

# Estudio sobre el papel de los receptores NMDA extrasinápticos en la toxicidad del péptido beta-amiloide

---

Universidad Pompeu Fabra

**Patricia Gallardo Mené**

Curso 2013-2014

## CERTIFICADO DEL TUTOR



Department of Health and Experimental Sciences  
Faculty of Health and Life Sciences  
Universitat Pompeu Fabra

Barcelona, 13 June, 2014

I, Francisco J. Muñoz López, authorize to Patricia Gallardo to present the current revision work entitled "Estudio sobre el papel de los receptores NMDA extrasinápticos en la toxicidad del péptido beta-amiloide". This work was carried out by Patricia as the the Final Degree Project of her studies of Human Biology.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Francisco J. Muñoz López', written over a faint, light-colored rectangular stamp or watermark.

Francisco J. Muñoz, PhD  
Laboratory of Molecular Physiology and Channelopathies  
CEXS-UPF  
Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona  
Calle Dr. Aiguader, 88  
08003 Barcelona, Spain  
Tel: + 34 93 316 08 52  
Fax: + 34 93 316 09 01  
e-mail: [paco.munoz@upf.edu](mailto:paco.munoz@upf.edu)

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La activación glutamatérgica de los receptores de *N-metil-D-aspartato* extrasinápticos (eNMDARs) por parte del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) provoca una serie de procesos neurotóxicos directamente relacionados con la etiopatogenia de la Enfermedad del Alzheimer (EA). Así mismo la activación patológica de estos receptores puede producir un aumento de la producción de  $A\beta$  por inducción del procesamiento amiloidogénico de la proteína precursora del amiloide (APP).

## OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es la revisión y discusión del papel de los receptores de NMDA en la etiología y progresión de la EA. Los objetivos parciales se focalizan en: i) la activación de los receptores de NMDA extrasinápticos por los oligómeros del péptido  $A\beta$ ; ii) la relación entre actividad neuronal y procesamiento del APP; iii) la relevancia de la interacción del  $A\beta$  con los receptores nicotínicos de acetilcolina (AChRs), en concreto, el subtipo  $\alpha 7$ , presentes en distintos centros encefálicos pero principalmente en el hipocampo, el centro formador de memoria.

## RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por pérdida de memoria progresiva que desemboca en una demencia y un compromiso de todas las funciones cerebrales. La causa de este proceso neurodegenerativo es el aumento en la producción del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), el cual tiende a agregar en pequeños oligómeros que progresan a fibras formando las placas seniles. Los oligómeros de  $A\beta$  ( $\alpha A\beta$ ) son los causantes de la disfunción sináptica y muerte neuronal, principalmente en el hipocampo y en el neocórtex. La unión del  $A\beta$  a los receptores de NMDA extrasinápticos (eNMDARs) produce una desregulación de la homeostasis del calcio neuronal disparando excitotoxicidad, impidiendo los procesos fisiológicos de formación de memoria. Esta unión también aumenta la producción del propio  $A\beta$  al afectar a las enzimas que cortan a la proteína precursora del amiloide (APP) e incluso promueve la síntesis de isoformas de APP más susceptibles de ser procesadas por la vía amiloidogénica. Sin embargo la activación de los NMDARs sinápticos (sNMDARs) induce neuroprotección, haciendo a las neuronas más resistentes. En este trabajo se presenta y discute como las perturbaciones en el balance entre las dos subpoblaciones de NMDARs contribuye al desarrollo de la EA.

**Palabras clave:** Enfermedad de Alzheimer; péptido beta-amiloide ( $A\beta$ ); receptores NMDA; proteína precursora de amiloide (APP); calcio.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive memory loss that leads to dementia and commitment of all brain functions. The cause of this neurodegenerative disease is the increased production of  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ), which tends to aggregate in small oligomers progressing to fibers, which form the senile plaques.  $A\beta$  oligomers ( $oA\beta$ ) cause synaptic dysfunction and neuronal death, particularly in the hippocampus and neocortex.  $A\beta$  binding to extrasynaptic NMDA receptors (eNMDARs) causes a deregulation of calcium homeostasis triggering neuronal excitotoxicity, preventing the physiological processes of memory formation. This union also increases the production of  $A\beta$  itself by affecting enzymes that cut the amyloid precursor protein (APP) and even promotes the synthesis of isoforms most likely to be processed by the amyloidogenic pathway APP. However the activation of synaptic NMDARs (sNMDARs) induces neuroprotection, making the neurons more resistant. This paper presents and discusses how disturbances in the balance between the two subpopulations of NMDARs contributes to the development of AD.

**Keyword:** Alzheimer's disease; amyloid beta-peptide ( $A\beta$ ); amyloid precursor protein (APP); NMDA receptors; calcium.

## ABREVIATURAS

$A\beta$ ,  $\beta$ -amiloide; ACh, acetilcolina; AChE, acetilcolin esterasa; AChT, ACh transferasa; ADAM, a disitegrin and metalloproteinase; AICD, fragmento C-terminal intracelular del APP; AID, activity-regulated inhibitors of death; AMPA, ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropionico; AMPc, adenosín monofosfado cíclico; Apaf1, apoptosi protease-activating factor-1;  $\alpha 7$ AChRs, receptores nicotínicos de tipo  $\alpha 7$ ; BACE1,  $\beta$ -secretasa; BDNF, neurotrofina brain derived neuronal factor; CaMKII, calmodulina quinasa 2; CREB, cAMP response element-binding protein; EA, Enfermedad del Alzheimer; eNMDARs receptores de NMDA extrasinápticos; ERK1/2, señal extracelular regulada por la quinasa 1/2; fMRI, imagen de resonancia magnética funcional; GLT-1, transportador de glutamato; GMPc, guanosín monofosfato cíclico; hnRNP, ribonucleoproteína nuclear heterogénea; KPI, Kunitz protease inhibitor; LTD, depresión a largo plazo; LTM, región temporal medial; LTP, potenciación a largo plazo; mAChR, transporte de ACh en vesículas; NFAT, factor nuclear de activación de células T; NFIA, factor nuclear I subtipo A; NFG, factor de crecimiento neuronal; NMDAR, receptores de *N-metil-D-aspartato*; nNOS, NO sintasa neuronal; NO, óxido nítrico; NOs, óxido nítrico sintetasa;  $oA\beta$ , oligómeros de  $A\beta$ ; PET, tomografía por emisión de positrones; PKA, proteína quinasa A; PKC, proteína quinasa C; PKG, proteína quinasa G; PP2B, proteína fosfatasa 2B; proNGF, precursor de NGF; PS-1, presenilina-1; sAPP $\alpha$ , fragmento soluble de APP alpha; sAPP $\beta$ , fragmento soluble de APP beta sNMDARs, receptores NMDARs sinápticos.

# ÍNDICE

## **1. Introducción: La enfermedad de Alzheimer**

### 1.1. Características

#### 1.1.1. Ruta colinérgica

#### 1.1.2. Anticolinesterásicos

### 1.2. Hipótesis de la cascada amiloide

### 1.3. Procesamiento del APP y formación de A $\beta$

### 1.4. Agregación del A $\beta$

## **2. La sinapsis glutamatérgica y la formación de memoria**

### 2.1. La sinapsis glutamatérgica

#### 2.1.1. Receptores NMDA

### 2.2. Fisiología en las espinas dendríticas

### 2.3. Neuroprotección dependiente de los NMDARs sinápticos (sNMDARs)

#### 2.3.1. Inducción de genes de supervivencia

#### 2.3.2. Supresión de genes que provocan la muerte

#### 2.3.3. Protección contra el estrés oxidativo

### 2.4. El óxido nítrico

## **3. La fisiopatología de los receptores de NMDA extrasinápticos**

### 3.1. Efectos diferenciales entre los sNMDARs y los eNMDARs

### 3.2. Neurotoxicidad dependiente de los NMDARs extrasinápticos (eNMDARs)

#### 3.2.1. Inactivación del factor de transcripción CREB y el papel de la proteína Jacob

#### 3.2.2. Inactivación de ERK1/2

#### 3.2.3. Activación de FOXO

#### 3.2.4. Activación de calpaina y escisión de STEP

### 3.3. El péptido A $\beta$

#### 3.3.1. Relación de A $\beta$ con los NMDARs

#### 3.3.2. Relación de A $\beta$ con los receptores $\alpha 7$ nicotínicos ( $\alpha 7$ AChRs)

#### 3.3.3. Relación entre la actividad neuronal y la producción de A $\beta$

#### 3.3.4. Activación de NMDAR y síntesis de A $\beta$

### 3.4. Nitrosilación y efectos deletéreos

## **4. Dianas terapéuticas en la EA dirigidas hacia la señalización glutamatérgica**

## **5. Discusión**

## **6. Bibliografía**

# 1. Introducción: La Enfermedad del Alzheimer

## 1.1. Características

La enfermedad del Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa de mayor prevalencia en los seres humanos. La EA se caracteriza por disfunción sináptica y pérdida neuronal selectiva, que provocan el deterioro cognitivo progresivo<sup>1</sup>. Aunque la etiología de la EA es desconocida, hay una buena caracterización de las señas de identidad de ésta: la deposición extracelular del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) en forma de placas seniles y la acumulación intracelular de agregados de proteína tau hiperfosforilada en forma de ovillos neurofibrilares. Los ovillos neurofibrilares son comunes en varios desórdenes neurológicos, pero sólo las placas de  $A\beta$  son características en la EA, lo que le hace protagonista de la demencia tipo EA. De hecho hay muchos estudios que demuestran que el deterioro de la memoria está fuertemente correlacionado con los niveles de oligómeros de  $A\beta$  ( $oA\beta$ ) en el hipocampo<sup>2</sup>. El hecho de que sea el hipocampo el área que más gravemente se ve afectado en los estados iniciales ha dirigido la atención de una gran parte de estudios al papel de los receptores de NMDA en la toxicidad amiloidea.

Sin embargo parece que de forma inicial la ruta que se encuentra primeramente afectada es la colinérgica, donde se ha descrito que previamente a la formación de placas existe neurotoxicidad, cambios electrofisiológicos y alteración en la función cognitiva. Esto podría estar relacionado con la posterior progresión del daño hacia la ruta glutamatérgica hipocampal debido a que existen entradas colinérgicas desde la corteza entorrinal hacia el hipocampo.

### 1.1.1. Ruta colinérgica

El prosencéfalo basal está formado por estructuras como el septum medial y horizontal, la banda diagonal de Broca y el núcleo basal de Meynert. Estas estructuras presentan las mayores proyecciones hacia dianas corticales en el hipocampo y a lo largo del neocórtex como sería la amígdala o el núcleo talámico<sup>3,4</sup>.

La acetilcolina (ACh) tiene un papel importante en el desarrollo y función cortical. A parte de tener relevancia como neurotransmisor, puede actuar como morfógeno para modular y regular la maduración celular y su diferenciación en las dianas corticales. Además podría estar implicado en la diferencia de comportamiento entre sexos (apoyando la teoría de que la ACh tiene un rol importante en la modulación cognitiva del comportamiento durante el desarrollo), produciendo un dimorfismo sexual<sup>3</sup>. Además, la ACh aumenta la producción de factores neurotróficos en el cerebro y protege de la neurotoxicidad producida por el  $A\beta$ .

Existe abundante información sobre la existencia de un vínculo entre los receptores nicotínicos cerebrales y los mecanismo patogénicos esenciales de la EA. El  $A\beta$  soluble se ve implicado en la

neurotransmisión colinérgica, pudiendo explicar el déficit en el aprendizaje y memoria, antes de la formación de placas, ya que puede afectar directamente a los receptores nicotínicos de tipo  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ AChRs), reduciendo la activación nicotínica y disminuyendo la entrada de calcio. Puede actuar como agonista o como antagonista (inhibidor) de estos receptores, dependiendo de la concentración en la que se encuentre<sup>5,6</sup>. Se ha demostrado que la pérdida de estos receptores va precedida a la acumulación intracelular de A $\beta$ .

Por otra parte existen razones metabólicas en el daño colinérgico. En el envejecimiento normal hay pérdida neuronal pero en la EA se produce de forma aguda y progresiva<sup>7,8</sup>. Las neuronas del prosencéfalo basal son muy vulnerables a agentes tóxicos en comparación con las células que se encuentran en el estriado y el tronco cerebral, siendo la ruta colinérgica más susceptible al daño por A $\beta$  que la serotoninérgica<sup>4</sup>. El envejecimiento altera la actividad metabólica en las neuronas colinérgicas y esto ocurre mucho más pronunciado en el prosencéfalo basal<sup>9</sup>. Para la síntesis de ACh se necesita acetil-CoA, que procede de la degradación de la glucosa, y una deprivación en el aporte de glucosa por motivos vasculares o por impedimento de la glicólisis podría producir déficit de acetil-CoA y por tanto de ACh.

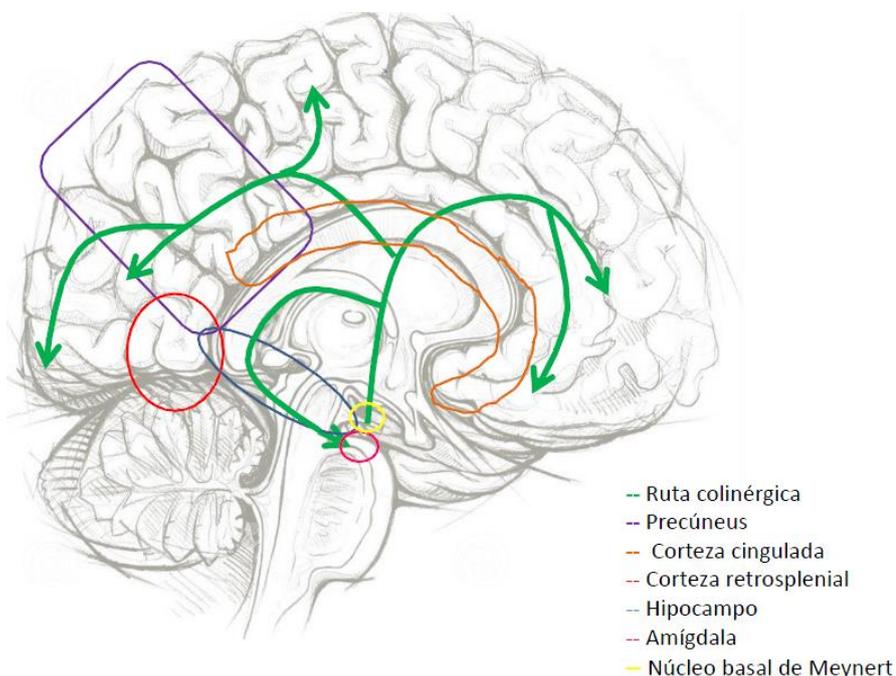
También se ha propuesto que la degeneración colinérgica puede ser debida a la reducción de agentes tróficos. El factor de crecimiento neuronal (NFG) está implicado en la protección y el mantenimiento de las neuronas colinérgicas. La mayoría de componentes funcionales y la señalización de las células colinérgicas dependen del NGF. Una reducción brusca en el transporte retrógrado de NGF hace que las células colinérgicas sean incapaces de transportarlo, apareciendo una reducción de este factor. La administración de NGF puede provocar efectos secundarios, pero retarda el declive cognitivo<sup>4</sup>. El NFG se une con alta afinidad a trkA y con baja afinidad a p75NTR, receptores de neurotrofinas<sup>4</sup>. Las neuronas que contienen estos receptores, los cuales colocalizan con la ACh transferasa (AChT), se encuentran significativamente reducidos en el núcleo basal de Meynert en sujetos con EA en comparación con sujetos sin deterioro cognitivo. Otros estudios muestran una disminución del receptor trkA en estos pacientes. El precursor de NGF (proNGF) se encuentra incrementado en el córtex de pacientes de EA, ya que éste se acumula en presencia de niveles reducidos de trkA en el córtex y con niveles altos de p75NTR, provocando un cambio dramático en el equilibrio entre supervivencia y muerte celular. También se ha descrito que si hay una sobreexpresión de proNGF, se desregula la maduración de NGF y consecuentemente hay un aumento de la vulnerabilidad del sistema colinérgico.

Existen evidencias sobre los déficits severos de marcadores presinápticos colinérgicos en el córtex cerebral en pacientes de etapas tempranas de EA<sup>10</sup>. Además, hay una correlación entre la clínica de la demencia y una reducción de estos marcadores como la acetilcolina transferasa (AChT), transporte de ACh en vesículas (mAChR), la unión a nAChR según los niveles de ACh<sup>11</sup>. Esto

sugiere que hay una asociación entre la hipofunción colinérgica con los déficits cognitivos, dirigiéndolo a la formulación de la teoría colinérgica<sup>12,13</sup> de la disfunción de la memoria en la senescencia y en EA<sup>14</sup>. Esta teoría postula que hay una pérdida neuronal en el cerebro de los pacientes, afectando especialmente a las neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert, habiendo una disminución de AChT, acetilcolin esterasa (AChE) y de receptores nicotínicos<sup>4</sup>.

La desconexión que existe entre el córtex glutamatérgico entorrinal y el hipocampo ocurre tempranamente en la enfermedad. Esto relaciona la vía colinérgica con la degeneración hipocampal y por tanto con la vía glutamatérgicas<sup>15</sup>.

Se realizó un estudio que relacionaba los cambios moleculares, estructurales y funcionales de la EA. Lo primero que se observó fue que en estadios tempranos de la enfermedad se producía una atrofia en la región temporal medial (LTM), donde se encontraba una gran cantidad de proteína tau hiperfosforilada. Por lo tanto, se considera que hay una coexistencia de la patología y la atrofia de esta región, ya que mediante imágenes de resonancia magnética funcional (fMRI) se observó un hipermetabolismo en regiones temporo-parietales<sup>16</sup>. En ese momento, se pensó que los patrones metabólicos podían afectar en el desarrollo de la enfermedad, o bien los efectos metabólicos en las regiones corticales posteriores presentan consecuencias secundarias en la patología del LTM, ya que las regiones corticales posteriores están muy conectadas con este lóbulo, o que esas regiones corticales están directamente afectadas por la patología resultando a una temprana atrofia<sup>16</sup>. Además, se mapearon las estructuras que presentaban una atrofia estructural y se observó que se presentaba una atrofia marcada y acelerada en el LTM y en el precúneus en estadios tempranos de EA. A medida que progresa la enfermedad, la atrofia se extiende a regiones más frontales<sup>16</sup>. Con la información recogida hemos elaborado un esquema de la ruta de progresión de la EA (Figura 1).



**Figura 1** Corte sagital del cerebro. En verde se observa la vía colinérgica y la posible ruta de progresión en la EA. Marcado en amarillo tenemos al núcleo basal de Meynert donde se inicia la patología y la progresión hacia el precúneus (en morado), corteza cingulada (marrón), corteza retrosplenial (en rojo), hipocampo (en azul) y amígdala (rosa).

### 1.1.2. Anticolinesterásicos

La única estrategia farmacoterapéutica que ha demostrado cierta eficacia para mejorar la sintomatología de EA es la que se relaciona con evitar la degradación de ACh, con el objetivo de contrarrestar su déficit cerebral. Por lo tanto, aquellos fármacos que inhiben reversiblemente a la acetilcolinesterasa (AChE) cerebral (como la tacrina, donepecilo, rivastigmina o galantamina) evitan la degradación de ACh en la hendidura sináptica y facilitan los efectos del neurotransmisor, de esta manera se mejora la cognición<sup>17</sup>.

### 1.2. Hipótesis de la cascada de amiloide

Aunque fenotípicamente es sabido que la enfermedad se inicia con el deterioro de la ruta colinérgica y la presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares, las causas moleculares de la misma son controvertidas. La hipótesis de la cascada de amiloide sugiere que el péptido A $\beta$  es el responsable de esta enfermedad. El A $\beta$  deriva del proceso proteolítico secuencial de la proteína precursora de amiloide (APP) mediante la  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa<sup>18</sup>. En individuos sanos, el A $\beta_{40}$  se produce mayoritariamente, mientras que el A $\beta_{42}$  corresponde a una fracción muy pequeña del total. Se postula que una alteración en el metabolismo de APP iniciaría la patología de la EA con la acumulación y agregación del A $\beta$ , que proseguiría con una alteración de las conexiones sinápticas donde el protagonista sería especialmente A $\beta_{1-42}$ , ya que es la especie más hidrofóbica, por tanto más fibrillogénica, y con mayores efectos tóxicos en neuronas<sup>19,20,21</sup>.

Se han descrito multitud de efectos de los agregados de A $\beta$  como mecanismos de neurotoxicidad, estos incluyen la producción de estrés oxidativo, aumento de los niveles de calcio, desregulación de la liberación de neurotransmisores y la unión a distintos receptores como los ya nombrados  $\alpha 7$ -nicotínicos y a los NMDARs.

Como hemos comentado previamente una de las teorías propuestas para explicar el efecto del A $\beta$  es una desregulación en la homeostasis de calcio<sup>22-24</sup>. Esta teoría está reforzada por estudios experimentales que muestran alteraciones en la señales de calcio en la EA<sup>25,26</sup>. El calcio entra en las neuronas a través de distintos canales y receptores ionotrópicos. Los NMDARs se han estudiado detalladamente por su papel crucial en la plasticidad sináptica y en la excitotoxicidad, proceso que contribuye a la etiología de enfermedades neurodegenerativas, como la EA o la enfermedad de Huntington. La localización de los NMDARs es clave en el control de la viabilidad neuronal: la activación de los sNMDARs sinápticos conduce a la transcripción de genes neuroprotectores y promueve la supervivencia neuronal, mientras que la estimulación de los eNMDARs extrasinápticos promueve la muerte neuronal<sup>22,27-30</sup>. También se ha descrito que las perturbaciones en el balance de la actividad de los sNMDARs y los eNMDARs puede incrementar la producción de A $\beta$ <sup>22,31</sup>.

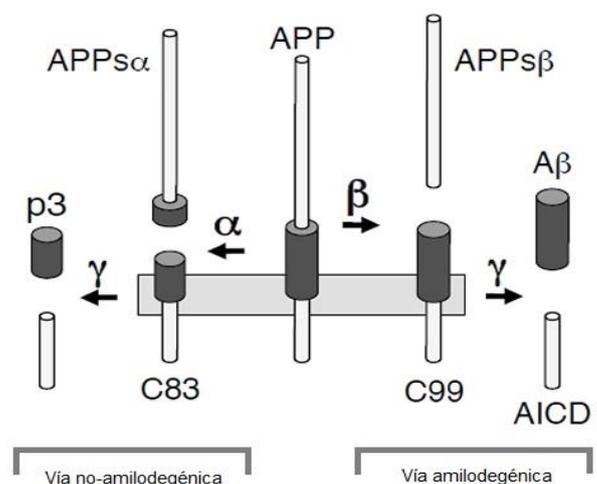
Respecto a otros daños funcionales derivados de la acción del A $\beta$ , se ha descrito que el aumento de concentración de calcio a nivel postsináptico produce depresión sináptica y eliminación de los AMPARs, resultando en la reducción de la formación de las espinas. Esto también facilita la inducción de depresión a largo plazo (LTD) <sup>32</sup> e inhibe la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo, afectando a la memoria y al aprendizaje <sup>33</sup>.

### 1.3. Procesamiento del APP y formación del A $\beta$

Las especies A $\beta_{1-40}$  y A $\beta_{1-42}$  constituyen la mayor parte del péptido A $\beta$  encontrado en el cerebro humano, siendo el A $\beta_{1-42}$  un 10% del total. Éstas derivan de una proteólisis intramembrana del APP, que puede ser procesada por dos vías: la vía no-amiloidogénica o la amiloidogénica. Es en esta última cuando se produce A $\beta$ <sup>1</sup>.

Inicialmente, la liberación del fragmento extracelular del APP puede ser través de la  $\alpha$ - o  $\beta$ -secretasa, produciendo un fragmento soluble de APP alpha (sAPP $\alpha$ ) y un fragmento soluble beta (sAPP $\beta$ ), respectivamente. Con la acción de  $\alpha$ - o  $\beta$ -secretasa, también se forman los fragmentos C-terminal de C83 o C99, respectivamente. Seguidamente, el fragmento C83 o C99 es proteolizado por la  $\gamma$ -secretasa dentro de la bicapa lipídica. Cuando la  $\gamma$ -secretasa procesa el fragmento C83, se produce la liberación del péptido p3 no-amiloidogénico y del fragmento C-terminal intracelular del APP (AICD), pero si procesa el fragmento C99, éste derivará a A $\beta_{40}$  o A $\beta_{42}$  y el AICD (Figura 2).

**Figura 2** Procesamiento proteolítico del APP a través de las secretasas<sup>34</sup>. En la vía amiloidogénica el APP se escinde secuencialmente por la  $\beta$ -secretasa y luego  $\gamma$ -secretasa. De la escisión a través de la  $\beta$ -secretasa se libera sAPP $\beta$  y el fragmento C99 unido a la membrana. Este último fragmento será escindido por  $\gamma$ -secretasa dando lugar a la secreción de A $\beta$  y AICD. Alternativamente, está la vía no-amiloidogénica que corresponde al procesamiento de APP en condiciones fisiológicas, donde primeramente actúa la  $\alpha$ -secretasa, liberando el fragmento sAPP $\alpha$  y dejará en la membrana el fragmento C83. Seguidamente la  $\gamma$ -secretasa proteolizará el fragmento C83 produciendo el péptido p3 y el AICD.



En condiciones fisiológicas, las proteasas de la familia de las ADAM (ADAM9, ADAM10, ADAM13 y ADAM17) son las implicadas en la actividad  $\alpha$ -secretasa, evitando la vía amiloidogénica, ya que este corte de APP imposibilita la formación del péptido A $\beta$  debido a que el dominio de escisión se encuentra dentro de la secuencia del dicho péptido (Figura 2). Por lo tanto, es la  $\beta$ -secretasa (BACE1) la responsable de iniciar la vía amiloidogénica. BACE1 produce intracelularmente el corte del APP por el aminoácido 1 del A $\beta$  y después la  $\gamma$ -secretasa, la cual incluye a la presenilina-1 (PS-1) como centro catalítico, liberará al A $\beta$ <sup>35</sup>.

El A $\beta$  en estado soluble no es tóxico, de hecho está presente en el cerebro de todos los seres humanos desde la infancia pero existen determinadas condiciones que favorecen su agregación convirtiéndolo en neurotóxico<sup>36,37</sup>. Los monómeros de A $\beta$  formarán oligómeros, fibras y eventualmente placas; se sabe que los oligómeros solubles son sinaptotóxicos y causan el deterioro cognitivo y la progresión de la EA<sup>38,39</sup>.

Por otra parte existen 3 isoformas de APP en los mamíferos. El gen del APP puede ser modificado mediante un splicing alternativo produciendo diferentes isoformas del APP variando su longitud de 695 a 770 aminoácidos<sup>1</sup>. La APP-695 es la isoforma predominante<sup>40</sup>, mientras que las variantes APP-770 y la APP-751 contienen el dominio inhibitorio serin-proteasa conocido como Kunitz protease inhibitor (KPI). Este dominio es capaz de inhibir a  $\alpha$ -secretasa (ADAM17), presentando un potencial amilodogénico<sup>41</sup> donde se incrementará la producción del A $\beta$ <sup>42</sup>. De hecho hay estudios que demuestran que los niveles del mRNA de la isoforma APP-770 están elevados en pacientes con EA<sup>22,43</sup>.

Por lo tanto, la producción de A $\beta$  es un proceso celular normal, ya que éste está en el líquido cefalorraquídeo y en el plasma de sujetos sanos a lo largo de la vida. La acumulación de A $\beta$  en el cerebro de pacientes de EA puede ser debido a problemas en el aclaramiento hacia el plasma o bien por una sobreproducción del mismo. Este aumento de producción puede deberse a un aumento de actividad de BACE1 o bien a cambios en la cantidad o distribución del APP<sup>30</sup>.

#### 1.4. Agregación del A $\beta$

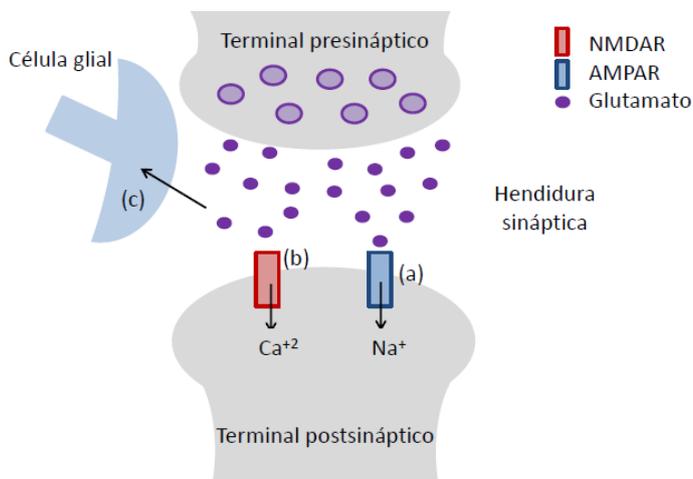
La formación de agregados proteicos, mayoritariamente debidos a plegamientos en hoja  $\beta$ , es característica de enfermedades neurodegenerativas como la EA, el Parkinson, la corea de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica. Estas proteínas que agregan pierden su funcionalidad y pueden llegar a generar agregados tóxicos. El A $\beta$  en estado soluble no es tóxico y no tiene una función identificada en el cerebro. El A $\beta$  tiende a agregarse, convirtiéndose en neurotóxico cuando agrega en hoja  $\beta$ <sup>44</sup>. Las proteínas que se encuentran parcialmente plegadas son las más vulnerables a plegarse incorrectamente o a formar agregados<sup>45</sup>. Estos agregados pueden estar formados por pocos monómeros (oligómeros) siendo altamente tóxicos o por muchos monómeros formando fibras que son menos tóxicas y se agrupan formando las placas seniles.

## 2. La sinapsis glutamatérgica y la formación de memoria

### 2.1. La sinapsis glutamatérgica

La transmisión glutamatérgica (Figura 3) está presente muchas áreas del sistema nervioso. Además de su rápida acción, la activación de los receptores de glutamato juega un importante papel en los cambios duraderos que conducen a la creación de nuevas sinapsis dentro de los

procesos de LTP y de plasticidad sináptica. Es decir estos receptores inician el codificado y almacenamiento de la memoria y la representación contextual de los estímulos.



**Figura 3** Transmisión glutamatergica. A nivel hipocámpico, la colateral de Schaffer de las neuronas de la zona CA3 (terminal presináptico) libera glutamato. La acción del glutamato recae en los botones postsinápticos de las neuronas de la zona CA1, (a) activando a los receptores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropionico (AMPA) y así generar un potencial postsináptico excitatorio. Esta despolarización es necesaria para poder (b) activar a los receptores NMDA, ya que se encuentran bloqueados por el ión magnesio (corresponde a un bloqueo voltaje dependiente). Por lo tanto, para que

los NMDAR se activen tiene que producirse simultáneamente la liberación de glutamato y una despolarización. Una vez abiertos entra el calcio que desencadena una señal intracelular específica para producir la LTP. Las células gliales (c) realizan un papel fundamental en la recaptación de glutamato.

### 2.1.1. Los receptores de NMDA

Los NMDARs son un subtipo de receptores inotrópicos glutamatergicos. Son canales tetraméricos, compuestos por dos subunidades NR1 siempre presentes (GluN1) y dos subunidades accesorias que pueden ser NR2 (GluN2A-D) o NR3 (GluN3A-B). Cada una de las cuatro subunidades de los NR2 presenta diferencias funcionales, siendo los NR2A y los NR2B los más abundantes en el prosencéfalo. Los NMDARs que contienen NR2A se encuentran ligeramente abiertos pero una vez se libera el glutamato lo hacen de manera completa, mientras que los receptores que presentan la subunidad NR2B presentan baja probabilidad de estar abiertos, pero tienen una alta afinidad de unión por el glutamato y una alta permeabilidad al calcio<sup>46</sup>. Durante el desarrollo postnatal, se producen cambios de expresión de NR2A en comparación con los NR2B. Estos cambios pueden explicarse por los efectos sobre la decadencia cinética de los NMDARs mediado por las respuestas sinápticas que ocurren durante el desarrollo, aunque recientemente se apoya que este cambio sea debido a la actividad cortical y las cascadas intracelulares. Otro factor importante que regula la función sináptica dependiente de NMDARs es que en el córtex adulto predominan los NR2A en lugares sinápticos mientras que los receptores que contienen NR2B se localizan preferencialmente en lugares extrasinápticos<sup>47</sup>. En otro estudio se vio que aquellos NMDARs que contienen GluN2A están implicados en la pérdida de espinas dendríticas inducidas por  $\text{A}\beta$ , mientras que aquellos que presentan GluN2B median la neurotoxicidad de  $\text{A}\beta$ <sup>48</sup>.

## 2.2. Fisiología en las espinas dendríticas

El hecho de que las moléculas esenciales para la formación de las espinas estén involucradas en la LTP y la memoria, indica que los cambios morfológicos pueden participar en el mantenimiento de la plasticidad estructural de las espinas dendríticas. De hecho, la inducción de la LTP y LTD se ha asociado con la ampliación o reducción de tamaño de las espinas, respectivamente<sup>49</sup>.

La plasticidad sináptica se muestra por dos paradigmas bien caracterizados: LTP y LTD. La LTP es un aumento de la duración en la transmisión sináptica entre dos neuronas que resulta de la estimulación repetitiva y de alta frecuencia (50-200 Hz) dando lugar a un aumento en la fuerza sináptica<sup>50,51</sup>. Existen varios tipos de LTP descritas, pero nos centraremos en la LTP dependiente de NMDARs que se produce en las neuronas tipo Hebb del hipocampo<sup>52</sup>. Por otro lado, la LTD es una reducción de la duración en la transmisión sináptica causada por una estimulación sostenida de baja frecuencia (<10 Hz)<sup>53</sup>.

La LTP incluye dos fases: una fase temprana, independiente de la síntesis de proteínas y una fase tardía, más persistente, relacionada con la síntesis de proteínas y cambio en la expresión de genes<sup>54</sup>. A su vez, la primera fase se puede dividir en los cambios a corto plazo (inducción) y los cambios a largo plazo (mantenimiento), que involucran principalmente la síntesis de nuevas proteínas y modificaciones estructurales de las espinas dendríticas.

En la fase temprana, durante la inducción de la LTP, el glutamato actúa sobre los AMPARs. Además encontramos a los NMDARs cerrados debido a que el ión magnesio bloquea el canal. Cuando se produce la despolarización de la membrana postsináptica, lo que sucede es que el NMDAR deja de estar bloqueado por el magnesio y se activa. Gracias a la acción del glutamato sobre los NMDARs, permite la entrada del calcio, siendo la fase crítica de la inducción de la LTP. Seguidamente, para mantener la LTP, el influjo de calcio desencadenará una cascada intracelular, activando a dos proteínas quinasa dependientes de calcio: la proteína quinasa C (PKC) y la calmodulina quinasa 2 (CaMKII). Estas dos proteínas fosforilarán un sustrato, hasta ahora desconocido, crítico en la inserción de AMPARs que hasta el momento se encontraban invaginados en la membrana. Estos receptores son translocados a la membrana dendrítica, aumentando las densidades postsinápticas asociadas, y por lo tanto, hay más posibilidad de contacto, incrementando la sensibilidad de la sinapsis al glutamato. En este momento, pueden volverse funcionales aquellas sinapsis que permanecían silenciosas, pero para que esto sea posible necesitamos una concurrencia de actividad entre la neurona presináptica y la postsináptica, conocido como la LTP hebbiana<sup>52</sup>, es decir, que ambas actúen al unísono. Esto sucede gracias a la participación del óxido nítrico (NO), molécula formada en el terminal postsináptico que difunde retrógradamente para aumentar la liberación de glutamato.

En la fase tardía, para que se observen cambios en el patrón de expresión génica y síntesis de nuevas proteínas, es necesaria la participación de la proteína quinasa A (PKA). La PKA activa a cAMP response element-binding protein (CREB), factor de transcripción, y éste se transloca al núcleo. Esto estimula la expresión de otros factores de transcripción, como c-fos o Junk, implicados en la síntesis de proteínas que contribuirán al desarrollo neuronal, nuevas espinas dendríticas y el crecimiento de éstas. De manera que, después de la LTP, se observa un aumento en la efectividad y un fortalecimiento de la sinapsis, ya que permitirán nuevos contactos sinápticos y facilitarán la transmisión de glutamato.

Mientras que la LTP es debida a la activación de proteínas quinasas, la LTD surge de la activación de fosfatasas dependientes de calcio. Para producir una LTD es necesaria una estimulación sostenida y de baja frecuencia, a diferencia de la LTP. Este tipo de estimulación despolariza levemente a las neuronas glutamatérgicas haciendo que haya una leve entrada de calcio. Seguidamente, se activan fosfatasas dependientes de calcio, como la calcineurina, que provocará la defosforilación de proteínas involucradas en la internalización de los AMPARs, a través de un proceso de endocitosis mediada por clatrina. Como consecuencia, disminuyen las densidades postsinápticas, la sensibilidad al glutamato y algunas sinapsis pasan a ser silentes, y por lo tanto, una pérdida de contacto en éstas<sup>55</sup>.

Las alteraciones morfológicas después de LTP y LTD se han estudiado en gran medida e incluyen cambios en el número de espinas, en su tamaño y forma<sup>56</sup>. Por lo tanto, el aumento de densidad de espinas podría contribuir en la mejora de la transmisión, ya que proporciona más conexiones con la neurona presináptica. Por otro lado, como resultado de LTD se produce una reducción del número de espinas y de una disminución de la superficie sináptica<sup>49</sup>.

Existen evidencias sobre la correlación entre la reorganización del citoesqueleto de actina con la plasticidad sináptica y el fortalecimiento de las sinapsis, que a su vez afecta a la morfología de las espinas<sup>57</sup>. La ampliación de las espinas dendríticas inducida por la LTP se acompaña de un aumento en los niveles de F-actina. El citoesqueleto de actina se estabiliza, por la inactivación de la cofilina y por la acción de la CaMKII y otras proteínas que se unen a actina<sup>58</sup>. Por otro lado, la LTP resulta en la contracción de las espinas dendríticas asociadas a la despolimerización de la actina<sup>59</sup>.

### 2.3. Neuroprotección dependiente de los receptores NMDA sinápticos (sNMDARs)

La estimulación de los sNMDARs induce la supervivencia celular desencadenando procesos genómicos que harán a las neuronas más resistentes a procesos de apoptosis y estrés; mientras que la estimulación de los eNMDARs anula esas vías, causando una disfunción mitocondrial y muerte celular<sup>60</sup>. Los sNMDARs inducen la expresión de genes de supervivencia, supresión de

genes apoptóticos y aumentan las defensas antioxidantes, principalmente a través de la activación de CREB y ERK 1/2<sup>27,60,61</sup>.

### 2.3.1. Inducción de genes de supervivencia

La señalización del calcio es un sistema de comunicación entre la célula y el núcleo; su actividad provoca una respuesta transcripcional en las neuronas, como ocurre tras la activación de los sNMDARs, promoviendo la potenciación sináptica<sup>27</sup>.

El calcio entra a través de los sNMDARs, aumentado por la liberación de las reservas internas, después este calcio invade el núcleo<sup>60</sup>. El calcio nuclear es uno de los activadores más potentes de la expresión de genes neuronales, existen unos 200 genes controlados por la señalización nuclear de calcio<sup>27,62</sup>. Las dianas más importantes del calcio nuclear son la CaMKIV y el factor de transcripción CREB (Figura 4a)<sup>63</sup>. CREB está regulado por la señal prototípica, cuyo rol es el de la supervivencia neuronal, así como otros muchos procesos (plasticidad sináptica, adicción, neurogénesis, aprendizaje y memoria). En las neuronas hipocampales, la expresión génica depende de CREB y casualmente está vinculada con la neuroprotección y en contra de los eventos de apoptosis y excitotoxicidad<sup>27,64</sup>. Entre el conjunto de genes regulados por el calcio nuclear, existen unos genes bien caracterizados conocidos como activity-regulated inhibitors of death (AID). Estos son capaces de proporcionar una neuroprotección de amplio espectro<sup>62</sup>. Alguno de estos genes (Atf3, Big2, Bcl6...) parecen ser diana de CREB y pueden otorgar protección neuronal a través de procesos comunes que hacen que las mitocondrias sean más resistentes hacia el estrés celular o agentes tóxicos<sup>62,65</sup>.

Otra diana de la señalización de los sNMDARs y del calcio nuclear es el gen que codifica para la neurotrofina brain derived neuronal factor (BDNF)<sup>60,62,66</sup>. BDNF presenta propiedades neuroprotectoras y puede rescatar aquellas neuronas a las que se les ha inducido la muerte a través del bloqueo de los NMDARs<sup>67</sup>.

A pesar de que CREB sea la clave de la neuroprotección, hay otro factor de transcripción implicado en la supervivencia a través de los NMDARs que también podría estar controlado por la señal de calcio nuclear, conocido como el factor nuclear de activación de células T (NFAT). En contraste, la activación de otros factores neuroprotectores como el factor nuclear I subtipo A (NFIA), puede ocurrir independientemente de la elevación de calcio a nivel del núcleo, ya que esta activación depende de una señal extracelular regulada por la quinasa 1/2 (ERK1/2) y de la síntesis del NO<sup>27</sup>.

### 2.3.2. Supresión de los genes que provocan la muerte

Un mecanismo secundario realizado a través de la actividad sNMDARs es la restricción del potencial apoptótico de las neuronas, provocando una supresión transcripcional de los

componentes centrales de la cascada de la apoptosis<sup>65</sup>. La actividad de los sNMDARs suprime la expresión del gen Puma (Figura 4c). La expresión de Puma es suficiente para inducir la muerte celular y para la apoptosis como respuesta al bloqueo de los NMDARs<sup>65</sup>. Como con la activación de CREB, la supresión de Puma es específica de la señalización de sNMDARs.

La supresión de Puma inhibe la cascada apoptótica por encima de la liberación del citocromo c, pero existen mecanismos protectores en procesos por debajo de éste, como el apoptosi protease-activating factor-1 (Apaf1) y la pro-caspasa 9, que también se encuentran suprimidos transcripcionalmente por la activación de sNMDARs. Además, pueden suprimir a otros genes como FOXO o p53 (Figura 4b), donde este último contribuye a la supresión de Apaf1<sup>65</sup>. El efecto neto de todos estos cambios transcripcionales es que se limita e inhibe la apoptosis, aumentando la viabilidad de las neuronas.

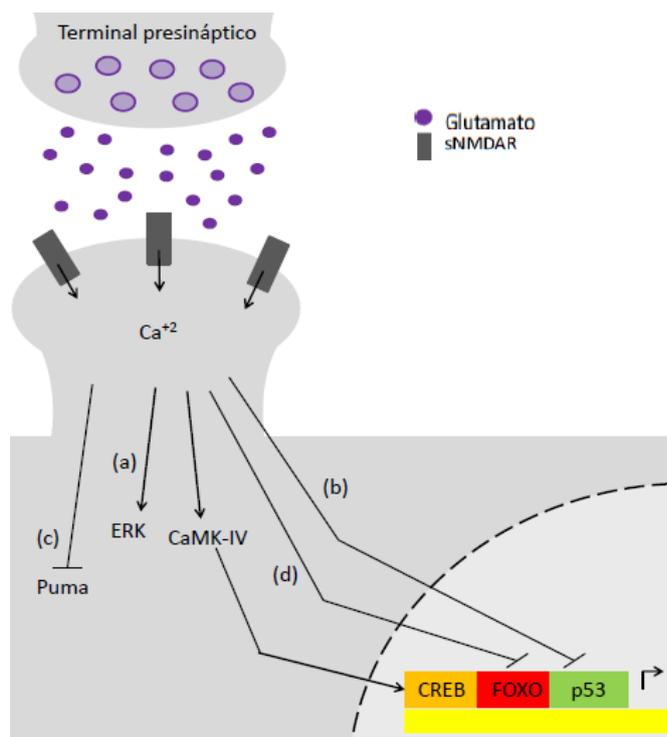
### 2.3.3. Protección contra el estrés oxidativo

Adicionalmente a la supresión de los efectos apoptóticos, la actividad de sNMDARs aumenta las defensas antioxidantes<sup>27</sup>, contribuyendo en la neuroprotección contra agentes oxidativos. Si los NMDARs son bloqueados, se provoca la muerte celular asociada a proteínas carboxiladas, marca específica de estrés oxidativo, cosa que sugiere que el papel fisiológico de la actividad de los NMDAR es reforzar y proporcionar defensas antioxidantes. También presenta un control sobre el sistema tioredoxina-peroxiredoxina, teniendo efectos neuroprotectores. Específicamente, la actividad sináptica aumenta la actividad de la tioredoxina y facilita la reducción de las peroxiredoxinas. Este efecto está controlado por un programa de cambios de expresión génica de genes como FOXO (Figura 4d)<sup>68</sup>. El hecho de que la actividad de sNMDAR pueda regular la expresión de ciertos genes implicados en el estrés oxidativo, hace pensar que tal vez otros sistemas como el del glutatión puedan estar regulados por este mecanismo.

## 2.4. El óxido nítrico

El NO es un neurotransmisor retrógrado que se sintetiza en la neurona postsináptica como respuesta al calcio que ha entrado a través de los NMDARs. Este calcio activará a la óxido nítrico sintetasa (NOS) que producirá NO a través de L-arginina y oxígeno. La función del NO es difundir desde el terminal postsináptico hasta el presináptico para estimular la liberación de glutamato por el terminal presináptico favoreciendo la LTP. Gracias a esta molécula existe una concurrencia de actividad entre la neurona presináptica y la postsináptica actuando al unísono. Pero no sólo es un mensajero retrógrado, sino que dentro de las neuronas postsinápticas puede activar a la guanilil ciclasa para producir guanosín monofosfato cíclico (cGMP) y activar a distintas proteínas por fosforilación mediada por la proteína quinasa G (PKG).

**Figura 4** Mecanismos por los que los sNMDARs confieren neuroprotección. Cuando se estimulan los sNMDARs se induce la supervivencia celular desencadenando procesos genómicos que harán a las neuronas más resistentes a procesos de apoptosis y estrés. La entrada de calcio a través de estos receptores induce: (a) la activación de CREB y ERK facilitando la expresión de genes protectores y de supervivencia, (b) la inactivación de genes como p53 para inhibir procesos apoptóticos, (c) inhibición del gen Puma suprimiendo la muerte celular y (d) inhibición de FOXO para conceder protección contra el estrés oxidativo. Por lo tanto, los sNMDARs inducen la expresión de genes de supervivencia, supresión de genes apoptóticos y aumentan las defensas antioxidantes, principalmente a través de la activación de CREB y ERK 1/2



### 3. Fisiopatología de los receptores de NMDA extrasinápticos

#### 3.1. Efectos diferenciales entre sNMDARs y eNMDARs

Bajo condiciones fisiológicas, la subpoblación de NMDARs más activos son los sNMDARs, pero durante eventos patológicos se produce una reducción de la actividad de éstos, aumentando la actividad de eNMDARs o de ambos <sup>27</sup>. Los eNMDARs promueven una sobrecarga de calcio, estrés oxidativo, comprometen el potencial de membrana mitocondrial, la inactivación de CREB y ERK 1/2<sup>31</sup> y median la neurodegeneración dependiente de tau<sup>48</sup>.

#### 3.2. Neurotoxicidad dependiente de los receptores NMDA extrasinápticos (eNMDARs)

La muerte neuronal dependiente de los NMDAR está mediada por múltiples vías, la contribución dependerá del tipo de célula, el estadio de desarrollo y/o la intensidad de los efectos excitotóxicos<sup>69,70</sup>. Estudios recientes muestran evidencias sobre la activación preferencial de eNMDARs para producir procesos pro-apoptóticos (Figura 6).

##### 3.2.1. Inactivación del factor de transcripción CREB y la papel de la proteína Jacob

La activación de los eNMDARs a través de glutamato induce una entrada de calcio y consecuentemente la defosforilación de CREB<sup>60,70</sup> mediante la inducción del transporte de la proteína mensajera, Jacob, hacia el núcleo (Figura 6a). Si hay una sobreexpresión de Jacob en el núcleo, se expresan una serie de genes que inducirán neurodegeneración, mientras que su supresión generará los efectos contrarios <sup>71,72</sup>.

Jacob es diana de ambas vías, tanto de eNMDARs como sNMDARs<sup>72</sup>. Exclusivamente la activación de sNMDARs, y no la de eNMDARs, produce la fosforilación de Jacob en el residuo Ser180 mediante ERK1/2. Para que ERK se active requiere una estimulación de alta frecuencia (LTP), cuando esto ocurre ERK se fosforila. Es decir, para que se produzca la translocación de Jacob al núcleo después de la estimulación de sNMDARS, depende de la activación de ERK. En este momento, se forma un complejo trimérico estable con la unión del neurofilamento  $\alpha$ -internexin y así evitar la defosforilación de Jacob/ERK durante el transporte hacia el núcleo.

Cuando eNMDARs está activo, Jacob no se fosforila, pero sin embargo sí se transloca al núcleo. Es importante destacar que la señalización a través de eNMDARs no afecta en la fosforilación de ERK<sup>27</sup>. Cuando Jacob se localiza en el núcleo desfosforila a CREB y promueve una pérdida de contactos sinápticos. Esta proteína contiene una señal de localización nuclear y este transporte hasta el núcleo requiere la unión de la  $\alpha$ -importina. Este proceso de unión e importación al núcleo está impedido por la caldendrina, la cual se encuentra unida a Jacob de manera calcio dependiente. La actividad de los sNMDARs promueve la retención de Jacob fuera del núcleo mediante la retención a través de caldendrina, mientras que la activación de eNMDARs promueve la acumulación de Jacob en el núcleo, con subsecuentes efectos en la supervivencia neuronal<sup>29,72</sup>.

Una vez en el núcleo, el estado de fosforilación de Jacob determinará si se induce la muerte neuronal o la supervivencia celular y la potenciación de la plasticidad sináptica<sup>29</sup>. La sobreexpresión de Jacob en estado fosforilado dirigirá la expresión génica para generar un fortalecimiento de la sinapsis, mientras que el estado desfosforilado de Jacob inducirá efectos opuestos y producirá una serie de eventos deteriorativos, causando la muerte celular<sup>29</sup>.

### 3.2.2. Inactivación de ERK1/2

La activación de eNMDARs induce la desfosforilación de ERK1/2 produciendo su inactivación (Figura 6b). Respecto a esto, los eNMDARs para poder ejercer su acción sobre ERK, previamente inactivan fuertemente a Ras, que se encuentra por encima en la activación de ERK<sup>27</sup>.

### 3.2.3. Activación de FOXO

La activación crónica de los NMDARs no da lugar a la exportación de FOXO desde el núcleo porque la activación de Akt no es suficiente<sup>68</sup>. Cuando hay una activación sustancial de la vía Akt induce la fosforilación de FOXO y su exportación al núcleo. Finalmente, la activación de FOXO (Figura 6c) hace que éste se transloque al núcleo e induce la muerte celular después de una activación masiva<sup>27</sup>.

### 3.2.4. Activación de calpaina y escisión de STEP

La estimulación de los eNMDARs activa a las calpainas (Figura 6d), proteasas dependientes de calcio, mientras que los sNMDARs no lo hacen<sup>73</sup>. Uno de los sustratos de las calpainas, en concreto la m-calpaina, es STEP, la cual es escindida de tal manera que no podrá interactuar con normalidad con sus sustratos. La p38-MAPK es uno de los sustratos con los que interacciona STEP y se encuentra en abundancia en las regiones extrasinápticas de las membranas y contribuye en la muerte neuronal mediada a través de la exposición crónica a NMDA o glutamato en las células granulares cerebelosas o en las neuronas corticales<sup>73</sup>.

La inhibición de la escisión de STEP mediada por la calpaina es suficiente para inhibir la activación de p38 y proteger a las neuronas de la toxicidad del glutamato y la privación de oxígeno y glucosa<sup>73</sup>.

Por lo tanto, una vez la calpaina ha completado la escisión de STEP y la subsecuente activación de p38, representa otra cascada de muerte celular que se activa selectivamente a través de los eNMDARs<sup>29</sup>.

A diferencia de la activación de sNMDARs, si se estimulan los eNMDARs no se induce el incremento de la expresión del mRNA de BDNF<sup>22</sup>.

## 3.3. El péptido A $\beta$

### 3.3.1. Relación de A $\beta$ con los NMDARs

El péptido A $\beta$  es capaz de regular negativamente el número de NMDARs a nivel postsináptico, desregulando el balance de sNMDARs y eNMDARs<sup>16,3131</sup>. El A $\beta$  actúa sobre los receptores  $\alpha$ 7AChRs y promueve la internalización de sNMDARs a través de la activación de la proteína fosfatasa 2B (PP2B), la cual desfosforilará y activará a STEP. Seguidamente, STEP desfosforilará a sNMDARs provocando su invaginación (Figura 6e)<sup>69</sup>. Por lo tanto, el A $\beta$  aumenta la endocitosis de los sNMDARs y como consecuencia se da una disminución de la expresión génica de supervivencia celular. Además, es importante destacar que el A $\beta$  no redistribuye los sNMDARs a regiones extrasinápticas, sino que se produce una reducción de éstos aumentando la proporción de los extrasinápticos<sup>74</sup>. Se ha observado en muestras hipocámpales de pacientes de EA que presentan una expresión reducida de PSD-95 y de GluN2B en la fracción sináptica pero no extrasináptica de los NMDARs.

Los efectos del A $\beta$  en las neuronas hipocámpales son un aumento en la liberación de glutamato a nivel presináptico, una inhibición de la receptación de glutamato a nivel de la glía y un incremento en general de la concentración extracelular del glutamato<sup>69</sup>. Recientemente se ha mostrado como el A $\beta$  provoca la ubiquitinación y una reducción de la expresión del transportador de glutamato

(GLT-1) en la superficie de las células gliales, disminuyendo la eliminación de glutamato liberado (Figura 6f)<sup>75</sup>.

### 3.3.2. Relación de A $\beta$ con los receptores $\alpha$ 7 nicotínicos ( $\alpha$ 7AChRs)

En pacientes de EA se observa una reducción significativa de los nAChRs, sugiriendo que el A $\beta$  puede dañar a los nAChRs<sup>6,76</sup>. El A $\beta$ , en concentraciones nanomolares<sup>6</sup>, afecta la actividad sináptica colinérgica, ya que se une con alta afinidad a los nAChRs, en particular al subtipo  $\alpha$ 7. Al unirse, inhiben la liberación de ACh y alteran la homeostasis del calcio<sup>76</sup> que desencadenarán a una neurodegeneración. La pérdida de estos receptores va precedida por la acumulación intracelular de A $\beta$  y se ve restringida a las regiones donde se desarrolla la patología<sup>4</sup>, pudiendo ser un factor clave en la degeneración neuronal colinérgica.

Adicionalmente, el A $\beta$  en concentraciones nanomolares también puede provocar la liberación de glutamato desde las células gliales hipocampales<sup>69</sup>, ya que se observó un rápido aumento de la liberación de glutamato dependiente de calcio a través de los astrocitos (Figura 6g). Este efecto depende de la activación de los receptores  $\alpha$ 7AChRs<sup>76</sup>.

Por lo tanto, el A $\beta$  se une y activa a los  $\alpha$ 7AChRs únicamente cuando se encuentra en concentraciones picomolares, funcionando como un agonista del receptor<sup>76,77</sup>, mientras que a altas concentraciones (nanomolares) actúa como un antagonista<sup>5,76</sup>. En concentraciones picomolares, induce una elevación del calcio intracelular en los astrocitos hipocampales, fomentando la producción de LTP, la plasticidad sináptica y la memoria<sup>77</sup>, mientras que en concentraciones nanomolares se produce una desensibilización del receptor<sup>5</sup>.

### 3.3.3. Relación entre la actividad neuronal y la producción de A $\beta$

Los pacientes de EA presentan una discapacidad y/o una fuerte pérdida de memoria que se correlaciona con los niveles corticales de A $\beta$  solubles, especialmente de los oligómeros. Existen estudios que demuestran que los oligómeros son capaces de interrumpir las funciones sinápticas progresivamente dirigiéndolo a una pérdida sináptica y a la muerte neuronal, es decir, se debilita la conectividad sináptica en el hipocampo de una manera dependiente a los NMDARs<sup>78</sup>. De la misma manera, también se ha descrito que inhiben la LTP y facilitan la LTD<sup>32</sup>. Con esto se muestra una evidencia de que los oA $\beta$  no afectan directamente a la viabilidad neuronal pero sí interfiere específicamente con la función sináptica.

Mediante la técnica PET, se ha observado que la acumulación de A $\beta$  se da en aquellas regiones cerebrales que exhiben una elevada actividad metabólica en reposo, como son el hipocampo y partes frontales y parietales del córtex, correlacionando los niveles altos de actividad con la producción de A $\beta$ <sup>16</sup>. Además también se relacionó el estrés con la actividad neuronal en EA. Hay

evidencias de que la actividad sináptica modula el metabolismo de  $A\beta$ ; se ha demostrado que un incremento de actividad sináptica, aumenta la formación y secreción del péptido  $A\beta$  en neuronas hipocámpales<sup>79</sup>. A su vez, el incremento del péptido  $A\beta$  inhibe la actividad neuronal, es decir, deprime selectivamente las transmisiones sinápticas excitatorias en aquellas neuronas que sobreexpresan APP. Esto refuerza la hipótesis que postula que el procesamiento amiloidogénico de APP y la actividad neuronal actúan en feedback, siendo el péptido una señal negativa para mantener el control de la hiperactividad<sup>79</sup>.

En 2005, Cirrito mostró que las vesículas de exocitosis, necesarias para la propagación de la actividad neuronal, actuaban rápida y bidireccionalmente para modular los niveles de  $A\beta$  en el líquido intersticial del cerebro. Con esto se vio que los niveles de  $A\beta$  son dinámicos y están directamente influenciados por la actividad sináptica<sup>80</sup>. Además, se ha visto que si se estimula la vía perforante incrementando la actividad sináptica dentro del hipocampo, los niveles de  $A\beta$  aumentan un 30%. Por otro lado, si se administra tetrodoxina (bloqueante del canal de sodio) cesa la actividad de las neuronas, haciendo que la actividad basal baje y en consecuencia los niveles de  $A\beta$  cae hasta un 40%.

Existe una demostración directa región-específica que relaciona los niveles de actividad neuronal con una susceptibilidad de la deposición de  $A\beta$ , seguida de una toxicidad<sup>81,82</sup>. Estos estudios confirman que la deposición de  $A\beta$  está asociada con una reducción bilateral de la conectividad funcional y que esta relación se correlaciona directamente con la magnitud de la pérdida funcional.

De esta manera, se puede decir que la actividad sináptica es paradójicamente perjudicial y puede contribuir en la patogenia de la EA. Aunque puede parecer contradictorio, hay estudios que apoyan las actividades cognitivas, ya que pueden ser protectoras contra esta enfermedad, relacionando niveles altos de actividades mentales con la baja probabilidad de padecer EA<sup>83</sup>. Además, estudios de comportamiento han demostrado que ambientes enriquecidos disminuyen los niveles de  $A\beta$  y su posterior acumulación<sup>84</sup>.

Diferentes autores defienden que los niveles de  $A\beta$  dentro de un rango picomolar, aumentan la plasticidad sináptica y la memoria<sup>77,85</sup>, sugiriendo que corresponde a un proceso que ocurre en situaciones fisiológicas.

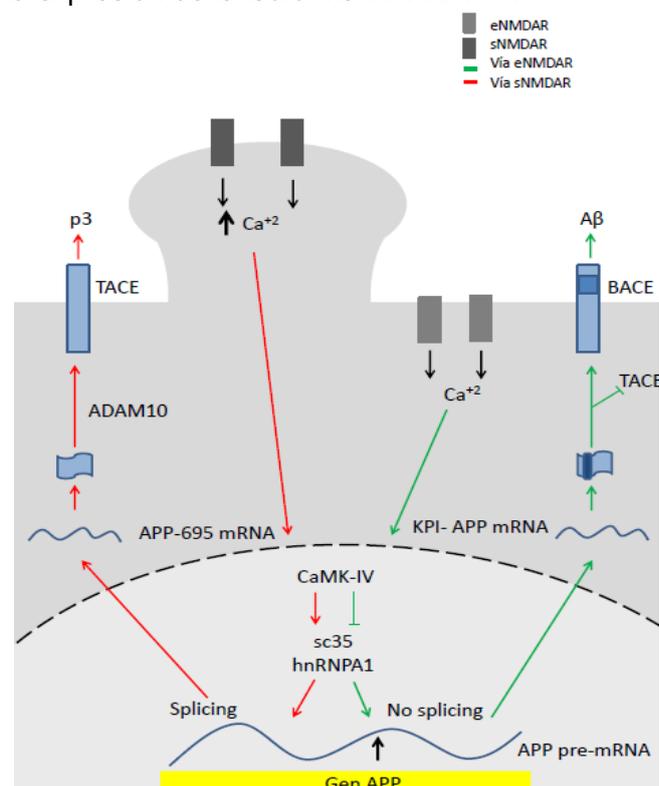
#### 3.3.4. Activación de NMDAR y síntesis de $A\beta$

Estudios recientes muestran la influencia selectiva de estimular ambas poblaciones de receptores sobre el metabolismo del APP y la producción de  $A\beta$ <sup>22</sup>. En cultivos primarios de neuronas corticales, una estimulación prolongada de eNMDARs, pero no de sNMDARs, incrementó la producción y secreción de  $A\beta$ <sup>30,42</sup>. Este efecto era precedido a la modificación del patrón de

expresión neuronal de APP, de la isoforma APP-695 a APP-KPI (Figura 5). Este cambio en el patrón de expresión hace que el procesamiento de APP se dé a través de  $\beta$ -secretasa, incrementando así la producción de A $\beta$ , ya que el dominio KPI inhibe la acción de  $\alpha$ -secretasa. En contra, la no inducción de APP-KPI se observaba cuando la estimulación se daba en los sNMDARs.

Las concentraciones intracelulares de calcio observadas después de la activación de eNMDARs son menores en comparación con la cantidad observada después de la activación de sNMDARs. Por lo tanto, la modificación observada en el metabolismo de APP y A $\beta$  no se puede explicar mediante la alta entrada de calcio, pero sí sugiere una diferente vía de señalización por cada tipo de receptores. Además, los cambios de expresión neuronal de APP mediados por la activación de eNMDARs están regulados por un splicing alternativo donde está involucrado calcio y CaMK. La desregulación de la neurotransmisión glutamatérgica está implicada en un incremento de los niveles de síntesis de A $\beta$  a través de eNMDARs<sup>30</sup>. Por lo tanto, se puede afirmar que la activación de eNMDARs, pero no de los sNMDARs, induce la expresión de la isoforma KPI-APP<sup>22</sup>.

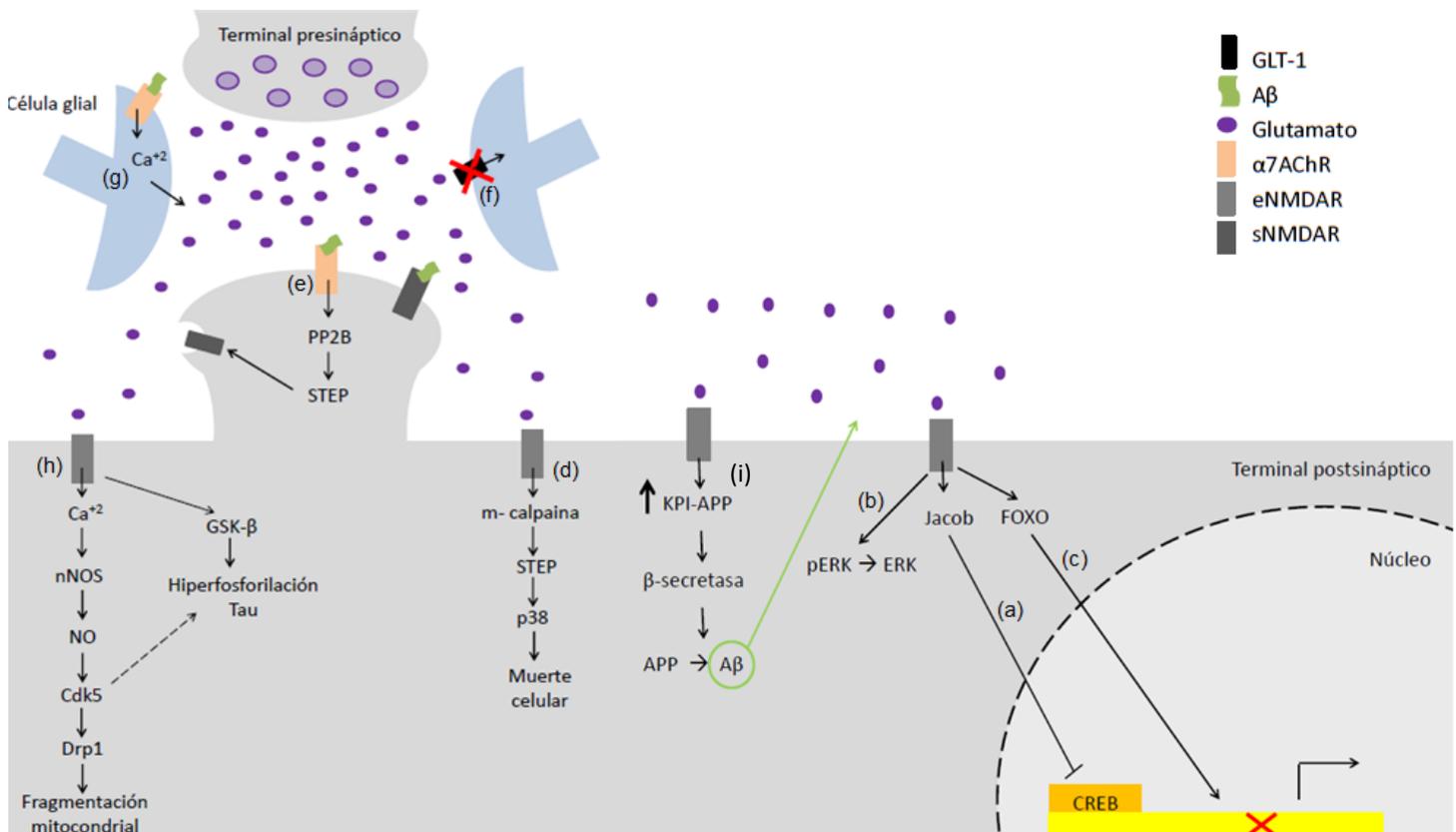
**Figura 5** La activación selectiva de los eNMDARs está involucrada en la liberación del A $\beta$  neuronal. La entrada de calcio neuronal a través eNMDARs activa a CaMK IV y seguidamente ésta reprime el splicing del pre-mRNA de APP, debido a la inhibición de la ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP) A1 y sc35. Esto lleva al aumento de la expresión neuronal de KPI-APP. El dominio KPI inhibe a la  $\alpha$ -secretasa y consecuentemente se aumenta la producción de A $\beta$  mediante la acción de la  $\beta$ -secretasa. Por el contrario, el splicing del pre-mRNA de APP ocurre con normalidad después de la estimulación de sNMDARs. Según este modelo, las dos poblaciones de NMDARs activan dos vías de señalización de calcio diferentes. El extrasináptico modifica el patrón de expresión de APP y finalmente conduce a una sobreproducción de A $\beta$ .



Además se demostró que bajas dosis de NMDA conducían a una activación sináptica y, por lo tanto, un incremento de la producción y secreción de amiloide, mientras que altas dosis de NMDA suprimía la vía amiloidogénica<sup>87</sup> a través de la activación de ERK. Esto sugirió que un aumento de la activación de ERK representaría una diana terapéutica para reducir la producción de amiloide y la progresión de EA, ya que se puede regular el procesamiento de APP<sup>86</sup>. Es importante destacar, que únicamente los antagonistas de NMDARs (como D-AP5 y MK801) y no los de AMPARs, son

capaces de modificar el metabolismo del APP y del A $\beta$ . Si se bloquean los NMDARs hay un incremento del corte del APP por la  $\alpha$ -secretasa.

Se confirmó que los sNMDARs son protectores, ya que reducen la formación del péptido a través de la promoción de la proteólisis de APP mediante  $\alpha$ -secretasa, mientras que la activación de eNMDARs promueve la escisión de APP por la  $\beta$ -secretasa, con la subsecuente formación de A $\beta$  (Figura 6i)<sup>22</sup>.



**Figura 6** Mecanismos de neurotoxicidad producida por A $\beta$  a través de eNMDARs. (a)(b) La elevada actividad de eNMDARs se asocia con la inhibición de ERK1/2 (desfosforilación) y una translocación de Jacob al núcleo, teniendo un efecto negativo sobre la transcripción mediada por CREB. (c) La transcripción del factor FOXO también es translocado al núcleo en la EA y después de una estimulación de los eNMDAR, pudiendo incrementar la expresión de genes que provocarán la muerte a la célula. (d) En la EA se observa un incremento de la expresión de la MAPK p38, que a su vez, aumentará la hidrolización de STEP a través de la m-calpaina mediada por la actividad de eNMDARs. (e) A $\beta$  actúa sobre los  $\alpha$ 7AChRs provocando una internalización de los sNMDARs a través de la activación de PP2B, la cual desfosforila y activa a STEP. Una vez activo, es capaz de desfosforilar a los sNMDARs e induce su internalización, desregulando el balance entre las dos poblaciones de NMDARs. (f) La expresión del transportador de glutamato está reducida en EA y como consecuencia hay un empeoramiento de la recaptación de glutamato, contribuyendo en la activación de eNMDARs. (g) Los  $\alpha$ A $\beta$  pueden unirse directamente a los  $\alpha$ 7AChRs e inducir una liberación de glutamato dependiente de calcio desde los astrocitos. Esto provoca un incremento de glutamato actuando sobre los eNMDARs. (h) Como resultado del aumento de glutamato extracelular, los eNMDARs están muy activos. Esto genera una sobreproducción de NO, el cual activará a Cdk5 (s-nitrosilación). Cdk5 s-nitrosilado podrá transnitrosilar a Drp1, provocando una fragmentación mitocondrial. Cdk5 es conocida como una quinasa de tau, siendo posible que ésta contribuya en la hiperfosforilación de tau en EA. (i) La activación de los eNMDARs también está relacionada con el aumento de la expresión de la isoforma

APP-KPI, facilitando la proteólisis de APP a través de  $\beta$ -secretasa produciendo A $\beta$  que terminará en el espacio extracelular. Por lo tanto, los eNMDARs promueven una sobrecarga de calcio, estrés oxidativo, compromete el potencial de membrana mitocondrial, la inactivación de CREB y ERK 1/2 y media la neurodegeneración dependiente de tau.

### 3.4. Nitrosilación y efectos deletéreos

En estudios recientes se demostró que la exposición a oA $\beta$  dirige a un incremento dramático en la producción de óxido nítrico (NO) en las neuronas cerebrocorticales (Figura 6h), donde la producción mayoritaria de NO se da en los eNMDARs<sup>28</sup>. Este efecto probablemente sea como resultado de la capacidad que presentan los oA $\beta$  para alterar el balance de la actividad glutamatérgica entre sNMDARs y eNMDARs<sup>31</sup>. El aumento excesivo de NO puede afectar a varias proteínas con papel crucial en la supervivencia neuronal. La producción de NO en las neuronas es mediante la NO sintasa neuronal (nNOS), una isoforma dependiente de calcio. Se ha descrito que la acción de los oA $\beta$  sobre los NMDARs induce la entrada de calcio en las neuronas, produciendo una gran cantidad de NO (~75% del total). También se demostró que los oA $\beta$  inducen S-nitrosilación de Drp1 y Cdk5 mediante los eNMDARs<sup>28</sup>.

La activación de Cdk5 se incrementa después de una exposición a glutamato. Esta proteína puede producir la S-nitrosilación, favoreciendo los efectos nocivos de la EA. Seguidamente se produce la trans-nitrosilación de Drp1, que provocará una disfunción mitocondrial, fallo bioenergético y pérdida sináptica<sup>69</sup>. Además, Cdk5 podría contribuir en el proceso de hiperfosforilación de tau. Estos procesos se encuentran aumentados en los pacientes de EA.

## 4. Dianas terapéuticas en la EA dirigidas hacia la señalización glutamatérgica

La memantina es el único antagonista no competitivo de los NMDARs aceptado para el tratamiento de EA, y normalmente suele combinarse con anticolinesterásicos. Una de las propiedades que hace a este compuesto tan interesante es su alta especificidad por los NMDARs. De hecho, diferentes estudios han demostrado una preferencia de bloqueo para los eNMDARs<sup>61,89</sup> cuando hay una actividad crónica. La memantina no afecta a la respuesta de los sNMDARs y eso es debido a que ésta sólo actúa bajo condiciones patológicas de los NMDARs, sin afectar a la neurotransmisión normal<sup>30</sup>. Al bloquear los eNMDARs se inhibe la expresión de APP-KPI, al igual que la liberación de más péptido A $\beta$ <sup>30</sup>.

Existen otros fármacos como el ifenprodil, antagonista específico de las subunidades GluN2B, que provoca una disminución de la frecuencia del calcio y la depresión sináptica producida por A $\beta$ <sup>71</sup>. Además, también puede bloquear la acción de Jacob de estado desfosforilado y evitar así la inactivación de CREB<sup>71</sup>. Por otro lado, fármacos como rolipram o forskolin, aumentan la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) para activar a CREB, o bien compuestos químicos como el antioxidante trolox cuya función es prevenir la disminución de la expresión del GLT-1<sup>75</sup>.

## 5. Conclusiones

La supervivencia neuronal requiere una comunicación entre la sinapsis y el núcleo. La señal de calcio inducida por la actividad de los NMDARs tiene un papel crucial en funciones neuronales como la plasticidad neuronal, la excitabilidad de la membrana o la expresión de genes, haciendo que la desregulación en la homeostasis del calcio contribuya al inicio de enfermedades neurodegenerativas como es la EA. Existen dos subtipos de NMDARs diferenciándose en su localización, los sinápticos y los extrasinápticos, y en la composición de sus subunidades, NR2A y NR2B, respectivamente.

La estimulación de sNMDARs induce la supervivencia celular desencadenando procesos genómicos que harán a las neuronas más resistentes a procesos de apoptosis y estrés; mientras que la estimulación de eNMDARs anula esas vías, causando neurotoxicidad, disfunción mitocondrial y muerte celular.

Recientemente, se ha observado que la subpoblación de eNMDARs está involucrada directamente en la patogénesis del EA, haciendo que una excesiva estimulación de éstos induzca un aumento en la producción de A $\beta$ . Por otro lado, la actividad sináptica modula la producción de A $\beta$  y la entrada de calcio a través de los NMDARs. A su vez, el incremento de A $\beta$  inhibe la actividad neuronal. Esto afirma que el procesamiento amiloidogénico del APP y la actividad neuronal actúan en feedback, donde el A $\beta$  actúa como una señal negativa para mantener el control de la actividad.

La alta afinidad que tienen los oA $\beta$  para unirse a diferentes receptores como los  $\alpha$ 7AChRs o los NMDARs provoca una serie de cambios morfológicos y sinápticos alterando la memoria y/o el aprendizaje. En el caso de los  $\alpha$ 7AChRs, por un lado pueden inducir una liberación de glutamato dependiente de calcio desde los astrocitos y, por otro lado, provocan la internalización de los sNMDARs afectando en el balance entre NMDARs sinápticos y extrasinápticos.

Actualmente, los únicos tratamientos considerados eficaces son los antagonistas de NMDARs (memantine) y los anticolinesterásicos. Dado que el deterioro de sinapsis comienza temprano en la EA se destaca la necesidad de desarrollar mejores diagnósticos e investigar más a fondo los cambios neurológicos que tienen lugar durante el inicio de la patología.

## 6. Bibliografía

1. Selkoe DJ. Alzheimer ' s Disease : Genes , Proteins , and Therapy. *Perspective*. 2001;81:741-767. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274343>.
2. Geng D, Kang L, Su Y, et al. Protective effects of EphB2 on A $\beta$ 1-42 oligomer-induced neurotoxicity and synaptic NMDA receptor signaling in hippocampal neurons. *Neurochem Int*. 2013;63:283-290. doi:10.1016/j.neuint.2013.06.016.
3. Berger-Sweeney J. The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: Important questions and potential answers. In: *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Vol 27.; 2003:401-411. doi:10.1016/S0149-7634(03)00070-8.
4. Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res*. 2011;221:555-563. doi:10.1016/j.bbr.2010.11.058.
5. Liu Q, Kawai H, Berg DK. beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4734-4739. doi:10.1073/pnas.081553598.
6. Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP. Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem*. 2000;75:1155-1161.
7. Burke SN, Barnes CA. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:30-40. doi:10.1038/nrn1809.
8. Ypsilanti AR, Girão da Cruz MT, Burgess A, Aubert I. The length of hippocampal cholinergic fibers is reduced in the aging brain. *Neurobiol Aging*. 2008;29:1666-1679. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.001.
9. Baskerville KA, Kent C, Personett D, et al. Aging elevates metabolic gene expression in brain cholinergic neurons. *Neurobiol Aging*. 2008;29:1874-1893. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.024.
10. Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci*. 1977;34:247-265. doi:10.1016/0092-8674(77)90303-8.
11. Gsell W, Jungkunz G, Riederer P. Functional neurochemistry of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 2004;10:265-293. doi:10.2174/1381612043386473.
12. García AG. Teoría Colinérgica del Alzheimer. *JANO*. 2002;62:1104.
13. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 1982;217:408-414. doi:10.1126/science.7046051.
14. Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol*. 2000;163:495-529. doi:10.1006/exnr.2000.7397.
15. Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert Rev Neurother*. 2008;8:1703-1718. doi:10.1586/14737175.8.11.1703.
16. Buckner RL, Snyder AZ, Shannon BJ, et al. Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J Neurosci*. 2005;25:7709-7717. doi:10.1523/JNEUROSCI.2177-05.2005.

17. Gandía L, Alvarez RM, Hernández JM, Gónzales-Rubio JM. Anticolinesterásicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol*. 2006;42:471-477.
18. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297:353-356. doi:10.1126/science.1072994.
19. Dodart JC, Mathis C, Ungerer A. The beta-amyloid precursor protein and its derivatives: from biology to learning and memory processes. *Rev Neurosci*. 2000;11:75-93.
20. Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD. Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001;21:4125-4133. doi:10.1074/jbc.M200066200.
21. Haass C. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J*. 2004;23:483-488. doi:10.1038/sj.emboj.7600061.
22. Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O, Buisson A. Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid- $\beta$  production. *J Neurosci*. 2010;30(47):15927-42. doi:10.1523/JNEUROSCI.3021-10.2010.
23. Rush T, Buisson A. Reciprocal disruption of neuronal signaling and A $\beta$  production mediated by extrasynaptic NMDA receptors: a downward spiral. *Cell and Tissue Research*. 2014:1-8.
24. Demuro A, Parker I, Stutzmann GE. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2010;285:12463-12468. doi:10.1074/jbc.R109.080895.
25. Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. 2004;430:631-639. doi:10.1038/nature02940.
26. Stutzmann GE. Calcium dysregulation, IP3 signaling, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist*. 2005;11:110-115. doi:10.1177/1073858404270899.
27. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11:682-696. doi:10.1038/nrn2911.
28. Molokanova E, Akhtar MW, Sanz-Blasco S, et al. Differential Effects of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors on A $\beta$ -Induced Nitric Oxide Production in Cerebrocortical Neurons. *J Neurosci*. 2014;34:5023-8. doi:10.1523/JNEUROSCI.2907-13.2014.
29. Karpova A, Mikhaylova M, Bera S, et al. Encoding and transducing the synaptic or extrasynaptic origin of NMDA receptor signals to the nucleus. *Cell*. 2013;152(5):1119-33. doi:10.1016/j.cell.2013.02.002.
30. Bordji K, Becerril-Ortega J, Buisson A. Synapses, NMDA receptor activity and neuronal A $\beta$  production in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 2011;22:285-294. doi:10.1515/RNS.2011.029.
31. Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, et al. Abeta induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:E2518-27. doi:10.1073/pnas.1306832110.
32. Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D. Soluble Oligomers of Amyloid  $\beta$  Protein Facilitate Hippocampal Long-Term Depression by Disrupting Neuronal Glutamate Uptake. *Neuron*. 2009;62:788-801. doi:10.1016/j.neuron.2009.05.012.
33. Li S, Shankar GM, Selkoe DJ. How do Soluble Oligomers of Amyloid beta-protein Impair Hippocampal Synaptic Plasticity? *Front Cell Neurosci*. 2010;4:5. doi:10.3389/fncel.2010.00005.

34. F. Lichtenthaler S. Alpha-Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein: Proteolysis Regulated by Signaling Pathways and Protein Trafficking. *Curr Alzheimer Res.* 2012;9:165-177. doi:10.2174/156720512799361655.
35. Hussain I, Powell D, Howlett DR, et al. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci.* 1999;14:419-427. doi:10.1006/mcne.1999.0811.
36. Roh JH, Huang Y, Bero AW, et al. Disruption of the Sleep-Wake Cycle and Diurnal Fluctuation of - Amyloid in Mice with Alzheimer's Disease Pathology. *Sci Transl Med.* 2012;4:150ra122-150ra122. doi:10.1126/scitranslmed.3004291.
37. Ulrich JD, Burchett JM, Restivo JL, et al. In vivo measurement of apolipoprotein E from the brain interstitial fluid using microdialysis. *Mol Neurodegener.* 2013;8:13. doi:10.1186/1750-1326-8-13.
38. Hoozemans JJM, Veerhuis R, Rozemuller JM, Eikelenboom P. Soothing the inflamed brain: effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on Alzheimer's disease pathology. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2011;10:57-67. doi:10.2174/187152711794488665.
39. Walsh DM, Selkoe DJ. A $\beta$  oligomers - A decade of discovery. *J Neurochem.* 2007;101:1172-1184. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x.
40. LeBlanc AC, Chen HY, Autilio-Gambetti L, Gambetti P. Differential APP gene expression in rat cerebral cortex, meninges, and primary astroglial, microglial and neuronal cultures. *FEBS Lett.* 1991;292:171-178. doi:10.1016/0014-5793(91)80861-V.
41. Ho L, Fukuchi K i, Younkin SG. The alternatively spliced Kunitz protease inhibitor domain alters amyloid beta protein precursor processing and amyloid beta protein production in cultured cells. *J Biol Chem.* 1996;271:30929-30934.
42. Lesné S, Ali C, Gabriel C, et al. NMDA receptor activation inhibits alpha-secretase and promotes neuronal amyloid-beta production. *J Neurosci.* 2005;25:9367-9377. doi:10.1523/JNEUROSCI.0849-05.2005.
43. Preece P, Virley DJ, Costandi M, et al. Amyloid precursor protein mRNA levels in Alzheimer's disease brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004;122:1-9. doi:10.1016/j.molbrainres.2003.08.022.
44. Uversky VN, Dunker AK. Understanding protein non-folding. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2010;1804:1231-1264. doi:10.1016/j.bbapap.2010.01.017.
45. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:333-366. doi:10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.
46. Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci.* 2012. doi:10.1038/nrn3192.
47. Massey P V, Johnson BE, Moulton PR, et al. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci.* 2004;24:7821-7828. doi:10.1523/JNEUROSCI.1697-04.2004.
48. Tackenberg C, Grinschgl S, Trutzel a, et al. NMDA receptor subunit composition determines beta-amyloid-induced neurodegeneration and synaptic loss. *Cell Death Dis.* 2013;4:e608. doi:10.1038/cddis.2013.129.
49. Bourne JN, Harris KM. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci.* 2008;31:47-67. doi:10.1146/annurev.neuro.31.060407.125646.

50. Kaibara T, Leung LS. Basal versus apical dendritic long-term potentiation of commissural afferents to hippocampal CA1: a current-source density study. *J Neurosci.* 1993;13:2391-2404.
51. Bliss TVP, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 1973;232:331-356.
52. Murakoshi H, Yasuda R. Postsynaptic signaling during plasticity of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 2012;35:135-143. doi:10.1016/j.tins.2011.12.002.
53. Alvarez VA, Ridenour DA, Sabatini BL. Distinct structural and ionotropic roles of NMDA receptors in controlling spine and synapse stability. *J Neurosci.* 2007;27:7365-7376. doi:10.1523/JNEUROSCI.0956-07.2007.
54. Sutton MA, Schuman EM. Dendritic Protein Synthesis, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cell.* 2006;127:49-58. doi:10.1016/j.cell.2006.09.014.
55. Kerchner GA, Nicoll RA. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9:813-825. doi:10.1038/nrn2595.
56. Ultanir SK, Kim J-E, Hall BJ, Deerinck T, Ellisman M, Ghosh A. Regulation of spine morphology and spine density by NMDA receptor signaling in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:19553-19558. doi:10.1073/pnas.0704031104.
57. Hotulainen P, Hoogenraad CC. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol.* 2010;189:619-629. doi:10.1083/jcb.201003008.
58. Okamoto K, Bosch M, Hayashi Y. The roles of CaMKII and F-actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology (Bethesda).* 2009;24:357-366. doi:10.1152/physiol.00029.2009.
59. Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GCR, Kasai H. The Subspine Organization of Actin Fibers Regulates the Structure and Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron.* 2008;57:719-729. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.013.
60. Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci.* 2002;5:405-414. doi:10.1038/nn835.
61. Léveillé F, El Gaamouch F, Gouix E, et al. Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J.* 2008;22:4258-4271. doi:10.1096/fj.08-107268.
62. Zhang SJ, Zou M, Lu L, et al. Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: Identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS Genet.* 2009;5. doi:10.1371/journal.pgen.1000604.
63. Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature.* 1993;365:855-859. doi:10.1038/365855a0.
64. Carlezon WA, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. *Trends Neurosci.* 2005;28:436-445. doi:10.1016/j.tins.2005.06.005.
65. Léveillé F, Papadia S, Fricker M, et al. Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. *J Neurosci.* 2010;30:2623-2635. doi:10.1523/JNEUROSCI.5115-09.2010.
66. Favaron M, Manev RM, Rimland JM, Candeo P, Beccaro M, Manev H. NMDA-stimulated expression of BDNF mRNA in cultured cerebellar granule neurones. *Neuroreport.* 1993;4:1171-1174.

67. Hansen HH, Briem T, Dziejko M, et al. Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. *Neurobiol Dis.* 2004;16:440-453. doi:10.1016/j.nbd.2004.03.013.
68. Papadia S, Soriano FX, Léveillé F, et al. Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci.* 2008;11:476-487. doi:10.1038/nn2071.
69. Parsons MP, Raymond L a. Extrasynaptic NMDA Receptor Involvement in Central Nervous System Disorders. *Neuron.* 2014;82(2):279-293. doi:10.1016/j.neuron.2014.03.030.
70. Hardingham GE, Bading H. Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Vol 1600.; 2002:148-153. doi:10.1016/S1570-9639(02)00455-7.
71. Rönicke R, Mikhaylova M, Rönicke S, et al. Early neuronal dysfunction by amyloid  $\beta$  oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol Aging.* 2011;32:2219-2228. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.01.011.
72. Dieterich DC, Karpova A, Mikhaylova M, et al. Caldendrin-Jacob: A protein liaison that couples NMDA receptor signalling to the nucleus. *PLoS Biol.* 2008;6:0286-0306. doi:10.1371/journal.pbio.0060034.
73. Xu J, Kurup P, Zhang Y, et al. Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP. *J Neurosci.* 2009;29:9330-9343. doi:10.1523/JNEUROSCI.2212-09.2009.
74. Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci.* 2005;8:1051-1058. doi:10.1038/nn1503.
75. Scimemi A, Meabon JS, Woltjer RL, Sullivan JM, Diamond JS, Cook DG. Amyloid- $\beta$ 1-42 slows clearance of synaptically released glutamate by mislocalizing astrocytic GLT-1. *J Neurosci.* 2013;33:5312-8. doi:10.1523/JNEUROSCI.5274-12.2013.
76. Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem.* 2000;275:5626-5632. doi:10.1074/jbc.275.8.5626.
77. Puzzo D, Privitera L, Leznik E, et al. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci.* 2008;28:14537-14545. doi:10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008.
78. Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci.* 2007;27:2866-2875. doi:10.1523/JNEUROSCI.4970-06.2007.
79. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, et al. APP Processing and Synaptic Function. *Neuron.* 2003;37:925-937. doi:10.1016/S0896-6273(03)00124-7.
80. Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, et al. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron.* 2005;48:913-922. doi:10.1016/j.neuron.2005.10.028.
81. Bero AW, Bauer AQ, Stewart FR, et al. Bidirectional Relationship between Functional Connectivity and Amyloid- $\beta$  Deposition in Mouse Brain. *J Neurosci.* 2012;32:4334-4340. doi:10.1523/JNEUROSCI.5845-11.2012.
82. Bero AW, Yan P, Roh JH, et al. Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid- $\beta$  deposition. *Nat Neurosci.* 2011;14:750-756. doi:10.1038/nn.2801.

83. Stern Y. Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2006;20:112-7. doi:10.1097/01.wad.0000213815.20177.19.
84. Lazarov O, Robinson J, Tang Y-P, et al. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell.* 2005;120:701-713. doi:10.1016/j.cell.2005.01.015.
85. Garcia-Osta A, Alberini CM. Amyloid beta mediates memory formation. *Learn Mem.* 2009;16:267-272. doi:10.1101/lm.1310209.
86. Verges DK, Restivo JL, Goebel WD, Holtzman DM, Cirrito JR. Opposing synaptic regulation of amyloid- $\beta$  metabolism by NMDA receptors in vivo. *J Neurosci.* 2011;31:11328-11337. doi:10.1523/JNEUROSCI.0607-11.2011.
87. Hoey SE, Williams RJ, Perkinton MS. Synaptic NMDA receptor activation stimulates alpha-secretase amyloid precursor protein processing and inhibits amyloid-beta production. *J Neurosci.* 2009;29:4442-4460. doi:10.1523/JNEUROSCI.6017-08.2009.
88. Marcello E, Gardoni F, Mauceri D, et al. Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. *J Neurosci.* 2007;27:1682-1691. doi:10.1523/JNEUROSCI.3439-06.2007.
89. Xia P, Chen HV, Zhang D, Lipton S a. Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. *J Neurosci.* 2010;30(33):11246-50. doi:10.1523/JNEUROSCI.2488-10.2010.