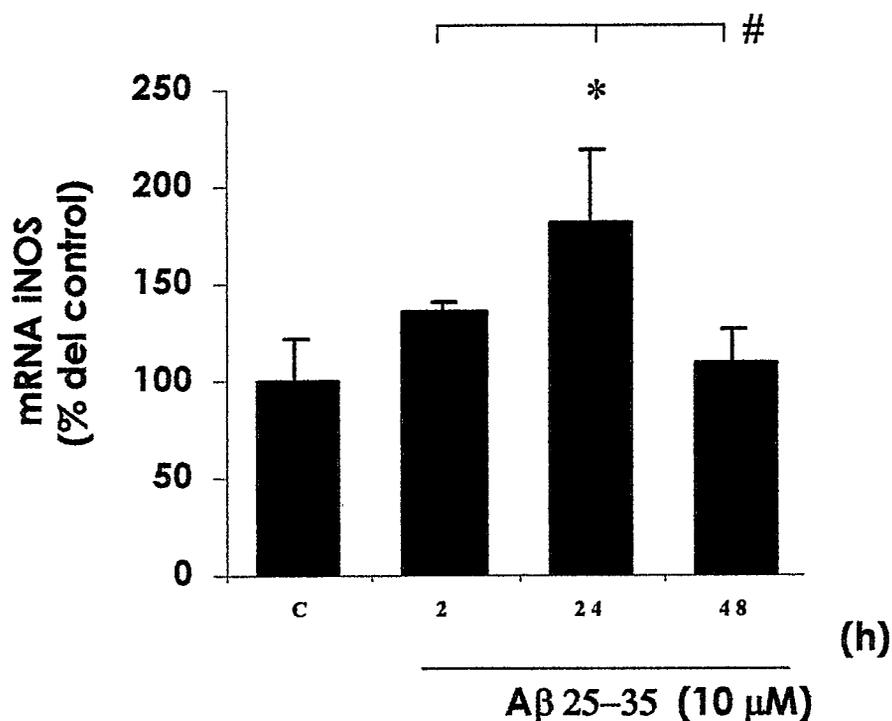


FIGURA 11. A β 25-35 induce la expresi3n de mRNA de iNOS en astrocitos de hipocampo. Inducci3n de mRNA de la enzima iNOS medida por RT-PCR a partir del RNA total de astrocitos tratados con 10 μ M A β 25-35 por variables per3odos de tiempo. Los datos se expresan como porcentaje de los niveles de mRNA iNOS en el control, media \pm SD de 3 experimentos independientes por duplicado (n=3). *significativamente diferente del control (p \leq 0,05, ANOVA de una entrada con repeticiones). #, Significativamente diferentes (p \leq 0,05) entre s3 (post-prueba de *Tukey-Kramer*).

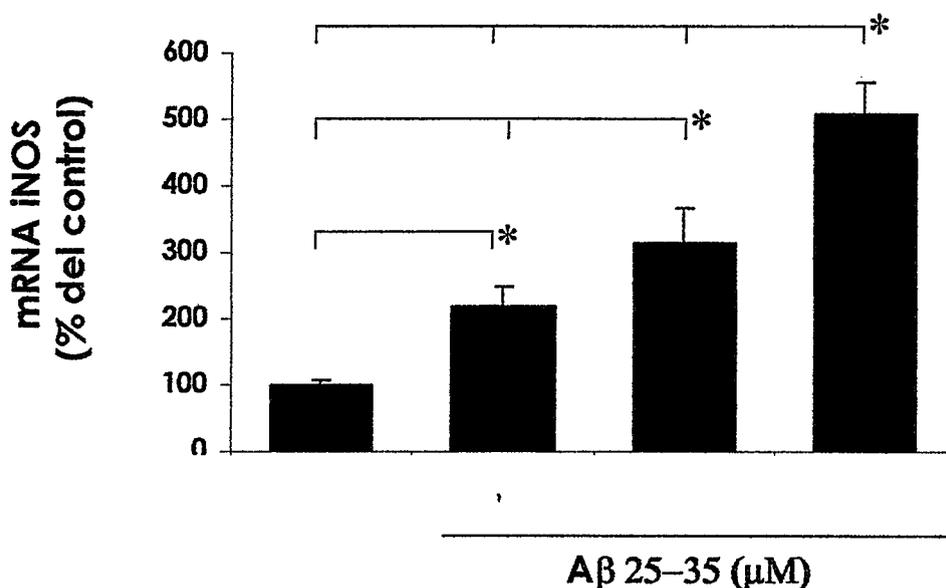


FIGURA 12. Astrocitos de hipocampo estimulados con distintas concentraciones de A β 25-35 aumentan la expresión de mRNA de iNOS. La inducción de mRNA de la enzima iNOS se ensayó por RT-PCR a partir del RNA total de astrocitos tratados con diferentes concentraciones del péptido A β 25-35 por 24h. Los datos se expresan como porcentaje de los niveles de mRNA iNOS en el control, media \pm SD de 3 experimentos independientes por duplicado (n=3). * Significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0,05$, ANOVA de una entrada con repeticiones, post-prueba de *Tukey-Kramer*). La post-prueba de *tendencia lineal* resultó significativa ($p \leq 0,05$).

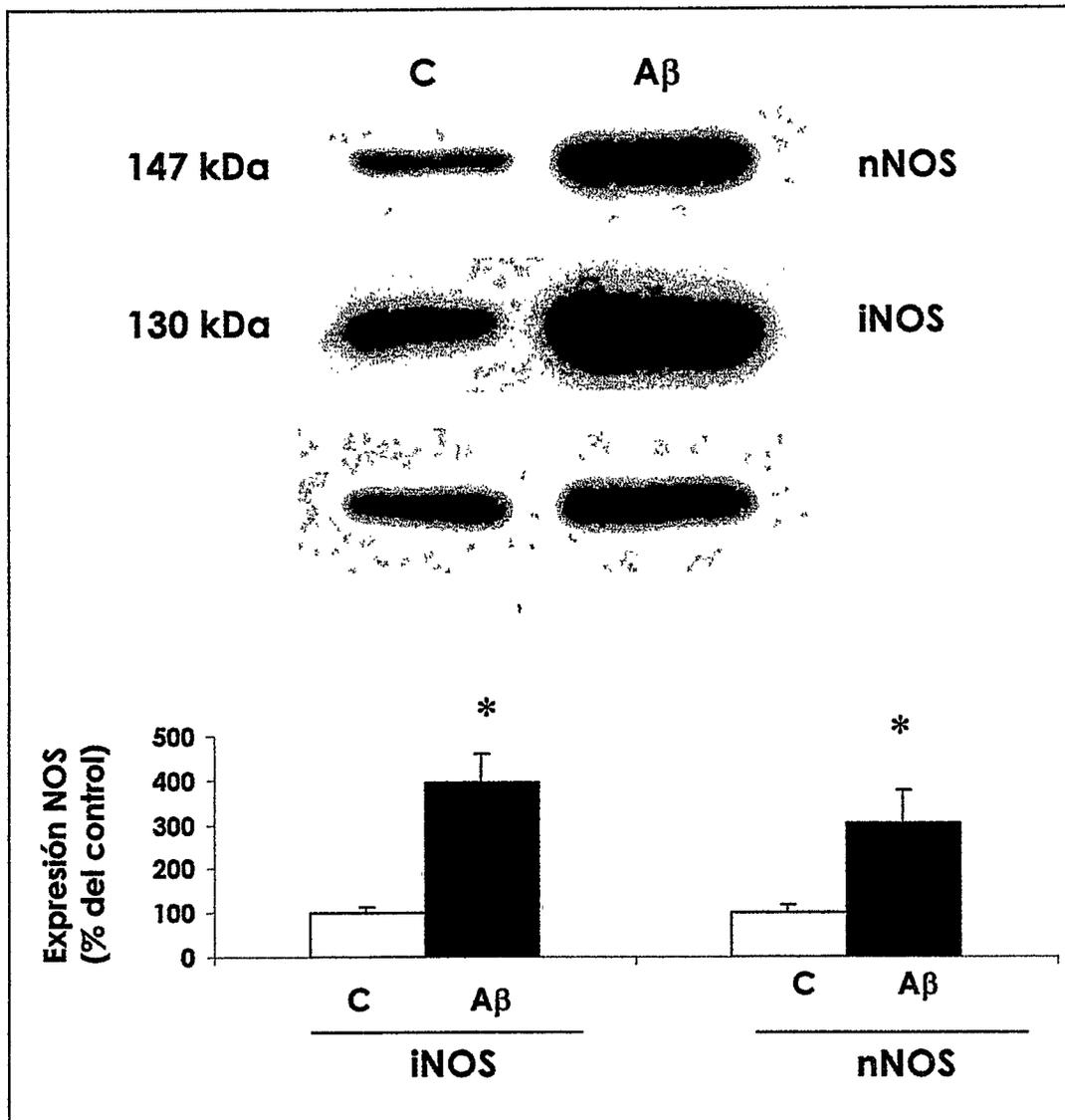


FIGURA 13. Astrocitos estimulados con A β 25-35 inducen la expresión de isoformas de NOS. A partir de extractos celulares de astrocitos de hipocampo estimulados con 10 μ M A β 25-35 por 24h se analizaron las proteínas por ensayos de *Western blot* para detectar la expresión de iNOS y nNOS con anticuerpos específicos para cada isoforma. La expresión de tubulina se utilizó como control interno. Los datos del histograma se expresan como porcentaje de los niveles de proteína en el control, media \pm SD de 3 (n=3) experimentos independientes por duplicado. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$, prueba *t de Student*).

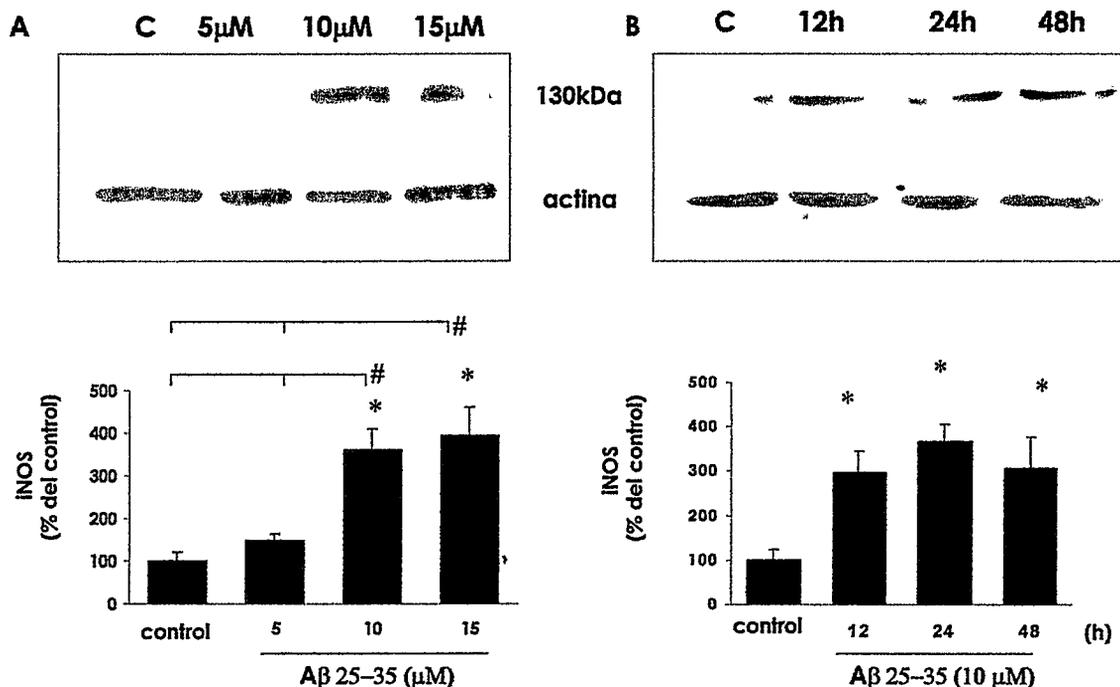


FIGURA 14. Astrocitos reactivos con A β 25-35 inducen la expresi3n de iNOS. Astrocitos de hipocampo estimulados con el p3ptido A β 25-35 en distintas concentraciones (A) por 24h 3 ó con 10 μ M a distintos tiempos (B) se lisaron y las prote3nas contenidas en los extractos se analizaron por ensayos de *Western blot* para detectar la expresi3n de iNOS con anticuerpo espec3fico. La expresi3n de tubulina se utiliz3 como control interno. Los datos de los histogramas se expresan como porcentaje de los niveles de prote3na en el control, media \pm SD de 3 (n=3) experimentos independientes por duplicado. *significativamente diferente del control (p \leq 0,05, ANOVA de una entrada con repeticiones).). #, Significativamente diferentes entre s3 (p \leq 0,05, post-prueba de *Tukey-Kramer*). La post-prueba de *tendencia lineal* result3 significativa (p \leq 0,05) para ambos histogramas.

7.2. ASTROCITOS REACTIVOS POR A β AFECTAN LAS NEURONAS DE HIPOCAMPO EN CO-CULTIVO.

El efecto de factores astrogliales sobre células neuronales se estudió en co-cultivos de neuronas y astrocitos provenientes del hipocampo de ratas. Para ello se diseñó un método experimental en el cual los astrocitos crecidos en cubreobjetos modificados son colocados sobre las neuronas cultivadas en placas de Petri (Figura 15). Alternativamente las neuronas se cultivan en los cubreobjetos exponiéndolas a astrocitos crecidos en placas. Los astrocitos se estimulan de forma previa con 10 μ M del péptido A β 25-35 por 24 h en el medio neuronal sin suero (Neurobasal suplementado con N2) y luego se lava exhaustivamente el A β de la solución y se pone en contacto el cubreobjetos conteniendo la monocapa de astrocitos con las neuronas crecidas en la placa de Petri, estableciéndose el co-cultivo

7.2.1. Astrocitos reactivos inducen la hiperfosforilación de tau en neuronas de hipocampo en co-cultivo.

El primer paso fue estudiar si astrocitos estimulados con el péptido A β 25-35 por 24 h eran capaces de inducir sobre neuronas en co-cultivo la hiperfosforilación de la proteína tau en epitopes característicos de la EA, detectado con los anticuerpos específicos PHF1 y AT8. Como se observa en la Figura 16, distintas concentraciones del péptido en un rango de 5-15 μ M sobre los astrocitos produce la hiperfosforilación de tau, la cual aumenta significativamente respecto del control, sin el péptido, para las concentraciones de 10 y 15 μ M. De la misma forma, el anticuerpo AT8 también fue capaz de detectar hiperfosforilación de tau en co-cultivos tratados previamente con el péptido.

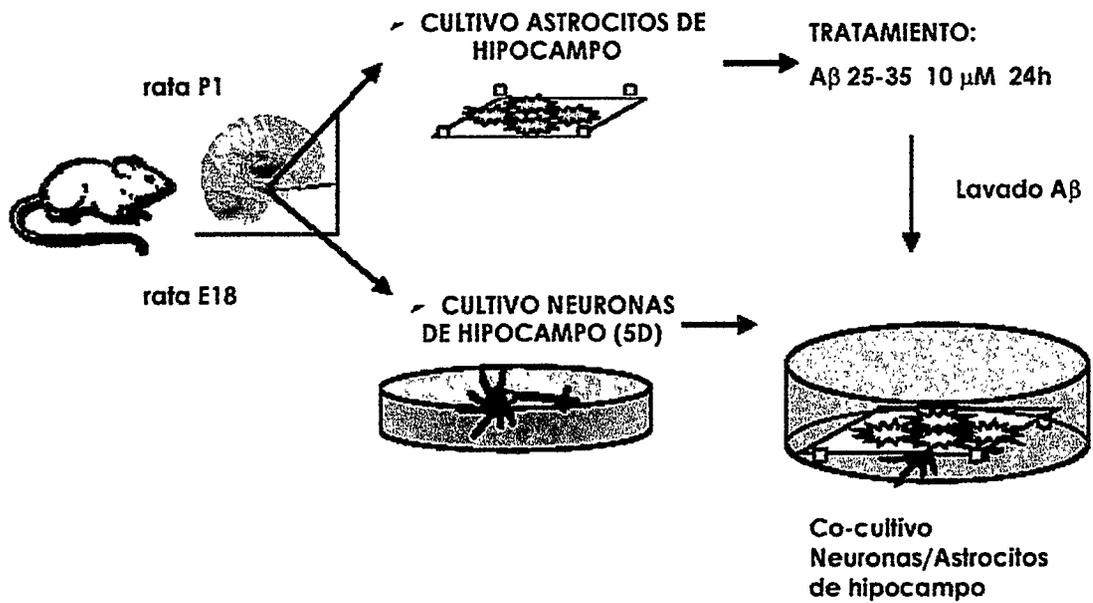


FIGURA 15. Esquema del co-cultivo. (ver explicación en el texto).

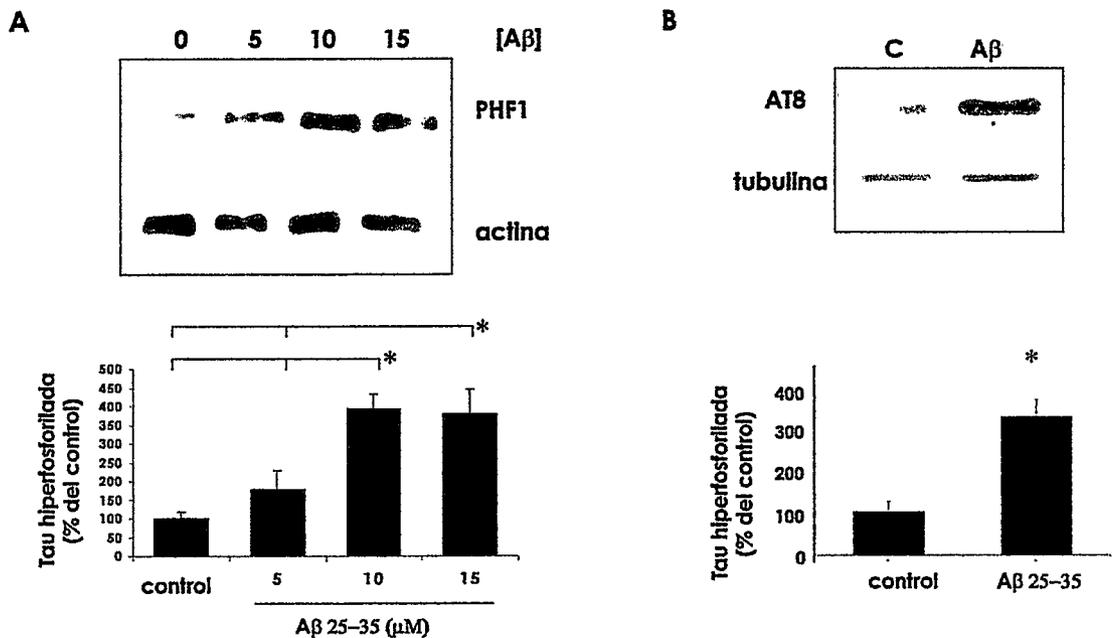


FIGURA 16. Astrocitos reactivos con Aβ 25-35 inducen la hiperfosforilación de tau en neuronas de hipocampo en co-cultivo. Astrocitos hipocampales crecidos en cubreobjetos modificados fueron expuestos al péptido Aβ 25-35 por 24h en distintas concentraciones (A) ó 10 μM , y luego de lavar exhaustivamente el péptido, se montaron sobre una monocapa de neuronas hipocampales de 5 días en cultivo. Las neuronas se lisaron luego de 24h en co-cultivo y con el extracto de proteínas se realizó un *western blot* con el anticuerpo PHF1 (A) y AT8 (B) contra epitopes del tipo Alzheimer (fosforilaciones específicas) en la proteína tau. En B, el control es un cultivo puro de neuronas. La expresión de actina (A) y tubulina (B) se utilizó como control interno. Los datos de los histogramas se expresan como porcentaje de los niveles de proteína en el control, media ± SD de 4 experimentos independientes por duplicado. * Significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0,05$, A: ANOVA de una entrada con repeticiones, post-prueba de *Tukey-Kramer*; B: prueba *t de Student*). La post-prueba de tendencia lineal resultó significativa ($p \leq 0,05$) para el histograma 16A.

En la figura 17 utilizamos una concentración de 10 μ M A β 25-35 ó del péptido invertido, 35-25, por 24 h sobre los astrocitos y analizamos el efecto en los co-cultivos. Como puede verse, la hiperfosforilación de tau es específica para la inducción con el fragmento reactivo 25-35 del péptido.

7.2.1.1. La hiperfosforilación de tau neuronal es dependiente del NO astrocitario

Valiéndonos de la farmacología apropiada para el caso, utilizamos el inhibidor de la enzima NOS L-NAME (*Nitro-L-arginina-metil-ester*), que inhibe cualquiera de sus isoformas por competir con la arginina endógena utilizada como sustrato para la producción de NO. La adición de este inhibidor al medio en una concentración 1 mM produjo un aumento en la hiperfosforilación de la proteína tau de aproximadamente 2 veces comparado con el incremento de 3,4 veces obtenido en los co-cultivos (Figura 18). Esto indica una clara participación de NO en la vía que induce la fosforilación de tau, y este interesante resultado fue publicado por nuestro grupo (Saez y col., 2004).

7.2.2. Expresión de receptores para NGF.

En la literatura se encuentran pocos estudios que traten la relación que existe entre el A β , los astrocitos y los receptores de NGF p75 y trkA. La mayoría de estos estudios se centran en la expresión de los receptores en pacientes con Alzheimer o modelos de esta patología, donde se cita un indiscutible aumento del receptor de baja afinidad p75 (Hu y col., 2002; Olivieri y col., 2002; Ernfors y col., 1990; Mufson y Kordower, 1992). Los datos no resultan tan claros en el caso de trkA, ya que algunos estudios no muestran cambios significativos en su expresión (Mufson y col. 2002), mientras que otros presentan una disminución de la misma (Boissiere y col., 1997;

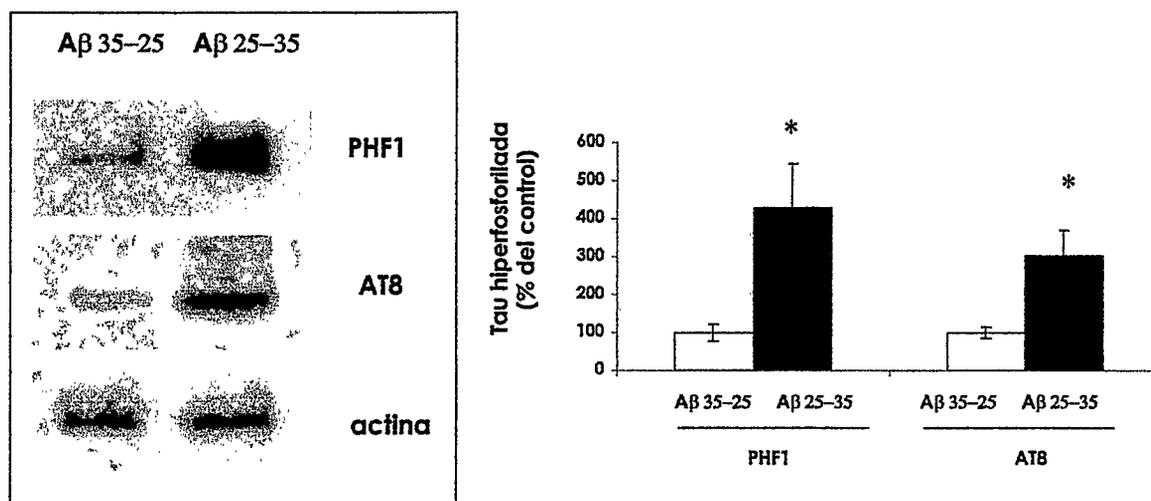


FIGURA 17. Astrocitos reactivos con Aβ 25-35 y no con Aβ 35-25 inducen la hiperfosforilación de tau en neuronas de hipocampo. Astrocitos de hipocampo en cultivo fueron estimulados con 10 μM Aβ 25-35 ó Aβ 35-25 por 24h y luego puestos en contacto con neuronas de hipocampo (5D) estableciéndose el co-cultivo. Después de 24h de tratamiento las neuronas se lisaron y se realizó un ensayo de western blot con los extractos celulares para detectar la presencia de la proteína tau en su forma hiperfosforilada en epitopes tipo Alzheimer, detectada con los anticuerpos específicos PHF1 y AT8. La expresión de actina se utilizó como control interno. Los datos se expresan como porcentaje de los niveles de proteína en el control, media ± SD de 3 (n=3) experimentos independientes por duplicado. * Significativamente diferente del control (p≤0,05, prueba *t de Student*).

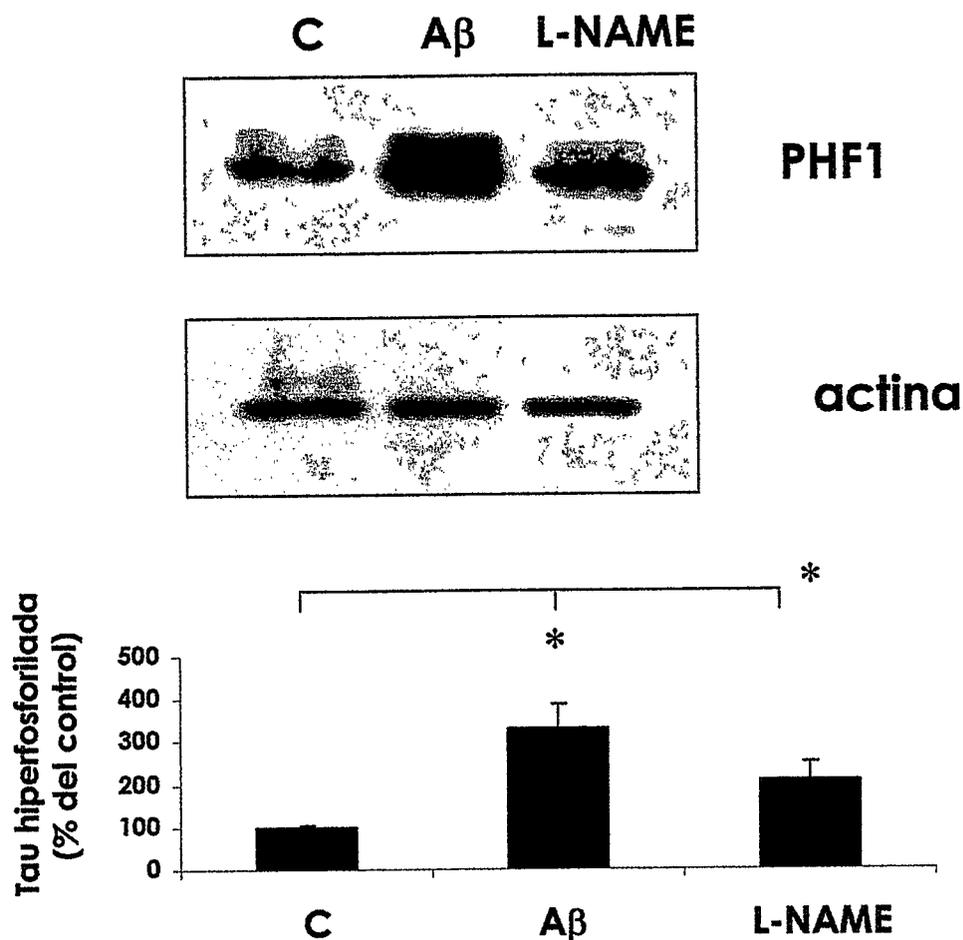


FIGURA 18. Astrocitos reactivos inducen la hiperfosforilación de tau dependiente de NO en neuronas en co-cultivo. Astrocitos de hipocampo tratados con 10 μ M A β 25-35 por 24h se montaron sobre una monocapa de neuronas y la hiperfosforilación de la proteína tau se detectó por western blot con anticuerpo anti-PHF1. C, neuronas en co-cultivo con astrocitos control; A β , neuronas en cocultivo con astrocitos estimulados con 10 μ M A β 25-35 por 24h; L-NAME, idem 2 con L-NAME (1mM). Los datos del histograma están expresados como porcentaje del control, media \pm SD de tres experimentos independientes (n=3) realizados por duplicado. *Significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0,05$, ANOVA de una entrada con repeticiones, post- prueba de *Tukey-Kramer*).

Mufson y col., 1997, 2000; Hock y col., 1998, 2000; Marinelli y col., 1999; Savaskan y col., 2000; Friedman, 2000; Dubus y col., 2000; Chu y col., 2001; Olivieri y col., 2002). Además, se ha visto que A β interactúa directamente con los trk, y Yaar y su equipo (1997) encontraron que el A β se une directamente a p75, y esta unión puede provocar apoptosis (Kuner y col., 1998).

En nuestro estudio, los astrocitos reactivos por previa incubación con 10 μ M A β 25-35 fueron capaces de inducir en las neuronas el aumento en la expresión de p75 (Figuras 19 y 20) dependiente de NGF (Figura 19) ya que la adición de un anticuerpo con actividad bloqueadora para esta neurotrofina revierte el aumento en la expresión del receptor evidenciada en las micrografías por inmunofluorescencia. Además, la incubación de los co-cultivos a distintos tiempos (Figura 20) muestra que la expresión de p75 se encuentra en promedio aumentada significativamente sobre el valor control desde las 12 h, siendo el aumento de 4.5 veces respecto del control a las 36h. El cambio de los niveles de expresión del receptor p75 no aparece acompañado de un cambio apreciable en la expresión del receptor de alta afinidad para NGF TrkA (Figura 21, A), ya que el mismo no aumenta significativamente respecto de los valores control, como sí lo hace p75. La adición de anticuerpos con actividad bloqueante para p75 (no se muestra) o NGF (Figuras 19) a los co-cultivos impide la inducción de p75. Estos resultados eran predecibles, ya que p75 se induce en condiciones de daño donde hay activación de la glia. Lo sorprendente fue no encontrar variación en los niveles de trkA, pero este resultado nos permite acotar los planteamientos de resultados posteriores casi exclusivamente a la modificación en la expresión de p75, que representa un cambio en la proporción entre p75 y trkA.

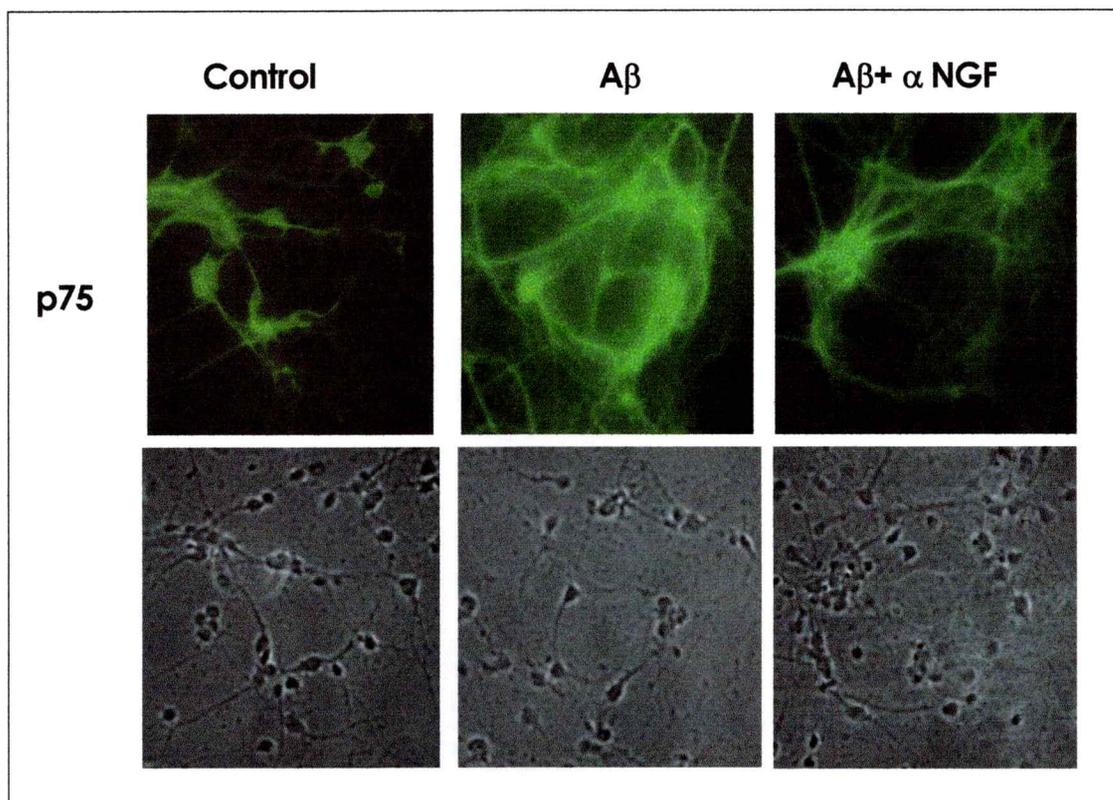


FIGURA 19. Astrocitos reactivos con A β 25-35 inducen la expresión de p75 dependiente de NGF en neuronas hipocámpales en co-cultivo. Micrografías de fluorescencia (arriba) mostrando reactividad para p75 (verde) en neuronas de hipocampo incubadas 48h con astrocitos estimulados 24h con vehículo (control) ó 10 μ M A β 25-35 (A β). Al momento del co-cultivo se adicionó anticuerpo anti-NGF donde se indica. Los paneles inferiores muestran las células en contraste de fases.

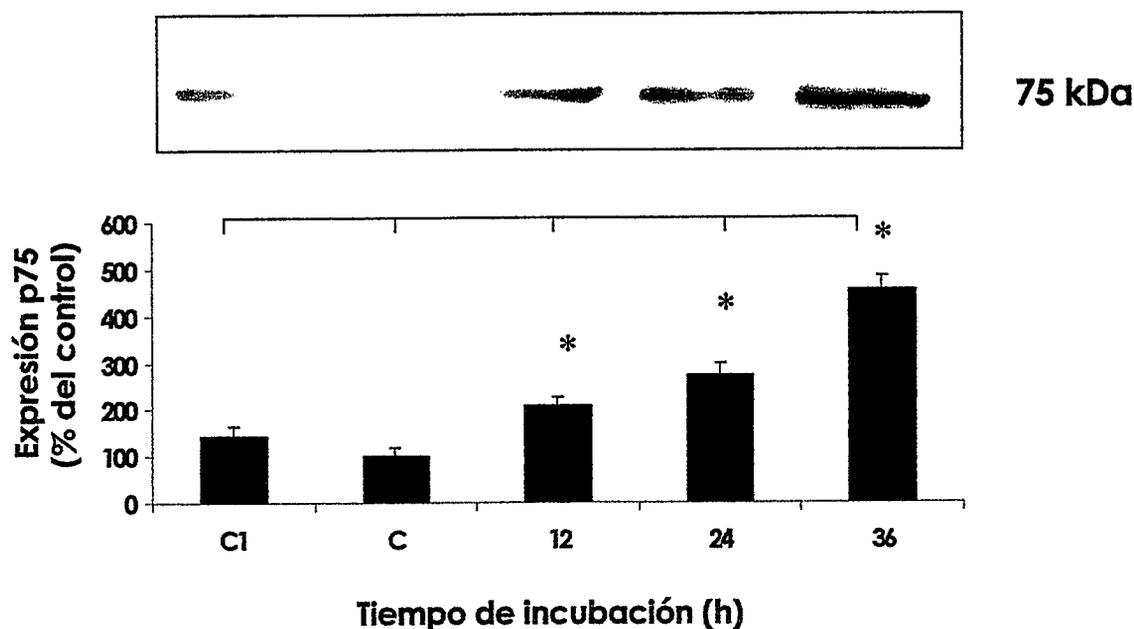


FIGURA 20. Astrocitos reactivos con A β 25-35 inducen la expresión de p75 en neuronas de hipocampo en co-cultivo. Astrocitos previamente estimulados 24h con 10 μ M A β 25-35 se lavaron y luego fueron montados sobre una monocapa de neuronas hipocampales. Los co-cultivos se mantuvieron por 12, 24 y 48h y los lisados neuronales fueron procesados por *Western blot* con anticuerpo específico para el receptor de baja afinidad para NGF, p75. C; las neuronas se incubaron sin astrocitos; C1, las neuronas fueron incubadas 24h con astrocitos sin estimular. Los datos del histograma se expresan como porcentaje de los valores del control (C), media \pm SD de tres experimentos independientes (n=3) realizados por duplicado *significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0,05$, ANOVA de una entrada con repeticiones; comparaciones múltiples con *Tukey-Kramer*). La post-prueba de *tendencia lineal* resultó significativa ($p \leq 0,05$).

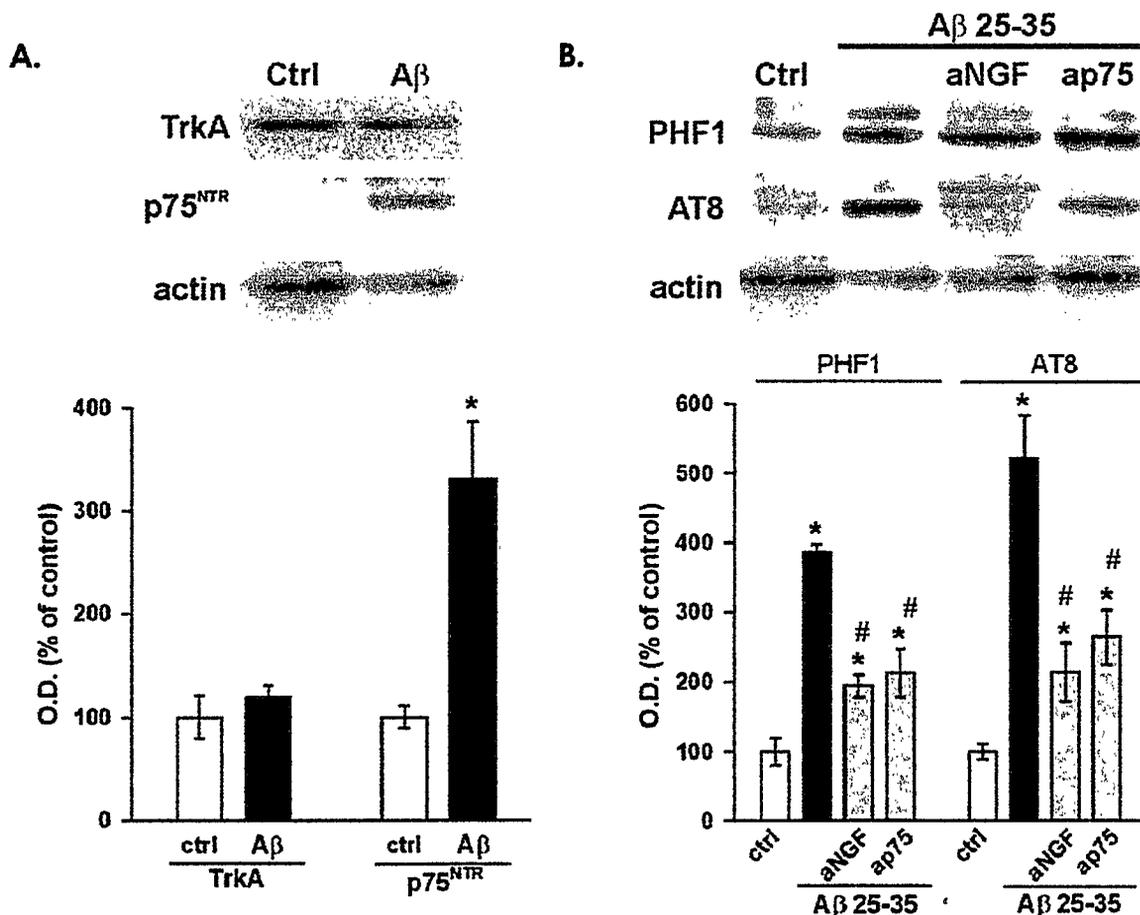


FIGURA 21. Astrocitos reactivos inducen la hiperfosforilación de tau dependiente de p75 en neuronas de hipocampo en co-cultivo. Astrocitos previamente estimulados 24h con 10 μ M A β 25-35 se lavaron y luego fueron montados sobre una monocapa de neuronas hipocampales. Los co-cultivos se mantuvieron por 24h y los lisados neuronales fueron procesados por *Western blot* con anticuerpos contra los receptores de alta y baja afinidad de NGF (*A*, TrkA y p75) y para epitopes específicos de la EA (*B*, PHF1 y AT8). *Ctrl.*, neuronas hipocampales con astrocitos no estimulados; *A β* , co-cultivo de neuronas con astrocitos estimulados (10 μ M A β 25-35); *aNGF*, *ap75*, idem *A β* con anticuerpos bloqueadores. La expresión de actina se utilizó como control interno. Los datos se expresan como

porcentaje del control, media \pm SEM de cuatro experimentos independientes (n=4) realizados por duplicado.* Significativamente diferente del control, # significativamente diferente del tratamiento con el péptido ($p \leq 0,05$, ANOVA de doble entrada con post-prueba de *Bonferrini*).

7.2.2.2. En la hiperfosforilación de tau participa la vía NGF/p75.

La expresión de p75 aumenta la toxicidad del péptido A β (Rabizadeh y col., 1994), y la expresión de este receptor se ha visto que coincide con neuronas que poseen tau hiperfosforilada en la EA (Hu y col., 2002). En nuestro estudio, la activación del receptor de baja afinidad para NGF claramente influye en la desregulación de sistemas quinasas responsables de fosforilar tau (Figura 21, B). El incremento en los patrones de fosforilación de la proteína tau en epitopes PHF1 y AT8 es dependiente, al menos en parte, de NGF y p75 debido a que el uso de anticuerpos que bloquean NGF o p75 logra reducir significativamente la fosforilación de tau cuando se adicionan a los co-cultivos (Figura 21, B y Figura 22). Los anticuerpos utilizados para detectar tau (PHF1 y AT8) revelan muchas veces (Figuras 18, 21, 28 y 39) más de una banda en los inmunoblots. Esto es debido a que detectan más de una de las 6 isoformas de tau (Spillantini y col., 1998). Para la cuantificación de la reactividad se toman siempre todas las bandas que aparecen entre 59-72 kDa, pero es importante mencionar que si se utilizaran para cuantificar algunas de las mismas, como la banda superior, la diferencia entre controles y tratamientos probablemente sería más significativa. Cabe destacar que en el ensayo se incluyeron importantes controles (no se muestran aquí): neuronas solas, que poseen cantidades basales de tau hiperfosforilada; y neuronas en co-cultivo con astrocitos no

estimulados con el péptido, donde la hiperfosforilación de tau es semejante a los niveles basales antes mencionados, indicando que la presencia de astrocitos no induce la hiperfosforilación de tau. Otro control son las neuronas cultivadas directamente con 10 μ M del péptido A β 25-35, que luego de 24 h inducen la hiperfosforilación de tau.

7.2.3. Los astrocitos reactivos inducen muerte celular a neuronas de hipocampo en co-cultivo.

La activación astrocitaria por el péptido A β aumenta la apoptosis de neuronas hipocampales en cocultivo (Malchiodi-Albedi, 2001). Este hecho, sumado a los datos en la literatura y los hallados en este estudio de la participación del receptor p75 en la neurotoxicidad inducida por el péptido A β , nos llevaron al próximo paso: investigar si astrocitos estimulados con A β inducían la muerte de neuronas en co-cultivo. Siguiendo el mismo protocolo de trabajo que utilizamos en el estudio de la hiperfosforilación de tau, las neuronas viables expuestas a astrocitos reactivos fueron contadas luego de permanecer en co-cultivo por 24, 48 y 72 h. En la Figura 23 se observa que a partir de las 36 h ya es significativa la muerte de neuronas, y a las 72 h se aprecia un porcentaje de muerte del orden de 50% del total de las células. La muerte neuronal fue estudiada también como control con el método del 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) modificado (Liu y col., 1997), pero como los valores fueron semejantes no se incluyeron en el trabajo.

7.2.3.1. Las neuronas mueren por apoptosis dependiente de la vía p75.

El receptor de baja afinidad para NGF p75 se ha visto involucrado en muerte celular por apoptosis. En este contexto, realizamos estudios en co-cultivos de

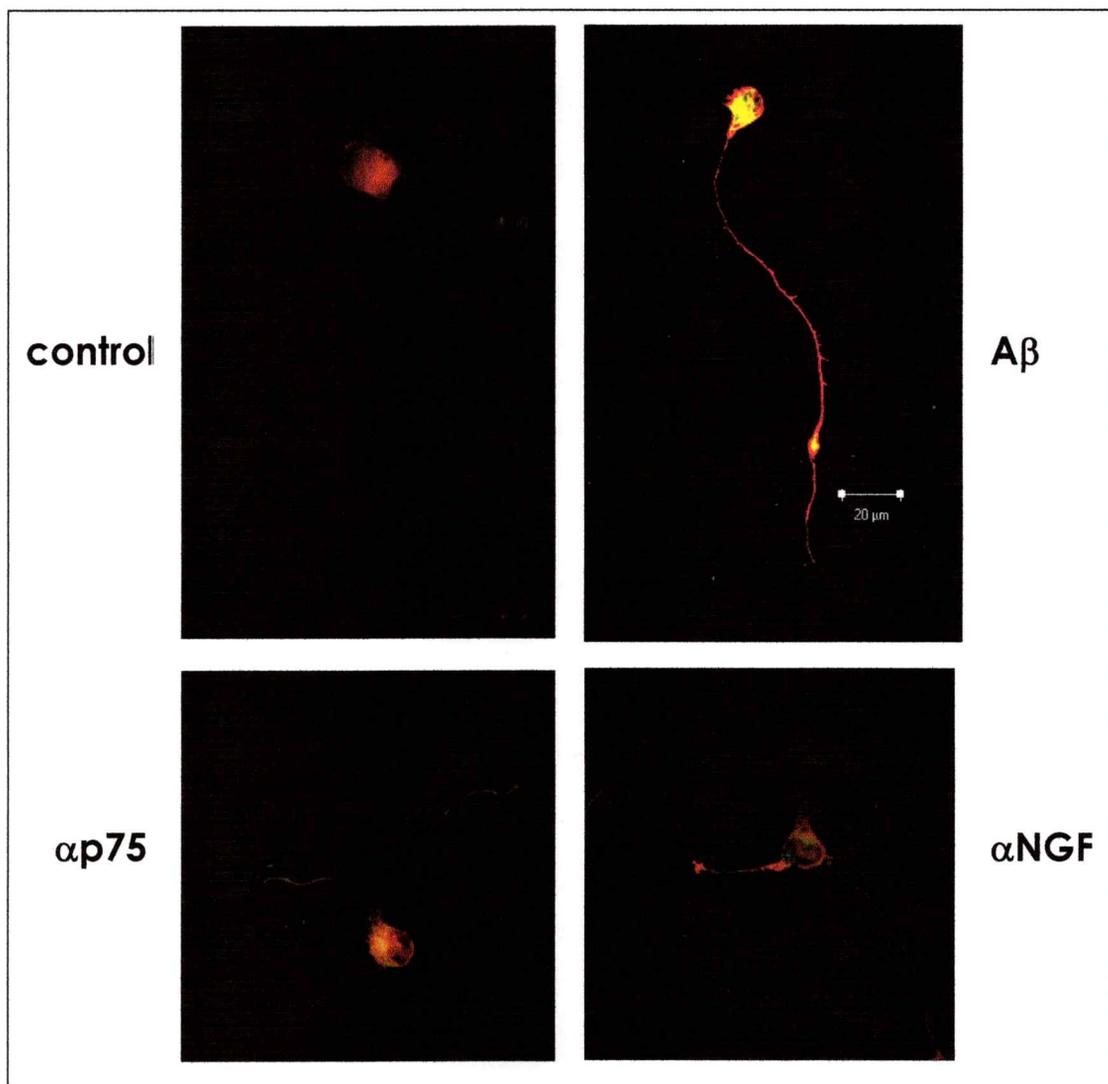


FIGURA 22. Astrocitos reactivos con A β 25-35 inducen hiperfosforilación de la proteína tau y muerte neuronal dependiente de p75. Micrografías de fluorescencia mostrando hiperfosforilación de tau (PHF1, rojo) y apoptosis (casp-3 hidrolizada, verde) en neuronas de hipocampo previamente en co-cultivo por 48h con astrocitos estimulados 24h con vehículo (control) ó 10 μ M A β 25-35 (A β). Los co-cultivos se mantuvieron en presencia de anticuerpos bloqueadores donde se indica (aNGF, ap75).

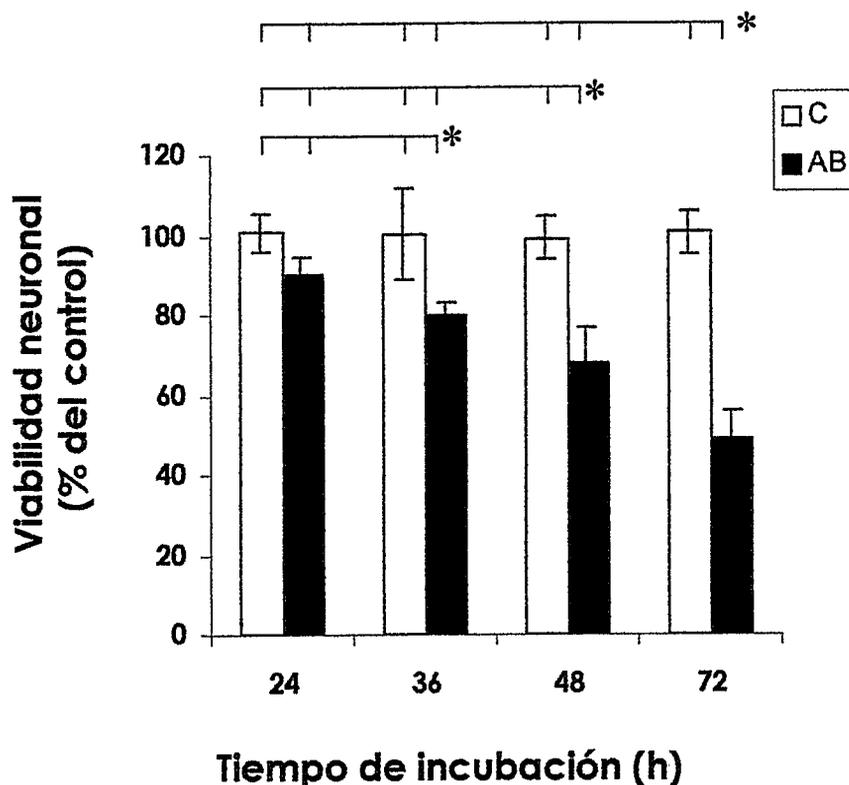


FIGURA 23. Astrocitos reactivos con A β 25-35 inducen la muerte retardada de neuronas hipocampales en co-cultivo celular. Neuronas hipocampales en co-cultivo con astrocitos previamente estimulados con 10 μ M del péptido A β 25-35 (24 h) son mantenidas por 24, 36, 48 y 72 h para determinar luego la viabilidad celular mediante conteo directo de células con neuritas intactas. Los datos se expresan como porcentaje de cada control, media \pm SD de 6 experimentos independientes (n=6) realizados por duplicado. *Significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0,05$, ANOVA de doble entrada, post-prueba de *Bonferrini*).

neuronas y astrocitos de hipocampo estimulados con el péptido A β a los que adicionamos los inhibidores de la vía de las caspasas DEDV-fmk y VAD-fmk. Luego de 72 h en cultivo, la adición de los inhibidores (Figura 24) previno la muerte neuronal inducida por astrocitos bajo estímulo con el péptido. Complementariamente inmunodetectamos por fluorescencia la proteína caspasa-3 hidrolizada en cultivos de neuronas de hipocampo en contacto directo con astrocitos o con el medio condicionado de los mismos. Esta enzima participa como último eslabón en la cascada apoptótica, y su estado activo es determinado por la hidrólisis. Las micrografías de la Figura 22 muestran además, que la marca para la caspasa 3 hidrolizada se pierde al poner en los cultivos anticuerpos que bloquean el efecto del NGF o de p75. Estos resultados apoyan la hipótesis de muerte neuronal por apoptosis, vía en la que claramente participan NGF y p75. La supervivencia neuronal a las 72 h no muestra diferencia significativa respecto del control cuando se emplean los anticuerpos que bloquean la actividad del NGF así como la del receptor p75 en los co-cultivos de neuronas y astrocitos estimulados (Figura 24). Esto permite inferir que la vía p75 claramente es inductora de muerte neuronal por apoptosis en nuestro modelo, inducida por el NGF liberado por astrocitos.

7.2.3.2. El NO participa en la muerte neuronal.

El próximo paso fue incluir el inhibidor de NOS L-NAME en los co-cultivos, como en el estudio de la hiperfosforilación de tau, para analizar la participación del NO en la muerte neuronal. Con L-NAME la muerte celular inducida por los astrocitos a las 72 h no presenta diferencia significativa respecto del control (Figura 25).

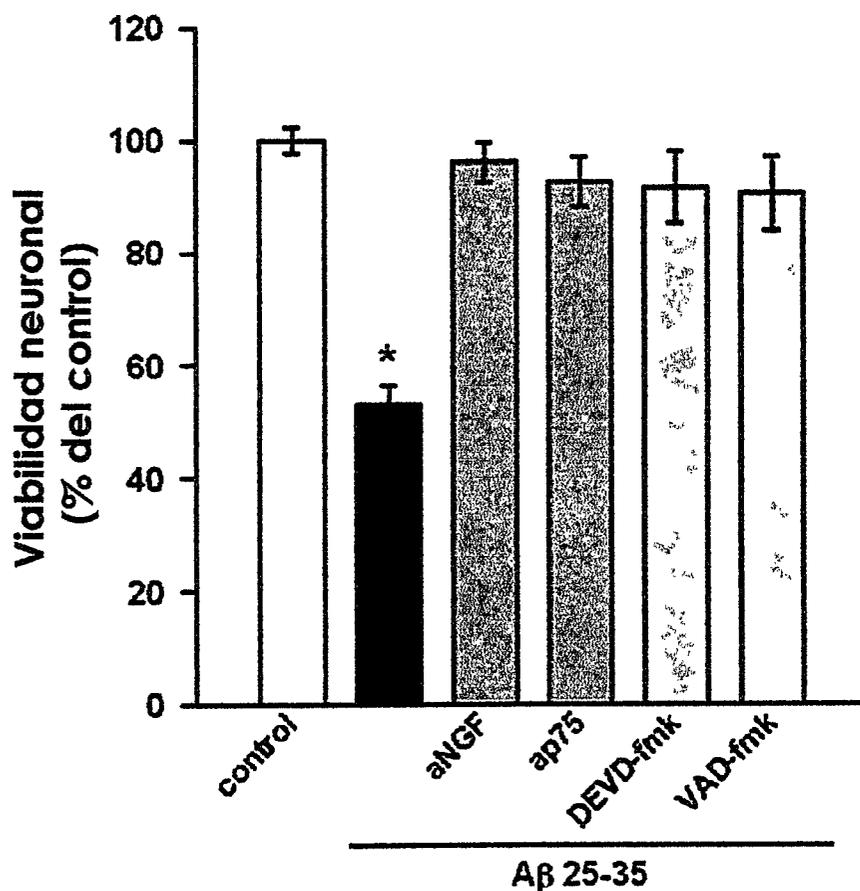


FIGURA 24. Astrocitos reactivos inducen muerte neuronal por apoptosis dependiente de p75 en neuronas de hipocampo en co-cultivo. Astrocitos previamente estimulados 24h con 10 μ M A β 25-35 se lavaron y fueron luego montados sobre una monocapa de neuronas hipocampales. Los co-cultivos se mantuvieron en presencia de los inhibidores de caspasas DEVD-fmk y VAD-fmk ó de anticuerpos con actividad bloqueadora para NGF o p75. La viabilidad neuronal se determinó a las 72 h por conteo directo de las células con neuritas intactas. Los datos se expresan como porcentaje del control, media \pm SD de tres experimentos independientes (n=3) realizados por duplicado. *Significativamente diferente ($p \leq 0,05$) del control y los otros tratamientos (ANOVA de una entrada con repeticiones, post-prueba de *Tukey-Kramer*).

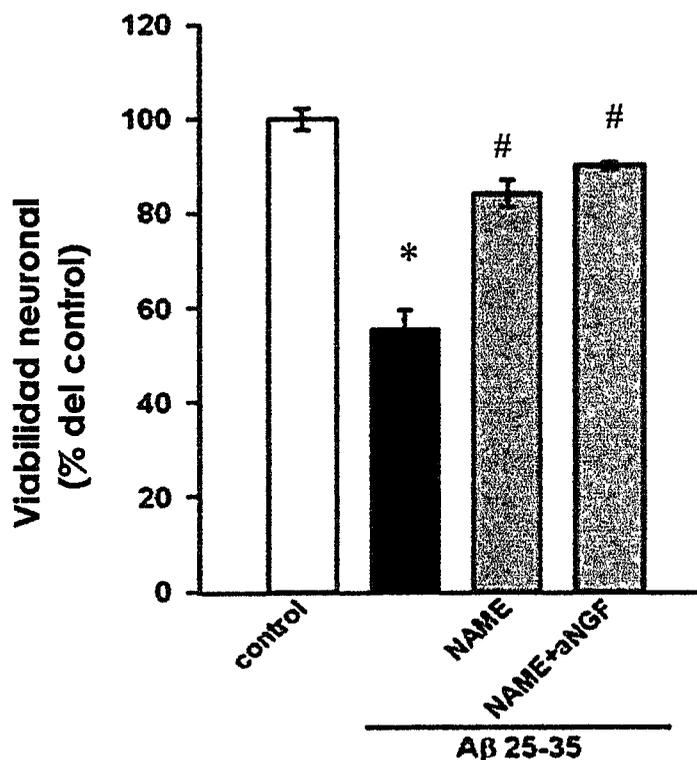


FIGURA 25. Astrocitos reactivos inducen muerte neuronal dependiente de NO y NGF en neuronas de hipocampo en co-cultivo. Astrocitos de hipocampo se estimularon 24 h con 10 μ M A β 25-35, luego se lavaron y fueron montados sobre una monocapa de neuronas hipocampales. Los co-cultivos se mantuvieron en presencia de 1mM L-NAME y anticuerpo anti-NGF con actividad bloqueadora donde se indica. La viabilidad neuronal se determinó a las 72 h por conteo directo de las células con neuritas intactas. Los datos se expresan como porcentaje del control, media \pm SD de cuatro experimentos independientes (n=4) realizados por duplicado. *significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$, ANOVA de una entrada con repeticiones). #, significativamente diferente del tratamiento con el péptido ($p \leq 0,05$, post-prueba de *Tukey-Kramer*).

7.2.4. NO y NGF intervienen en la neurotoxicidad inducida por A β .

En un intento de unificar los resultados anteriores, agregamos L-NAME junto con el anticuerpo que bloquea NGF. En la Figura 25 se observa que con el agregado de ambos compuestos la inducción de muerte celular por los astrocitos a las 72 h no es significativamente diferente del control. Al estudiar la hiperfosforilación de tau, el agregado del inhibidor y el anticuerpo con actividad bloqueante (como en el caso anterior) no producen cambio significativo en la hiperfosforilación de tau respecto del control, y a su vez difiere del aumento producido por el péptido (Figura 26). Esto confirma la participación de NGF y NO en los dos eventos celulares estudiados.

7.2.5. NO neuronal

Debido que el NO posee una vida media muy corta, analizamos si existe, además del NO astrocitario, un incremento de la producción de NO por las neuronas al ser cultivadas con astrocitos previamente estimulados con A β , que contribuya al deterioro neuronal. Estudiamos la inducción de isoformas de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) en neuronas luego de 48 y 72 h en co-cultivo con astrocitos estimulados. En la Figura 27 se observa un aumento significativo de ambas isoformas a las 48 h de co-cultivo con astrocitos estimulados. A las 72 h los niveles de nNOS se mantienen aumentados respecto del control, mientras que iNOS no presentó cambio significativo. Este resultado predice que el aumento de NO es mucho mayor y sostenido de lo esperado, debido a la contribución *in situ* del NO neuronal.

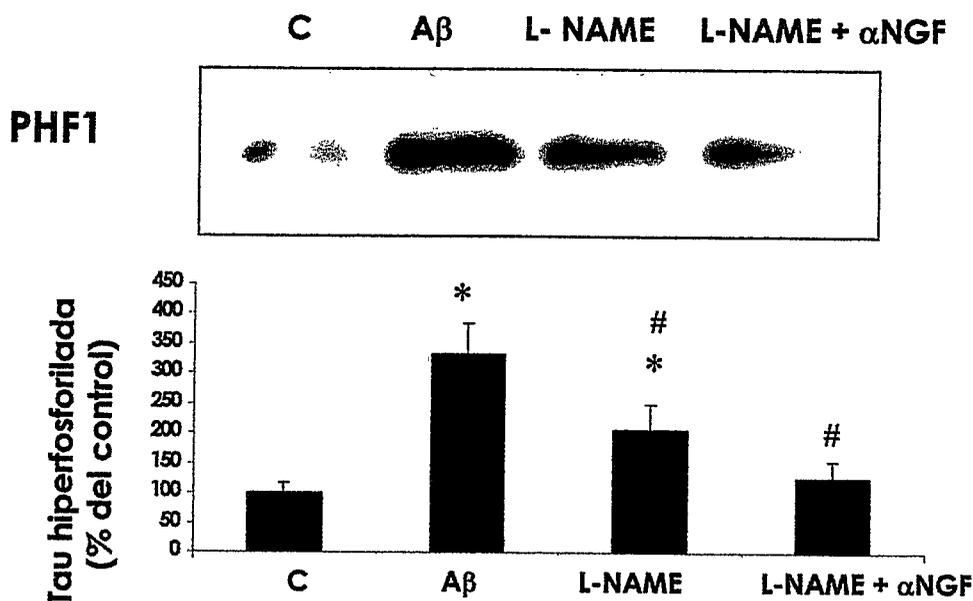


FIGURA 26. La hiperfosforilación de tau en neuronas de hipocampo en co-cultivo con astrocitos depende de NO y NGF. Astrocitos de hipocampo tratados con 10 μ M A β 25-35 por 24h se montaron sobre una monocapa de neuronas y la hiperfosforilación de la proteína tau se detectó por *western blot* con anticuerpo anti-PPHF1. C, neuronas en co-cultivo con astrocitos control; A β , neuronas en co-cultivo con astrocitos estimulados con 10 μ M A β 25-35 por 24h; L-NAME, idem A β con L-NAME (1mM); L-NAME+ α NGF, idem L-NAME con anti-NGF. Los datos del histograma están expresados como porcentaje del control, media \pm SD de tres experimentos independientes (n=3) realizados por duplicado. *significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$, ANOVA de una entrada con repeticiones). #, Significativamente diferente de A β ($p \leq 0,05$, post-prueba de *Tukey-Kramer*).

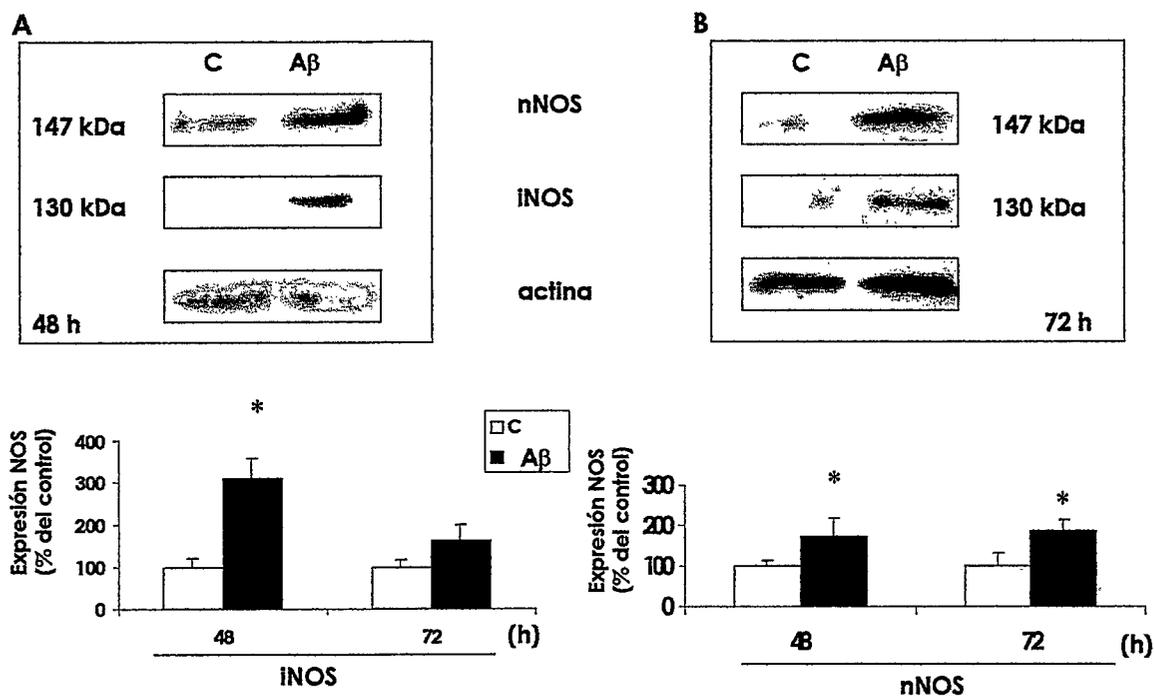


FIGURA 27. Astrocitos reactivos inducen la expresión de iNOS y nNOS en neuronas hipocampales en co-cultivo. Astrocitos de hipocampo tratados con 10 μ M A β 25-35 por 24h se montaron sobre una monocapa de neuronas y luego de 48h (A) ó 72h (B) se determinó la expresión iNOS y nNOS por *Western blot*. Los datos del histograma están expresados como porcentaje del control, media \pm SD de tres experimentos independientes (n=3) realizados por duplicado. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$, ANOVA de doble entrada con post-prueba de Bonferrini).

7.3. EL MEDIO DE ASTROCITOS MEDIA NEUROTOXICIDAD.

7.3.1. Inducción del receptor p75 y la hiperfosforilación de tau.

Luego nos preguntamos si el medio de cultivo obtenido de la astrogliá previamente estimulada con $A\beta$ era capaz de inducir el mismo efecto sobre neuronas puras en cultivo. Es decir, si los factores liberados al medio por los astrocitos estimulados con el péptido, recuperados mediante la rigurosa extracción del mismo, podían imitar la inducción de la fosforilación de la proteína tau neuronal al verterse éste sobre neuronas de hipocampo. En la Figura 28 se observa que el medio condicionado de los astrocitos aumenta significativamente la hiperfosforilación de la proteína tau detectada con los anticuerpos PHF1 y AT8. Este aumento no es significativo cuando se agrega el anticuerpo anti-p75. Además, en la misma figura también se observa el aumento en la expresión de p75 conseguido utilizando el medio condicionado sobre las neuronas. Los mismos resultados pueden observarse en las micrografías de fluorescencia de la Figura 29, donde las neuronas en cocultivo con astrocitos estimulados o con el medio extraído de los mismos son inmunomarcadas con el anticuerpo para tau hiperfosforilada PHF1.

7.3.2. Muerte neuronal.

El análisis del comportamiento del medio de cultivo de los astrocitos estimulados sobre las neuronas resultó en la activación de la vía de las caspasas (Figura 29), y también se indujo muerte neuronal significativa a partir de las 24 h (Figura 30). No existe diferencia significativa entre la muerte producida por el medio condicionado y los astrocitos estimulados con $A\beta$.

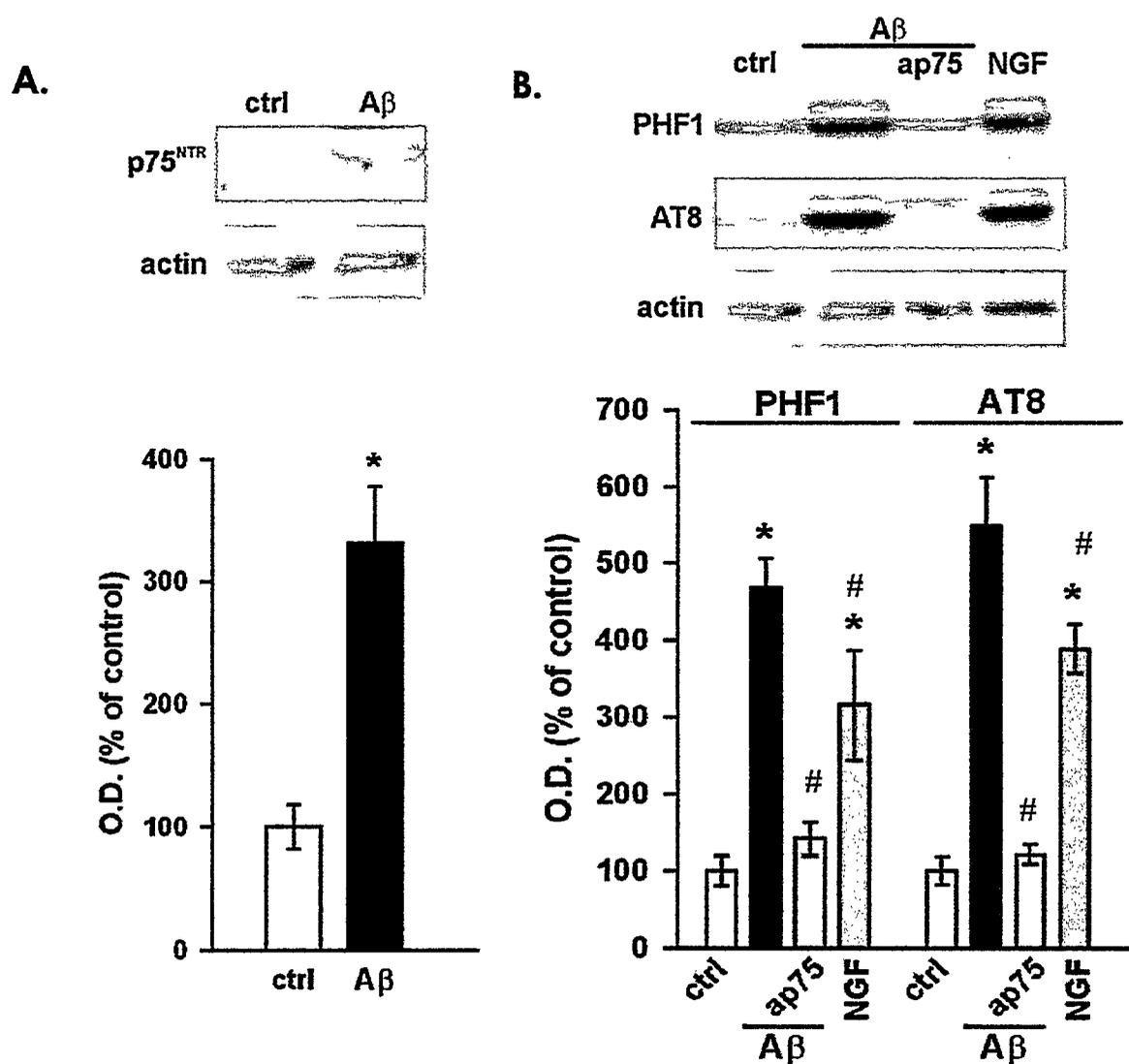


FIGURA 28. El medio condicionado de astrocitos reactivos induce en neuronas la hiperfosforilación de tau y la expresión de p75. Astrocitos fueron estimulados 24h con 10 μ M A β 25-35, luego el medio condicionado se adicionó sobre una monocapa de neuronas hipocampales de 5 días, y fueron mantenidas 24h. Los lisados neuronales se procesaron por *Western blot* para detectar la hiperfosforilación de tau con anticuerpos PHF1 y AT8 (B) y la expresión de p75 (A) con anticuerpo específico para dicho receptor. *Control*, neuronas con el medio de astrocitos sin estimular; *A β* , neuronas con medio condicionado de

astrocitos estimulados; *ap75*, idem A β con anticuerpo bloqueador para p75; *NGF*, cultivo de neuronas con el medio de astrocitos no estimulados a las que se adicionó 100 ng/ml NGF puro. Los datos se expresan como porcentaje del control (NH), media \pm SEM de cuatro experimentos independientes (n=4) realizados por duplicado. *significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$, prueba *t de Student* para A y ANOVA de doble entrada para B). #, significativamente diferente del tratamiento con el medio condicionado ($p \leq 0,05$, prueba de *Bonferroni*).

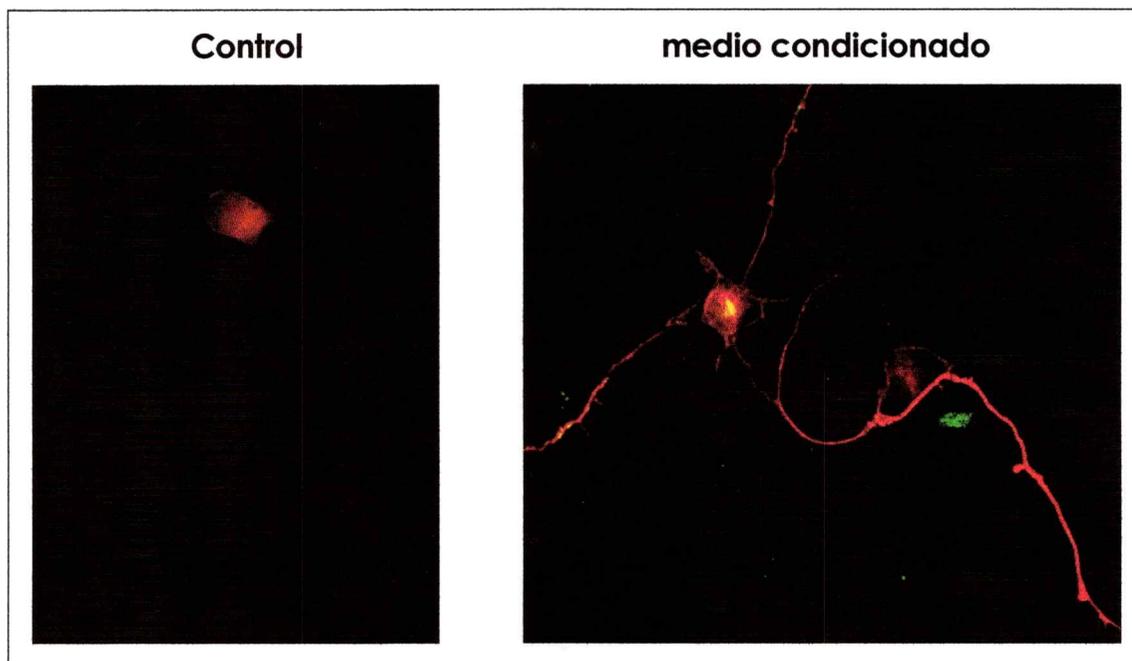


FIGURA 29. El medio condicionado de astrocitos reactivos induce la hiperfosforilación de tau y la activación de la vía de las caspasas. Micrografías de fluorescencia mostrando hiperfosforilación de tau (PHF1, rojo) y activación de la vía de caspasas apoptóticas (casp-3 hidrolizada, verde) en neuronas de hipocampo incubadas 48h con el medio de cultivo condicionado extraído de astrocitos estimulados 24h con vehículo (control) ó 10 μ M A β 25-35 (A β). Se adicionaron anticuerpos bloqueadores donde se indica (aNGF, ap75) al momento de incubación con el medio condicionado.

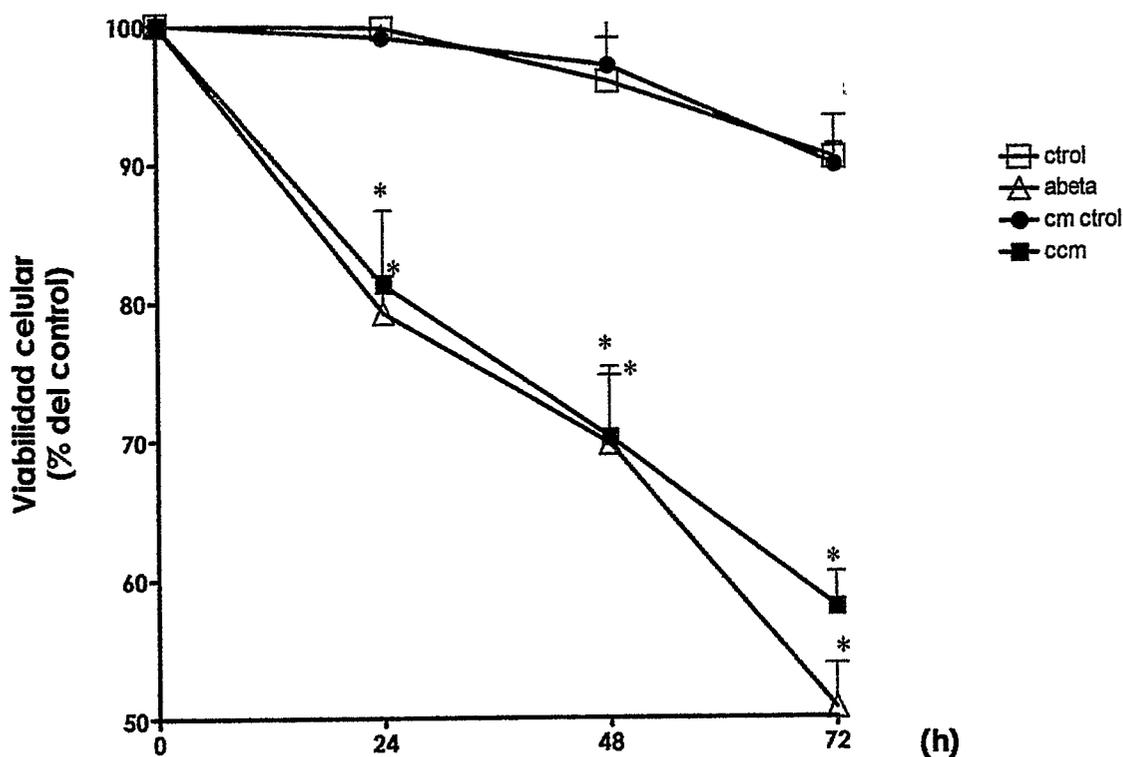


FIGURA 30. El medio condicionado de astrocitos reactivos induce muerte neuronal. Sobrevida de neuronas hipocampales luego de 24h con astrocitos reactivos ($10 \mu\text{M}$ A β 25-35) ó con el medio extraído de estos. *CM*, medio condicionado de astrocitos. La sobrevivencia neuronal se determinó a los tiempos señalados por conteo directo de las células con neuritas intactas. Los datos se expresan como porcentaje del control, media \pm SD de cuatro experimentos independientes ($n=4$) realizados por duplicado. *Significativamente diferente del control ó CM ($p \leq 0,05$, ANOVA de doble entrada con post-prueba de *Bonferrini*).

7.4. NO Y NGF INDUCEN FENOTIPO NEUROTÓXICO EN NEURONAS DE HIPOCAMPO.

7.4.1. NO exógenamente adicionado a los cultivos produce neurotoxicidad

Para profundizar en los estudios de la participación de NO, nos valimos de una táctica que consiste en aplicar sobre las neuronas de hipocampo una generación continua de concentraciones relevantes fisiológicamente de NO, logradas por administración de 10 μ M NOC-18, el cual no afecta la viabilidad celular. Investigamos si NOC-18 así administrado era capaz de inducir los fenotipos neurotóxicos antes estudiados en co-cultivo. La Figura 31 (Saez y col., 2004) muestra un incremento significativo en la hiperfosforilación de tau cuando las neuronas fueron tratadas con el donante de NO, NOC-18 respecto de neuronas control. Además, la administración de NOC-18 indujo muerte neuronal significativa a las 72 h de tratamiento (Figura 32). Estos resultados confirman que la producción de NO es importante para los cambios observados en los patrones de fosforilación de tau, y para la inducción de muerte neuronal.

7.4.2. NGF imita la neurotoxicidad inducida por astrocitos reactivos.

Valiéndonos de datos publicados por Pehar en el estudio de la enfermedad ELA, repetimos el experimento de adicionar exógenamente NGF en dos concentraciones (50 y 100 ng/ml, de acuerdo con los datos previamente publicados, Pehar y col., 2004) sobre co-cultivos no estimulados con el péptido A β , o sobre neuronas puras en cultivo. Los resultados muestran que se produce muerte significativa de neuronas con las dos concentraciones de NGF a las 72 h (figura 33).

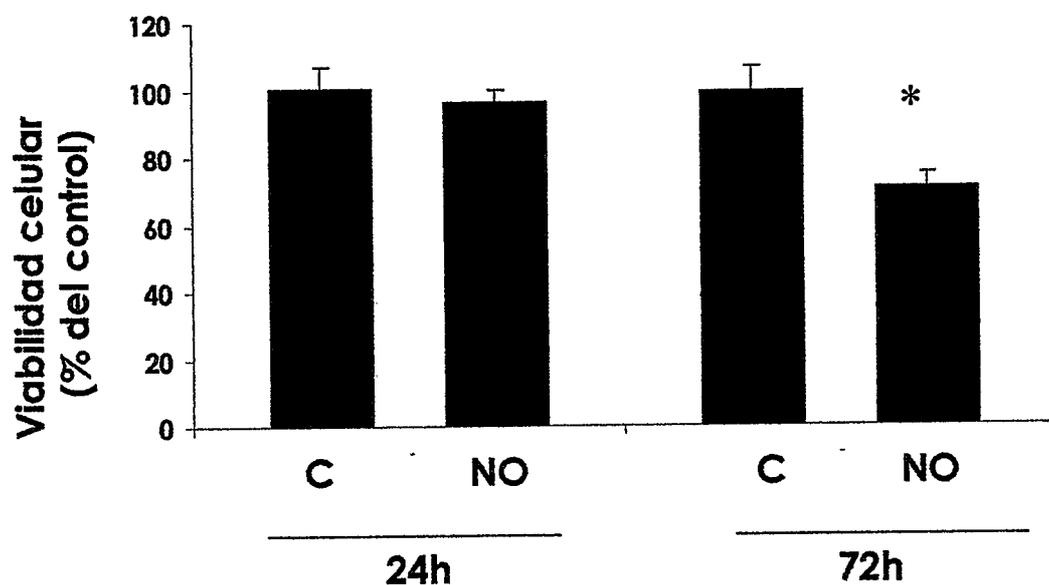


FIGURA 32. Viabilidad de neuronas de hipocampo expuestas a un flujo continuo de NO. Neuronas de hipocampo en cultivo se trataron con el generador de NO *NOC-18* ($10\mu\text{M}$) por 24 y 72 h. La viabilidad celular se evaluó por conteo directo de células con neuritas intactas. Los datos del histograma se expresan como porcentaje del control, media \pm SD de tres experimentos independientes ($n=3$) por duplicado. *significativamente diferente del control ($p\leq 0,05$, ANOVA de doble entrada, post-prueba de *Bonferrini*).

El NGF exógeno sobre los co-cultivos también provoca inducción significativa de la fosforilación de la proteína tau (Figura 28 B), pero significativamente distinta a la provocada con el medio de cultivo condicionado. Esto ratifica nuestra hipótesis que además de NGF hay uno o más factores que estarían influyendo sobre las neuronas.

7.4.3. NO y NGF en la neurotoxicidad inducida por A β

Finalmente estudiamos la influencia del agregado exógeno simultáneo de NGF y NO (NOC-18) (según concentraciones propuestas por Pehar y col., 2004) sobre neuronas de hipocampo. En este caso, NO, NGF y su administración conjunta aumentan la hiperfosforilación de tau (Figura 34) por sobre los niveles control, y la administración doble de NGF y NO es significativamente distinta del tratamiento con NGF solo. Sin embargo, no se diferencia del tratamiento con NO solo. Esto podría deberse a una regulación del NO sobre el NGF, que haría que al administrarlos juntos, el efecto del NGF sobre la hiperfosforilación de tau dejara de ser relevante. También se estudió la muerte neuronal en las mismas condiciones, es decir, agregando NOC-18 y NGF juntos y por separado, y el análisis se realizó a las 24, 48 y 72 h de cultivo. En la Figura 35 se observa que NGF y NO administrado por separado producen muerte significativa a las 48 y 72 h. No existe diferencia en la muerte que provocan a las neuronas ambos tratamientos. Cuando se administran juntos, son capaces de provocar muerte a las neuronas que es significativa a las 24 h de cultivo, y la misma difiere de la provocada por los tratamientos por separado.

En la figura 27 estudiamos la inducción de las isoformas de la NOS neuronal bajo estímulo astrocitario, y vimos que se inducían tanto la iNOS como la nNOS en neuronas en co-cultivo.

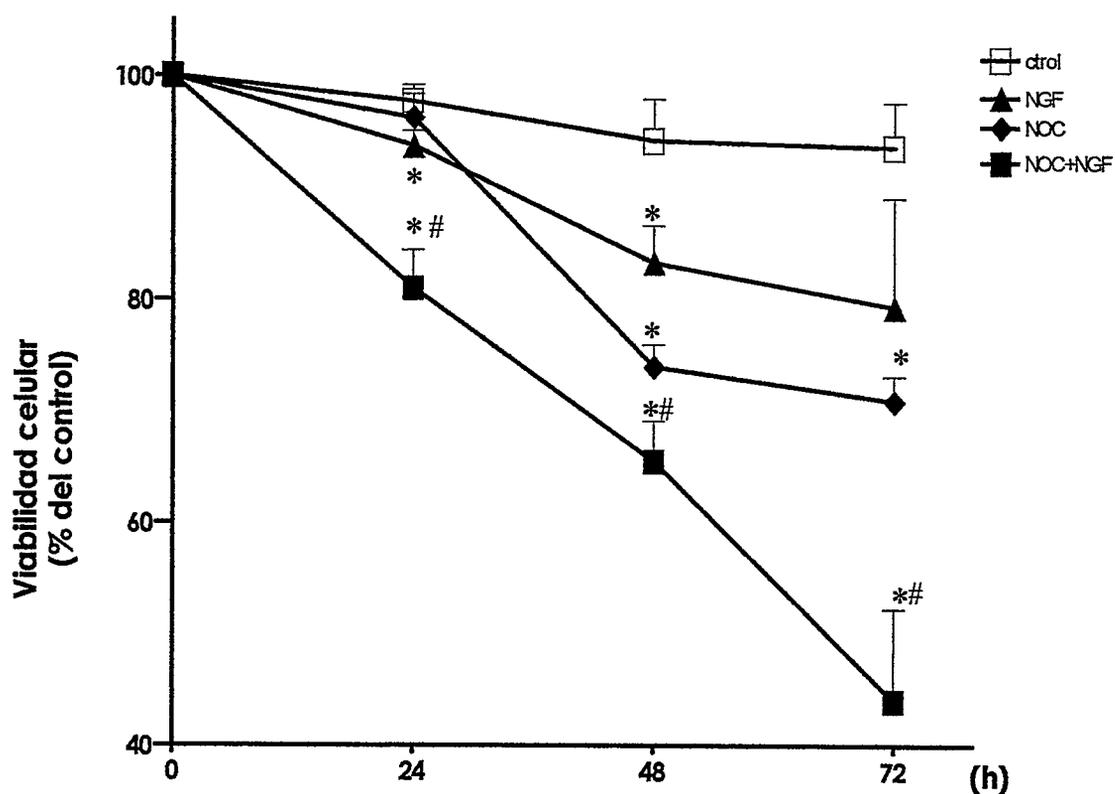


FIGURA 35. Sobrevida de neuronas hipocampales expuestas a NGF y NO. Neuronas puras en cultivo fueron tratadas con NGF (100 ng/ml) y/o un flujo continuo de de NO (10 μ M de *NOC-18*). Las células fueron mantenidas por los tiempos indicados para luego determinar la viabilidad mediante conteo directo de las células con neuritas intactas. Los datos del histograma están expresados como porcentaje del control, media \pm SD de tres experimentos independientes (n=3) realizados por duplicado. * significativamente diferente del control. ($p \leq 0,05$), #, significativamente diferente de *NO* o *NGF* ($p \leq 0,05$, ANOVA de doble entrada con post-prueba *de Bonferroni*). Las pendientes de las curvas se compararon por análisis de Regresión Lineal (ANCOVA), resultando la diferencia entre todas las pendientes extremadamente significativa ($p \leq 0,001$).

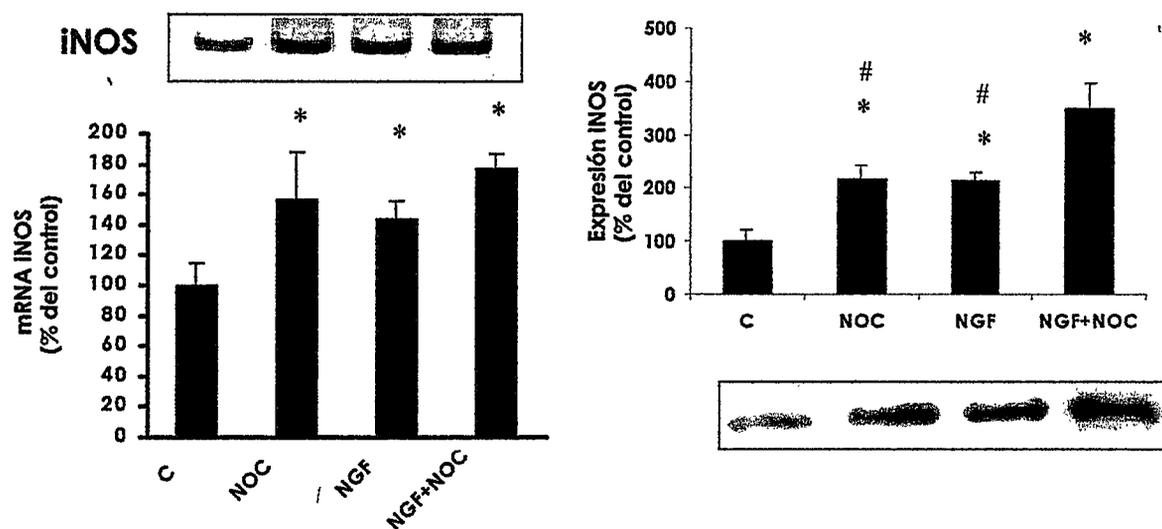


FIGURA 37. NGF y NO inducen aumento de iNOS en neuronas de hipocampo en cultivo. Neuronas puras en cultivo fueron tratadas con NGF (100 ng/ml) y/o un flujo continuo de de NO (10 μ M de *NOC-18*). Las células fueron mantenidas por 24h y se lisaron para extraer proteínas y RNA total. A., mRNA iNOS medido por RT-PCR; B, *Western blot* para iNOS. Los datos de los histogramas están expresados como porcentaje del control, media \pm SD de tres experimentos independientes (n=3) realizados por duplicado. * Significativamente diferente del control. ($p \leq 0,05$ ANOVA de una entrada con repeticiones). # Significativamente diferente de NOC + NGF ($p \leq 0,05$, post-prueba de *Tukey-Kramer*).

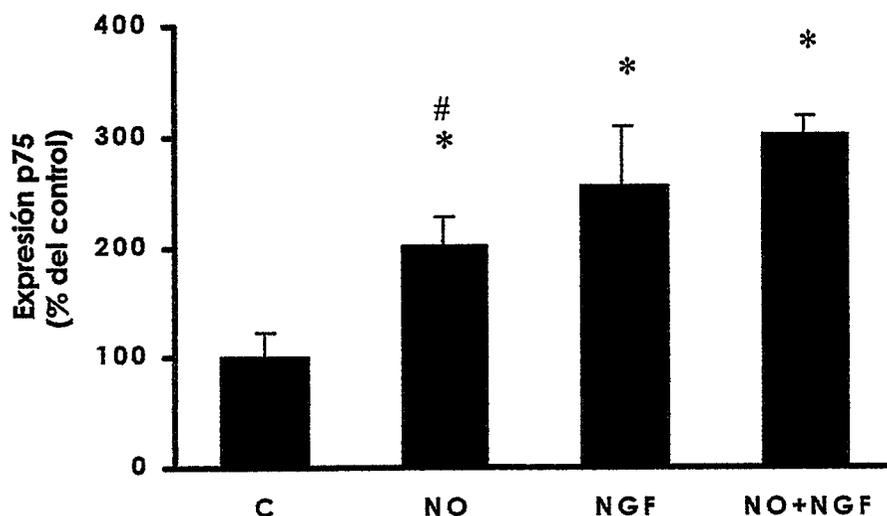
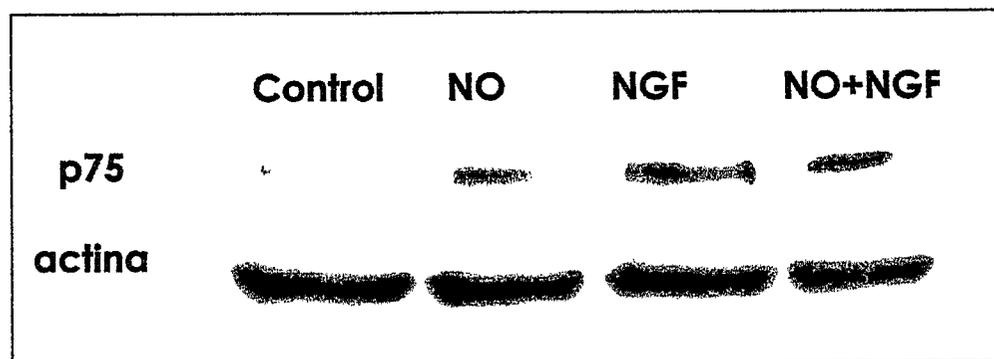


FIGURA 38. La adición exógena de NGF y NO inducen aumento en la expresión de p75 en neuronas de hipocampo en cultivo. Neuronas de hipocampo en cultivo fueron tratadas con NGF (100 ng/ml) y/o un flujo continuo de de NO (10 μ M de *NOC-18*). Las células fueron mantenidas por 24 h y se lisaron para extraer proteínas y se analizó por Western blot la expresión de p75. La expresión de actina se utilizó como control interno. Los datos del histograma están expresados como porcentaje del control, media \pm SD de tres experimentos independientes (n=3) realizados por duplicado. * Significativamente diferente del control. ($p \leq 0,05$, ANOVA de una entrada con repeticiones). # Significativamente diferente de NOC + NGF ($p \leq 0,05$, post-prueba de *Tukey-Kramer*).

El pretratamiento de los astrocitos con $A\beta$ induce la expresión de la quinasa (Figura 39), y esto es dependiente de NO y NGF, ya que la adición del inhibidor L-NAME sumado al anticuerpo bloqueante contra NGF no produce aumento significativo en la inducción de la misma. El agregado exógeno de NO y NGF a las concentraciones utilizadas anteriormente produce un incremento significativo en su expresión. Estos datos nos permiten concluir que astrocitos estimulados con $A\beta$ inducen la hiperfosforilación de tau mediada por NGF y NO, factores que señalizan a través de la vía del receptor p75 para inducir directa o indirectamente la expresión de la quinasa cdk5.

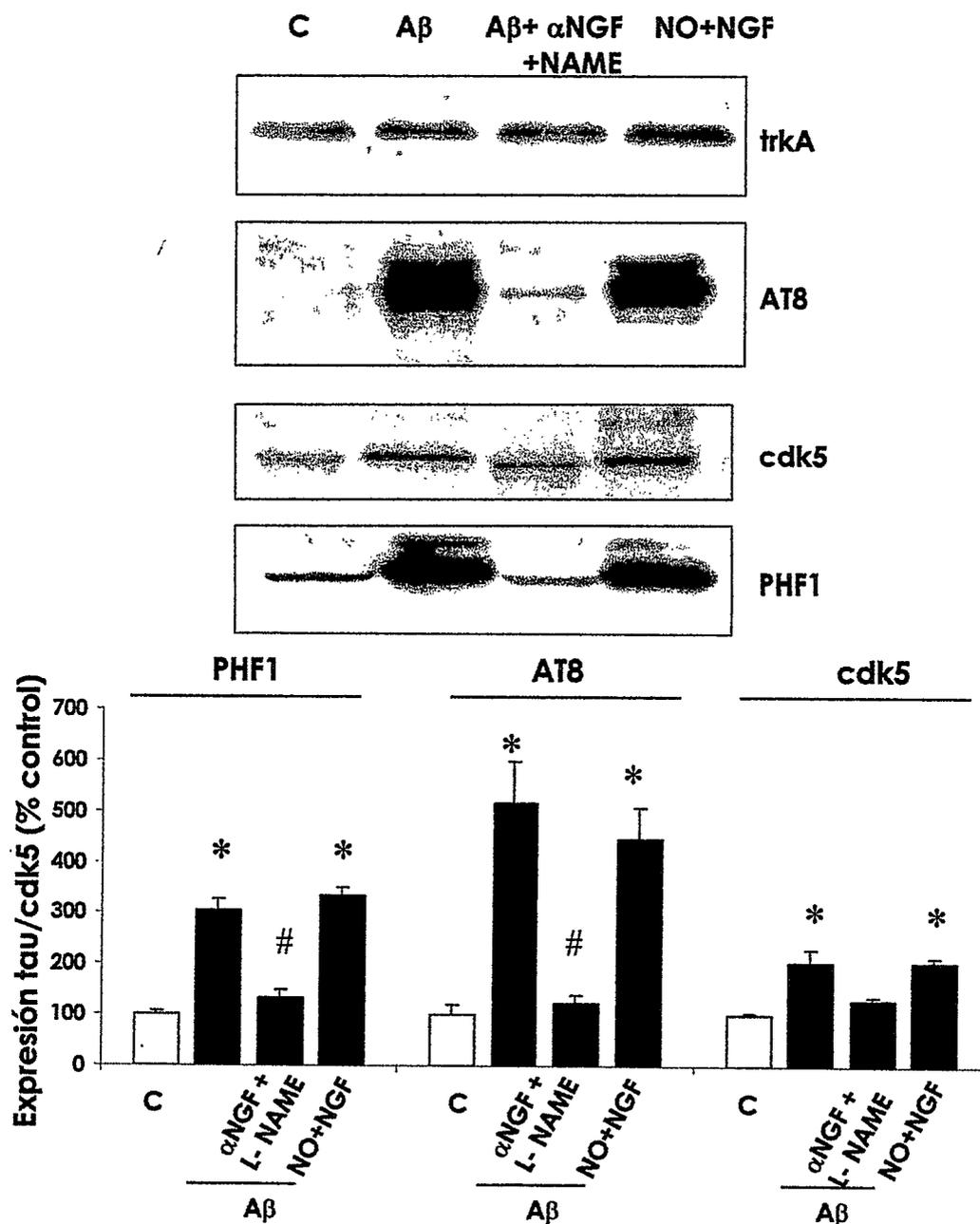


FIGURA 39. Expresión de cdk5 en neuronas de hipocampo dependiente de NGF y NO. Neuronas hipocampales puras ó en co-cultivo con astrocitos previamente estimulados 24h con 10 μ M A β 25-35 (A β) se mantuvieron por 24h y los lisados neuronales fueron procesados por *Western blot* con anticuerpos para cdk5 (C9), epitopes específicos de la EA (PHF1 y AT8) y para los receptores de alta y baja afinidad para NGF (TrkA y p75). *NH*, cultivo puro de neuronas hipocampales; *A β* ,

8. DISCUSIÓN

Los astrocitos responden al daño con profundos cambios morfológicos y de expresión génica (Edleston & Mucke, 1993; Ridet y col., 1997). En el presente trabajo mostramos que NGF/proNGF de astrocitos reactivos por A β interviene en la hiperfosforilación de tau, aumento en la expresión de p75 y muerte de neuronas hipocampales, a través de la activación del receptor de baja afinidad p75. Además, tenemos evidencias que la producción de NO es necesaria para los efectos neuronales inducidos por NGF, ya sea que el mismo provenga de la neurona y/o de astrocitos. Esto sugiere un mecanismo donde el NO interactúa con la vía de señalización NGF/p75.

8.1. RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS AL A β

Para inducir la activación astrocitaria utilizamos el fragmento reactivo del péptido A β , que contiene los aminoácidos entre el 25-35, con comprobadas propiedades neurotóxicas (Harris y col., 1996; Fabrizi y col., 1999; McLean y col., 1999; Xu y col., 2001; Kim y col., 2001; Baskys y Adamchik 2001; Morais y col., 2002; Arias y col., 2002; Yamaguchi y col., 2002; Rovira y col., 2002; Galeazzi y

col., 2002; Stepanichev y col., 2003 a y b; Perez-Severiano y col., 2004; Ramalho y col., 2004; Abramov y col., 2004) y lo empleamos en su forma soluble, por ser en esta condición determinante de severidad (Tabaton y col., 1994; Wang y col., 1999; Lue y col., 1999; McLean y col., 1999). Además, son escasos en la literatura los estudios con este péptido, más aún en nuestro modelo, y por tanto nuestro trabajo resulta original.

Los niveles de A β en líquido cefalorraquídeo (LCR) de personas normales son del orden de nanomolar (nM) a sub-nanomolar (Andreasen y col., 1999; Walsh y col., 2002). En pacientes con la EA, las concentraciones medidas en LCR disminuyen hasta un orden de magnitud (Andreasen y col., 1999; Walsh y col., 2002), probablemente debido al depósito del péptido en las placas. En 1995 Gravina y col. determinaron que el A β aumenta de 500-4500 veces en corteza de pacientes con EA, siendo la concentración del péptido en los controles del orden de pmoles / g de tejido húmedo. Cirrito y col. (2003) logran determinar mediante microdiálisis y ELISA concentraciones de A β en el fluido intersticial del hipocampo (entre 0,02 y 0,12 nM) y en LCR (entre 0,2 y 1,6 nM) de ratones transgénicos para APP. Este trabajo muestra concentraciones efectivas del péptido que van de 4 nM a 1,32 μ M en el hipocampo (Cirrito y col., 2003). Sin embargo, como se plantea en la discusión del manuscrito, dichas concentraciones titulares reflejan la suma del A β extracelular, intracelular, asociado a membranas y asociado a agregados del A β . Así, la mayoría del A β en lisados de tejido no representa y sobreestima significativamente los compartimentos extracelulares del A β . De tal forma, la concentración de A β extracelular de hipocampo, obtenido de datos de extracción de tejidos, debería

fluctuar entre 0,4 y 132 nM (asumiendo un 10 % para el A β extracelular) Los estudios de Cherny y col. (1999) documentan concentraciones de 0,5 μ M en corteza cerebral de controles y 9 μ M en pacientes con EA. Estos datos provienen de la extracción de tejido cerebral mediante PBS, Urea 8 M y/o agentes quelantes. Nuevamente, estos datos reflejan la suma de A β extracelular, intracelular, asociado a membranas, a proteínas intra- y extracelulares y asociado a agregados del A β . De tal forma, los datos de Cherny y col. sobreestiman los verdaderos niveles extracelulares del péptido, los cuales debieran ser uno o dos órdenes de magnitud menores.

De acuerdo con los antecedentes de la literatura citados previamente, los niveles extracelulares de A β están en un rango de concentraciones nanomolar. Sin embargo, sólo con concentraciones de A β del orden de μ M se consigue formar fibrillas del péptido en solución en estudios *in vitro* (Walsh y col., 1999), y se conoce por estudios *in vivo* e *in vitro* que el A β en forma fibrilar es el responsable de la toxicidad neuronal (Mattson y col., 1997). Por último, a partir de concentraciones de 10 μ M se alcanza un 50% de reactividad en astrocitos corticales (Kato y col., 1997).

En el presente trabajo se utilizaron concentraciones del péptido que van entre 1 y 20 μ M. Estas concentraciones están muy por encima (1000 veces) del rango de concentraciones documentado en hipocampo de pacientes con la EA, pero es una aproximación experimental *in vitro* para evaluar los efectos del A β . Por ello a este nivel de la investigación no se puede extrapolar a la situación patológica en el Alzheimer, y su posible significado fisiopatológico debe analizarse con cautela. Así, en los numerosos trabajos que existen en la literatura donde utilizan el péptido A β , las concentraciones que se utilizan son de 1-200 μ M (Harper y col., 1999). Además,

en estudios *in vitro* concentraciones menores a 1 μM no han tenido efecto citotóxico (Álvarez y col., 2001). 5 μM es una concentración justamente usada para visualizar efectos neurotóxicos comparables con condiciones eventualmente patológicas, especialmente en la cascada de señalización (Quintanilla y col., 2005). Además, el subfragmento Abeta 25-35, aunque corresponde a la región efectiva del péptido amiloide, no tiene la misma actividad que Abeta 1-42 por ejemplo, y por lo tanto es justificable utilizar concentraciones en el rango 1-20 μM ; concentraciones ciertamente neurotóxicas para este péptido en particular. Además, en este y otros trabajos se intenta reproducir lo que ocurre en el cerebro en muchos meses del proceso fisiopatológico (en la EA la patogenia se da por acumulación de proteínas anómalas) en pocas horas por ello es racional el uso de concentraciones altas para simular el efecto del $\text{A}\beta$ en condiciones patológicas.

El estímulo fue fijado en una concentración de 10 μM $\text{A}\beta$ 25-35, por 24 h de incubación, a partir de resultados obtenidos de curvas dosis-respuesta y de tiempo de liberación del NGF y NO. El tiempo de incubación de 24 h es apropiado para trabajar en el laboratorio, y la concentración de 10 μM es sólo una aproximación experimental válida para poder investigar el problema, pero su significado no es necesariamente conciliable con la situación patológica. Cabe destacar, que con estos parámetros experimentales logramos una liberación de NGF similar a la documentada por Hock y col. (2000b) en pacientes con EA.

En este trabajo nosotros reproducimos con el fragmento reactivo del péptido $\text{A}\beta$ en astrocitos de hipocampo, los cambios morfológicos inducidos por otros fragmentos del péptido, como el $\text{A}\beta$ 1-42, antes descritos (Pike y col., 1994; Akama

y col., 1998; Johnston y col., 1999; Bach y col., 2001; Malchiodi-Albedi, 2001; Szczepanik y col., 2001). Nuestros estudios muestran que la exposición de astrocitos de hipocampo al fragmento reactivo del péptido A β produjo un profundo cambio fenotípico sin inducir muerte celular. Este hecho no es extraño, ya que los astrocitos son menos vulnerables a tratamientos tóxicos, como el A β , que otros tipos celulares, por ejemplo los astrocitos resisten diversos estrés de tipo oxidativos, ya que contienen altos niveles de antioxidantes endógenos incluyendo el glutatión y la vitamina E (Makar y col., 1994); y además, cuando son sometidos a estrés oxidativo, sufren cambios compensatorios que evitan la citotoxicidad. Estos cambios incluyen el aumento de la producción de glutatión (García-Nogales y col., 1999) y la inducción de la expresión de la enzima antioxidante SOD1 (Kim y col., 2000); de esta manera los astrocitos se vuelven mucho más resistentes a las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Pechan y col., 1992; Bolaños y col., 1995).

En nuestro estudio el A β 25–35 indujo cambios morfológicos característicos, con la aparición de largas prolongaciones (“pseudo-procesos”) que perduran varios días después de realizado el tratamiento. Es poco probable que la formación de las prolongaciones astrocitarias sea consecuencia de una retracción mecánica de la membrana plasmática inducida por acciones directas del agregado del péptido, pues los cambios fenotípicos que se observan perduran un tiempo mayor que el hipotéticamente requerido por los mecanismos de reparación celular. Esto nos lleva a pensar que los cambios reactivos inducidos por el A β involucran la activación de vías de señalización, como por ejemplo la mediada por AMP cíclico. Los factores capaces de señalar por este segundo mensajero provocan la retracción y/o crecimiento de prolongaciones en la astroglia (Goldman y Abramson, 1990).

Alternativamente, el A β podría inducir en los astrocitos la liberación de factores capaces de promover los cambios morfológicos descritos y que por lo tanto, contribuyan en el mantenimiento del fenotipo reactivo a través de un mecanismo autócrino o parácrino. Cabe destacar que un péptido del mismo peso molecular (el péptido invertido A β 35–25) no produce la reactividad de la glia observada con A β 25–35, y tampoco se logran niveles significativos de fosforilación de la proteína tau neuronal en co-cultivos, cuando astrocitos son previamente activados con el péptido invertido (Figura 17).

8.1.1. Producción de NGF y óxido nítrico por astrocitos reactivos.

Una característica remarcable del fenotipo reactivo inducido por el tratamiento con A β , es la inducción de la expresión y secreción de NGF y sus formas precursoras (pro-NGF). Estudios previos han mostrado la sobre-expresión de NGF en astrocitos reactivos por estimulación con diversas citoquinas (Edleston & Mucke, 1993; Ridet y col., 1997).

La liberación de NGF por cultivos de células astrogiales provenientes de hipocampo de ratas resultó significativa con concentraciones de 10 μ M de A β por 24 h, en cambio el mRNA de este factor se mostró significativamente aumentado a partir de concentraciones de 5 μ M, y a las 16 h ya se pudo detectar inducción. Resultado lógico, siendo la inducción de mRNA el paso previo a la producción de la proteína.

En nuestro modelo el NGF presume ser secretado principalmente como proNGF, lo que puede estar vinculado a una mayor capacidad de inducir apoptosis

sobre las neuronas. El NGF es sintetizado como un precursor inmaduro que es procesado por proteólisis intracelular para producir la neurotrofina madura (Heymach y Shooter, 1995; Seidah y col., 1996; Mowla y col., 2001). Sin embargo, algunas formas precursoras (28-50 kDa) pueden ser secretadas y proteolizadas en el espacio extracelular por proteasas como la plasmina y metaloproteinasas de la matriz (Heymach y Shooter, 1995; Seidah y col., 1996; Lee y col., 2001).

Los astrocitos reactivos en respuesta a la neurodegeneración juegan un importante papel en la regeneración neuronal, elevando los niveles de componentes de la matriz extracelular así como modificando el patrón de expresión de enzimas metaloproteinasas (MMPs) e inhibidores de tejido de MMPs (TIMPs) (Rathke-Hartliebs y col., 2000). Una de estas proteasas, MMP7, ha sido identificada como una de las responsables de la proteólisis del propéptido proNGF a su forma madura (Lee y col., 2001), pero no se tienen datos del comportamiento en la EA. En cambio, su inhibidor específico TIMP3 se ha visto aumentado en astrocitos reactivos en neurodegeneración (Rathke-Hartliebs y col., 2000) por lo que podría ser éste el mecanismo de inactivación de la proteasa, que finalmente llevaría a elevados niveles de proNGF. Otra enzima implicada en la proteólisis extracelular de proNGF es la *plasmina*, y es interesante destacar que el inhibidor de la activación del plasminógeno, PAI-2 ha sido descrito que aumenta en microglía de EA (Akiyama y col., 1993), estabilizando la proteasa en su forma inactiva (plasminógeno) y como consecuencia promoviendo una elevada expresión de proNGF.

Sorpresivamente, al analizar por *Western blot* las formas de NGF liberadas al medio por los astrocitos, no detectamos la especie madura de 13 kDa de NGF. Sin

embargo, este hecho concuerda con los datos publicados por Fahnstock (2001) donde manifiesta que la forma predominante de NGF en cerebro no es su forma madura sino la forma precursora proNGF, y que esta especie se halla aumentada en EA. El bandeo que se obtiene al analizar con el anticuerpo contra el pre-prodominio del NGF parece indicar la presencia de más de una especie de alto peso molecular. Sin embargo, el anticuerpo utilizado en este estudio no nos permite asegurar que las especies obtenidas son efectivamente proNGF, ya que por estudios de espectrometría de masa no hemos hallado la secuencia pre-pro del péptido. No obstante, sabemos con certeza que se trata de especies del NGF debido a que la secuencia de su forma madura aparece en cada banda analizada. En la actualidad, en el laboratorio del Dr. Barbeito se está trabajando en la obtención de un anticuerpo específico anti proNGF que complementará este y otros importantes estudios.

La acumulación de proNGF en la EA (Fahnstock y col., 2001) indica, como ya se discutió, que podría deberse a una falta de procesamiento del proNGF en esta enfermedad. Si es así, esto resultaría en una disminución de la disponibilidad de NGF para las células del cerebro basal anterior. Se sabe que el NGF regula tanto la actividad colinérgica como la expresión de trkA, y una disminución de NGF debe estar implicada en la reducción de trkA y de actividad de transferasa de acetilcolina (ChAT) en EA (Higgins y col., 1989; Hagg y col., 1989; Rylett y Williams, 1994; Kojima y col., 1994, 1995; Li y col., 1995; Whitehouse y col., 1998). La consecuente disminución de trkA, así como el aumento en la expresión de p75, produce cambios en el equilibrio entre trkA y p75 en favor del último, el cual se sabe capaz de suprimir la señalización de takA, e incluso puede mediar apoptosis de neuronas (Chen y col., 1997a; Van der Zee y col., 1995a) y posiblemente un aumento en el

procesamiento de APP (Felder y col., 1993; Roberson y col., 1997). Por lo tanto, la disminución en el procesamiento de proNGF llevaría a la disfunción de las neuronas del cerebro basal anterior y degeneración en EA.

Las placas seniles en EA se observan inmunorreactivas para NOS (Wallace y col., 1997; Smitc y col., 2000). Característicamente, los astrocitos reactivos inducen la expresión de iNOS (Murphy y col., 1993; Dawson y col., 1994; Ridet y col., 1997). Este hecho es extensivo para enfermedades neurodegenerativas, incluso EA, donde se observa que aumentan la expresión de NOS y la producción de NO (Wallace y col., 1997; Smic y col., 2000; Heneka y col., 2001; Lüth y col., 2002). Los ratones transgénicos para APP también muestran un incremento de iNOS y eNOS (Lüth y col., 2001), y está descrito que A β estimula la producción de NO en astrocitos en cultivo (Akama y col., 1998). Realizamos un estudio muy completo que consta de analizar la inducción de mRNA para la enzima iNOS, expresión de proteína de iNOS y nNOS y liberación de nitritos y nitratos al medio de cultivo por astrocitos estimulados con el péptido. Nuestros resultados fueron interesantes, mostrando inducción en todos los estudios y es así que fueron publicados.

Todos estos datos apoyan la hipótesis sostenida durante mucho tiempo de la importancia del NO en la toxicidad por A β , y nuestros estudios enfocan la atención al NO astrocitario como principal fuente de NO tóxico. Esto permite suponer la producción de flujos elevados de NO al medio. Estudios previos han mostrado que astrocitos reactivos en cultivo pueden ejercer efectos neurotóxicos (Eddleston y Mucke, 1993). Los astrocitos estimulados con LPS o citoquinas inducen degeneración neuronal vía un mecanismo dependiente de NO (Chao y col., 1996;

Skaper y col., 1995). La liberación excesiva de NO por astrocitos puede causar una disfunción en neuronas vecinas vulnerables, sin afectar la viabilidad astrocitaria.

8.2. EXPRESIÓN DE NGF EN RATONES TRANSGÉNICOS TG2576.

Al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas que involucran una importante reacción astrogial (Gall y col., 1991; Lorez y col., 1989; Fahnstock y col., 1996), en los hipocampos de los ratones Tg2576 la expresión del NGF se encontró aumentada. Dicho aumento parece deberse a un incremento en la expresión de NGF por parte de los astrocitos reactivos, ya que las marcas de GFAP y NGF coinciden en la zona de astrocitosis rodeando el depósito amiloide (teñidos con rojo Congo) que conforma la placa neurítica. Sin embargo, al realizarse las inmunodetecciones en distintos cortes, no podemos aseverar que las marcas colocalizan. Estos resultados, en conjunto con las observaciones obtenidas en cultivo, permiten sugerir un potencial papel del NGF/pro-NGF secretado por los astrocitos reactivos en la inducción de fenotipos tóxicos observados en el ratón Tg2576. Cabe destacar que el tipo celular responsable del aumento de NGF observado en EA aún no ha sido identificado, y estos datos junto con los obtenidos en cultivo de astrositos, permiten postular que son estas células las responsables de tal aumento.

Nuestros datos en cultivo indican un aumento en los niveles de NGF así como NO por astrocitos estimulados con A β . El óxido nítrico puede reaccionar con superóxido para formar peroxinitrito, proceso referido como estrés oxidativo. Tanto NO como su metabolito tóxico peroxinitrito han sido implicados en muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA (Luth y col., 2002; Castegna y

col., 2003; Reynolds y col., 2005). El peroxinitrito, a su vez, nitrifica residuos de tirosina generando nitrotirosina, la cual puede ser identificada por inmunohistoquímica. En nuestro estudio intentamos estudiar la nitrotirosinación de proteínas en los cortes del ratón Tg2576, pero la técnica resultó muy sucia y no fuimos capaces de identificar claramente su localización y distribución. Nuestros estudios de inducción de NOS en cultivo celular fueron investigados por Lüth y col. (2001) en este modelo transgénico, y hallaron la inducción de iNOS y eNOS en directa asociación con los depósitos de A β . Los resultados obtenidos de estudios *in vitro* parecen corresponder con los obtenidos por nuestro y otros grupos en este modelo *in vivo* de EA (Tg2576), pero desafortunadamente los estudios en el ratón transgénico son incompletos para proclamar tal afirmación.

8.3. NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR ASTROCITOS REACTIVOS

La EA afecta de forma selectiva a regiones específicas, entre ellas el hipocampo. Dentro del hipocampo las células más afectadas son neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3. Así, estudiamos el efecto de astrocitos reactivos por el péptido Abeta sobre neuronas de hipocampo en co-cultivo. Las neuronas son extraídas en el estadio de desarrollo E18, así el número de interneuronas y células gliales es muy bajo, y las neuronas provenientes del giro dentado se excluyen por generarse posnatalmente. Por la forma en que se desarrolla el cultivo primario luego de la disección (Banker y Cowan, 1977), las neuronas empleadas son de las regiones CA1 y CA3 (Alvarez y col., 1999, 2000). Los cultivos están compuestos principalmente de neuronas piramidales glutamatérgicas, junto con un pequeño número (aproximadamente 6%) de interneuronas GABAérgicas (Goslin

y Banker, 1991; Benson y col., 1994). Para los propósitos del presente trabajo no es necesario hacer distinción entre las neuronas piramidales de esas regiones, que a pesar de diferir en ciertas propiedades fisiológicas y de conectividad, son similares en muchos aspectos fundamentales (Goslink y col., 1998). Para establecer los co-cultivos, astrocitos son previamente tratados con el péptido de forma aislada y luego de la incubación se lavan para eliminar el Abeta del medio previo cultivo con las neuronas. De esta forma se evita el contacto directo del péptido con las neuronas, y en consecuencia el efecto sobre las células se debería sólo a factores liberados por la astroglia en condiciones de estimulación por el péptido.

8.3.1. Formación de ovillos neurofibrilares ONF

Una característica común de los astrocitos reactivos en este y otros estudios es la adquisición de propiedades neurotóxicas. Los astrocitos son capaces de mantener la supervivencia de neuronas de hipocampo en co-cultivo sin necesidad del agregado exógeno de factores tróficos. Sin embargo, el pre-tratamiento con A β provoca una disminución en el número absoluto de neuronas, y las neuronas remanentes mostraron un escaso desarrollo de la arborización neurítica y formación de ovillos neurofibrilares característicos de la EA al comparar con los cultivos no tratados. El aumento de la hiperfosforilación de tau en las neuronas de hipocampo involucró un mecanismo dependiente de la vía de señalización NGF/p75, ya que la adición de anticuerpos que bloquean tanto NGF como el receptor de baja afinidad previno el fenotipo neurotóxico.

No menos importante resultó ser la influencia del óxido nítrico astrocitario sobre la hiperfosforilación de tau neuronal, capaz de prevenirse parcialmente por el

agregado del inhibidor de la NOS L-NAME (Saez y col., 2004). La expresión de la enzima óxido nítrico sintasa del tipo inducible y neuronal en astrocitos podría ser una fuente de flujos elevados de óxido nítrico que difunda a las neuronas próximas para inducir toxicidad (Murphy y col., 1993; Dawson y col., 1994; Akama y col., 1998; Hu y col., 1998; Stewart y col., 2000). Es conocido que la expresión de iNOS ocurre por todo el cerebro en EA (Smith y col., 1997) y una gran fuente de daño oxidativo es por peroxinitrito (Beckman y Koppenol, 1996). El uso de antioxidantes parece retrasar la demencia en EA (Beckman y Koppenol, 1996), y como la misma se ha visto relacionada con los cambios a nivel celular, no es extraño que el NO esté conectado con los mismos.

Más sorprendente aún resultó el estudio de la expresión de enzimas NOS en las neuronas afectadas por los astrocitos reactivos. A las 48 h encontramos inducción de ambas isoformas (iNOS y nNOS) neuronales productoras de NO, y a las 72 h nNOS continua inducida. Esta fuente de óxido nítrico proveniente de las neuronas resulta muy interesante, ya que traería aparejado un aumento del NO local y sostenido, con lo cual el daño producido por este radical se elevaría potencialmente, relacionado con la formación de nitrotirosina en las neuronas de hipocampo en EA.

Otro dato interesante es la inducción del receptor de baja afinidad para NGF, p75, en neuronas en co-cultivo con astrocitos estimulados con el péptido. Sin embargo, es conocido el hecho que este receptor se induce en condiciones patológicas. Nosotros no hallamos variación en los niveles del receptor de alta afinidad trkA, al igual que lo publicado por Mufson y col. (2002). De todas formas, la inducción de p75 produce una variación del equilibrio que debe existir en

condiciones normales entre ambos receptores, y es esta nueva situación que favorece la presencia de p75 en la neurona la que debe volver vulnerables las neuronas afectadas de ser inducidas hacia una vía de toxicidad, probablemente sin retorno.

8.3.2. Inducción de muerte celular

El precursor pro-NGF de 32 kDa aumenta en estadios de desarrollo embrionario y en situaciones de estrés celular (Yan y Jonson, 1988). El proNGF ha mostrado tener mayor afinidad por el receptor p75^{NTR} que por TrkA, pudiendo entonces inducir apoptosis aún en células que expresan ambos receptores (Lee y col., 2001b). Las neuronas de hipocampo expresan ambos receptores. Adicionalmente, la señalización NGF/p75^{NTR} ha sido ligada a la inducción de apoptosis. En acuerdo con estos estudios, nuestra investigación sugiere que la muerte de neuronas en cultivo inducida por los astrocitos reactivos es mediada por la secreción de proNGF/NGF y la activación de p75^{NTR}, como lo indica el efecto neuroprotector de anticuerpos que bloquean la actividad de NGF o la activación de p75^{NTR}.

Cabe destacar que la inducción de apoptosis por p75 también se relaciona con moléculas que regulan el ciclo celular. Las quinasas dependientes de ciclina (cdks) 4 y 5 fosforilan la proteína retinoblastoma (Rb) y participan en la muerte neuronal por NGF (Park y col., 2000a). Además, la apoptosis por p75 puede bloquearse farmacológicamente con el inhibidor de cdk5 *roscovitina* (Frade, 2000). Este hecho explica nuestro resultado del incremento en la expresión de cdk5 en las neuronas de hipocampo en cocultivo con astrocitos estimulados con A β , dependiente de NGF. Esta quinasa se induciría por NGF y NO astrocitario, y participaría en la muerte neuronal a largo plazo, pero también en la fosforilación de tau.

Existen claras evidencias de la participación del NO en la muerte neuronal que ocurre en EA (Norris y col., 1996; de la Monte y col., 1997, 2000; Lüth y Arendt, 1998; Lüth y col., 2000; Thorns y col., 1998; Yew y col., 1999). En nuestro estudio los efectos neurotóxicos del NO no sólo afectan la hiperfosforilación de tau, sino que también directa o indirectamente están involucrados en la inducción de muerte neuronal, ya que la adición a los cultivos de L-NAME bloquea cierto porcentaje de apoptosis (Saez y col., 2004). Por otro lado, cuando se adiciona sobre co-cultivos de astrocitos estimulados y neuronas de hipocampo L-NAME junto con anticuerpos que bloquean la actividad de NGF, el porcentaje de células que mueren a las 72 h dejan de ser significativos. El mismo resultado se obtiene para la hiperfosforilación de tau, que disminuye a niveles basales cuando ambos factores dejan de actuar. Estos resultados se traducen en la clara participación de NGF y NO tanto en la hiperfosforilación de tau como en la inducción de muerte neuronal mediada por astrocitos reactivos por el A β .

8.4. EL MEDIO DE CULTIVO DE ASTROCITOS REACTIVOS ES INDUCTOR DE TOXICIDAD

Al extraer cuidadosamente el medio condicionado de los astrocitos y aplicarlo directamente sobre neuronas puras en co-cultivo logramos reproducir los resultados de los co-cultivos. Es decir, el medio fue capaz de inducir tanto la hiperfosforilación de tau como la muerte de las neuronas, por mecanismos dependientes de NGF y p75, ya que la inclusión de anticuerpos que bloquean su efecto previene la neurotoxicidad. Este hecho pone en duda si la presencia de astrocitos es estrictamente necesaria para la inducción del mecanismo patogénico por el cual estas células son capaces de

promover desarreglos en el citoesqueleto y muerte de neuronas hipocampales, ya que el medio conteniendo los factores de señalización astrogliales por sí solo es capaz de desencadenar tal fenotipo neurotóxico.

8.5. NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR NGF Y NO.

La aplicación de NGF exógeno fue suficiente para inducir apoptosis sobre astrocitos no estimulados, por un mecanismo dependiente de la señalización por p75^{NTR}. El mecanismo de muerte inducido por el NGF involucra la activación de caspasas, como lo observamos mediante la adición de los inhibidores de esta vía. El NGF parece actuar directamente en los receptores p75 de las neuronas pues no tiene efectos sobre la supervivencia neuronal cuando se aplica únicamente a los astrocitos. Por otro lado, la muerte inducida por NGF fue prevenida por inhibidores de la NOS; sugiriendo un mecanismo mediante el cual la señalización por NGF/p75^{NTR} y las especies reactivas derivadas del óxido nítrico interactúan de manera crítica para inducir la apoptosis de neuronas. Esta observación es novedosa pues hasta el presente no se ha reportado un efecto regulatorio del óxido nítrico sobre la activación del receptor p75. Así, hemos sido capaces de inducir la expresión de p75 en neuronas de hipocampo al adicionar exógenamente NO y NGF, sin cambio en los niveles del receptor trkA. Pero la adición de ambos compuestos también es capaz de desregular las enzimas responsables de un aumento de NO a nivel local, iNOS y nNOS neuronales, por lo que se infiere que los flujos de NO deben ser necesariamente elevados en la neurona, produciendo no sólo los daños característicos documentados, sino más interesante aún, la regulación (o desregulación) de diversas cascadas intracelulares. Interesantemente, NOC y NGF adicionados por separado sobre las

neuronas también son importantes inductores de la expresión de mRNA y proteína para las isoformas de NOS, aumentan la expresión de p75 así como la hiperfosforilación de la proteína tau, y son capaces de producir cierto porcentaje de muerte neuronal a las 48 h de cultivo.

Las vías de señalización de la apoptosis inducida por p75^{NTR} son relativamente poco conocidas. El p75 puede activar caspasas a través de la activación de la quinasa JNK (Casaccia-Bonofil y col., 1998; Hempstead, 2002) o aumentar la producción de ceramidas por activación de la esfingomilelinasa, comprometiendo entonces la funcionalidad mitocondrial (Dobrowsky y col., 1994; Casaccia-Bonofil y col., 1998). Si bien el estudio de la interacción funcional del óxido nítrico con la señalización de p75^{NTR} es motivo de una investigación en curso en el laboratorio de Barbeito, postulamos que el óxido nítrico (astrocitario o neuronal) o bien el peroxinitrito, modulan críticamente la vulnerabilidad de las neuronas de hipocampo a la señalización pro-apoptótica del receptor p75, probablemente actuando a nivel mitocondrial.

Por otro lado, hemos visto que la formación endógena de NO en astrocitos incluye sobre la hiperfosforilación de tau y la inducción de muerte neuronal. Lo mismo se obtiene al adicionar NO exógenamente a concentraciones relevantes fisiológicamente que no afectan la viabilidad neuronal.

En cuanto a las vías que se inducen, una posibilidad es que el NO influya a corto plazo sobre los sistemas de proteínas quinasas tales como cdk5/p35 y GSK3 β , directa o indirectamente, tal vez a través de la vía p75/NGF. Es conocido el hecho que el NGF es capaz de inducir la expresión de cdk5, y probablemente el NO

colabore con la activación anormal de este complejo enzimático responsable de los cambios observados en los patrones de fosforilación de la proteína tau. Por ejemplo, se conoce que en células de Purkinje el NO es capaz de inhibir la enzima PP2A (Endo y cols., 1999), Ser/Thr fosfatasa que desfosforila tau, esto contribuiría al aumento de tau en su forma hiperfosforilada. Además, la vía p75 activa Rac (Harrington y cols, 2002), que también está implicada en la activación de cdk5. La presencia de cantidades anormales de NO podría también tener un efecto a largo plazo, sensibilizando la neurona a la apoptosis inducida por p75, y ejerciendo un estrés celular que incrementa la vulnerabilidad al NGF/proNGF, por ejemplo aumentando la expresión de p75, de proteínas adaptadoras (Pehar y cols, 2004), o variando el balance entre p75 y trkA.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran la posible existencia de un mecanismo patogénico mediado por la producción de NGF/pro-NGF y óxido nítrico por parte de los astrocitos. Además pone de manifiesto un posible mecanismo mediante el cual los astrocitos reactivos pueden contribuir a la selección de neuronas de hipocampo. Al censar señales de daño, una neurona puede liberar factores capaces de inducir cambios fenotípicos reactivos en los astrocitos circundantes. Esto provocaría un aumento en la síntesis y liberación de NGF/pro-NGF y óxido nítrico por parte de los astrocitos. A su vez, las neuronas estresadas re-expresarían durante este período el receptor p75^{NTR}, volviéndose vulnerables al efecto pro-apoptótico del NGF. De esta manera se generaría un círculo vicioso que podría explicar el fenómeno progresivo de la EA. Sin embargo, parece ser la excepción y no la regla, que una respuesta al estrés celular desencadene un mecanismo progresivo de degeneración. De alguna manera, en condiciones normales los cambios observados

en astrocitos y neuronas son reversibles y estrictamente controlados para evitar un fenómeno patogénico progresivo. En enfermedades neurodegenerativas como la EA este mecanismo de control parece encontrarse alterado.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo mostramos un mecanismo mediante el cual la astrocitosis reactiva, secretando NGF/pro-NGF y óxido nítrico, puede participar en la selección neuronal durante un proceso patológico. Empleando como modelo de estudio el cocultivo de astrocitos y neuronas hipocampales hemos mostrado que el A β es capaz de desencadenar una reacción astrocitaria similar a la observada *in vivo*, que resulta neurotóxica para neuronas. La neurotoxicidad es mediada por la producción y secreción simultánea de NGF/pro-NGF y NO por parte de los astrocitos reactivos, y está caracterizada por la inducción de la hiperfosforilación de tau y muerte por apoptosis de la neurona. Por otra parte, mostramos que los astrocitos reactivos observados en los hipocampos de ratones APP Tg2576 sintomáticos aumentan la expresión de NGF, coincidiendo con astrocitos reactivos marcados para GFAP. En conjunto, estos resultados permiten sugerir un potencial papel del NGF/pro-NGF secretado por los astrocitos reactivos en la inducción de hiperfosforilación de tau y muerte neuronal observada en EA, donde el NO astrocitario parece tener un papel modulador.

Nuestros hallazgos son suficientemente novedosos como para generar nuevas preguntas acerca de los mecanismos desencadenantes y reguladores de la

neurotoxicidad de neuronas de hipocampo. Por ejemplo, ¿cuál es el mecanismo mediante el cual la señalización por NGF/p75^{NTR} y las especies reactivas derivadas del óxido nítrico interactúan para inducir por un lado la hiperfosforilación de tau y por otro la apoptosis?; ¿cuál es el papel de las formas precursoras del NGF en la inducción de los sistemas quinasa responsables de fosforilar tau, así como de la muerte neuronal?.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abramov, A.Y., Canevari, L., Duchen, M.R. 2004. Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta*. 1742(1-3): 81-7.

Akama, K.T., Albanese, C., Pestell, R.G., Van Eldik, L.J. 1998. Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(10): 5795-800.

Akiyama, H., Ikeda, K., Kondo, H., Kato, M., McGeer, P.L. 1993. Microglia express the type 2 plasminogen activator inhibitor in the brain of control subjects and patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 164: 233-5.

Alvarez, A., Toro, R., Caceres, A., Maccioni, R.B. 1999. Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett*. 459(3): 421-6.

Alvarez, A., Muñoz, J.P., Maccioni, R.B. 2001. A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res*. 264(2): 266-74.

Andreasen, N., Hesse, C., Davidsson, P., Minthon, L., Wallin, A., Winblad, B., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., Blennow, K. 1999. Cerebrospinal fluid beta-amyloid (1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch. Neurol*. 56(6): 655-656.

Apelt, J., Schielbs, R. 2001. Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res*. 894(1): 21-30.

Appel, S.H. 1981. A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, Parkinsonism and Alzheimer's disease. *Ann. Neurol*. 10: 499-505.

Arias, C., Arrieta, I., Tapia, R. 1995. b-amiloid peptide fragment 25-35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory aminoacids from depolarized hippocampal slices. *J. Neurosci. Res*. 41: 561-566.

Arias, C., Montiel, T., Quiroz-Baez, R., Massieu, L. 2002. beta-Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 176(1): 163-74.

Arendt, T., Holzer, M., Grossmann, A., Zedlick, D., Bruckner, M.K. 1995. Increased expression and subcellular translocation of the mitogen activated protein kinase kinase and mitogen-activated protein kinase in Alzheimer's disease.

Neuroscience. 68(1): 5-18.

Ariga, T., Yu, R. 1999. GM1 inhibits amyloid beta-protein-induced cytokine release. *Neurochem. Res.* 24: 219-226.

Armstrong, D.M., Brady, R., Hersh, L.B., Hayes, R.C., Wiley, R.G. 1991. Expression of choline acetyltransferase and nerve growth factor receptor within hypoglossal motoneurons following nerve injury. *J. Comp. Neurol.* 304: 596-607.

Bach, J.H., Chae, H.S., Rah, J.C., Lee, M.W., Park, C.H., Choi, S.H., Choi, J.K., Lee, S.H., Kim, Y.S., Kim, K.Y., Lee, W.B., Suh, Y.H., Kim, S.S. 2001. C-terminal fragment of amyloid precursor protein induces astrocytosis. *J Neurochem.* 78: 109-20.

Baeuerle, P., Henkel, T. 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu.Rev. Immunol.* 12: 141-179.

Banker, G., Cowan, W. 1977. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* 126: 397-42.

Banker, G.A. 1980. Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* 209(4458): 809-810.

Barker, P.A., Shooter, E.M. 1994. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron.* 13 (1): 203-15.

Barrett, G.L., Georgiou, A., Reid, K., Barlett, P.F., Leung, D. 1998. Rescue of dorsal root sensory neurons by NGF and NT-3, but not BDNF or NT-4, is dependent on the level of the p75 neurotrophin receptor. *Neuroscience* 85 (4): 1321-1328.

Baskys, A., Adamchik, Y. 2001. Neuroprotective effects of extracellular glutamate are absent in hippocampal organotypic cultures treated with the amyloid peptide Abeta (25-35). *Brain Res.* 907(1-2): 188-94.

Beckman, J.S., Koppenol, W.H. 1996. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am. J. Physiol.* 271: c1424-37.

Benson, D.L., Watkins F.H., Steward, O., Banker, G. 1994. Characterization of GABAergic neurons in hippocampal neurons in hippocampal cell cultures. *J. Neurocytol.* 23: 279-295.

Benzi, G., Moretti, A. 1995. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* 16: 661-674.

Berg, L., McKeel, D.W Jr., Miller, J.P., Storandt, M., Rubin, E.H., Morris, J.C., Baty, J., Coats, M., Norton, J., Goate, A.M., Price, J.L., Gearing, M., Mirra, S.S., Saunders, A.M. 1998. Clinicopathologic studies in cognitively healthy aging and Alzheimer's disease: relation of histologic markers to dementia severity, age, sex, and apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol.* 55(3): 326-35.

Bezzi, P., Volterra, A. 2001. A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11(3): 387-394.

Bibel, M., Barde, Y. 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 14: 2919-2937.

Boissiere, F., Faucheux, B., Ruberg, M., Agid, Y., Hirsch, E.C. 1997. Decreased TrkA gene expression in cholinergic neurons of the striatum and basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 145(1): 245-252.

Bolaños, J.P., Heales, S.J.R., Land, J.M., Clark, J.B. 1995. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary cultures. *J Neurochem.* 64: 1965-1972.

Brandt, R., Leger, J., Lee, G. 1995. Interaction of tau with the neuronal plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131(5): 1327-1340.

Bruckner, S.R., Tommarinello, S.P., Kuan, C.Y., Flavell, R.A., Rakic, P., Estus, S. 2001. JNK3 contributes to c-jun activation and apoptosis but not oxidative stress in NGF-deprived sympathetic neurons. *J. Neurochem.* 78 (2): 298-303.

Buck, C.R., Martinez, H.J., Black, I.B., Chao, M.V. 1987. Developmentally regulated expression of the nerve growth factor receptor gene in the periphery and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84 (9): 3060-3.

Capote, C., Maccioni, R.B. 1998. The association of tau-like proteins with vimentin filaments in cultured cells. *Exp Cell Res* 239: 202-13.

Carroll, P., Sendtner, M., Meyer, M., Thoenen, H. 1993. Rat Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF): gene structure and regulation of mRNA levels in glial cell cultures. *Glia* 9 (3): 176-187.

Carter, B.D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhauser, N., Bohm-Matthaei, R., Baeuerle, P.A., Barde, Y.A. 1996. Selective activation of NF- κ B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science.* 272: 542-545.

Casaccia-Bonnel, P., Kong, H., Chao, M.V. 1998. Neurotrophins: the biological paradox of survival factors eliciting apoptosis. *Cell Death Differ.* 5: 346-356.

Casha, S., Yu, W.R., Fehlings, M.G. 2001. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 103: 203-218.

Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein J.B., Lynn, B., Markesbery, W.R., Butterfield, D.A. 2003. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.* 85(6): 1394-401.

Castillo-Díaz, L., de la Cuétara-Bernal, K., García-Varona, A.Y. 2005. Marrow stromal cells cultured in N2-supplemented medium: implications on the generation of neural cells. *Rev. Neurol.* 40(2): 69-73.

Chao, C.C., Hu, S., Sheng, W.S., Bu, D., Bukrinsky, M.I., Peterson, P.K. 1996. Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia* 16: 276-84.

Chen, Y., Dicou, E., Djakiew, D. 1997a. Characterization of nerve growth factor precursor expression in rat spermatids and the trophic effects of nerve growth factor in the maintenance of Sertoli cell viability. *Mol. Cell. Biol.* 111: 2851-2859.

Cheema, J.S., Barret, G.L., Barlett, P.F. 1996. Reducing p75 NGF receptor levels using antisense oligonucleotides prevents the loss of axotomized sensory neurons in the dorsal root ganglia of newborn rats. *Neurosci. Res.* 46 (2): 239-45.

Cheng, B., McMahon, D.G., Mattson, M.P. 1993. Modulation of Ca²⁺ current, intracellular calcium levels and cell survival by glucose deprivation and growth factors in hippocampal neurons. *Brain Res.* 607 (1-2): 255-285.

Cherny, R.A., Legg, J.T., McLean, C.A., Fairlie, D.P., Huang, X., Atwood, C.S., Beyreuther, K., Tanzi, R.E., Masters, C.L., Bush, A.I. 1999. Aqueous dissolution of Alzheimer's disease A β amyloid deposits by biometal depletion. *Journal of Biological Chemistry.* 274(33): 23223-23228.

Chu, Y., Cochran, E.J., Bennett, D.A., Mufson, E.J., Kordower, J.H. 2001. Down-regulation of *trkA* mRNA within nucleus basalis neurons in individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol.* 437 (3): 296-307.

Cirrito, J.R., May, P.C., O'Dell, M.A., Taylor, J.W., Parsadanian, M., Cramer, J.W., Audia, J.E., Nissen, J.S., Bales, K.R., Paul, S.M., DeMattos, R.B., Holtzman, D.M. In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid- β metabolism and half-life. 2003. *The journal of Neurosci.* 23(26): 8844-8853.

Cohen-Cory, S., Preyfus, C.F., Black, I.B. 1991. NGF and excitatory neurotransmitters regulate survival and morphogenesis of cultures cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 11 (2): 462-471.

Connor, B., Young, D., Lawlor, P., y cols. 1996. Trk receptor alterations in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 42: 1-17.

Coughlan, C. y Breen, K. 2000. Factors influencing the processing and function of the amyloid beta precursor protein-a potential therapeutic target in Alzheimers disease? *Pharmacol. Ther.* 86: 111-145.

Coyle, J.T., Price, D.L., DeLong, M.R. 1983. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science.* 219 (4589): 1184-90.

Cross, D., Vial, C., Maccioni, R.B. 1993. A tau-like protein interacts with stress fibers and microtubules in human and rodent cultured cell lines. *J Cell Sci* 105: 51-60.

Cross, D., Tapia, L., Garrido, J., Maccioni, R.B. 1996. Tau-like proteins associated with centrosomes in cultured cells. *Exp Cell Res.* 229 (2): 378-87.

Crutcher, K.A., Scott, S.A., Liang, S., Everson, W.V., Weingartner, J. 1993. Detection of NGF-like activity in human brain tissue: increased levels in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 13: 2540-50.

Cummings, B.J., Pike, C.J., Shankle, R., Cotman, C.W. 1996. Beta-amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 17 (6): 921-33.

Cummings, J.L., Vinters, H.V., Cole, G.M., Khachaturian, Z.S. 1998. Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology.* 51 (1 Suppl 1): S2-17; discussion S65-7.

Cunningham, M.E., Stephens, R.M., Kaplan, D.R., Greene, L.A. 1997. Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth receptor. *J. Biol. Chem.* 272 (16): 10957-10967.

Currie, D.N., Kelly, J.S. 1981. Glial versus neuronal uptake of glutamate. *J. Exp. Biol.* 95: 181-193.

Dawson, V.L., Brahmabhatt, H.P., Mong, J.S., Dawson, T.M. 1994. Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glia cortical cultures. *Neuropharmacol.* 33: 1425-30.

Dawson, T.M., Sasaki, M., Gonzalez-Zulueta, M., Dawson, V.L. 1998. Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signalling pathways. in neurodegeneration. *Prog. Brain Res.* 118: 3-11.

Deckel, A.W. 2001. Nitric oxide and nitric oxide synthase in Huntington's disease. *J.Neurosci.Res.* 64(2): 99-107.

de Freitas, M.F., McQuillen, P.S., Shatz, C.J. 2001. A novel p75 NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical

subplate neurons. *J. Neurosci.* 21: 5121-5129.

Delacourte, A., Buée, L., David, J-P. 1998. Lack of continuum between cerebral aging and Alzheimer's disease as revealed by PHF-tau and A β biochemistry. *Alzheimers Rep* 1: 101-110.

de la Monte, S.M., Bloch, K.D. 1997. Aberrant expression of the constitutive endothelial nitric oxide synthase gene in Alzheimer's disease. *Mol. Chem. Neuropathol.* 30: 139-159.

de la Monte, S.M., Lu, B.X, Sohn, Y.K., Etienne, D., Kraft, J., Ganju, N., Wands, J.R. 2000. Aberrant expression of nitric oxide synthase III in Alzheimer's disease: relevance to cerebral vasculopathy and neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* 21: 309-319.

de la Monte, S.M., Chiche, J., von dem Bussche, A., Sonyal, S., Lahousse, S.A., Janssens, S.P., Bloch, K.D. 2003. NOS-3 overexpression causes apoptosis and impairs neuronal mitochondria function: relevance to Alzheimer's type neurodegeneration. *Lab. Invest.* 83 (2): 287-98.

del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Palma, J.M. y cols. 1992. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biol Med.* 13: 557-580.

Dickson, D.W., Crystal, H.A., Bevona, C., Honer, W., Vincent, I., Davies, P. 1995. Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiol Aging.* 16 (3): 285-98.

Dickson, D.W. 1997. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol Aging.* 18 (4 Suppl): S21-6.

Dobrowsky, R.T., Werner, M.H., Castellino, A.M., Chao, M.V., Hannun Y.A. 1994. Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science.* 265: 1596-1599.

Dowling, P., Ming, X., Raval, S., Husar, W., Casaccia-Bonnel, P., Chao, M., Cook, S., Blumberg, B. 1999. Up-regulated p75NTR neurotrophin receptor on glial cells in MS plaques. *Neurology* 53: 1676-1682.

Dubus, P., Faucheux, B., Boissiere, F., Groppi, A., Vital, C., Vital, A., Agid, Y., Hirsch, E.C., Merlio, J.P. 2000. Expression of Trk isoforms in brain regions and in the striatum of patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 165 (2): 285-94.

Eddleston, M., Mucke, L. 1993. Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience.* 54(1):15-36.

Endo, S., Suzuki, M., Sumi, M., Nairn, A.C., Morita, R., Yamakawa, K., Greengard, P., Ito, M. 1999. Molecular identification of human G-substrate, a possible downstream component of the GMP-dependent protein kinase cascade in cerebellar Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad Sci.* 96 (5): 2467-72.

Ernfors, P., Henschen, A., Olson, L., Persson, H. 1989. Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron* 2: 1605-13.

Ernfors, P., Lindfors, N., Chan-Palay, V., Persson, H. 1990. Cholinergic neurons of the nucleus basalis express elevated levels of nerve growth factor receptor mRNA in senile dementia of the Alzheimer type. *Dementia.* 1: 138-145.

Estévez, A.G., Crow, J.P., Sampson, J.B., Reiter, C., Zhuang, Y.,

Richardson, G.J., Tarpey, M.M., Barbeito, L., Beckman, J.S. 1999. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science* 286: 2498-2500.

Fabrizi, C., Businaro, R., Lauro, G.M., Starace, G., Fumagalli, L. 1999. Activated alpha2 macroglobulin increases beta-amyloid (25-35)-induced toxicity in LAN5 human neuroblastoma cells. *Exp Neurol*. 155 (2): 252-9.

Fagan, A.M., Garber, M., Barbacid, M., Silos-Santiago, I., Holtzman, D.M. 1997. A role for TrkA during maturation of striatal and basal forebrain cholinergic neurons in vivo. *J Neurosci* 17 (20): 7644-54.

Fahnestock, M., Scott, S.A., Jette, N., Weingartner, J.A., Crutcher, K.A. 1996. Nerve growth factor mRNA and protein levels measured in the same tissue from normal and Alzheimer's disease parietal cortex. *Brain Res Mol Brain Res*. 42 (1): 175-8.

Fahnestock, M., Michalski, B., Xu, B., Conghlim, M. 2001. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Molecular & Cellular Neuroscience* 18: 210-220.

Fariás, G.A., Muñoz, J.P., Garrido, J., Maccioni, R.B. 2002. Tubulin, actin and tau protein interactions and the study of their molecular assemblies. *J. Cell Biochem*. 85 (2): 315-324.

Fawcett, J.W., Asher, R.A. 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res.Bull*. 49 (6): 377-391.

Felder, C.C., Ma, A.L., Briley, E.M., Axelrod, J. 1993. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes associated with release of Alzheimer amyloid precursor derivatives activates multiple signal transduction pathways. *Ann NY Acad. Sci*. 695: 15-18.

Ferri, C.C., Moore, F.A., Bisby, M.A. 1998. Effects of facial nerve injury on mouse motoneurons lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor. *J. Neurobiol*. 34 (1): 1-9.

Ferri, C.C., Bisby, M.A. 1999. Improved survival of injured sciatic nerve Schwann cells in mice lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor. *Neurosci Lett*. 273 (3): 191-194.

Fontana, A., Fierz, W., Wekwrlw, H. 1984. Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature* 307 (5948): 237-246.

Förstermann, U., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E.I., Kleinert, H. 1995. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol*. 50: 1321-1332.

Förstermann, U., Kleinert, H. 1995. Nitric oxide synthase expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 352: 351-364.

Frade, J.M., Barde, Y.A. 1999. Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development* 126: 683-90.

Frade, J.M. 2000. Unscheduled re-entry into the cell cycle induced by NGF precedes cell death in nascent retinal neurones. *J Cell Sci*. 113 (Pt 7): 1139-48.

Friedman, W.J. 2000. Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci*. 20 (17): 6340-6.

Funato, H., Yoshimura, M., Kussoi, K., Tamaoka, A., Ishikawa, K., Ohkoshi, N., Namekata, K., Okeda, R., Ihara, Y. 1998. Quantitation of amyloid beta-protein (A-beta) in the cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 152: 1633-1640.

Galeazzi, L., Corder, E.H., Galeazz, R., Casoli, T., Valli, M.B., Giunta, S. 2002. In vitro apolipoprotein E protects human red blood cells against lysis induced by amyloid-beta (AP) fragment 25-35. *Amyloid.* 9 (2): 103-7.

Gall, C.M., Isackson, P.J. 1989. Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science (Wash. DC)*.245:758-761.

Gall, C., Murray, K., Isackson, P.J. 1991. Kainic acid-induced seizures stimulate increased expression of nerve growth factor mRNA in rat hippocampus. *Mol Brain Res* 9: 113-23.

Garcia-Nogales, P., Almeida, A., Fernandez, E., Medina, J.M., Bolanos, J.P. 1999. Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to prevent nitric oxide-mediated glutathione depletion in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* 72 (4): 1750-8.

Gärtner, U., Holzer, M., Heumann, R., Arendt, T. 1995. Induction of p21 ras in Alzheimer's pathology. *Neuroreport* 6: 1313-1316.

Gärtner, U., Holzer, M., Arendt, T. 1999. Elevated expression of p21 ras is an early event in Alzheimer's disease and precedes neurofibrillary degeneration. *Neuroscience* 91: 1-5.

Georganopoulou, N., McLaughlin, M., McFarlane, I., Breen, K. 2001. The role of post-translational modification in beta-amyloid precursor protein processing. *Biochem. Soc. Sym.* 67: 23-36.

Gnahn, H., Hefti, F., Heumann, R., Schwab, M.E., Thoenen, H. 1983. NGF-mediated increase of choline acetyltransferase (ChAT) in the neonatal rat forebrain: evidence for a physiological role of NGF in the brain. *Dev Brain Res* 9: 42-52.

Goedert, M. 2001. Alpha-synuclein and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2(7): 492-501.

Goldstein, G.W. 1988. Endothelial cell-astrocyte interactions. A cellular model of the blood-brain barrier. *Ann NY Acad Sci.* 529: 31-39.

Goldman, S.E., Abranson, B. 1990. Cyclic AMP-induced shape changes of astrocytes are accompanied by rapid depolymerization of actin. *Brain Res.* 528 (2): 189-196.

Gonzalez, C., Farías, G., Maccioni, R.B. 1998. Modification of tau to an Alzheimer's type protein interferes with its interaction with microtubules. *Cell Mol. Biol.* 44 (7): 1117-1127.

Goslin, K., Banker, G. 1991. Rat hippocampal neurons in low density culture. In: *culturing nerve cells* (Banker, G., Goslin, K., eds), pp 251-282. Cambridge, MA:MIT.

Goslin, K., Asmussen, H., Banker, G. 1998. *Culturing nerve cells.* Massachusetts Institute of Technology. Cambridge, Massachusetts. pp339-369.

Gravina, S.A., Ho, L., Eckman, C.B., Long, K.E., Otvos, L., Younkin, L.H., Suzuki, N., Younkin, S.G. 1995. Amyloid β protein (A β) in Alzheimer's disease brain. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 7013-7016.

Gu, C., Cassacia-Bonnet, P., Srinivasan, A., Chao, M. 1999.

- Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation *J. Neurosci* 19: 3043-3049.
- Hagg, T., Fass-Holmes, B., Vahlsing, H.L., Manthorpe, M., Conner, J.M., Varon, S. 1989. Nerve growth factor (NGF) reverses axotomy-induced decreases in choline acetyltransferase, NGF receptor and size of medial septum cholinergic neurons. *Brain Res.* 505: 29-38. and Alzheimer's disease.
- Hamanoue, M., Middleton, G., Wyatt, S., Jaffray, E., Hay, R.T., Davies, A.M. 1999. p75-mediated NF-kB activation enhances the survival response of developing sensor neurons to nerve growth factor. *Mol. Cell. Neurosci.* 14: 28-40.
- Harding, T.C., Xue, L., Bienenmann, A., Haywood, D., Dickens, M., Tolkovsky, A.M., Uney, J.B. 2001. Inhibition of JNK by overexpression of the JNL binding domain of JIP-1 prevents apoptosis in Sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* 276 (7): 4531-4.
- Harper, J.D., Wong, S.S., Lieber, C.M., Lansbury, P.T. 1999. Assembly of A beta amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. *Biochem* 38: 8972-8980.
- Harrington, A.W., Kim, J.Y., Yoon, S.O. 2002. Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *The Journal of Neuroscience* 22 (1): 156-166.
- Harrington, A.W., Leiner, B., Blechschmitt, C., Arevalo, J.C., Lee, R., Mörl, K., Meyer, M., Hempstead, B.L., Yoon, S.O., Giehl, K.M. 2004. Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 16:6226-6230.
- Harris, M.E., Wang, Y., Pedigo, N.W. Jr., Hensley, K., Butterfield, D.A., Carney, J.M. 1996. Amyloid beta peptide (25-35) inhibits Na⁺-dependent glutamate uptake in rat hippocampal astrocyte cultures. *J Neurochem.* 67 (1): 277-86.
- Harrison, D.G., Sayegh, H., Ohara, Y., Inoune, N., Venema, R.C. 1996. Regulation of expression of endothelial cell nitric oxide synthase. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23: 251-255.
- Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F., Chao, M.V. 1991. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature.* 350(6320):678-83.
- Hempstead, B.L. 2002. The many faces of p75NTR. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12: 260-267.
- Heneka, M.T., Wiesinger, H., Dumitrescu-Ozimek, L., Riederer, P., Feinstein, D.L., Klockgether, T. 2001. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60 (9): 906-16.
- Heymach, J.V. Jr., Shooter, E.M. 1995. The biosynthesis of neurotrophin heterodimers by transfected mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270 (20): 12297-12307.
- Higgins, G.A., Koh, S., Chen, K.S., Gage, F.H. 1989. NGF induction of NGF receptor gene expression and cholinergic neuronal hypertrophy within the basal forebrain of the adult rat. *Neuron* 3: 247-256.
- Hock, C., Heese, K., Muller-Spahn, F., Hulette, C., Rosenberg, C., Otten, U. 1998. Decreased trkA neurotrophin receptor expression in the parietal cortex

of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 241 (2-3): 151-4.

Hock, C.H., Heese, K., Olivieri, G., Hulette, C.H., Rosenberg, C., Nitsch, R.M., Otten, U. 2000. Alterations in neurotrophins and neurotrophin receptors in Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl.* 59: 171-174.

Hock, C., Heese, K., Müller-Spahn, F., Huber, P., Riesen, W., Nitsch, R.M., Otten, U. 2000b. Increased CFS levels of nerve growth factor in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 54: 2009-2011.

Hof, P.R., Glezer, I.I., Conde, F., Flagg, R.A., Rubin, M.B., Nimchinsky, E.A., Vogt Weisenhorn, D.M. 1999. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat.* 16 (2): 77-116.

Holtzman, D.M., Li, Y., Parada, L.F., Kinsman, S., Chen, C.K., Valletta, J.S., Zhou, J., Long, J.B., Mobley, W.C. 1992. p140trk mRNA marks NGF-responsive forebrain neurons: evidence that trk gene expression is induced by NGF. *Neuron.* 9 (3): 465-78.

Holtzman, D., Fagan, A., MacKey, B., Tenkova, T., Sartorius, L., Paul, S., Bales, K., Ashe, K., Irizarry, M., Hyman, B. 2000. Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. *Ann. Neurol* 47: 739-747.

Homayouni, R., Curran, T. 2000. Cortical development: cdk5 gets into sticky situations. *Curr. Biol.* 10 (9): R331-334.

Hrabie, J.A., Klose, J.R., Wink, D.A., Keefer, L.K. 1993. New Nitric Oxide-Releasing Zwitterions Derived from Polyamines. *J Org. Chem.* 58: 1472-1476.

Hu, X.Y., Zhang, H.Y., Qin, S., Xu, H., Swaab, D.F., Zhou, J.N. 2002. Increased p75(NTR) expression in hippocampal neurons containing hyperphosphorylated tau in Alzheimer patients. *Exp Neurol.* 178 (1): 104-11.

Hyman, B.T., Marzloff, K., Arriagada, P.V. 1993. The lack of accumulation of senile plaques or amyloid burden in Alzheimer's disease suggests a dynamic balance between amyloid deposition and resolution. *J Neuropathol Exp Neurol.* 52 (6): 594-600.

Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y.A., Juhasz, M., Yancopoulos, G.D., Squinto, S.P., Lindsay, R.M. 1991. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature.* 350 (6315): 230-2.

Ignarro, L., Byrns, R.E., Buga, G.M., Wood, K.S. 1987. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those for nitric oxide radical. *Circ Res.* 61: 866-879.

Isaacson, J.S., Nicoll, R.A. 1991. Aniracetan reduces glutamate receptor desensitization and shows the decay fast excitatory synaptic currents in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88(23): 10936-10940.

Jing, S., Tapley, P., Barbacid, M. 1992. Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 9: 1067-1079.

Johnston, M., Gearing, A., Miller, K. 1999. A central role for astrocytes in the inflammatory response to β -amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *Journal of Neuroimmunology* 93: 182-193.

Kang J., Jiang, L., Goldman, S., Nedergaard, M. 1998. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* (8): 683-92.

- Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V., Parada, L.F. 1991. The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*. 252 (5005): 554-8.
- Kaplan, D.R., Miller, F.D. 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10: 381-391.
- Kato, M., Saito, H., Abe, K. 1997. Nanomolar amyloid beta protein-induced inhibition of cellular redox activity in cultured astrocytes. *J Neurochem* 68 (5): 1889-1895.
- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C., Murad, F. 1977. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res.* 3(1): 23-35.
- Kesavapany, S., Li, B.S., Pant, H.C. 2003. Cyclin-dependent kinase 5 in neurofilament function and regulation. *Neurosignals* 12 (4-5): 252-264.
- Kilt, C.A., Price, D.L., Struble, R.G., Cork, L.C., Wainer, B.H., Becher, M.W., Mobley, W.C. 1984. Evidence for cholinergic neurites in senile plaques. *Science*. 226 (4681): 1443-1445.
- Kim, H.T., Russel, R.L., Raina, A.K., Harris, P.L., Siedlak, S.L., Khu, X., Petersen, R.B., Shimihama, S., Smith, M.A., Peryy, G. 2000. Protein disulfide isomerase in Alzheimer's disease. *Antiox. Redox. Signal* 2 (3): 485-489.
- Kim, H.J., Lee, W.H., Yoon, C.H., Jeong, J.C., Nam, K.S., Kim, H.M., Choo, Y.K., Lee, M.C., Kim, C.H. 2001. Bombycis corpus extract prevents amyloid-beta-induced cytotoxicity and protects superoxide dismutase activity in cultured rat astrocytes. *Pharmacol Res.* 43 (1): 11-6.
- Kim, H.J., Chae, S.C., Lee, D.K., Chromy, B., Lee, S.C., Park, Y.C., Klein, W.L., Kraft, G.A., Hong, S.T. 2003. Selective neuronal degeneration induced by soluble ligomeric amyloid beta protein. *FASEB J.* 17:118-120.
- Klegeris, A., Walker, D., Mc Geer, P. 1994. Activation of macrophages by Alzheimer beta amyloid peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 984-991.
- Klegeris, A., McGeer, P. 1997. beta-amyloid protein enhances macrophage production of oxygen free radicals and glutamate. *J. Neurosci. Res.* 49: 229-235.
- Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., Barbacid, M. 1991. The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell.* 65 (1): 189-97.
- Kleppisch, T., Pfeifer, A., Klatt, P., Ruth, P., Montkowski, A., Fässler, R., Hofmann, F. 1999. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking the cGMP-dependent protein kinase is normal and susceptible to inhibition of NO synthase. *J. Neuroscience* 19: 48-55.
- Kogner, P., Barbary, G., Dominici, C., Castello, M.A., Raschella, G., Persson, H. 1993. Coexpression of mRNA for *trk* proto-oncogene and low affinity NGF receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res.* 53 (9): 2044-2050.
- Koh, S., Oyler, G.A., Higgins, G.A., 1989. Localization of nerve growth factor receptor messenger RNA and protein in the adult rat brain. *Exp. Neurol.* 106: 209-221.
- Kojima, M., Ikeuchi, T., Hatanaka, H. 1994. Nerve growth factor induces

trkA mRNA expression in cultured basal forebrain cholinergic neurons from 17-day fetal rats. *Neurosci. Lett.* 169: 47-50.

Kojima, M., Ikeuchi, T., Hatanaka, H. 1995. Role of nerve growth factor in the expression of trkA mRNA in cultured embryonic rat basal forebrain cholinergic neurons. *J. Neurosci. Res.* 42: 775-783.

Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Bakalis, S., Neve, R.L. 1989. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron.* 2(4):1389-97.

Kume, T., Nishikawa, H., Tomioka, H., Katsuki, H., Akaike, A., Kaneko, S., Maeda, T., Kihara, T., Shimohama, S. 2000. p75-mediated neuroprotection by NGF against glutamate cytotoxicity in cortical cultures. *Brain Res.* 852: 279-289.

Kuner, P., Schubnel, R., Hertel, C. 1998. Beta-amyloid binds to p75NTR and activates NfkappaB in human neuroblastoma cells. *J. Neurosci Res.* 54: 798-804.

Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T.C., Kirkpatrick, J.B., Murdoch, G.H., Ball, M.J., Roher, A.E. 1996. Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* 271 (8): 4077-81.

Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Bisgaier, C.L., Essenburg, A.D., Lampert, H.C., Drumm, D., Roher, A.E. 1998. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun.* 252 (3): 711-715.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lander, H.M., Ogiste, J.S., Pearce, S.F.A., Levi, R., Novogrodsky, A. 1995. Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21 ras. *J. Biol. Chem.* 270: 7017-7020.

Large, T.H., Bodary, S.C., Clegg, D.O., Weskamp, G., Otten, U., Reichardt, L.F. 1986. Nerve growth factor gene expression in the developing rat brain. *Science.* 234 (4774): 352-355.

Lee, R., Kermani, P., Teng, K., Hempstead, B. 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294:1945-48.

Leeds, P., Leng, Y., Chalecka-Frandszek, E., Chuang, D.M. 2005. Neurotrophins protect against cytosine arabinoside-induced apoptosis of immature rat cerebellar neurons. *Neurochem Int.* 46(1): 61-72.

Lev-Ram, V., Jiang, T., Wood, J., Lawrence, D.S., Tsien, R.Y. 1997. Synergies and coincidence requirements between NO, cGMP, and Ca²⁺ in the induction of cerebellar long term depression. *Neuron* 18: 1025-1038.

Levi-Montalcini, R., Skaper, S., Dal Toso, R., Petrelli, L. 1996. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokin. *Trends Neurosci* 19:514-20.

Lewin, G.R., Barde, Y.A. 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 289-317.

Li, Y., Holtzman, D.M., Kromer, L.F., Kaplan, D.R., Chua-Couzens, J., Clary, D.O., Knusel, B., Mobley, W.C. 1995. Regulation of TrkA and ChAT expression in developing rat basal forebrain: evidence that both exogenous and endogenous NGF regulate differentiation of cholinergic neurons. *J Neurosci.* 15 (4): 2888-2905.

Liesi, P., Reichardt, L., Wartiovaara, J. 1983. NGF induces adrenergic

neuronal differentiation in F9 teratocarcinoma cells. *Nature* 306 (5940): 265-267.

Lindsay, R.M. 1979. Adult brain astrocytes support survival of both NGF-dependent and NGF-insensitive neurones. *Nature* 282 (5734): 80-82.

Liu, X.Q., Buchanan, W., Matthews, A.J., Chung, B.H., Bagdade, J.D. 1997. Lack of effect of vitamin E on cholesteryl ester transfer and lipoprotein composition in cholesterol-fed rabbits. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 117 (4): 553-9.

Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U., Jonge, H.R. 1997. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem. Sci.* 22: 307-312.

Lopez, H., Keller, F., Ruess, G., Otten, U. 1989. Nerve growth factor increases in adult rat brain after hypoxic injury. *Neurosci Lett* 98: 339-44.

Lorton, D., Kocsis, J., King, L., Madden, K., Brunden, K. 1996. beta-Amyloid induces increased release of interleukin-1 beta from lipopolysaccharide-activated human monocytes. *J. Neuroimmunol.* 67: 21-29.

Lu, B., Buck, C.R., Dreyfus, C.F., Black, I.B. 1989. Expression of NGF and NGF receptor mRNAs in the developing brain: evidence for local delivery and action of NGF. *Exp Neurol.* 104 (3): 191-199.

Lucidi-Phillipi, C.A., Gage, F.H. 1993. The neurotrophin hypothesis and the cholinergic basal forebrain projection. *Prog Brain Res* 98: 241-249.

Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., Rogers, J. 1999. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 155: 853-62.

Lüth, H.J., Arendt, T. 1998. Nitric oxide and Alzheimer's disease. *J. Brain Res.* 39: 245-251.

Lüth, H.J., Holzer, M., Gertz, H.J., Arendt, T. 2000. Aberrant expression of nNOS in pyramidal neurons in Alzheimer's disease is highly colocalized with p21 ras and p16INK4a. *Brain Res.* 852: 45-55.

Lüth, H.J., Holzer, M., Gärtner, U., Staufenbiel, M., Arendt, T. 2001. Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Research* 913: 57-67.

Lüth, H.J., Munch, G., Arendt, T. 2002. Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. *Brain Res* 953: 135-43.

Maccioni, R.B., Vera, J.C., Dominguez, J., Avila, J. 1989. A discrete repeated sequence defines a tubulin binding domain on microtubule-associated protein tau. *Arch. Biochem. Biophys.* 275 (2): 568-579.

Maccioni, R.B., Concha, I., Otth, C., Muñoz, J.P. 2001a. The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *European J. Biochemistry* 268: 1518-1529.

Maccioni, R.B., Muñoz, J.P., Barbeito, L. 2001b. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch. Medical Research* 32: 367-381.

Mahadeo, D., Kaplan, L., Chao, M.V., Hempstead, B.L. 1994. High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than

p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J. Biol. Chem.* 269 (9): 6884-6891.

Makar, T.K., Nedergaard, M., Preuss, A., Gelbard, A.S., Perumal, A.S., Cooper, A.J., 1994. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide and enzymes of glutamate metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J. Neurochem.* 62 (1): 45-53.

Malchiodi-Albedi, F., Domenici, M., Paradisi, S., Bernardo, A., Ajmone-Cat, M., Minghetti, L. 2001. Astrocytes contribute to neuronal impairment in Abeta toxicity increasing apoptosis in rat hippocampal neurons. *Glia* 34: 68-72.

Mandelkow, E.M., Bierna, T.J., Drewes, G., Gustke, N., Trinczek, B., Mandelkow, E. 1995. Tau domains, phosphorylation and interactions with microtubuls. *Neurobiol. Aging* 16 (3): 355-362.

Marinelli, L., Cammarata, S., Nobbio, L., Schenone, A., Zaccheo, D., Angelini, G., Tabaton, M. 1999. Tyrosine kinase A-nerve growth factor receptor is antigenically present in dystrophic neurites from a variety of conditions but not in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 273 (1): 67-71.

Martin, G.M., Austad, S.N, Johnson, T.E. 1996. Genetic analysis of aging: role of oxidative and environmental stresses. *Nat Genet* 13 (1): 25-34.

Martinez, H.J., Dreyfus, C.F., Jonakait, G.M., Black, I.B. 1985. Nerve growth factor promotes cholinergic development in brain striatal cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (22): 7777-7781.

Mattson, M. Y Guo, Q. 1997. Cell and molecular neurobiology of presenilins: a role for endoplasmatic reticulum in the pathogenesis of Alzheimer disease? *J. Neurosci. Res.* 50: 505-513.

McGeer, P., Itagaki, S., Tago, H., McGeer, E. 1987. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci. Lett.* 79: 195-200.

McGraw, J., Hiebert, G.W., Steeves, J.D. 2001. Modulating astrogliosis after neurotrauma. *J. Neurosci. Res.* 63(2): 109-115.

McKee, A.C., Kosik, K.S., Kowall, N.W. 1991. Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 30 (2): 156-65.

McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I., Masters, C.L. 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46: 860-6.

McNaught, K., Brown, G. 1998. Nitric oxide causes glutamate release from brain synaptosomes. *J Neurochem* 70: 1541-1546.

Meda, L., Bonaiuto, C., Szendrei, G., Ceska, M., Rossi, F., Cassatella, M. 1995. beta-Amyloid (25-35) induces the production of interleukin-8 from human monocytes. *J. Neuroimmunol.* 59: 29-33.

Metsis, M., Timmusk, T., Allikmets, R., Saarma, M., Persson, H. 1992. Regulatory elements and transcriptional regulation by testosterone and retinoic acid of the rat nerve growth factor receptor promoter. *Gene.* 121 (2): 247-54.

Mollace, V., Nistico, G. 1995. Release of nitric oxide by astroglial cells: a key mechanism in neuroimmune disorders. *Adv. Neuroimmunol.* 5: 421-430.

Morais Cardoso, S., Swerdlow, R.H., Oliveira, C.R. 2002. Induction of cytochrome c-mediated apoptosis by amyloid beta 25-35 requires functional

mitochondria. *Brain Res.* 931 (2): 117-125.

Mowla, S.J., Farhadi, H.F., Parrek, S., Atwal, J.K., Morris, S.J., Seidah, N.G., Murphy, R.A. 2001. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to BDNF. *J. Biol. Chem.* 276 (16): 12660-12666.

Mufson, E.J., Bothwell, M., Kordower, J.H. 1989. Loss of nerve growth factor receptor-containing neurons in Alzheimer's disease: a quantitative analysis across subregions of the basal forebrain. *Exp Neurol* 105: 221-232.

Mufson, E.J., Kordower, J.H. 1992. Cortical neurons express nerve growth factors in advanced age and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 569-573.

Mufson, E.J., Conner, J.M., Kordower, J.H. 1995. Nerve growth factor in Alzheimer's disease: defective retrograde transport to nucleus basalis. *NeuroReport* 6: 1063-106.

Mufson, E.J., Lavine, N., Jaffar, S., Kordower, J.H., Quirion, R., Saragovi, H.U. 1997. Reduction in p140-TrkA receptor protein within the nucleus basalis and cortex in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 146(1):91-103.

Mufson, E.J., Kordower, J.H. 1999. Nerve growth factor in Alzheimer's disease. In Peter AA., Morrison JH., editores. *Cerebral cortex*. New York: Kluwer Academic/Plenum Press. P 681.731.

Mufson, E.J., Ma, S.Y., Cochran, E.J., Bennett, D.A., Beckett, L.A., Jaffar, S., Saragovi, H.U., Kordower, J.H. 2000. Loss of nucleus basalis neurons containing trkA immunoreactivity in individuals with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Comp Neurol.* 427 (1): 19-30.

Mufson, E.J., Ma, S.Y., Dills, J., Cochran, E.J., Leurgans, S., Wu, J., Bennett, D.A., Jaffar, S., Gilmor, M.L., Levey, A.I., Kordower, J.H. 2002. Loss of basal forebrain p75 (NTR) immunoreactivity in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Comp. Neurol.* 443 (2): 136-153.

Munoz, J.P., Alvarez, A., Maccioni, R.B. 2000. Increase in the expression of the neuronal cyclin-dependent protein kinase cdk-5 during differentiation of N2A neuroblastoma cells. *Neuroreport.* 11 (12): 2733-8.

Murphy, S., Simmons, M.L., Agullo, L., Garcia, A., Feinstein, D.L., Galea, E., Reis, D.J., Minc-Golomb, D., Schwartz, J.P. 1993. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci.* 16: 323-328.

Murphy, S. 2000. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29: 1-13.

Newman, E.A., Zahs, K.R. 1998. Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci.* 18 (11): 4022-4028.

Norris, P.J., Faull, R.L.M., Emson, P.C. 1996. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA expression and NADPH-diaphorase staining in the frontal cortex, visual cortex and hippocampus of control and Alzheimer's disease brains. *Mol. Brain Res.* 41: 36-49.

Oh, J.D., Chartisathian, K., Chase, T.N., Butcher, L.L. 2000. Overexpression of neurotrophin receptor p75 contributes to the excitotoxin-induced cholinergic neuronal death in rat basal forebrain. *Brain Res.* 853: 174-185.

Ohshima, T., Ward, J.M., Huh, C.G., Longenecker, G., Veerana, Pant, H.C., Brady, R.O., Martin, L.J., Kulkarni, A.B. 1996. Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal and

perinatal death. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (20): 1173-1178.

Olivieri, G., Otten, U., Meier, F., Baysang, G., Dimitriades-Schmutz, B., Muller-Spahn, F., Savaskan, E. 2002. Oxidative stress modulates tyrosine kinase receptor A and p75 receptor (low-affinity nerve growth factor receptor) expression in SHSY5Y neuroblastoma cells. *Neurol Clin Neurophysiol.* 2002 (2): 2-10.

Olton, D., Markowska, A., Voytko, M.L., Givens, B., Gorman, L., Wenk, G. 1991. Basal forebrain cholinergic system: a functional analysis. *Adv Exp Med Biol* 295: 353-372.

Osborne, K.A., Robichon, A., Burges, E., Butland, S., Shaw, R.A., Coulthard, A., Pereira, H.S., Greenspan, R.J., Sokolowsky, M.B. 1997. Natural behavior polymorphism due to a cGMP-dependent protein kinase of *Drosophila*. *Science* 277: 834-836.

Pacifici, R.E., Davies, K.J.A. 1991. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* 37: 166-180.

Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.

Park, J.A., Lee, J.Y., Sato, T.A., Koh, J.Y. 2000. Co-induction of p75NTR and p75NTR-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the Rat. *J. Neurosci.* 20: 9096-9103.

Pechan, P.A., Chowdhury, K., Seifert, W. 1992. Free radicals induce gene expression of NGF and bFGF in rat astrocyte culture. *Neuroreport.* 3 (6): 469-472.

Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J., Estévez, A., Barbeito, L. 2004. Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implication for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 89: 464-473.

Pekny, M., Stanness, K.A., Eliasson, C., Betsholtz, C., Janigro, D. 1998. Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice. *Glia* 22 (4): 390-400.

Perez-Severiano, F., Salvatierra-Sanchez, R., Rodriguez-Perez, M., Cuevas-Martinez, E.Y., Guevara, J., Limon, D., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., Santamaría, A. 2004. S-Allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *Eur J Pharmacol.* 489 (3): 197-202.

Peters, A., Josephson, K., Vincent, S.L. 1991. Effects of aging on the neuroglial cells and pericytes within area 17 of the rhesus monkey cerebral cortex. *Amat. Rec.* 229 (3): 384-398.

Peterson, S., Bogenmann, E. 2003. Osmotic swelling induces p75 neurotrophin receptor (p75NTR) expression via nitric oxide. *J Biol Chem.* 278 (36): 33943-50.

Pfeifer, A., Aszódi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F., Fässler, R. 1996. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* 274: 2082-2086.

Philips, H.S., Hains, J.M., Armanini, M., Laramée, G.R., Johnson, S.A., Winslow, J.W. 1991. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7(5): 695-702.

- Pike, C.J., Cummings, B.J., Monzavi, R., Cotman, C.W. 1994. Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 63 (2): 517-531.
- Pike, C.J., Cummings, B.J., Cotman, C.W. 1995. Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 132: 172-179.
- Purves, D., Snider, W.D., Voyvodic, J.T. 1988. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* 336 (6195): 123-128.
- Quintanilla, R.A., Muñoz, F.J., Metcalfe, M.J., Hitschfeld, M., Olivares, G., Godoy, J.A., Inestrosa, N.C. 2005. Trolox and 17 β -Estradiol Protect against Amyloid β -Peptide Neurotoxicity by a Mechanism That Involves Modulation of the Wnt Signaling Pathway *J. Biol. Chem.*, 280 (12): 11615-11625.
- Rabizadeh, S., Bitler, C.M., Butcher, L.L., Bredesen, D.E. 1994. Expression of the low affinity nerve growth factor receptor enhances beta-amyloid peptide toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10703-10706.
- Rakic, P. 1971. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electron microscopic study in *Macacus rhesus*. *J Comp Neurol* 141: 283-312.
- Raff, M.C., Miller, R.H., Noble, M. 1983. A glial progenitor cell that develops into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303 (5916): 390-396.
- Ramalho, R.M., Ribeiro, P.S., Sola, S., Castro, R.E., Steer, C.J., Rodrigues, C.M. 2004. Inhibition of the E2F-1/p53/Bax pathway by tauroursodeoxycholic acid in amyloid beta-peptide-induced apoptosis of PC12 cells. *J Neurochem.* 90 (3): 567-575.
- Ransom, J.T., Cambier, J.C. 1986. B cell activation. VII independent and synergistic effects of mobilized calcium and diacylglycerol on membrane potential and I-A expression. *J. Immunol.* 136 (1): 66-72.
- Rathke-Hartlieb, S., Budde, P., Ewert, S., Scholman, U., Staeger, M.S., Jockusch, H., Bartsch, S.W., Frey, J. 2000. Elevated expression of membrane type 1 metalloproteinase (MT1-MMP) in reactive astrocytes following neurodegeneration in mouse central nervous system. *FEBS Lett* 481: 227-234.
- Raub, T.J., Kventzel, S.L., Sawada, G.A. 1992. Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Exp. Cell Res.* 199 (2): 330-340.
- Reynolds, M.R., Berry, R.W., Binder, L.I. 2005. *Biochemistry* 44(5) : 1690-700.
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20 (12): 570-577.
- Roberson, M.R., Harell, L.E. 1997. Cholinergic activity and amyloid precursor protein metabolism. *Brain Res. Rev.* 25: 50-69.
- Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G., Barde, Y.A. 1990. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4 (4): 487-492.

- Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G., Gotz, R., Barde, Y.A. 1992. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* 11 (3): 917-922.
- Rosenberg, G.A. 2002. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39: 279-291.
- Roux, P.P., Colicos, M.A., Barker, P.A., Kennedy, T.E. 1999. p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *J. Neurosci.* 19: 6887- 6896.
- Roux, P.P., Bhakar, A.L., Kennedy, T.E., Barker, P.A. 2001. The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 23097-23104.
- Rovira, C., Arbez, N., Mariani, J. 2002. Abeta(25-35) and Abeta(1-40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 296 (5): 1317-21.
- Ryden, M., Ibañez, C.F. 1996. Binding of NT3 to p75 LNGFR, TrkA and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by TrkC. *J. Biol. Chem.* 271: 5623-56277.
- Rylett, R.J., Williams, L.R. 1994. Role of neurotrophins in cholinergic-neurone function in the adult and aged CNS. *Trend Neurosci* 17: 486-490.
- Saez, T.E., Pehar, M., Vargas, M., Barbeito, L., Maccioni, R.B. 2004. Astrocytic nitric oxide triggers tau hyperphosphorylation in hippocampal neurons. *in vivo* 18: 275-280.
- Saneto, R.P., De Vellis, J. 1987. Neuronal and glial cells: cell culture of the central nervous system. En A.J. Turner y H.S. Brachelard (eds), *Neurochemistry: a practical approach.* pp 27-63. IRL Press, Washington, DC.
- Sariola, H., Saarma, M., Sainio, K., Arumae, U., Palgi, J., Vaahtokari, A., Thesleff, I., Karavanov, A. 1991. Dependence of kidney morphogenesis on the expression of nerve growth factor receptor. *Science.* 254 (5031): 571-573.
- Savaskan, E., Muller-Spahn, F., Olivieri, G., Bruttel, S., Otten, U., Rosenberg, C., Hulette, C., Hock, C. 2000. Alterations in trk A, trk B and trk C receptor immunoreactivities in parietal cortex and cerebellum in Alzheimer's disease. *Eur Neurol.* 44 (3): 172-180.
- Sayre, L.M., Smith, M.A., Perry, G. 2001. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem.* 8 (7): 721-738.
- Schmidtmayer, J., Jacobsen, C., Miksch, G., Sievers, J. 1994. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. *Glia* 12 (4): 259-27.
- Sehgal, A., Patil, N., Chao, M. 1988. A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene. *Mol Cell Biol.* 8:3160-3167.
- Segal, I., Bailey, J., Hitzemann, K., Pittelkow, M.R., Maihle, N.J. 1994. Epidermal growth factor receptor-dependent stimulation of amphiregulin expression in androgenstimulated human prostate cancer. *Mol Biol. Cell* 5(3):339-347.
- Segal, R.A., Greenberg, M.E. 1996. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.* 19: 463-89.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberté, J., Lazure, C., Chrétien, M., Murphy, R.A. 1996. Cellular

processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem. J.* 314: 951-960.

Shimohama, S., Ogawa, N., Tamura, Y., Akaike, A., Tsukahara, T., Iwata, H., Kimura, J. 1993. Protective effect of nerve growth factor against glutamate-induced neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res.* 632: 296-302.

Skaper, S., Facci, L., Leon, A. 1995. Inflammatory mediator stimulation of astrocytes and meningeal fibroblasts induces neuronal degeneration via the nitridergic pathway. *J Neurochem* 64: 266-276.

Simic, G., Lucassen, P.J., Krstic, Z., Kruslin, B., Kostovic, I., Winblad, B., Bogdanovi. 2000. nNOS expression in reactive astrocytes correlates with increased cell death related DNA damage in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol* 165: 12-26.

Smith, M.A., Fanger, G.R., O'Connor, L.T., Bridle, P., Maue, R.A. 1997. Selective regulation of agrin mRNA induction and alternative splicing in PC12 cells by Ras-dependent actions of nerve growth factor. *J Biol Chem.* 272 (25): 15675-81.

Smith, M.A., Nunomura, A., Zhu, X., Takeda, A., Perry, G. 2000. Metabolic, metallic and mitotic sources of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Antioxid. Redox Signal* 2(3): 413-420.

Smits, H., Van Muiswinkel, F., de Vos, N., Verhoef, J., Nottet, H. 1999. *Alzheimer's Disease and Related Disorders.* Wiley, Sussex, pp.457-461.

Smits, H., Rijmsus, A., van Loon, J., Wat, J., Verhoef, J., Boven, L., Notet, H. 2002. Amyloid-beta-induced chemokine production in primary human macrophages and astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 127: 160-168.

Spillantini, M.G., Bird, T.D., Ghetti, B. 1998. Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathology* 8: 387-402.

Squinto, S.P., Stitt, T.N., Aldrich, T.H., Davis, S., Bianco, S.M., Radziejewski, C., Glass, D.J., Masiakowski, P., Furth, M.E., Valenzuela, P.M., et al. 1991. TrkB encodes a functional receptor for BDNF and NT-3 but not NGF. *Cell* 65 (5): 885-893.

Stepanichev, M.Y., Moiseeva, Y.V., Lazareva, N.A., Onufriev, M.V., Gulyaeva, N.V. 2003a. Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25-35) peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats. *Brain Res Bull.* 61 (2): 197-205.

Stepanichev, M.Y., Zdobnova, I.M., Yakovlev, A.A., Onufriev, M.V., Lazareva, N.A., Zarubenko, I.I., Gulyaeva, N.V. 2003b. Effects of tumor necrosis factor-alpha central administration on hippocampal damage in rat induced by amyloid beta-peptide (25-35). *J Neurosci Res* 71 (1): 110-20.

Stewart, V., Sharpe, M., Clark, J., Heales, S. 2000. Astrocyte-derived nitric oxide causes both reversible and irreversible damage to the neuronal mitochondrial respiratory chain. *J Neurochem* 75: 694-670.

Su, J.H., Anderson, A.J., Cummings, B.J., Cotman, C.W. 1994. Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5: 2529-2533.

Szczepanik, A., Funes, S., Petko, W., Ringheim, G. 2001. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta(1-42)-induced cytokine and chemokine production in

primary murine microglia and a human monocyte cell line. *J. Neuroimmunol.* 113: 49-62.

Tabaton, M., Nunzi, M.G., Xue, R., Usiak, M., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P. 1994. Soluble amyloid beta-protein is a marker of Alzheimer amyloid in brain but not in cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Res Commun.* 200 (3): 1598-1603.

Théry, C., Stanley, E.R., Mallat, M. 1992. Interleukin 1 and TNF-alpha stimulate the production of colony-stimulating factor 1 by murine astrocytes. *J. Neurochem.* 59 (3): 1183-1186.

Thorns, V., Hansen, L., Masliah, E. 1998. nNOs expressing neurons in the entorhinal cortex and hippocampus are affected in patients with Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 150: 14-20.

Tjernberg, L.O., Lilliehook, C., Callaway, D.J., Naslund, J., Hahne, S., Thyberg, J., Terenius, L., Nordstedt, C. 1999. *J. Biol. Chem.* 272 (19): 12601-05.

Tongiorgi, E., Righi, M., Cattaneo, A. 1997. Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 17 (24): 9492-9505.

Tongiorgi, E., Righi, M., Cattaneo, A. 2000. Differential somatodendritic localization of TrkA, TrkB, TrkC and p75 mRNAs in vivo. *Neuroreport* 11 (14): 3265-3268.

Tsacopoulos, M., Magistretti, P.J. 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* 16 (3): 877-885.

Van der Zee, C.E.E.M., Lourenszen, S., Stanis, J., Dianond, J. 1995^a. NGF deprivation of adult rat brain results in cholinergic hypofunction and selective impairments in spatial learning. *Eur. J. Neurosci.* 7: 160-168.

Vantini, G., Schiavo, N., Di Martino, A., Polato, P., Triban, C., Callegaro, L., Toffano, G., Leon, A. 1989. Evidence for a physiological role of nerve growth factor in the central nervous system of neonatal rats. *Neuron* 3 (3): 267-73.

Verdi, J.M., Birren, S.J., Ibañez, C.F., Persson, H., Kaplan, D.R., Benedetti, M., Chao, M.V., Anderson, D.J. 1994. p75LNGFR regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron* 12: 733-745.

Vodovotz, Y., Lucia, M.S., Flanders, K.C., Chesler, L., Xie, Q., Smith, T.W., Weidner, F., Mumford, R., Webber, R., Nathan, C., Roberts, A.B., Lippa, C.F., Sporn, M.B. 1996. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 184: 1425-1433.

Wallace, M.N., Geddes, J.G., Farquhar, D.A., Masson, M.R. 1997. Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to beta-amyloid plaques. *Exp Neurol* 144: 266-72.

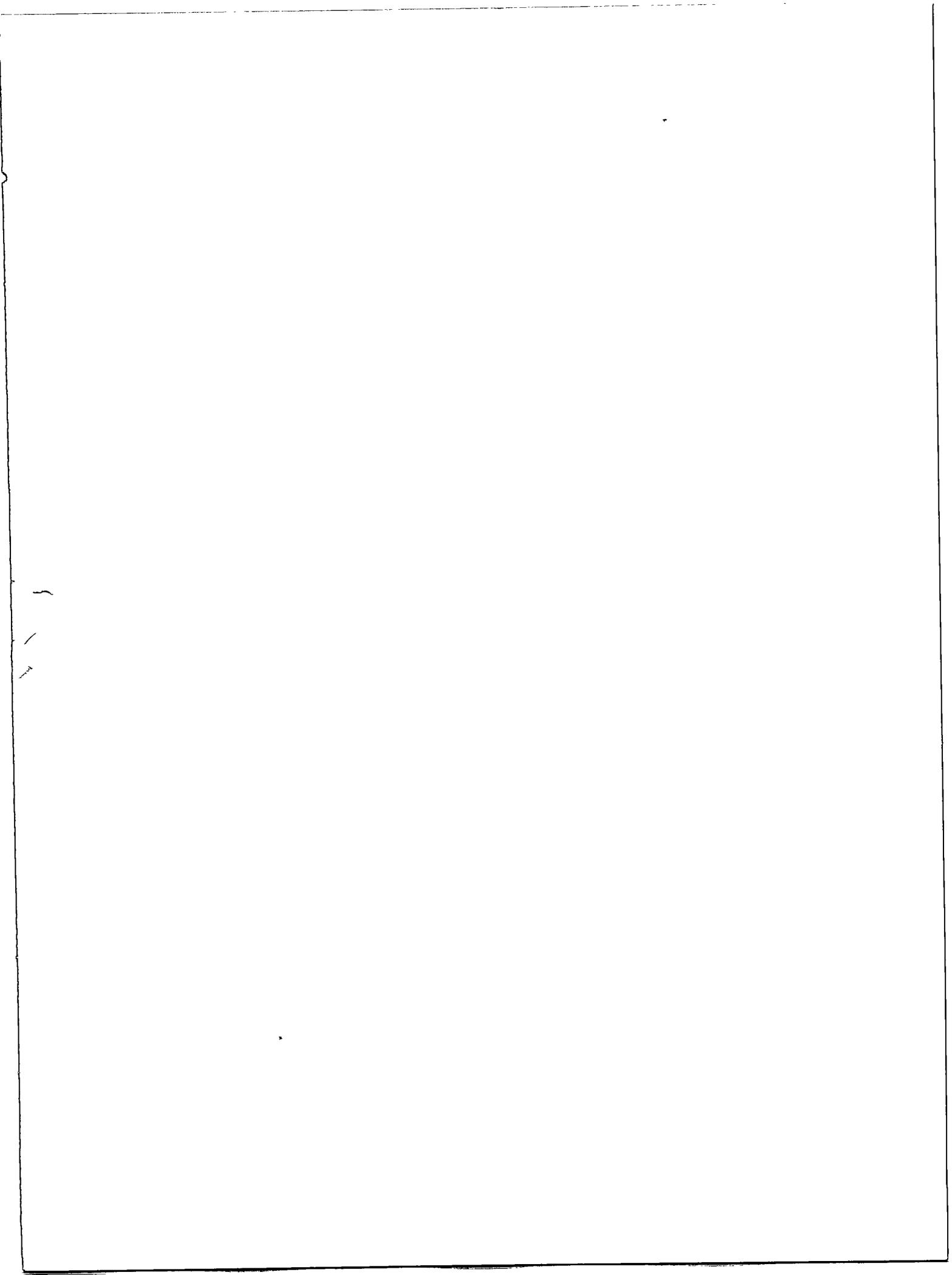
Walsh, DM

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* 416: 535-539.

Wang, J., Dickson, D.W., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. 1999. The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol.* 158(2):328-37.

Wang, X., Bauer, J.H., Li, Y., Shao, Z., Zetoune, F.S., Cattaneo, E.,

- Vincenz, C. 2001. Characterization of a p75(NTR) apoptotic signaling pathway using a novel cellular model. *J. Biol. Chem.* 276: 33812-33820.
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T., Delon, M.R. 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215 (4537): 1237-9.
- Whitehouse, P.J. 1998. The cholinergic deficits in Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry* 59 (13): 19-22.
- Xu, J., Chen, S., Ahmed, S.H., Chen, H., Ku, G., Goldberg, M.P., Hsu, C.Y. 2001. Amyloid-beta peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. *J Neurosci.* 21 (1): RC118.
- Yaar, M., Zhai, S., Pilch, P.F., Doyle, S.M., Eisenhauer, P.B., Fine, R.B., Gilchrest, B.A. 1997. Binding of beta-amyloid to p75 neurotrophin receptor induces apoptosis: a possible mechanism for Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 100: 2333-2340.
- Yaar, M., Zhai, S., Fine, R.E., Eisenhauer, P.B., Arble, B.L., Stewart, K.B., Gilchrest, B.A. 2002. Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling. *J Biol Chem.* 277: 7720-7725.
- Yamaguchi, Y., Matsuno, T., Kawashima, S. 2002. Antiamnesic effects of azaindolizone derivative ZSET845 on impaired learning and decreased ChAT activity induced by amyloid-beta 25-35 in the rat. *Brain Res.* 945 (2): 259-265.
- Yan, Q., Johnson, E.M. 1988. An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. *J Neurosci.* 8 (9): 3481-3498.
- Yan, X.X., Cariaga, W.A., Ribak, C.E. 1997. Immunoreactivity for GABA plasma membrane transporter, GAT-1, in the developing rat cerebral cortex: transient presence in the somata of neocortical and hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res.* 99 (1): 1-19.
- Yang, L., Ksiezak-Reading, H. 1998. Ubiquitin immunoreactivity for Paired Helical Filaments differs in Alzheimer's disease and corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol. (Berl)*96(5): 520-526.
- Yew, D.T., Wong, H.W., Li, W.P., Lai, H.W., Yu, W.H. 1999. Nitric oxide synthase neurons in different areas of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 89: 675-686.
- Yoon, S., Cassacia-Bonnefil, P., Carter, B., Cao, M. 1998. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J. Neurosci.* 18: 3273-3281.
- Yu, C., Kim, S., Ikeuchi, T., Xu, H., Gasparini, L., Wang, R., Sisodia, S. Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein in carboxyl-terminal fragment gamma. Evidence for distinct mechanisms involved in gamma-secretase processing of the APP and Notch 1 transmembrane domains. *J. Biol. Chem.* 276: 43756-43760.
- Yun, H.Y., Gonzalez-Zulueta, M., Dawson, V.L., Dawson, T.M. 1998. Nitric oxide mediates N-methyl D-aspartate receptor-induced activation of p21 ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5773-5778.
- Zhuo, M., Hu, Y., Schultz, C., Kandel, E.R., Hawkins, R.D. 1994. Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature* 368: 635-639.



Astrocytic Nitric Oxide Triggers Tau Hyperphosphorylation in Hippocampal Neurons

T. ESTEFANÍA SAEZ¹, MARIANA PEHAR², MARCELO VARGAS²,
LUIS BARBEITO² and RICARDO B. MACCIONI¹

¹Millennium Institute for Advanced Studies CBB, Faculty of Sciences,
University of Chile, Las Encinas 3370, Ñunoa, Santiago, Chile;

²Departamento de Neurobiología Celular,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

Abstract. Production of nitric oxide (NO) by glial cells has been proposed to mediate cytotoxic effects on neighboring neurons. Although extensive genetic data implicate the beta amyloid peptide (A β) in the neurodegenerative cascade of Alzheimer's disease (AD), the molecular mechanisms underlying its effects on neurons and glia and the relationship between glial activation and neuronal death are not well understood. In AD, A β is sufficient to induce glial activation and promote the generation of inflammatory mediators including NO. We examined whether A β stimulated astrocytes to express nitric oxide synthase and produce NO. Also, we investigated whether astrocytic NO contributes to degenerative changes occurring in co-cultured hippocampal neurons. We found that the treatment of rat hippocampal astrocyte cultures with A β (25-35) fragment up-regulated the mRNA and protein levels of both the inducible and neuronal forms of nitric oxide synthase (iNOS and nNOS, respectively) and increased the production of nitric oxide. Remarkably, hippocampal neurons co-cultured with astrocytes, previously stimulated with A β , displayed hyperphosphorylation of the microtubule-associated protein tau. This effect was attenuated by iNOS inhibitors, suggesting the role of overproduction of NO by reactive astrocytes in AD pathogenesis.

Astrocytes represent the largest cell population in the central nervous system (CNS). They closely interact with neurons to provide structural, metabolic and trophic support, and actively participate in modulating neuronal excitability and neurotransmission (1,2). Astrocytes and microglia in injured brain display characteristic phenotypic changes commonly

described as gliosis. Astrocytes respond to CNS damage by adopting a "reactive phenotype" characterized morphologically by hypertrophy of nuclei and cell bodies, increased cell proliferation and elaboration of distinct long and thick processes with increased content in glial intermediary filaments mainly composed by glial fibrillary protein (GFAP). In addition, reactive astrocytes express a wide variety of markers such as cytoskeletal proteins, cell surface and matrix molecules, proteases and several growth factors and cytokines (3,4). Because gliosis also occurs in a variety of conditions such as cerebral ischemia, Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease, frontotemporal dementia and Huntington's disease (5), it has long been considered as an unespecific response of glial cells to neuronal injury and is often not considered as a primary pathogenic element in AD.

A role of inflammation in the pathogenesis of AD has been postulated (6-8). On the other hand, there is cumulative evidence that beta amyloid peptide (A β) may promote or exacerbate local inflammation by inducing glial cells to release immune mediators. Reactive astrocytes expressing inflammatory markers surround senile plaques in AD patients (9); and it has been demonstrated that A β deposits can induce glial activation (10), initiating an inflammatory response characterized by the production of both pro- and anti-inflammatory molecules (11,12). Reactive astrocytes can profoundly affect the surrounding cells at least in part by induction of trophic factors, inflammatory mediators and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) (13,14). iNOS generates nitric oxide (NO) and NO-derived reactive nitrogen species such as peroxynitrite. In addition to its vasoactive and immunological properties, NO plays major neurophysiological functions. However, overproduction of NO can also be neurotoxic. An excess of astrocyte-released NO has been suggested to cause energy depletion in neighboring neurons by inducing mitochondrial dysfunction and possibly inhibition of the respiratory

Correspondence to: Prof. Dr. R.B. Maccioni, Department of Biology, Edificio Milenio, Las Encinas 3370, Ñunoa, Santiago, Chile. Tel: (562) 260 0255, e-mail: rmaccion@uchile.cl

Key Words: Nitric oxide, glial cells, tau hyperphosphorylation, hippocampal neurons.

chain (15). However, astrocytes are relatively resistant to NO and peroxy-nitrite toxicity (16,17). Interestingly, there is increasing evidence that NO may have a role in the aforementioned AD pathogenetic mechanisms, and putative links between NO and AD are beginning to be recognized (18).

Oxidative stress is one pathological hallmark of AD resulting in lipid peroxidation, tyrosine nitration, DNA oxidative damage and ultimately neuronal death (19-22). NOS immunoreactivity has been observed near A β neuritic plaques (14) and iNOS expression can be stimulated by A β in cultured astrocytes or microglia (13, 23-26). This A β stimulation of iNOS can result in the production of excessive amounts of diffusible NO, which can exert detrimental cytopathological consequences by mechanisms involving peroxy-nitrite formation (27).

We evaluated the induction of a reactive phenotype in astrocytes by A β (25-35) fragment, by assessing the expression of mRNA and protein levels of neural and inducible isoforms of nitric oxide-synthase (nNOS and iNOS) and the NO production. In this context, we studied whether NO produced by reactive astrocytes following amyloid exposure induced neurotoxic effects on co-cultured hippocampal neurons, by assessing tau hyperphosphorylation. Tau hyperphosphorylation, a hallmark of AD (28,29), result as a consequence of a dysregulation in the cdk5/p35 and GSK3 β protein kinases.

Materials and Methods

Materials. Culture media, serum and antibiotics were purchased from GIBCO. Polyclonal antibody to iNOS and nNOS were from Transduction Laboratories. Monoclonal antibody to Alzheimer's tau (PHF1) was obtained through a generous donation of Dr. Peter Davis. All other reagents were from Sigma Aldrich. Chemical reagents were of the highest analytical purity.

Cell cultures. Primary astrocyte cultures were prepared from 1 to 2-day-old rat hippocampus according to the procedures of Saneto and De Vellis (30) with minor modifications. Astrocytes were plated at a density of 2×10^4 cells/cm² in a 35-mm Petri dish or glass coverslips and maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, HEPES (3.6 g/l), penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 μ g/ml). The astrocyte monolayers were >98% pure as determined by GFAP immunoreactivity and were devoid of OX42-positive microglial cells.

Hippocampal neurons from 18E rats were prepared as described by Banker and Cowan (31). Hippocampi were dissected and then dissociated following incubation in 0.25% trypsin-EDTA for 10 min at 37°C, then plated over poly-L-lysine (0.5 mg/ml) at a density of 5,000 cells per cm² for immunofluorescence and 15,000 cells per cm² for Western blot. Cultures were maintained for 3h in Neurobasal medium supplemented with 10% fetal bovine serum and then the media was replaced by N2-supplemented Neurobasal media and maintained for 4-5 days. For co-culture experiments, astrocytes plated over coverslips were mounted over hippocampal neurons grown in poly-L-lysine-coated 35-mm Petri dishes.

Exposure of astrocyte monolayers to A β (25-35). Astrocyte monolayers were exposed to different concentrations of A β (25-35) peptide soluble (Sigma) in serum-free media (Neurobasal supplemented with N2). The media was collected for nitrate and nitrite determinations. For co-cultures, astrocytes were treated for 24h with A β and, after extensive washing, the astrocytes monolayers were mounted over the neurons.

Determination of NO levels. NO production by A β -stimulated astrocytes was estimated by assessing the levels of nitrate (NO₃⁻) and nitrite (NO₂⁻) in the culture media, using a colorimetric kit (Cayman) based on Griess reaction.

Treatment with NO donor and NOS inhibitor. The NO donor 10 μ M NOC-18 (DETA-NONOATO, Alexis) was added directly to the culture media of 5D hippocampal neurons and tau phosphorylation was assessed 24 h later. The NOS inhibitor Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 1 μ M) was directly applied to the culture media immediately after establishing the co-cultures.

Western blot. Protein extracts from hippocampal neurons were separated by SDS-PAGE, electrotransferred to nitrocellulose membranes and processed for immunodetection as described by Cross *et al.* (32,33).

Relative quantitative RT-PCR. Total RNAs from hippocampal astrocytes was isolated using Trizol reagent (Gibco-BRL, Life Technology). Two μ g of total RNA were randomly reversely transcribed using the RETROscript Kit (Ambion). The levels of mRNA were quantified by relative-quantitative RT-PCR. The PCRs were carried out in a 50 μ l reaction volume containing 1 μ l of cDNA, 20pmoles of each NOS primer, 4 μ l of 18S primers, 200 μ M dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 U of Taq DNA polymerase and 1X Taq DNA polymerase PCR buffer (Invitrogen). The cycling parameters were as follows: 95°C, 30 sec; 56°C, 30sec; 72°C, 30 sec during 35 cycles. The iNOS primers were 5' GGGATCTTGGAGCGAGTTGTGG and 3' TCTGCCTGTGCGTCTCTCCG. Minus RT controls were included in each assay. The amplification products were run in a non-denaturing 6% acrylamide gel and stained with SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes). Densitometric analysis was performed using the NIH Image program, and iNOS expression levels were normalized against 18S levels.

Statistical analysis. Data analysis was performed by using standard statistical packages (Sigma Stat). All the values correspond to the mean of at least three independent experiments, each one performed in duplicate.

Results and Discussion

Previous reports have shown that reactive astrocytes in culture may induce iNOS expression (13, 23-26). To further characterize the astrocytic phenotype induced by A β we studied the mRNA as well as protein expression of NOS isoforms and the NO production. In a time course experiment, astrocytes treated for 24h with 10 μ M A β increased the expression of iNOS mRNA by 1.9-fold (Figure 1A) as determined by RT-PCR. In this study, the iNOS mRNA levels gradually increased as the A β

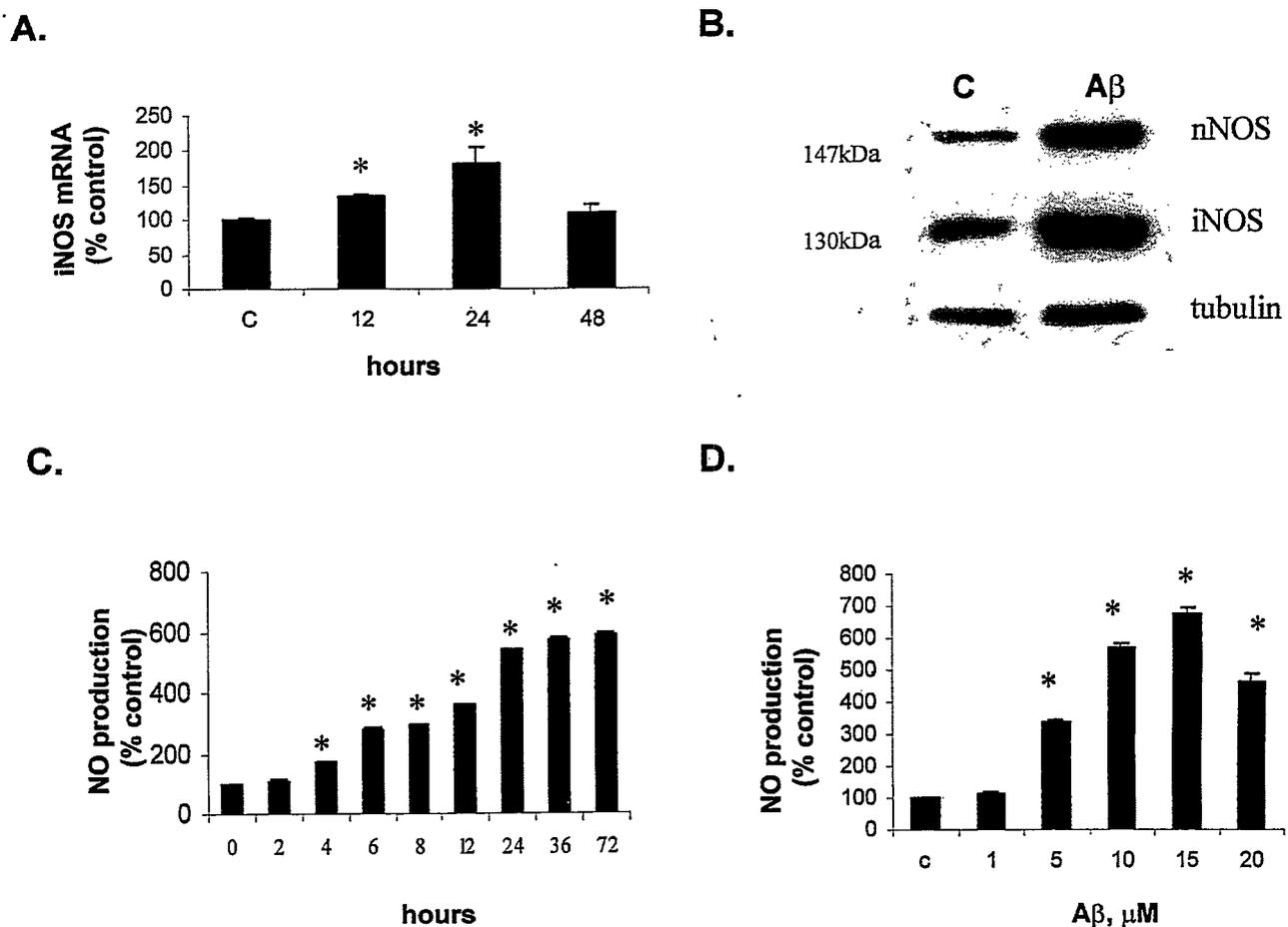


Figure 1. $A\beta(25-35)$ increases iNOS and nNOS expression and NO release by hippocampal astrocytes in culture. *A.* The expression of iNOS mRNA was determined by RT-PCR of total RNA extracted at the indicated times after exposure to $10 \mu\text{M}$ $A\beta(25-35)$. iNOS mRNA levels are expressed as percentage of control (C). Each bar corresponds to mean \pm SD of 5 determinations ($n=5$). *B.* iNOS and nNOS expression after treatment with $10 \mu\text{M}$ $A\beta(25-35)$ ($A\beta$) for 24 h assessed by Western blots, as compared with untreated controls (C). *C.* Time course of nitrite plus nitrate concentration (as a measure of NO production) in culture media of astrocytes stimulated with $10 \mu\text{M}$ $A\beta(25-35)$ for 24h. *D.* Astrocytes treated with the indicated variable concentrations of $A\beta(25-35)$ for 24h and assayed for nitrite and nitrate levels in the culture media. Data are expressed as percentage of the levels in control (C), mean \pm SD of four different experiments. * Significantly different from control ($p \leq 0.05$).

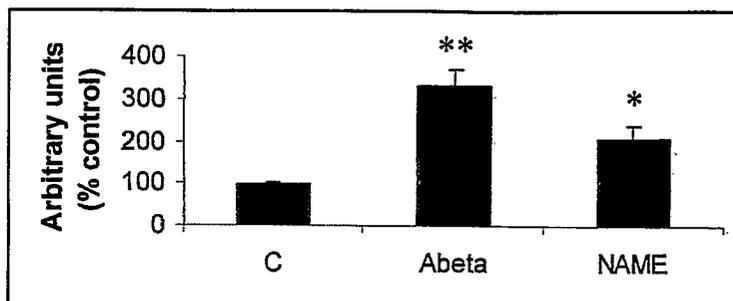
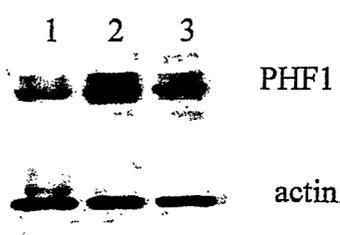
concentration in the media was elevated (data not shown). The increase in iNOS messenger was followed by a concomitant rise in iNOS protein expression as determined by Western blotting (Figure 1B). $A\beta$ treatment also induced the expression of the neuronal isoform of NOS (nNOS) (Figure 1B, upper panel). Control astrocytes treated with vehicle only showed a limited expression of iNOS and nNOS, corresponding to basal levels.

To further characterize the $A\beta$ -induced phenotype, we evaluated NO production by assessing nitrite/nitrate concentration in the culture media. NO is produced in trace quantities by different cells. This NO is scavenged rapidly and acts in a paracrine fashion to transduce cellular signals. NO undergoes a series of reactions with several

molecules present in biological fluids, and the final products of NO are nitrite and nitrate. Thus, the best index of total NO production is the sum of both nitrite and nitrate levels. In a time course experiment, nitrite and nitrate levels in the culture media increased by 5.5-fold 24 h after $10 \mu\text{M}$ $A\beta$ treatment (Figure 1C). $A\beta$ treatment dramatically enhanced NO production by astrocytes in a dose-dependent manner (Figure 1D).

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease characterized by the formation of extracellular amyloid plaques and cytoplasmic neurofibrillary tangles (NFT). The latter are filaments composed mainly of hyperphosphorylated tau protein (33,34). To determine the contribution of reactive astrocytes previously stimulated with $A\beta$ on neuronal tau

A.



B.

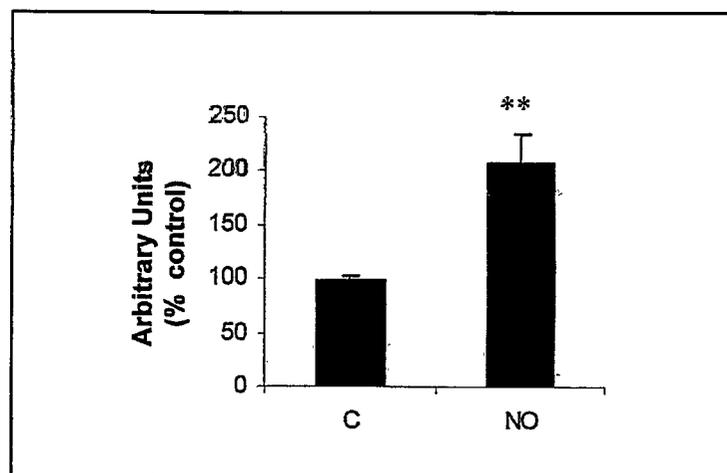
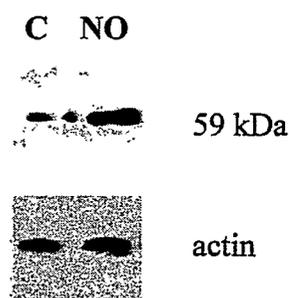


Figure 2. Reactive astrocytes induce NO-dependent tau hyperphosphorylation in hippocampal neurons in co-culture. A. Left panel, Hippocampal astrocytes treated with $10 \mu\text{M}$ $\text{A}\beta(25-35)$ for 24h were mounted over cultured hippocampal neurons and tau hyperphosphorylation was detected by Western blot of extracts from hippocampal neurons probed with PHF1 antibody. 1, neurons in co-culture with non-stimulated astrocytes; 2, neurons in co-culture with stimulated astrocytes; 3, same as 2 also treated with L-NAME ($1 \mu\text{M}$). Right panel, the histogram of the densitometric analysis of data, the left panel, expressed as percentage of control (C). Histograms represent the mean \pm SD of three independent experiments. B. Hippocampal neurons were treated with NO donor NOC-18 ($10 \mu\text{M}$) for 24h and cell extracts were processed for tau by Western blot using PHF1 antibody. Actin was used as an internal control. The histograms on the right panel represent data expressed as percentage of levels in control (C), mean \pm SD of four different experiments. *, **: Significantly different from control (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

phosphorylation, we analyzed, by Western blotting, tau post-transductional changes with a specific Alzheimer's epitope antibody (PHF1). We found that astrocytes previously treated with $\text{A}\beta$ induce tau hyperphosphorylation in co-cultured hippocampal neurons. To determine whether astrocytic nitric oxide was involved in this phenomena, we analyzed the effect of NOS inhibitor L-NAME on co-cultures. As shown in Figure 2A, tau hyperphosphorylation increased only by 2.0-fold in co-cultures pretreated with L-NAME ($1 \mu\text{M}$), as compared to 3.4-fold with $\text{A}\beta$ treatment. We also investigated whether continuous generation of a physiologically relevant concentration of nitric oxide ($< 50 \text{nM}$ steady state) by $10 \mu\text{M}$ NOC-18, which did not affect

cell survival, induced tau hyperphosphorylation in pure hippocampal neurons. Figure 2B shows a 2.1-fold increase in tau phosphorylation when hippocampal neurons are treated with the NO donor NOC-18. These results suggest that not only NO production is important for tau hyperphosphorylation, but also other factors might be involved in the process.

In agreement with previous observations, exposure to $\text{A}\beta$ peptide induced long-lasting reactive changes in astrocytic monolayers and no apparent cell death as estimated by phase contrast microscopy (data not shown). We confirmed that the reactive phenotype acquired by stimulation with $\text{A}\beta$ was accompanied by induction of iNOS and nNOS

expression and the subsequent increase in NO production. We have now shown that A β caused long lasting phenotypic changes in hippocampal astrocytes that made these cells neurotoxic to hippocampal neurons, as evidenced by tau hyperphosphorylation. We also showed that the general NOS synthesis inhibitor L-NAME partially reduced tau hyperphosphorylation in hippocampal neurons induced by reactive astrocytes stimulated by A β , suggesting that NO production by astrocytes is not the only mechanism involved. Furthermore, the exogenous addition of NO to hippocampal neurons, achieved by treatment with NOC-18, up-regulated tau hyperphosphorylation, supporting the participation of NO in the process.

Basal production of NO by astrocytes may have a regulatory role in neuronal activity, metabolism and survival. However, exaggerated production of NO by astrocytes mediates neurotoxicity as well as mitochondrial damage (18). We have shown evidence, for the first time, that nitric oxide also participates in the modulation of tau hyperphosphorylation in hippocampal neurons. This is supported by the finding that tau hyperphosphorylation in cocultures was reduced by inhibition of nitric oxide production and that exogenous NO is able to achieve the same phenotype. Taken together, these results suggest that endogenous formation of NO in astrocytes may influence kinase systems such as cdk5/p35 and GSK3 β directly or indirectly. These studies shed light on the often conflicting views on the roles of NO in mediating neuronal damage, indicating that NO is not a proximate cause of neurotoxic mechanism induced by A β but a true contributor.

References

- Bezzi P and Volterra A: A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol* 11: 387-394, 2001.
- Fedoroff S, Vernadakis A (Eds.): *Astrocytes: Biochemistry, Physiology and Pharmacology of Astrocytes*. Vol 2, Academic Press inc., Orlando, 1986, 420pp.
- Eddleston M and Mucke L: Molecular profile of reactive astrocytes: implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54: 15-36, 1993.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A and Gage FH: Reactive astrocytes: cellular and molecular clues to biological function. *Trends Neurosci* 20: 570-577, 1997.
- 5 Shipper HM: Astrocytes, brain aging and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 17: 467-480, 1996.
 - 6 Johnston A: A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol* 93: 182-93, 1999.
 - 7 Mc Gee R: Inflammation of the brain in Alzheimer's disease: implications for therapy. *J Leukocyte Biol* 65: 409-15, 1999.
 - 8 Quintanilla R, Orellana D, Gonzalez-Billault C and Maccioni RB: Interleukin 6 induces Alzheimer's type phosphorylation of tau protein by the cdk5/p35 pathway. *Mol Biol Cell* 13: 126a, 2002.
 - 9 Pike C, Cummings B and Cotman C: Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 132: 172-9, 1995.
 - 10 Eddleston M and Mucke L: Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54: 15-36, 1993.
 - 11 Smits H, Rijmsus A, van Loon J, Wat J, Verhoef J, Boven L and Notet H: Amyloid-beta-induced chemokine production in primary human macrophages and astrocytes. *J Neuroimmunol* 127: 160-68, 2002.
 - 12 Szczepanik A, Funes S, Petko W and Ringheim G: IL-4, IL-10 and IL-13 modulate a beta(1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *J Neuroimmunol* 113: 49-62, 2001.
 - 13 Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA and Van Eldik LJ: Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res* 785: 195-206, 1998.
 - 14 Wallace MN, Geddes JG, Farquhar DA and Masson MR: Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to beta-amyloid plaques *Exp Neurol* 144: 266-272, 1997.
 - 15 Stewart VC, Sharpe MA, Clark JB and Heales SJR: Astrocyte-derived nitric oxide causes both reversible and irreversible damage to the neuronal mitochondrial respiratory chain. *J Neurochem* 75: 694-700, 2000.
 - 16 Bolanos JP, Heales SJR, Land JM and Clark JB: Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurochem* 64: 1965-1972, 1995.
 - 17 Bolanos JP, Peuchen S, Heales SJR, Land JM and Clark JB: Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J Neurochem* 63: 910-916, 1994.
 - 18 de la Monte SM, Chiche J, von dem Bussche A, Sanyal S, Lahousse SA, Janssens SP and Bloch KD: Nitric oxide synthase-3 overexpression causes apoptosis and impairs neuronal mitochondrial function: relevance to Alzheimer's-type neurodegeneration. *Lab Invest* 83: 287-98, 2003.
 - 19 Smith MA, Richey-Harris PL, Sayre LM, Beckman JS and Perry G: Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17: 2653-2657, 1997.
 - 20 Mattson MP: Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Alzheimer's Disease Rev* 2: 1-14, 1997.
 - 21 Hensley K, Butterfield DA, Hall N, Cole P, Subramaniam R, Mark R, Mattson M P, Markesbery WR, Harris ME, Aksenov M, Aksenova M, Wu JF and Carney JM: Reactive oxygen species as causal agents in the neurotoxicity of the Alzheimer's disease-associated amyloid beta peptide. *Ann NY Acad Sci* 34: 120-134, 1996.
 - 22 Van Dyke K: The possible role of peroxynitrite in Alzheimer's disease: a simple hypothesis that could be tested more thoroughly. *Med Hypotheses* 48: 375-380, 1997.
 - 23 Rossi F and Bianchini E: Synergistic induction of nitric oxide by beta-amyloid and cytokines in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 474-478, 1996.
 - 24 Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Baron P, Villalba M, Ferrari D and Rossi F: Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature (London)* 374: 647-650, 1995.

- 25 Goodwin JL, Uemura E and Cunnick JE: Microglial release of nitric oxide by the synergistic action of beta-amyloid and IFN-gamma. *Brain Res* 692: 207-214, 1995.
- 26 Ii M, Sunamoto M, Ohnishi K and Ichimori Y: Beta-amyloid protein-dependent nitric oxide production from microglial cells and neurotoxicity. *Brain Res* 720: 93-100, 1996.
- 27 Beckman JS and Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-C1437, 1996.
- 28 Maccioni RB, Concha I, Otth C and Munoz JP: The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem* 268: 1518-1529, 2001a.
- 29 Maccioni RB, Munoz JP and Barbeito L: The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* 32: 367-381, 2001b.
- 30 Saneto RP and De Vellis J: *Neurochemistry: A Practical Approach*. AJ Turner, 1987.
- 31 Banker G and Cowan W: Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* 126: 397-42, 1977.
- 32 Cross D, Vial C and Maccioni RB: A tau-like protein interacts with stress fibers and microtubules in human and rodent cultured cell lines. *J Cell Sci* 105: 51-60, 1993.
- 33 Cross D, Tapia L, Garrido J and Maccioni RB: Tau-like proteins associated with centrosomes in cultured cells. *Exp Cell Res* 229(2): 378-87, 1996.
- 34 Alonso A, Grundke-Iqbal I, Barra H and Iqbal K: Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 298-303, 1997.
- 35 Billingsley M and Kincaid R: Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J* 323: 577-591, 1997.

*Received December 15, 2006.
Accepted April 1, 2004*