Mecanismos de muerte celular en la enfermedad de Alzheimer

M. R. Luquin, E. Martínez-Vila, L. Saldise

Departamento de Neurología y Neurocirugía. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.

RESUMEN. Los mecanismos moleculares implicados en la degeneración neuronal que existe en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer no son conocidos. Se ha postulado un efecto tóxico directo del β-amiloide, un incremento del estrés oxidativo celular, un mecanismo de excitotoxidad, alteración de los mecanismos de transducción y últimamente se ha sugerido que la muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer puede ser apoptótica.

SUMMARY. Molecular mechanisms involved in neuronal degeneration in Alzheimer's disease remain still unknown. A toxic effect induced by β amyloid, oxidative stress, excitotoxicity and alterations in signal transduction mechanisms are the main factors linked to neuronal death. In addition, it has been suggested that apoptosis may also participate as a part of the cascade of events resulting in neurodegeneration.

(Rev Med Univ Navarra 1997; 41: 34-45).

Correspondencia

M. Rosario Luquin Departamento de Neurología y Neurocirugía Clínica Universitaria 31080 Pamplona

Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más frecuente de demencia en nuestro medio. Estudios epidemiológicos recientes indican que la EA afecta a un 12.5% de la población mayor de 65 años aumentando hasta un 47.5% en la población mayor de 85 años (1). Existen numerosos factores que se han relacionado con el desarrollo posterior de EA como el envejecimiento, factores genéticos, antecedentes de traumatismos craneales, exposición previa a anestésicos etc. Sin

embargo, resulta imprescindible realizar un abordaje de los mismos desde un punto de vista molecular que explique qué mecanismos ocurren en la EA que ponen a las neuronas en alto riesgo de neurodegeneración.

β-amiloide

La EA es una enfermedad degenerativa progresiva caracterizada por el depósito cerebral de amiloide en las placas neuríticas y la pared vascular. El constituyente más importante de los depósitos de amiloide es un péptido de 39-42 aminoácidos, aproximadamente, denominado proteína \(\beta\)-amiloide (A\(\beta\)) (2). Aunque la presencia de AB está asociada a neuronas que degeneran, el mecanismo de neurodegeneración subyacente es desconocido. Existe una gran controversia en relación a la posible toxicidad del β-amiloide. Para algunos autores el β-amiloide y la formación de la placa son la causa de la neurodegeneración, mientras que para otros, ambos son el resultado de la disfunción neuronal. Ambas hipótesis intentan explicar cómo se procesa la proteína precursora del amiloide (AAP), cómo funciona en el cerebro normal y cómo se degrada posteriormente para formar el β-amiliode que constituye el centro de la placa en cerebros con EA (3,4). La formación de A4 ó β-amiloide parece ser la consecuencia de un procesamiento anómalo de la proteína precursora, probablemente secundaria a una alteración de la membrana celular que condiciona una proteolísis aberrante de la porción transmembranosa de la proteína precursora (5,6).

Estudios *in vitro* sobre la actividad biológica del β -amiloide han demostrado que posee propiedades neurotóxicas y sorprendentemente puede actuar también como una sustancia neurotrófica (7). Estudios iniciales en cultivos de células de hipocampo demostraron que A β sintético en su forma soluble, inducía un acortamiento en la supervivencia neuronal cuando se utilizaba β_{1-42} ó β_{1-28} (8). Posteriormente, se comprobó que el β_{1-42} inducía un aumento significativo de la arborización dendrítica en las mismas condiciones experi-

mentales (9). Sin embargo, este aparente efecto neurotrófico es temporal y sustituido rápidamente por un efecto neurotóxico.

El β-amiloide existe primariamente como agregados insolubles. Por tanto la acción neurotóxica/neurotrófica del B-amiloide puede depender de su estado de agregación. En cultivos de células de hipocampo en desarrollo el \(\beta_{1-42} \) soluble induce un crecimiento neurítico sin incremento de la supervivencia neuronal. Por el contrario, células tratadas con la forma β₁₋₄₂ insoluble experimentan una marcada degeneración neuronal (10,11). Más recientemente Pike y cols (12) han demostrado que la neurotoxicidad ligada al β-amiliode puede prevenirse al bloquear la formación de agregados insolubles ó al revertir el estado de agregación de los péptidos β. De este modo, los péptidos solubles Aβ podrían ejercer inicialmente un efecto neurotrófico y eventualmente facilitar la neurodegeneración, mientras que los péptidos AB agregados podrían iniciar la neurodegeración incluso en neuronas sanas.

Estrés Oxidativo

La hipótesis de que el estrés oxidativo es responsable de la neurodegeneración observada en la EA está basada en la observación de que algunos procesos que inducen la formación de radicales libres, como traumatismos craneales y envejecimiento, han sido considerados como factores de riesgo para la EA, y por la similitud que existe entre la EA y el síndrome de Down, en el que existe un incremento en la producción de radicales libres (13).

Los radicales libres se definen como átomos ó moléculas que contienen uno o más orbitales externos con un electrón no pareado. Son compuestos muy inestables que tienden a reaccionar rápidamente con las moléculas vecinas para captar los electrones que les falta, produciendo la oxidación de las mismas. Los radicales libres mas importantes en biología humana son el radical superóxido (O₂-), radical hidroxilo (OH•), oxido nítrico (NO) tiil (RS) y triclorometil (CCl₃). Habitualmente, los radicales libres reaccionan con sustancias no radicales, transformándolas en nuevos radicales libres, que originan reacciones en cadena, en las cuales la sustancia no radical se transforma en un radical libre, que a su vez oxida a otra sustancia no radical (14).

Los metales de transición juegan un papel muy importante en las reacciones oxidativas mediadas por radicales libres. Estos presentan dos estados de valencia que se encargan de la transferencia de electrones en las reacciones de oxidación/reducción. Los más importantes son el hierro (Fe²⁺ y Fe³⁺), el cobre (Cu⁺ y Cu²⁺) y el manganeso (Mn⁺ y Mn²⁺). Las reacciones de las sales ferrosas con H₂O₂, que originan radicales OH[•] se denominan reacciones de Fenton (15,16).

Los organismos vivos se protegen de la presencia de hierro libre gracias a proteínas de transporte (transferrina) y almacenamiento (ferritina y hemosiderina). Sin embargo, el estrés oxidativo puede por sí mismo facilitar la presencia de hierro libre para generar más reacciones oxidativas (17,18). Por ejemplo, radicales libres como el O₂- y el NO inducen reacciones oxidativas que pueden actuar interrumpiendo la cadena oxidativa (*chain-breakers*: por ejemplo superóxido dismutasa, catalasa y glutation peroxidasa) ó por reacción directa con los radicales libres (*scavengers*, p.e. ácido ascórbico, alfatocoferol y betacaroteno).

Envejecimiento y estrés oxidativo

Los lípidos, las proteínas y el DNA son las principales dianas de los radicales libres y fundamentalmente de los radicales hidroxilo (19). El hecho de que las membranas celulares sean muy ricas en ácidos grasos polinsaturados, hace que la peroxidación lipídica sea fácilmente inducible.

El desarrollo de reacciones de peroxidación lipídica en relación con la edad es un hecho comprobado. Algunos autores han encontrado en cerebros de roedores añosos, un incremento de los índices de peroxidación lipídica, disminución de los niveles de glutation peroxidasa, disfunción mitocondrial y disminución de enzimas antioxidantes (20,21,22). Por otro lado, en humanos se ha descrito una alteración en la distribución celular de ferritina y proteínas ligadoras de hierro en astrocitos y oligodendrocitos, en relación con la edad (23).

Un índice claro de la existencia de alteraciones en el metabolismo lipídico y posible acumulación de peróxidos lipídicos con la edad, es el acúmulo de lipofucsina. Existe una perfecta correlación entre acúmulo de lipofucsina y la edad del organismo, pero no se conoce la causa exacta por la que este pigmento se acumula en el SNC (24). En animales de experimentación el depósito de lipofucsina aumenta considerablemente cuando éstos son alimentados con dieta deficitaria en vitamina E, y se reduce considerablemente si reciben suplemento vitamínico (25,26). Estos resultados demuestran la existencia de un incremento del estrés oxidativo con el envejecimiento. Sin embargo, cuando los mecanismos antioxidantes de defensa permanecen in-

tactos, el cerebro no muestra alteraciones patológicas significativas. De este modo, las enfermedades degenerativas del SNC ocurrirían en un cerebro envejecido si los mecanismos antioxidantes no son capaces de neutralizar el exceso de producción de radicales libres (27,28,29).

Estrés Oxidativo en la enfermedad de Alzheimer

Las neuronas son especialmente vulnerables al estrés oxidativo y al daño por radicales libres ya que contienen niveles bajos de glutation peroxidasa, principal responsable de la eliminación de peróxidos citosólicos (30) Por otro lado, las membranas neuronales contienen una proporción alta de ácidos grasos polinsaturados susceptibles a la acción de radicales libres, lo que las hace más susceptibles al daño oxidativo. Además, el alto consumo de oxígeno por parte de las neuronas, aumenta enormemente el estrés oxidativo en las mismas (31,32).

Existen diferentes fuentes de radicales libres que deben considerarse en la patogénesis de la EA. En primer lugar, la concentración de hierro, potente inductor de las reacciones de oxidación/reducción, está incrementado en las neuronas que presentan degeneración neurofibrilar (33). En segundo lugar, este incremento de hierro podría inducir alteraciones en la estructura de las proteínas que son catalizadas por metales iónicos al reducir los azúcares (34). Además las células de la microglía, que son una fuente importante de radicales libres, están incrementadas en número en la EA. Por último, el aumento de aluminio en las neuronas con degeneración neurofibrilar puede ejercer una acción estimuladora de la peroxidación lipídica inducida por hierro (35).

Las alteraciones de la membrana celular que se observan en las neuronas que degeneran y en las neuritas, probablemente como consecuencia de la peroxidación lipídica, producen una entrada de Ca²⁺ al interior de la célula que desestabiliza el citoesqueleto de la célula y activa enzimas específicos. Estos enzimas, a su vez, potencian la peroxidación de la membrana y en consecuencia la producción de radicales libres (36,37).

Recientemente Hesley y cols (38) han descrito que el β -amiloide, en solución acuosa, es capaz de producir radicales libres e inactivar enzimas como glutamina sintetasa. Asimismo, en cultivos celulares la toxicidad del β -amiliode puede ser bloqueada por agentes antioxidantes como la vitamina E, lo que sugiere que su aparente toxicidad está ligada a la capacidad pro-oxi-

dante intrínseca del β-amiloide (39). El incremento de producción de radicales libres podría además inducir una disfunción de los transportadores de glutamato que potenciaría los fenómenos de excitotoxicidad (40).

Además de existir un incremento de producción de radicales libres, los mecanismos de defensa celular frente al estrés oxidativo están también alterados en los cerebros con EA. Se ha descrito una reducción de los niveles plasmáticos de vitamina E, vitamina A y carotenos en pacientes con EA (41), aunque otros autores no han encontrado diferencias significativas en los niveles cerebrales de vitamina E en relación a los controles (42).

Por otro lado, en diversos trabajos se describe un incremento de la actividad superóxido dismutasa (SOD) en cerebros (43,44) y fibroblastos (45) de pacientes con EA. Aunque la acción de la SOD es fundamentalmente proteger al cerebro del radical superóxido (convierte el radical superóxido en H₂O₂ y agua), su acción protectora depende en gran medida de la adecuada actividad de otros enzimas como catalasa ó glutation peroxidasa, que convierten el H₂O₂ generado por la SOD en agua. De este modo, si la concentración de SOD está incrementada por enzima de los niveles de catalasa y GSH, se produciría un incremento de H₂O₂ y de radicales OH^o que a su vez iniciarían la peroxidación lipídica.

Existe amplia evidencia de un incremento de los niveles de SOD Cu/Zn en hipocampo y cortex temporal de cerebros con EA y de su implicación en los mecanismos que median la muerte neuronal en la EA (46). Estudios de hibridación in situ han demostrado que el RNAm correspondiente a la SOD Cu/Zn está incrementado en cortex temporal e hipocampo de cerebros con EA y parece que este enzima está localizado preferentemente en las neuronas más vulnerables a la neurodegeneración (47). Además, la distribución del RNAm de SOD Cu/Zn en el cerebro guarda una perfecta correlación con la de los depósitos de β-amiloide (48), lo que sugiere una participación directa del estrés oxidativo en la muerte neuronal que ocurre en la EA.

Por último, se ha descrito recientemente una disminución en la actividad de la citocromo c oxidasa mitocondrial en cerebros de pacientes con EA (49). Aunque la relación entre esta alteración y la patogénesis de la EA no es clara, es probable que esta disfunción mitocondrial produzca alteraciones metabólicas severas, incluyendo un incremento en la vulnerabilidad a excitotoxinas, aumento de producción de radicales libres y

daño oxidativo de las membranas mitocondriales. Todo ello, unido al hallazgo de mutaciones mitocondriales puntuales en algunos casos de EA (50), sugiere que las alteraciones en el funcionamiento mitocondrial que aparecen en el envejecimiento normal, podrían contribuir a la patogénesis de la EA.

Excitotoxicidad

El aminoácido excitatorio l-glutamato, no media solamente la mayor parte de las señales excitadoras en el cerebro, sino que también ha sido identificado como una potente neurotoxina. Estudios *in vitro* e *in vivo*, han identificado la exicitotoxicidad como un proceso patológico que contribuye a la pérdida neuronal en un amplio espectro de agresiones neurológicas como isquemia, traumatismos, anoxia e hipoglucemia (51).

El glutamato y el resto de aminoácidos excitatorios ejercen su acción en el SNC por la activación de receptores específicos de membrana que se dividen en dos grupos: ionotrópicos (ligados a canales iónicos) y metabotrópico (acoplado a proteínas G). El mejor caracterizado de los tres es el receptor NMDA el cual es permeable a Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ de un forma voltaje dependiente. La activación de receptores NMDA permite la entrada de iones Ca²⁺ y Na⁺ al interior de las neuronas, siendo su estimulación excesiva una de las causas que contribuyen a la sobrecarga neuronal de Ca²⁺ (52).

En cultivos celulares, Cotman y cols (53) han demostrado que dosis subletales de glutamato inducen muerte neuronal masiva si se añade al medio de cultivo proteína β -amiloide₁₋₄₂. Del mismo modo, las neuronas corticales sometidas a una deprivación de glucosa experimentan una degeneración masiva si se asocia amiloide β_{1-42} al medio de cultivo (54).

La toxicidad mediada por glutamato y potenciada por los péptidos β , parece relacionarse con la capacidad de estos últimos en desestabillizar los niveles intracelulares de Ca²⁺, haciendo a las neuronas más vulnerables a la toxicidad mediada por Ca²⁺. Esta hipótesis queda confirmada por resultados en cultivos celulares, en los que la potenciación de la neurotoxicidad por los péptidos β desaparece al eliminar el Ca²⁺ del medio de cultivo (55).

Todos estos hallazgos sugieren que el Aβ desestabiliza la capacidad de las neuronas para regular adecuadamente los niveles de Ca²+ haciéndolas más vulnerables a cualquier agresión que incremente la concentración de Ca²+ intracelular. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la relación entre los factores que alteran la concentración intracelular de calcio y la

capacidad de inducir una respuesta neurotóxica no es siempre perfecta. Por ejemplo, estudios in vitro han demostrado que NMDA, t-ACDP (agonista metabotrópico) y carbacol incrementan por separado los niveles intracelulares de Ca²⁺; pero cuando se combinan no presentan el hipotético efecto aditivo sobre el daño neuronal. Por otro lado, el pretratamiento con t-ACDP 6 carbacol protege a las neuronas del daño producido por NMDA (56).

Estos resultados no solamente muestran la complejidad de los mecanismos que regulan la concentración intracelular de calcio, sino que señalan la importancia que desempeñan en la muerte neuronal tanto los niveles intracelulares de calcio como la vía metabólica implicada en el incremento de los mismos. Por último, en base al efecto protector del carbacol frente a la toxicidad inducida por NMDA, podría hipotetizarse que la pérdida del "input" colinérgico, como sucede en la EA, contribuiría a incrementar la vulnerabilidad de las neuronas todavía funcionantes al glutamato (57).

Alteración de los mecanismos de transducción

Se denominan mecanismos de transducción aquellos por los que estímulos extracelulares generan mensajeros intracelulares que regulan la función y supervivencia celular. Los mensajeros intracelulares son de gran importancia en el SNC, ya que están integrados en diferentes aspectos de la plasticidad sináptica, como liberación de neurotransmisores, apertura/cierre de canales iónicos, crecimiento neurítico, etc.

Los factores neurotróficos y la estimulación de receptores por neurotransmisores, inicia una cascada de eventos produciendo un aumento de segundos mensajeros intracelulares, activación de proteín-kinasas y cambio en el estado de fosforilación de las proteínas. Es concebible que cualquier alteración en esta cascada intracelular pueda alterar la función celular y contribuir a la muerte neuronal e incluso desempeñar un papel clave en el desarrollo de los marcadores histológicos de la EA como la degeneración neurofibrilar y el deposito de amiloide. Por otro lado, la alteración de los mecanismos de transducción explicaría por qué los tratamientos sustitutivos con fármacos que intentan restablecer la función colinérgica perdida no han sido eficaces en la EA.

Neurotransmisores y receptores

El hallazgo más constante en los cerebros de pacientes con EA es la disminución de la actividad colinacetil-transferasa (> 95%) en regiones corticales y subcorticales, consecuencia de la degeneración de núcleos colinérgicos troncoencefálicos como el basal de Meynert (58). Sin embargo, otros neurotransmisores como noradrenalina, serotonina, GABA, glutamato y neuropéptidos con sus correspondientes receptores (5-HT₁, 5-HT₂, GABA, α_1 , α_2 y β 2 adrenérgicos) también están reducidos en el cortex de pacientes con EA (59,60).

Quizás el sistema de neurotransmisión más ampliamente estudiado en los últimos años es el sistema glutamatérgico. El glutamato es un neurotransmisor localizado en las neuronas piramidales y media la neurotransmisión intracortical y corticofugal. El hecho de que la pérdida de neuronas piramidales sea un hallazgo prominente en la EA, ha sugerido la posibilidad de que la alteración de la transmisión glutamatérgica pueda contribuir a la progresión de la enfermedad (61). Sin embargo, aunque existen trabajos que demuestran una hiperfunción glutamatérgica en la EA, la mayoría de los estudios han encontrado que al igual que sucede con el resto de neurotransmisores, el sistema de neurotransmisión glutamatérgico es hipoactivo en la EA (62). Por ello, no puede establecerse que el déficit especifico de un neurotransmisor ó de sus receptores asociados sea responsable de la extensa pérdida neuronal que existe en la EA.

Proteinas G

La interacción de ligandos con sus receptores transmembrana para generar respuestas intracelulares, puede realizarse a través de unión a proteínas G ó mediante la asociación de los mismos a canales iónicos. Los receptores GABA y glutamatérgicos son ejemplos de receptores ligados a canales iónicos, regulando de esta manera el flujo de iones Ca2+ y Cl- a través de la membrana celular. Por el contrario, los receptores colinérgicos, dopaminérgicos, noradrenérgicos, serotonérgicos e histaminérgicos son receptores acoplados a proteínas G y generan segundos mensajeros los cuales a su vez modulan la actividad de proteín-kinasas y la concentración de Ca2+ intracelular (63). Por tanto, las proteínas G constituyen el primer lazo de unión entre la activación de una gran variedad de receptores y la modulación de los sistemas efectores intracelulares.

Las proteínas G están constituidas por tres subunidades diferentes α , β y γ , siendo la subunidad α la que da la especificidad. En cerebros de pacientes con EA los niveles de las subunidad α (G α) en cortex frontal, hipocampo y cerebelo no muestran modificaciones

significativas en relación a sujetos de edad similar (64). Sin embargo, aunque los niveles de $G\alpha$ no presentan alteraciones en la EA, la integridad funcional de las mismas no está garantizada.

Estudios más recientes han demostrado que el acoplamiento de los receptores muscarínicos y D₁ a proteínas G está interrumpido en cortex frontal de cerebros con EA (65,66), lo que explicaría la reducción de la actividad de la adenilato ciclasa (mediada por estimulación de proteínas G) observada en diversas regiones de cerebros con EA (67). Posteriormente, técnicas histoquímicas de hibridación in situ han demostrado un aumento significativo del RNAm correspondiente a la subunidad α de Gs en células piramidales de cortex temporal e hipocampo de cerebros con EA. Este hallazgo, representaría mecanismo compensatorio al déficit funcional de la estimulación de adenilato ciclasa mediada por proteína G, y podría interpretarse como un acoplamiento receptor-proteína G anormal. Sin embargo, no se conoce si la alteración en este proceso de acoplamiento es especifico de la EA ó consecuencia de la patología subyacente a la EA ya que esta alteración podría interpretarse como una reacción a la deaferentización neuronal. Por otro lado, estos cambios en proteínas G parecen ser receptor-específico ya que el acoplamiento a proteínas G de los receptores corticales α₂ adrenérgicos y 5HT_{1A} no está alterado en cerebros de pacientes con EA (69,70).

Aunque los niveles de proteínas G no muestran alteraciones significativas en los cerebros con EA, su capacidad funcional parece estar alterada. La integridad del citoesqueleto y de la membrana celular es indispensable para que exista un normal funcionamiento en el acoplamiento a proteínas G. Por otra parte, las proteínas G modulan directamente la estructura del citoesqueleto e interaccionan con los complejos proteicos de la membrana que contienen colágeno y actina (71). Dos de las proteínas G, Gs y Gi, pueden interaccionar con tubulina para intercambiar GTP, proceso que a su vez puede influir en la actividad de la proteínas G (72). La tubulina es el principal constituyente de los microtúbulos, por tanto es concebible que cambios en la estructura del citoesqueleto, como las descritas en la EA, puedan inducir modificaciones en la interacción con proteínas G. Además en la EA se ha descrito una unión aberrante de tubulina-GPT (73) y una alteración en la composición y fluidez de la membrana (74) que interferirían con la transducción normal de señales extracelulares vía proteínas G.

Segundos mensajeros

Via del AMPc

En el cortex frontal de cerebros con EA se ha descrito una reducción significativa en la actividad de la adenilato ciclasa acoplada a proteína Gs (75). Esta disminución no parece deberse a la pérdida neuronal a nivel frontal, ya que la actividad de la adenilato ciclasa está preservada en otras estructuras como el hipocampo y cortex temporal donde la disminución del número de neuronas es considerable. Parece por tanto, que en la EA existe una alteración en los mecanismos de interacción proteína G-adenilato ciclasa ó bien cambios conformacionales en el acoplamiento de Gs a adenilato ciclasa en una región específica cerebral. Esta última posibilidad resulta interesante ya que el acoplamiento normal a proteínas G podría ser dependiente de la integridad del complejo membrana-citoesqueleto el cual está alterado en la EA (76).

Alteración de la vía de los fosfatidilinositoles

El calcio desempeña un papel primordial en las acciones mediadas por diversos neurotransmisores y hormonas. Los incrementos de la concentración de calcio intracelular dentro de un rango permisivo, son necesarias para el crecimiento y plasticidad neuronal. Sin embargo, cuando se produce un aumento mantenido de la concentración libre de calcio pueden producirse alteraciones del citoesqueleto, degeneración neurítica y en último termino la muerte neuronal (77).

Se ha sugerido que modificaciones en la hidrólisis de fosfoinosítidos (PI) puede producir una alteración en los mecanismos de regulación de Ca2+ intracelular y contribuir a la neurodegeneración en la EA. La hidrólisis de fosfoinosítidos está regulada por la actividad de una familia de enzimas conocida como fosfolipasa fosfoinosítido C (PLC). De este modo, la estimulación del receptor por un agonista induce la activación de una fosfolipasa C específica que hidroliza el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato [PdIns(4,5)P2] a inositol 1,4,5 trifosfato [(Ins (1,4,5)P₃] y diacilglicerol (DAG). El DAG formado permanece en la membrana donde puede activar isoenzimas de proteín-kinasa C, las cuales comprenden una variedad de fosfolípido-kinasas dependientes de calcio que regulan numerosas funciones celulares y desempeñan un papel crucial en la plasticidad y muerte neuronal. A su vez, Ins(4,5) P3 estimula la liberación de calcio del retículo endoplasmático al estimular un receptor de canal iónico (78).

La importancia de la vía de fosfatidil inositoles en la

regulación de la concentración de calcio intracelular apoya la hipótesis de que cualquier alteración en el acoplamiento de la transmisión colinérgica a este sistema de transducción, puede ser responsable de los cambios degenerativos que aparecen en la EA. El hecho de que los fibroblastos de pacientes con EA muestren concentraciones de calcio anormalmente bajas (79), sugiere una alteración, probablemente genética, del manejo de calcio intracelular. Sin embargo, no explicaría por qué las alteraciones morfológicas se centran casi de forma exclusiva en el SNC.

Crews y cols (80) han postulado que la neurodegeneración que existe en la EA puede seguir la siguiente secuencia de eventos. En primer lugar la alteración, probablemente de origen genético, en el manejo de calcio intracelular induciría la formación de β-amiloide el cual a su vez inhibiría la hidrólisis de PI ligada a la estimulación colinérgica. La falta de hidrólisis de PI produciría un incremento de aferencias excitatorias en las neuronas colinérgicas del tronco del encéfalo que conllevaría una pérdida progresiva de las mismas. Por tanto, la continua exposición de las neuronas colinérgicas a aferentes excitatorias, en ausencia de un feedback negativo, daría lugar a una lenta y progresiva pérdida de señales de transducción colinérgicas en cortex e hipocampo. Al cabo de varias décadas, el aumento del número de placas de amiloide en el cerebro, comprometería de forma importante la neurotransmisión colinérgica e incrementaría las aferencias excitatorias hacia neuronas colinérgicas centrales. La consecuencia final sería una disminución adicional del contenido de acetilcolina cerebral. Es conocido que la acetilcolina ejerce una acción muy importante sobre la viabilidad de todo el cortex cerebral y fundamentalmente del hipocampo, como lo demuestran estudios realizados en animales en los que lesiones del núcleo basal de Meynert inducen una degeneración lenta y progresiva de neuronas corticales (81). Por tanto, el hallazgo de que β-amiloide altera la hidrólisis de fosfoinosítidos inducida por estimulación colinérgica, es consistente con la idea de que la acumulación progresiva de β-amiloide induce una pérdida progresiva de estimulación colinérgica. Esta, a su vez, produce una disminución de neuronas colinérgicas y posteriormente de otros tipos celulares en cortex e hipocampo.

Los cerebros de pacientes con EA muestran una pérdida neuronal generalizada que se acompaña además de un hipometabolismo celular, el cual es dependiente en gran medida de la actividad sináptica neuronal. Además, la estimulación muscarínica y la actividad de fosfatidil inositoles ejercen una acción importante sobre la actividad metabólica cortical. Por tanto, una susceptibilidad inicial de las células al calcio y la alteración de la cascada de fosfatidil inositoles inducida por el β-amiloide, podría inducir una pérdida inicial de neuronas colinérgicas centrales, que a su vez provocaría posteriormente un daño neuronal adicional debido a la disfunción cada vez más importante de la cascada de inositoles inducida por el déficit de acetilcolina. Así mismo, existiría una disminución de activación de receptores muscarínicos y en consecuencia la pérdida de actividad trófica derivada de la activación de la cascada de inositoles.

Terceros mensajeros: proteín kinasas

La proteín kinasa C (PKC) se encuentra ampliamente distribuida en el cerebro y modula diferentes aspectos de la plasticidad sináptica como los mecanismos de neurotransmisión, crecimiento y diferenciación celular, memoria y aprendizaje, y es indudablemente la kinasa más extensamente estudiada en la EA (83,84).

El hallazgo más constante en cerebros con EA es la disminución de los niveles de PKC a expensas fundamentalmente de la fracción particulate. Además la fosforilación de la proteína P86, principal sustrato de PKC, está específicamente reducida en homogeneizados de cerebros con EA, y no se altera en otras enfermedades como la demencia tipo Pick o la demencia multinfarto (85).

Existen 4 isoformas diferentes de protein kinasas C (α, βI, βII, y γ) con una compartimentación neuronal especifica en el sistema nervioso central (83,84). De todas ellas, la isoforma BII es la única que repetidamente se ha encontrado reducida en cerebros con EA, a expensas de la fracción particulate. La localización de las diferentes isoformas de PKC en relación a las placas es diferente. Por ejemplo, anticuerpos anti-PKC (α) tiñen enteramente las placas y las células gliales que la rodean, anti-βI tiñen las neuritas distróficas de la placa y los anticuerpos anti-βII tiñen el centro de la placa que se corresponde perfectamente con el depósito de amiloide (86). Por otro lado, el estudio de la colocalización de las diferentes isoformas de PKC con las placas difusas, las cuales se consideran un marcador inicial de la patología de la EA, ha demostrado que éstas presentan una inmunorreactividad positiva anti-BII lo que sugiere una afectación precoz de PKC (βII) en la EA (87). Estos resultados son apoyados por los hallazgos de que en pacientes con placas difusas pero clínicamente no demenciados, los niveles de PKC(βII) y la fosforilación in vitro de sustratos endógenos (P86) están reducidos (88). Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen otras isoformas de PKC no dependientes de calcio (89), con una concentración en hipocampo más elevada que las calcio-dependientes, que no han sido estudiadas en la EA y que podrían tener un papel importante en los mecanismos moleculares relacionados con el proceso neurodegerativo subyacente.

Otras porteín kinasas como caseín kinasa II (CKII) también están alteradas en la EA. Los niveles de CKII están reducidos en el cerebros de EA. Así mismo, su distribución inmunohistológica también está alterada con una disminución de inmunorreactividad anti-CKII en neuronas que no presentan degeneración neurofibrilar y un incremento significativo en los ovillos neurofibrilares (90, 91).

Posiblemente las tirosin kinasas son las kinasas más importantes en la regulación del crecimiento y supervivencia celular. Estas son componentes intrínsecos de los receptores de polipéptidos y factores de crecimiento y están significativamente reducidas en cerebros con EA (92,93).

Cuartos mensajeros: fosforilación protéica

La fosforilación protéica es el último producto de la activación de proteín-kinasas producida por la unión de neurotransmisores y factores neurotróficos a sus respectivos receptores. En el caso de cerebros con EA se han descrito alteraciones muy severas en la fosforilación de proteínas como tau, proteínas asociadas a microtúbulos, neurofilamentos, proteína P60 y P86 (94).

La fosfoproteína asociada al crecimiento, GAP43, es sustrato de PKC y CKII. Aunque su función exacta en el control de la supervivencia celular no es bien conocida, los niveles de esta proteína incrementan durante la axogenesis y en la regeneración post-traumatismo, lo que sugiere un papel funcional de esta proteína en el crecimiento y desarrollo celular (95). Por otro lado, es conocido que los cambios en el estado de fosforilación de GAP43 son parte importante en los mecanismos moleculares que median la potenciación a largo plazo, modelo celular de memoria y aprendizaje (96).

En la corteza de cerebros con EA, los niveles de GAP43, medidos mediante técnicas immunohistoquímicas, están reducidos en el neocortex e incrementados en hipocampo y placas neuríticas donde existe reinervación. Este incremento local de GAP43 puede ser responsable de la inervación aberrante descrita en cerebros con EA (97,98). La alteración en el estado de fosforilación de GAP43 puede comprometer también la

ARTICULOS DE REVISION

función de segundos mensajeros, ya que esta proteína regula la actividad de proteínas G y se une a la calmodulina en la terminal sináptica. En este sentido, resulta interesante el hecho de que la isoforma PKC que fosforila GAP43 es la PKC βI/βII, que a su vez es la isoforma más afectada en la EA.

El incremento en la fosforilación de proteínas puede ser consecuencia de un incremento en la actividad de proteín kinasas, disminución de la actividad de fosfoproteín fosfatasa, alteración en la estructura protéica ó modificaciones en la compartimentación de estos enzimas. Todavía no se ha podido demostrar que la actividad de la fosfoproteín fosfatasa sea responsable de la hiperfosforilación de diferentes proteínas en el cerebro de pacientes con EA (99).

En resumen, podríamos concluir que existe amplia evidencia de la afectación de diferentes moléculas de los sistemas de transducción en el cerebro de pacientes con EA y muchas de ellas muestran además una actividad excesiva. Parece, por tanto, poco probable que la muerte neuronal en la EA sea el resultado de un deterioro general en la actividad celular. Datos experimentales recientes sugieren que la hiperactividad de diferentes componentes de los sistemas de transducción son responsables de distintos tipos de muerte celular como apoptosis o excitotoxicidad (100). En el caso de la EA se ha postulado que la hiperfunción de los sistemas de transducción podrían estar desencadenados por la proteína precursora del amiloide (APP) o de sus fragmentos, de tal forma que la hiperactividad celular en la EA sería consecuencia de la presencia de una APP aberrante.

Apoptosis

Durante la última década, numerosos trabajos han demostrado que las células pueden morir por dos mecanismos diferentes: necrosis y apoptosis. La necrosis es responsable de la muerte celular que aparece tras una agresión aguda, como trauma, isquemia, etc. Por el contrario, la apoptosis aparece en relación a una alteración metabólica interna que pone en marcha un programa celular de autodestrucción. Aunque en el sistema nervioso central, la apoptosis se ha relacionado clásicamente con los cambios que aparecen durante el desarrollo, existe evidencia reciente de que la apoptosis puede jugar un papel muy importante en enfermedades degenerativas del sistema nervioso central como la EA (101,102).

La apoptosis constituye un sistema de autorregulación del número de neuronas y de su supervivencia.

En la actualidad se acepta que las células conservan su capacidad de autodestrucción a lo largo de toda su vida, existiendo diferentes factores que pueden activarla o suprimirla (103). Las células que entran en apoptosis muestran de forma característica un abombamiento de la membrana celular acompañado de una condensación del núcleo y el citoplasma y agregación de la cromatina a la membrana nuclear formando masas granulares densas Por acción de endonucleasas la cromatina se fragmenta en oligonucleótidos de una determinada longitud. Esto contrasta con el proceso descrito en la necrosis, en la cual existe un edema de las mitocondrias, seguido de destrucción de membrana nuclear y citoplasmática y lisis de lisosomas y ribosomas, con la consiguiente liberación de detritus celulares y reacción inflamatoria local. De esta forma, las células que experimentan una muerte celular apoptótica, conservan la integridad de la membrana hasta el último estadío de degeneración. Posteriormente estas células son fagocitadas in vivo por las células vecinas y lisadas espontáneamente in vitro. Por último, hay que tener en cuenta que la muerte celular apoptótica no ocurre al azar, sino que afecta de forma preferente a células viejas, preneoplásicas o parcialmente lesionadas (101).

Aunque la apoptosis ocurre en diferentes sitemas, la mayoría de los estudios se han realizado en timocitos y han permitido caracterizar la secuencia de mecanismos moleculares que conducen en último término a la muerte celular. En cultivos de timocitos, los corticoesteroides inducen apoptosis en un periodo de varias horas (104). Este proceso es calcio-dependiente y es inhibido al bloquear la síntesis proteíca o de RNA, lo que sugiere una participación activa por parte de la célula en el proceso de apoptosis. El aumento de calcio intracelular activa una endonucleasa dependiente de calcio que rompe el DNA en fragmentos pequeños creando un efecto en escalera en la electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo, un aumento incontrolado de calcio intracelular da lugar a una muerte celular por necrosis, lo que sugiere que al igual que sucede en los fenómenos de excitotoxicidad, la cinética y compartimentación del calcio intracelular son factores críticos en determinar la respuesta celular y únicamente el incremento de calcio por activación de vías específicas es capaz de inducir apoptosis (104).

La hipótesis de que la apoptosis puede contribuir a la neurodegeneración en la EA resulta atractiva por un número de razones. En primer lugar, la apoptosis es compatible con la pérdida neuronal progresiva de neuronas aisladas que ocurre en la EA, en oposición a la pérdida de grupos neuronales observadas tras diferentes agresiones al sistema nervioso central. Del mismo modo, la capacidad de determinadas toxinas de inducir apoptosis en una gran variedad de células, sugiere un papel importante de las mismas en la patogénesis de la EA. Tal es el caso del β -amiloide y del aluminio, los caules inducen cambios bioquímicos y morfológicos compatibles con apoptosis en cultivos celulares (105).

Existe evidencia de que la apoptosis puede contribuir a la neurodegeneración en la EA. Por ejemplo, la glicoproteína 2 (SGP-2), que se expresa en tejidos en apoptosis (106), está aumentada en hipocampo de pacientes con EA y en la enfermedad de Pick (107,108) y se ha demostrado que la exposición de neuronas a β-amiloide induce cambios bioquímicos y morfológicos sugestivos de apoptosis (105). Recientemente, Anderson y cols (109) han demostrado cambios morfológicos en células del hipocampo de pacientes con EA, sugestivos de

apoptosis. Estos mismos autores han descrito por técnicas de inmunocitoquímica que las neuronas del cortex entorrinal de cerebros con EA que son marcadas con TdT (deoxinucleotidil transferasa, marca específicamente los fragmentos de DNA) también expresan c-Jun.

La apoptosis inducida por β-amiloide en cultivos celulares se acompaña de un expresión selectiva y prolongada de c-Jun (110), mientras que las neuronas resistentes a β-amiloide no lo expresan (111). Los hallazgos de Anderson y cols (109) sugieren, por tanto, que c-Jun participa en un programa apoptótico de muerte celular, y en el caso de la EA las neuronas marcadas con TdT serían aquellas que han iniciado un programa apoptótico de muerte celular en el que participa c-Jun. Por último, la capacidad de determinadas toxinas para producir apoptosis en una gran variedad de neuronas, sugiere un papel importante de las mismas en la patogénesis de la EA.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook MJ, Heber LE, Hennekens CH, Taylor JO. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older people. JAMA 1989; 202: 2551-8.
- 2. Tanzi RE, St George-Hyslop PH, Gusella JF. Molecular genetic approaches to Alzheimer's disease. TINS 1989;12:152-8.
- Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. TIPS 1991; 12:383-6.
- Mullan M, Crawford F. Genetic and molecular advances in Alzheimer's disease. TINS 1993; 16:398-408.
- 5. Dyrks T, Dyrks E, Hartman T, Masters C, Beyreuther K. Amyloidogenicity of bA4 and bA4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation. J Biol Chem 1992; 267: 18210-7
- Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G. Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. EMBO J 1988; 7: 949-57.
- 7. Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. Neuron

- 1991, 6: 487-98.
- 8. Whitson JS, Selkoe DJ, Cotman CW. Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. Science 1989, 243: 1488-90.
- 9. Whitson JS, Glabe CG, Shintani E, Abcar A, Cotman CW. Beta-amyloid protein promotes neuritic branching in hippocampal cultures. Neurosci Lett 1990;110:319-24.
- 10. Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. In vitro aging of betaamyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. Brain Res 1991;563:311-14.
- Pike CJ, Cummings BJ, Cotman CW. Beta-amyliod induces neuritic dystrophy in vitro: similarities with Alzheimer pathology. Neuroreport 1992;3:769-72.
- 12. Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. J Neurosci 1993;13:1676-87.
- 13. Lai F. En Nadel L, Epstein CJ (eds). Down's syndrome and Alzheimer's disease. New York. Wiley-Liss 1992;15-34.

- 14. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha tocopherol and ascorbate. Arch Biophys 1993, 300: 535-43.
- 15. Nakato M. A possible mechanism of iron neurotoxicity. Eur Neurol 1993; 33(sup) 44-51.
- 16. Ryan TP, Aust SD. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. Crit Rev Toxicol 1992, 22: 119-41.
- 17. Harris DE, Regulation of antioxidants enzymes. FASEB J 1992; 6:2675-83.
- 18. Krinsky NI. Mechanisms of action of biological antioxidants. Proc Soc Exp Biol Med 1992; 200: 248-54.
- 19 Pacifici RE, Davies KJA. Protein, lipid, and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. Gerontology 1991, 37:166-80.
- 20. Benzi G, Pastoris O, Marzatico F, Villa RF, Dagani F, Curti D. The mitochondrial electron transfer alteration as a factor involved in the aging brain. Neurobiol Aging 1992; 13:361-8.
- 21. Bossi SR, Simpson JR, Isacson O. Age dependence of striatal neuronal death caused by mitochondrial dysfunction. Neuroreport 1993; 4:73-6

ARTICULOS DE REVISION

- 22. Cand F, Verdetti J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. Free Radic Biol Med 1989; 7: 59-63.
- 23. Connor JR, Menzies SL, St Martin SM, Mufson EJ. Celullar distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged humans brains. J Neurosc Res 1990; 27:595-611.
- 24. Dowson JH. Neuronal lipofuscin accumulation in ageing and Alzheimer dementia: a pathogenic mechanism? Br J Psychiatr 1982; 140: 142-8.
- 25. Dowson JH, Fattoretti P, Cairns M, James NT, Wilton-Cox H, Bertoti-Freddari C. The effect of ageing and a vitamin E-deficient diet on the lipopigment content of rat hippocampal and Purkinje neurones. Arch Gerontol Geriatr 1992; 140:142-8.
- 26. Koistinaho J, Alho H, Hervonen A. Effect of vitamin E and selenium supplement on the aging peripheral neurons of the male Sprague-Dawley rat. Mech Ageing Dev 1990; 51: 63-72.
- 27. Adams JD, Odunze IN. Oxygen free radicals and Parkinson's disease. Free Rad Biol Med 1991; 10: 161-9.
- 28. Ames NB, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:7915-22.
- 29. Ceballos Y, Javoy-Agid J, Delacourte A, Defossez A, Nicole A, Sinet PM. Parkinson's disease and Alzheimer's disease: neurodegenerative disorders due to brain antioxidant system deficiency?. En: Emerit Y eds. Antioxidants in therapy and preventive medicine. New York: Plenum, 1990:251-8.
- 30. Cohen G. Oxidative stress in the nervous system. En Sies H. eds Oxidative stress. Londres: Academic, 1985; 383-402
- 31. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem 1992; 59: 1609-23.
- 32. Benzi G, Moretti A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's

- disease?. Neurobiol Ageing 1995;16:661-74.
- 33. Weidemann A, Koning G, Bunke D y cols. Identification, biogenesis and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. Cell 1989; 57:115-26.
- 34. Connor JR, Snyder BS, Beard JL, Fine RE, Mufson EJ. Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. J Neurosci Res 1992; 31:327-35.
- 35. Stadtman ER, Protein oxidation and aging. Science 1992;257:1220-24.
- 36. Oteiza PI. A mechanism for the stimulatory effect of aluminium on iron-induced lipid peroxidation. Arch Biochem Biophys 1994;308:374-8.
- 37. Okabe E, Sugihara M, Tanaka K, Sasaki H, Ito H. Calmodulin and free oxygen radicals interaction with steady state calcium accumulation and passive calcium permeability of cardiac sarcoplasmic reticulum. J Pharmacol Exp Ther 1989;250:286-92.
- 38. Hensley K, Carney JM, Matton MP. A model of b-amyliod aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer's disease. Proc Natl Acd Sci USA 1994; 91:3270-4.
- 39. Behl C, Davis J, Cole GM, Schubert D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid B protein toxicity. Biochem Biophys Res Commun 1992; 186:944-50.
- 40. Koh J, Yang LL, Cotman CW. Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxicity damage. Brain Res 1990; 533:315-20.
- 41. Zaman Z, Roche S, Fielden P, Frost PG, Niriella DC, Cayley ACD. Plasma concentrations of vitamins A and E and carotenoids in Alzheimer's disease. Age Aging 1992; 21:91-4.
- 42. Metcalfe T, Bowen DM, Muller DPR. Vitamine E concentration in human brain of patients with Alzheimer's disea-

- se, fetuses with Down's syndrome, centenarians, and controls. Neurochem Res 1989; 14:1209-12.
- 43. Williams LR. Oxidative Stress, agerelated neurodegeneration and the potential for neurotrophic treatment. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1995; 7:55-73.
- 44. Marklund SF, Adolfsson R, Gott-fries CG, Winbland B. Superoxide dismutase isoenzymes in normals brains and brains from patients with dementia of Alzheimer type. J Neurol Sci 1985; 67:319-25.
- 45. Zubenko GS, Sauer P. SOD-1 activity and platelet membrane fluidity in Alzheimer's disease. Biol Psychiatry 1989; 25:671-8.
- 46. Zemlan FP, Thienhaus OJ, Bosmann HB. Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical formation. Brain Res 1989; 476:160-2.
- 47. Ceballos I, Javoy-Agid F, Delacourte A, Defossez A. Neuronal localization of copper-zinc superoxide dismutase protein and mRNA whitin the human hippocampus from control and Alzheimer's disease brains. Free Radc Res Commun 1991; 12-13:571-80.
- 48. Goedert TM. Neuronal localization of amyloid beta protein precursor mRNA in normal human brain and in Alzheimer's disease. EMBO J 1987; 6:3627-32.
- 49. Chandrasekaran K, Giordano T, Brady DR, Stoll J, Martin LJ, Rapoport SI. Impairments of mitochondrial cytochrome oxidase gene expression in Alzheimer's disease. Mol Brain Res 1994; 24:336-340.
- 50. Lin FH, Lin R, Wisniewski Hm, Hwang YW, Grundkelqbal Y, Healy Louie G, Iqbal K. Detection of point mutations in codon 331 of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 2 in Alzheimer's brains. Biochem Biophys Res Commun 1992: 182:238-246.
- 51. Choi DW. En Meldrum BS, Moroni F, Simon RP, Woods JH (eds). Fast and slow excitotoxicity in cortical cell

- culture. New York: Raven Press, 1991: 555-61.
- 52 Rothman SM, Olney JW. TINS 1987; 10:299-302.
- 53. Koh JY, Yang L, Cotman CW. Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured neurons to excitoxicity damage. Brain Res 1990; 533:315-20.
- 54. Copani A, Hoh JY, Cotman CW. Beta-amyloid increases neuronal susceptibility to injury by glucose deprivation. Neuroreport 1991;2:763-5.
- 55. Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Leieberburg Y, Rydel R. Beta-amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. J Neurosci 1992; 12:376-89.
- 56. Koh JY,Palmer E, Cotman CW. Activation of metabotropic glutamate receptor attenuates N-methyl-D-aspartate neurotoxicity in cortical cultures. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:9431-5.
- 57. Cotman CW, Bridges R, Pike C, Kesslak, Loo D, Copani A. En Corain B, Iqbal K, Nicolini M, Winblad B, Wisniewski H, Zatta (eds). Alzheimer's disease: advances in clinical and basic research. Wiley, 1993: 281-90.
- 58. Bartus RT, Dean RL III, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory disfunction. Science 1982; 217:408-17.
- 59. Hardy J, Adolfsson R, Alafuzoff I. Transmitters deficits in Alzheimer's disease. Neurochemistry 1985; 7:545-63.
- 60. Reinikainen KJ, Soininen H, Riekkinen PJ, Neurotransmitter changes in Alzheimer's disease: implications to diagnostics and theraphy. J Neurosci Res 1990; 27:576-86.
- 61. Greenamyre JT, Maragos WF, Albin RL, Penney JB, Young AB. Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry 1988; 12:421-30.
- 62. Hardy J, Cowburn R, Barton A. Region specific loss of glutamate inner-

- vation in Alzheimer's disease. Neurosci Lett 1987; 73:77-80.
- 63. Linder ME, Gilman AG. G proteins. Sci Am 1992; 276: 56-65.
- 64. Fowler CJ, O'Neil C, Garlink A, Cowburn RF. Alzheimer's disease: is there a problem beyond recognition? Trends Pharmacol Sci 1990; 11:183-4.
- 65. McLaughlin M, Ross BM, Milligan G, McCulloch J, Knowler JT. Robustness of G-proteins in Alzheimer's disease: an immunoblot study. J Neurochem 1991; 57:9-14.
- 66. Flynn DD, Weinstein DA, Mash DC. Loss of high affinity agonist binding to M1 muscarinic receptors in Alzheimer's disease-implications for the failure of cholinergic replacement therapies. Ann Neurol 1991; 29:256-62.
- 67. DeKeyser J, Ebinger G, Vauquelin G. D1-dopamine receptor abnormality in frontal cortex points to a functional alteration of cortical cell membranes in Alzheimer's disease. Arch Neurol 1990;47:761-63.
- 68. Harrison BJ, Barton AJL, Najlerahim A, McDonald B, Pearson RCA. Alzheimer's disease: specific increases in a G protein subunit (Gsa) mRNA in hippocampal and cortical neurons. Mol Brain Res 1991; 10:71-81.
- 69. O'Neill C, Fowler CJ, Wiehager B, Cowburn RF, Alafuzoff Y, Winblad B. Coupling of human cerebral cortical a2-adrenoceptors to GTP-binding proteins in Alzheimer's disease. Brain Res 1991; 563:39-43.
- 70. O'Neill C, Cowburn RF, Wiehager B, Alafuzoff Y, Winblad B, Fowler CJ. Preservation of 5-hydroxytryptamine 1A receptor-G protein interactions in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. Neurosci Lett 1991; 133:15-9.
- 71. Bengtsson T, Sarndahl E, Stendahl O, Andersson T. Involvement of GTP-binding proteins in actin polymerization in human neurotrophils. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:2921-5.
- 72. Wang N, Yan K, Rasenick MM. Tubulin binds specifically to the signal-

- transducing proteins Gsa and Gia1, J Biol Chem 1990; 265:1239-42.
- 73. Khatoon S, Campbell SR, Haley BE, Slevin JT. Aberrant guanosine triphosphate-beta tubulin interaction in Alzheimer's disease. Ann Neurol 1989; 26:210-5.
- 74. Zubenko GS, Cohen BM, Growdon J, Corkin S. Cell membrane abnormality in Alzheimer's disease. Lancet 1984;2:235.
- 75. Dewar D, Horsburgh K, Graham DI, Brooks DN, Mc-Culloch J. Selective alterations of high affinity 3H forskolin binding sites in Alzheimer's disease: a quantitative autoradiographic study. Brain Res 1990;511:241-48.
- 76. Saitoh T, Masliash E, Baum L. Degradation of proteins in the membranecytoskeleton complex in Alzheimer's disease: might amyloidogenic processing be just the tip of the iceberg? Ann NY Acad Sci 1992; 674:180-192.
- 77. Lipton SA, Kater SB. Neurotrasmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. TINS 1989; 12:265-71.
- 78. Meltzer HY, Psychopharmacology: the third generation of progress. Raven Press 1993; 315-27.
- 79. Peterson C, Ratan RR, Shelanski ML, Goldman JE. Cytosolic free calcium and cell spreading decrease in fibroblasts from aged and Alzheimer's disease donors. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:7999-8001.
- 80. Crews FT, Kurian P, Freund G. Neurodegeneration in Alzheimer's disease may be caused by b-amyloid protein inhibition of growth factor and neurotransmitter activation of phosphoinositide hydrolysis. En: Alzheimer's disease: advances in clinical and basic reseach. Corain B, Iqbal M, Nicolini B y cols (eds). John Wiley, 1993: 305-314.
- 81. Pepeu G, Marconcini J, Pepeu I. Disfunction of the brain cholinergic system during aging after lesions of the nucleus basalis of Meynert. J Neural Transm 1994;44:189-194.

ARTICULOS DE REVISION

- 82. Simmons DA, Winegrad AI, Martin DB. Significance of tissue myo-inositol concentrations in metabolic regulation in mice. Science 1982;217:848-50.
- 83. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for celular regulation. Nature 1988;33:661-5.
- 84. Nishizuka Y. The family of protein kinase C for signal transduction. JAMA 1989;262:1826-32.
- 85. Cole G, Dobkins KR, Hansen LA, Terry RD, Saitoh T. Decreased levels of protein kinase C in Alzheimer's disease. Brain Res 1988; 452:165-74.
- 86. Masliash E, Cole G, Hansen L, De Teresa R, Terry RD, Saitoh T. Differential involvement of protein kinase C isoenzymes in Alzheimer's disease. J Neurosci 1990;10:2113-224.
- 87. Masliash E, Cole GM, Hansen LA, Albrigth T, Terry RD, Saitoh T. Protein kinase C alteration is a early biochemical marker in Alzheimer's disease. J Neurosci 1991; 11:2759-67.
- 88. Horsburgh K, Saitoh T. Altered signal transduction in Alzheimer's disease. En: Terry RD, Katzman R, Birk KL (eds). Alzheimer's disease. Raven Press 1994;387-404.
- 89. Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler Y. Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. J Cell Biol 1992; 117:121-31.
- 90. Aksenova MV, Burbaeva GS, Kandror KV, Kapkov DV, Stepanov AS. The decreased level of casein kinase 2 in brain cortex of schizophrenic and Alzheimer's disease patients. FEBS Lett 1991;279:55-7.
- 91. Iomoto DS, Masliah E, De Teresa R, Terry RD, Saitoh T. Aberrant casein kinase II in Alzheimer's disease. Brain Res 1989;507:273-80.
- 92. Hunter T, Cooper JA. Protein tyrosine kinases. Annu Rev Biochem 1985;54:897-930.

- 93 Wood JG, Zinzmeister P. Tyrosine phosphorylation systems in Alzheimer's disease. Neurosci Lett 1991;121:12-16.
- 94. Saitoh T, Dobkins KP. In vitro phosphorilation of a Mr 60.000 protein is elevated in Alzheimer's disease. J Neuropathol Exp Neurol 1988;47:1-8.
- 95. Kalil K, Skene JHP. Elevated synthesis of an axonally transported protein correlattes with axon outgrowth in normal and injured tracts. J Neurosci 1986;6:2563-70.
- 96. Routtenberg A, Lovinger DM, Steward O. Selective increase in the phophorylation of a 47 KD protein (F1) directly related to long-term potentiation. Behav Neural Biol 1985;43:3-11.
- 97. Coleman PD, Rogers K, Flood D. The neuropil and GAP/43/B50 in normally aging and Alzheimer's disease human brain. Prog Brain Res 1991;89:263-69.
- 98. Masliash E, Malloy M, Hansen L. Patterns of aberrant sprouting in Alzheimer's disease. Neuron 1991;6:729-39.
- 99. Saitoh T, Masliash E, Jin L-W. Cole GM, Wieloch T, Shapiro IP. Biology of disease. Protein kinase and phosphorylation in neurologic disorders and cell death. Lab Invest 1991;64:596-616.
- 100. Kerr JFR, Harmon BV. En: Tomei LD, Cope FO (eds). Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1991:5-29.
- 101. Cotman CW, Anderson AJ. A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. Mol Neurobiol 1995:101:1-19.
- 102. Su JH,Anderson AJ, Cummings BS, Cotamn CW. Immmunohistolchemical evidence for DNA fragmentation in neurons in the AD brain. Neuroreport 1994;5:2529-33.
- 103. Bursch W, Oberhamer F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and

- its protective role against disease. TIPS 1992;13:245-51.
- 104. McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocites. FASEB J 1989;3:1843-8.
- 105. Loo DT, Copani AG, Pike CJ, Whitermore ER, Valencewicz AJ, Cotamn CW. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:7951-55.
- 106. Montpetit ML, Lawless KR, Tenniswood M. Androgen-repressed messages in the rat ventral prostate. The prostate 1986;8:25-36.
- 107. May PC, Lampert-Etchells M.Johnson SA, Porier J, Masters JN, Finch CE. Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lessions in rat. Neuron 1990; 5:831-9.
- 108. Duguid JR, Bohmont CW, Liu N, Tourtellotte WW. Changes in brain gene expression shared by scrapie and Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:7260-4.
- 109. Anderson AJ, Su JH, Cotman CW. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, an effect of postmortem delay. J Neurosci 1996;16:1710-19.
- 110. Forloni G, Chiesa R, Smiroldo S, Verga L, Salmona M, Tagliavini F, Angeratti N. Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35. Neuroreport 1995;4:523-26.
- 111. Anderson AJ, Pike CJ, Cotman CW. Differential induction of IEGs in response to Ab peptides in cultured neurons: association between c-Jun immunoreactivity and Ab-mediated apoptosis. J Neurochem 1995;1487-89