

# Hipofunción de los receptores de NMDA inducida por el maleato de dizocilpina (MK801). Modulación de calpaínas y el metabolismo de aminoácidos neurotransmisores

## Hypofunction of the NMDA receptor induced dizocilpine maleate (MK801). Calpain and amino acid neurotransmitters metabolism modulation

CARLOS AYALA GROSSO\*

### Resumen

La hipofunción de los receptores del ácido glutámico promovida por la administración de antagonistas del subtipo de receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) precede a la hiperactividad glutamatérgica compensatoria que puede conducir a un patrón de degeneración neuronal de las células piramidales en áreas del cerebro comunes a las descritas durante la progresión de la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer. El objetivo de este estudio es determinar si la función de la caspasa-3 y calpaína se encuentra involucrada en la hiperactividad glutamatérgica inducida por el maleato de dizocilpina (MK801) y la pilocarpina. El uso de un anticuerpo monoclonal que reconoce la holoproteína  $\alpha$ II-espectrina, así como los fragmentos de esta proteína generados por la caspasa-3 y calpaína, permite inferir la actividad relativa de estas proteasas. Al mismo tiempo, la determinación de la concentración de los aminoácidos neurotransmisores excitatorios e inhibitorios en esta condición experimental permitió establecer la asociación entre el metabolismo de aminoácidos neurotransmisores y la activación de las proteasas. La administración de MK801 y pilocarpina promovió la proteólisis de la espectrina por la calpaína en la corteza piriforme, retrosplenial, en una manera dosis dependiente, pero no en la corteza entorrina y la amígdala. Asociado a estos eventos, el contenido tisular de los aminoácidos aspártico, glutámico y glutamina se incrementó en la corteza entorrina, pero no en las otras regiones corticales analizadas. Estos hallazgos sugieren que el antagonismo de los receptores de NMDA genera una actividad de las calpaínas inversamente asociada al metabolismo de estos neurotransmisores.

**Palabras clave:** Excitotoxicidad, calcio, muerte celular programada, neurodegeneración, enfermedad de Alzheimer.

### Abstract

Hypofunction of the NMDA receptor as a consequence of administration of NMDA antagonists leads to a compensatory hyperactivity of the glutamatergic system that may produce a pattern of neuronal degeneration that resembles Alzheimer's disease. Antagonists of the N-methyl-aspartate (NMDA) subtype of glutamate receptor induce neuronal degeneration confined to pyramidal neurons of rat corticolimbic brain areas. The objective of this study is to determine whether calpain and caspase-3 are involved in the glutamatergic hyperactivity induced by MK801 and pilocarpine administration. Using a monoclonal antibody that recognizes the holoprotein  $\alpha$ II-spectrin, as well as fragments generated by caspase-3 and calpain mediated cleavage of spectrin, we determined activation of these proteases. At the same time, quantification of amino acids neurotransmitters allowed us to study the association between amino acids metabolism and activation of these proteases. Administration of MK801 and pilocarpine increases breakdown of  $\alpha$ II-spectrin as a result of calpain activation in the piriform and retrosplenial cortex, in a dose-dependent manner. The concentration of aspartic, glutamic and glutamine increased in the entorhinal cortex. These findings suggest that NMDA receptor hypofunction induces an activation of calpain that is negatively associated to excitatory neurotransmitters metabolism.

**Key words:** Neurotoxicity, calcium, programmed cell death, neurodegeneration, Alzheimer's disease.

\* Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

## Introducción

Se ha dedicado considerable atención a la dilucidación de los mecanismos responsables de la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas crónicas, tales como la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple, la demencia asociada al virus de inmunodeficiencia humano, la esquizofrenia, la enfermedad de Huntington, de Parkinson y de Alzheimer (Cotman y Anderson, 1995; Levine y col., 1999; Behl, 2000; Heintz y Zoghbi, 2000; Hugon y col., 2000; Honig y Rosemberg, 2000; Shimohama, 2000; Terry, 2000; Yuan and Yankner, 2000; Raff et al., 2002; Cepeda y col., 2003; LeBlanc., 2005). En estas patologías de lenta progresión, así como en procesos agudos como el trauma mecánico cerebral, accidentes cerebrovasculares y epilepsia, aunque con etiopatogénesis diversa, el daño celular puede converger en etapas posteriores hacia eventos comunes en los que predomina la sobreestimulación de los receptores de ácido glutámico, especialmente los del subtipo de N-metil-D-aspartato (NMDA), provocando la muerte celular por excitotoxicidad (Zhang y col., 1998; Pellegrini-Giampietro y col., 1999; Seubert y col., 1988; Ginsberg y col., 1999; Anguelova y col., 2000; Kolasa y Harrell, 2000; Nath y col., 2000; Ginsberg y Martin, 2002; Pike y col., 1998, 2001; Del Rio y Massieu, 2008).

La muerte neuronal a consecuencia de la excitotoxicidad se define como una exposición excesiva al neurotransmisor glutamato o a la estimulación exacerbada preferencialmente del subtipo de receptor de NMDA, que resulta en un incremento en el flujo del ión calcio a través del canal iónico asociado al receptor. Como una consecuencia de la acumulación continuada de calcio, se puede observar un deterioro de la función mitocondrial caracterizada por la pérdida de su potencial de membrana, del influjo excesivo de calcio y la disminución de la carga energética del organelo (Ankarcona y col., 1995; García y col., 2005). Estos eventos pueden promover un estado de amplificación de la muerte celular programada a través de la activación de la quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK)-MEF2C, de las enzimas inductoras de apoptosis que incluyen a las caspasas y al factor inductor de apoptosis (Rameau y col., 2000). El incremento en el ión calcio además puede provocar una inactivación de la calpastatina, el inhibidor endógeno de las proteasas dependientes de calcio, generando formas activas de estas proteasas que a su vez pueden degradar múltiples sustratos que son requeridos para la integridad de la neurona. Adicionalmente, pueden actuar sinérgicamente con las proteasas de muerte celular, las caspasas, amplificando su nivel de activación (Newcomb-Fernandez y col.,

1997; Nath y col., 2000, 2000a, 2000b; Wang 2000; (para una revisión, Huang y Wang, 2001); García y col., 2005; Del Río y Massieu, 2008).

La activación de las calpaínas puede conducir a la muerte neuronal a través de la degradación de las proteínas del citoesqueleto, tales como la actina y la fodrina (Saido y col., 1993; Robert-Lewis y col., 1994), de la activación de la quinasa ciclina 5 activadora de la proteína p35 que puede promover la hiperfosforilación y agregación de la proteína asociada a los microtúbulos, Tau (Lee y col., 2000; Nath y col., 2000a). En varios desórdenes crónicos neurodegenerativos se ha demostrado una actividad alterada de las calpaínas, entre ellos en la esclerosis lateral amiotrófica (Li y col., 1998), en la enfermedad de Parkinson (Mouatt-Prigent y col., 1996) y en la enfermedad de Alzheimer (Nixon y col., 1994, 2000, 2003; Ayala-Grosso, 2003).

En la enfermedad de Alzheimer, las características histopatológicas más relevantes las constituyen la deposición extracelular del péptido amiloide en la típica placa neurítica y la acumulación intracelular de haces neurofibrilares que se caracterizan por la hiperfosforilación de la proteína asociada a los microtúbulos, Tau (Braak y Braak, 1991a, 1991b; Cummings y col., 1998; Cummings, 2002; Naslund y col., 2000; Morris y Price, 2001). La atrofia progresiva de amplias zonas del cerebro ocurre por la pérdida de las sinapsis, de las poblaciones neuronales y además por la compresión del neuropilo o tejido intersticial que involucra la red neural constituida por los axones, dendritas y las células gliales (Dekosky y Scheff, 1990; Dekosky y col., 1996; Brun y Englund, 1981; Thompson y col., 2003).

El desarrollo de la placa senil involucra progresivamente sistemas de neurotransmisión específicos durante el progreso de la patología, lo que sugiere una vulnerabilidad diferencial para el sistema colinérgico, seguido por el glutamatérgico y en última instancia el gabaérgico (Bell y col., 2003). Estudios recientes han demostrado un curso temporal característico en donde el sistema glutamatérgico muestra un incremento en su actividad en sujetos con daños cognitivos leves, como un indicador temprano del establecimiento de la patología de Alzheimer (Bell y col., 2007).

La muerte neuronal puede ocurrir en la fase temprana de la patología y progresa consistentemente con la acumulación de los haces neurofibrilares que en pacientes de Alzheimer en estado avanzado se encuentran en su mayor grado de acumulación. Sin embargo, la disminución de la densidad de esta subpoblación neuronal excede tanto a los índices de acumulación de los haces neurofibrilares como los

de la densidad de las placas seniles, por lo que la muerte neuronal pareciera ser un evento resultante de diversos factores. Ésta ocurre especialmente en las poblaciones neuronales constituidas por neuronas piramidales glutamatérgicas responsables de los circuitos intracorticales y extracorticales, que se caracterizan por un elevado contenido de neurofilamentos de mediano y elevado peso molecular, en consecuencia su degeneración conlleva un compromiso de la función cortical en los procesos de aprendizaje y memoria (Morrison y Hof, 1997; Hof y col., 1990, 2002; Morrison y col., 2002; Bussiere y col., 2003; Ayala-Grosso y col., 2006).

En estudios recientes hemos determinado, en muestras de autopsia de cerebros de pacientes diagnosticados con un estado avanzado de la enfermedad de Alzheimer, la acumulación de fragmentos proteolíticos derivados de la proteína precursora del péptido amiloide (Ayala-Grosso y col., 2002) y de la espectrina como resultado de la actividad relativa de la caspasa-3 y la calpaína en las neuronas piramidales de la corteza frontal inferior y temporal superior (Ayala-Grosso, 2004; Ayala-Grosso y col., 2006). Estos resultados han sugerido que la activación de las proteasas caspasas y la calpaína contribuyen a la muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer.

Una de las propuestas que ha pretendido explicar la degeneración selectiva de este tipo celular se fundamenta en un ciclo de amplificación anómalo que se originaría por una reducción de la actividad glutamatérgica intracortical (Olney y col., 1998); esto liberaría la actividad colinérgica de los circuitos largos que provienen del núcleo basal de Meynert, por una reducción del tono inhibitorio intrínseco de la corteza cerebral provisto por la actividad GABAérgica responsable del control del nivel de excitación en las diferentes capas de la corteza. Esta proposición pareciera factible de ocurrir en un estadio inicial de la patología y constituye una propuesta teórica que pudiera tener su demostración experimental en los paradigmas descritos por Corso y col., (1997), Wozniak y col., (1998) y Farber y col. (2002), en los que se establece la disminución selectiva de poblaciones de las neuronas piramidales a consecuencia de la hipofunción glutamatérgica y activación colinérgica.

Sin embargo, siguiendo el esquema de experimentación provisto por estos estudios, no se ha explorado la dinámica de los aminoácidos neurotransmisores a consecuencia de la hipofunción glutamatérgica, ni se ha establecido si la actividad de las proteasas dependientes de calcio y/o de las caspasas (proteasas involucradas en la muerte celular programada) se encuentran implicadas en el proceso de lesión. Dado que existe una relación

estrecha entre el metabolismo de los aminoácidos aspártico, glutámico, glutamina y  $\gamma$ -amino butírico (GABA), ya sea porque convergen hacia vías metabólicas comunes o porque en su transformación pueden incorporarse a los reservorios respectivos de sustrato o producto, la determinación de sus niveles puede ser indicativa de la dinámica de estos neurotransmisores durante la hipofunción glutamatérgica.

En este estudio se establece la dinámica de los aminoácidos neurotransmisores mediante: a) la determinación del contenido tisular de aminoácidos neurotransmisores por cromatografía líquida de alta resolución en regiones específicas de la corteza cerebral proveniente de ratas tratadas con vehículo (control) o con el tratamiento combinado de MK801 y pilocarpina. La utilización del antagonista glutamatérgico en adición al agonista muscarínico se basa en una acción sinérgica que promueve una actividad aún mayor del eje glutamatérgico, tal como ha sido demostrado previamente (Corso y col., 1997; Wozniak y col., 1998; Farber y col., 2002). Al mismo tiempo se infiere la actividad enzimática de la calpaína y la caspasa-3 mediante la determinación de la acumulación de fragmentos de la proteína del citoesqueleto  $\beta$ -II-espectrina proveniente del clivaje diferencial por estas proteasas.

## Materiales y métodos

### PREPARACIÓN DE COMPUESTOS

#### Maleato de dizocilpina (MK801)

El antagonista del receptor de NMDA, MK801 (maleato de dizocilpina, Sigma, MO, USA) se disolvió en solución salina (0.9% p/v) y se inyectó intraperitonealmente (i.p.) (en una dosis única de 2.5, 5.0 ó 10 mg/kg). El agonista muscarínico, pilocarpina (Sigma, MO, USA) se disolvió en solución salina y se administró en una dosis de 10 mg/Kg subcutánea, 45 min después del MK801. Los animales fueron mantenidos hasta cuatro días después de la administración de los compuestos de interés. Transcurridos cuatro días, fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/Kg, ip) y decapitados para extraer el cerebro.

### ANIMALES EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley (Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Universidad Central de Venezuela) de 275 a 325 g de peso corporal, que tuvieron acceso libre al agua y al alimento, con un régimen de iluminación de luz diaria de al menos 12 h. Los animales se mantuvieron en jaulas en número no mayor de cuatro animales y fueron trasladados al laboratorio experimental

por lo menos 72 horas antes de realizar los experimentos.

#### DISECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL

Los animales fueron sacrificados por decapitación y el cráneo se fracturó rápidamente mediante una pinza corta hueso a fin de exponer el cerebro, el tejido se lavó con la solución requerida para el tipo de análisis a 4 °C, con el fin de preservar los analitos de interés y se mantuvo inmerso en él hasta su microdissección.

El cerebro fue seccionado en rebanadas de 2 mm, por secciones en dirección rostral caudal, que se colectaron en una cápsula de petri; las rebanadas se seleccionaron sobre un portaobjetos y se ordenaron en dirección rostral caudal, manteniendo la orientación. Seguidamente se colectaron la corteza retrosplenial, piriforme y entorrinal, y posteriormente se tomaron secciones de la amígdala mediante la técnica de «punch de tejido».

Siguiendo el esquema de experimentación, 8 a 12 animales control (salina) o lesionados (tratados) fueron decapitados bajo anestesia profunda. El cerebro se mantuvo en una solución tampón mantenida en hielo de Tris-HCl 0,05 M (Gibco) que contenía 0,002 M de ácido etilendiaminotetracético (EDTA, Gibco).

La obtención de la corteza piriforme, entorrinal, retrosplenial y el núcleo central de la amígdala se logró mediante una disección de rebanadas de 2 mm obtenidas con un bloque calibrado de disección o la técnica de punch. Las muestras se preservaron a -80 °C hasta su análisis.

#### ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE MUESTRAS DE CORTEZA CEREBRAL

El día del análisis, las muestras se homogenizaron con 0,15 ml de tampón de lisis TNE (0,05 M Tris, 1% nonidet-40, 0,002 M EDTA) conteniendo un minicoctel de inhibidor de proteasas (Roche), y se mantuvieron en hielo por 30 min, para ser centrifugadas a 27000 g por 25 min. a 4°C.

La concentración de proteína del sobrenadante del homogenizado del tejido se determinó mediante el método de Lowry, utilizando la albúmina sérica de bovino como estándar. Se prepararon muestras balanceadas de proteínas para electroforesis en gel en un tampón de carga que contiene 0,25 M Tris (pH 6,8), 0,2 M ditioneitol (DTT), 8% sodium dodecil sulfato (SDS), 0,02% azul de bromofenol, y 20% glicerol en agua destilada. Las muestras se incubaron por 5 min a 95 °C. Para cada línea se sembraron 45 microgramos de proteína que se resuelven en geles al 6%

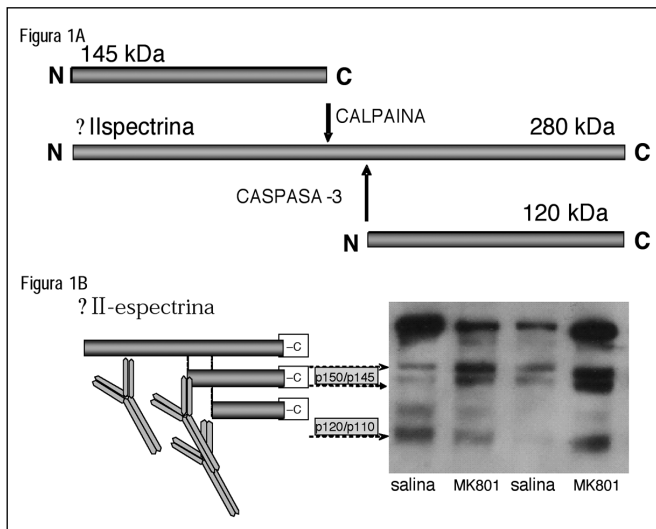
acrilamida/Bis-acrilamida, 2h a 110 voltios. Transcurrida la electroforesis, las proteínas separadas se transfieren lateralmente a membranas de nitrocelulosa de 0,45 micrómetros en un tampón de transferencia que contiene 0,192 M de glicina, 0,025 M tris (pH 8,3) y 10% metanol a un voltaje constante de 15 voltios por 15 h a 4 °C. Para controlar una transferencia exitosa de las proteínas y asegurar una carga homogénea de las proteínas por línea, se realizó rutinariamente una tinción de Rojo de Ponceau (Sigma, St. Louis, Mo, USA).

Con el objeto de iniciar la inmunodetección de las bandas resueltas, las membranas se incubaron por una hora a temperatura ambiente con una solución al 5% de leche descremada en solución tampón Tris (pH 8,3). Los inmunoblots de extractos proteicos de tejido cortical se probaron con el anticuerpo monoclonal generado contra  $\alpha$ II-espectrina (MAB-1622, Chemicon, Temecula, Cal.USA) que detecta la holo-proteína de 280 kDa así como los fragmentos de 150, 145 y 120 kDa. La naturaleza de estos fragmentos proteolíticos se ha descrito previamente (Nath y col., 2000, Wang y col 1998, Wang, 2000). Primeramente, dos fragmentos proteolíticos no idénticos de 150 kDa son producidos tras ocurrir la activación de la calpaína o la caspasa-3. Luego el fragmento de 150 kDa que reserva el carboxi-terminal de la proteína original se degrada por la calpaína para dar un fragmento de 145 kDa (Nath y col., 1996) o por la caspasa-3 para generar un fragmento de 120 kDa (Figura 1).

Las membranas se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo MAB1622 (dilución 1/1000, v/v) diluido en una solución al 5% en leche descremada. Transcurrido el tiempo, las membranas se lavaron con una solución tampón y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente a una dilución 1/5000 (v/v) con el anticuerpo secundario de amplificación conjugados a la peroxidasa del rábano: IgG cabra antirratón. La señal específica fue desarrollada usando reactivos de quimioluminiscencia (Supersignal, Pierce o ECL (Amersham) y detectada mediante emulsión fotográfica Kodak Biomax ML. La densidad óptica relativa se determinó mediante un lector de geles de Pharmacia Biotech para el que se desarrolló un protocolo de determinación de densidad óptica con una respuesta densitométrica lineal y de baja saturación.

#### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISORES EN ANIMALES TRATADOS CON VEHÍCULO, PILOCARPINA Y/O MK801

Los animales fueron sacrificados por decapitación y en un tiempo menor de 120 seg el cerebro se



**Figura 1.** Esquema de la proteína  $\alpha$ II-espectrina y de los sitios susceptibles a clivaje por las proteasas caspasa-3 y calpaina. A) El peso molecular de la proteína  $\alpha$ II-espectrina es aproximadamente 280 kDa. La activación de la calpaina y caspasa-3 trae como consecuencia el clivaje de la proteína  $\alpha$ II-espectrina y la generación de dos fragmentos diferentes, pero de un peso molecular similar aproximado de 150 kDa. *Panel superior:* El fragmento generado por la calpaina es clivado posteriormente por la misma proteasas para generar un segundo fragmento de 145 kDa. *Panel inferior:* El fragmento primario de 150 kDa generado por la caspasa-3 es clivado por la misma proteasa para dar un producto de 120 kDa. B) Esquema del clivaje de la proteína  $\alpha$ II-espectrina y de los fragmentos determinados por western blot en homogenizados de cerebro de rata.

extrajo en ácido perclórico 0,05 N a 4 °C. Las rebanadas de tejido cerebral obtenidas tal como se describió previamente se manipularon en ácido perclórico 0,05 N a 4 °C. El contenido de amino ácidos se determinó según el método de Donzanti y Yamamoto (1988) modificado por Ayala-Grosso y Urbina (1999). Los sobrenadantes se prederivaron con *O*-ftalaldehído (OPA) para su análisis posterior por cromatografía líquida de alta resolución (Waters), en un sistema isocrático utilizando una columna Resolve C18 de 4  $\mu$ m y un detector de fluorescencia con una  $\lambda_{exc}$  de 340 nm y un  $\lambda_{em}$  de 420 nm. La fase móvil consistió de una solución tampón de fosfato dibásico de sodio 0,1 M, EDTA 1  $\mu$ M y 34% metanol (HPLC) ajustada a pH 6,0 con ácido fosfórico al 85%. La solución se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,22  $\mu$ M que se satura con nitrógeno para evitar la acumulación de burbujas en el sistema cromatográfico, que se estabiliza a un flujo de 1 ml/min durante 45 min, posteriormente se ajustó a un flujo de trabajo de 0,9 ml/min.

La cuantificación de los aminoácidos se realizó por derivación precolumna con una solución de trabajo de OPA que contiene 27 mg de OPA en 1 ml de metanol, enrasado a 10 ml con una solución de tetraborato de sodio pH 9,3 (Sigma) y activada con  $\beta$ -mer-

captoetanol, que se coloca 24 horas antes de su utilización, la solución se mantiene en frasco ámbar y se prepara cada semana para obtener una respuesta óptima. El contenido tisular de los aminoácidos se expresó en ng/mg de proteínas.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La concentración de los aminoácidos (asp, glu, ser, gln, tau, gaba) y la densidad óptica relativa para los fragmentos de espectrina por calpaina o caspasa-3 se estimaron en las áreas de interés. Se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), no paramétrico (Kruskal-Wallis) de diseño mixto (dos factores dentro (área de la corteza) y un factor entre (sujeto control vs tratado) para comparar la concentración de aminoácidos o fragmentos de espectrina en las regiones de la corteza cerebral de interés. La prueba estadística fue considerada significativa para un valor de probabilidad  $p < 0,05$ . Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa Prisma (versión 4.0, 2003).

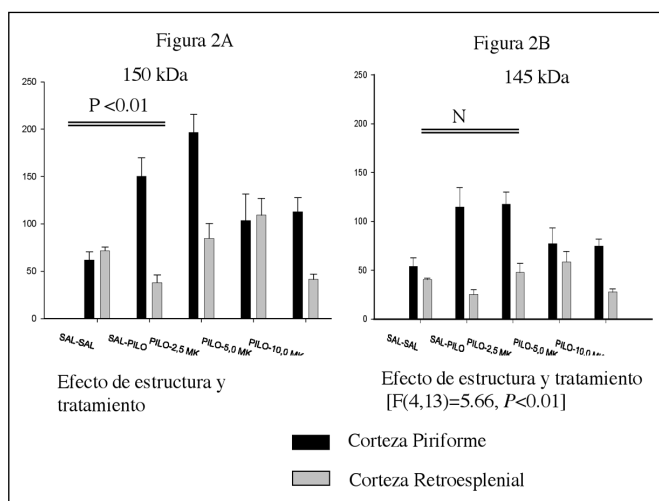
## Resultados

#### ANÁLISIS CONDUCTUAL

Posterior a la administración del MK801, se observó una conducta estereotipada que se caracteriza por una hiperactividad locomotora inicial, acompañada de salivación y conducta de olfateo profusa, seguida por una fuerte ataxia (análisis conductual no mostrado). Estas conductas se presentaron durante los primeros 5 a 10 min. después de la administración del MK801 y fueron dependientes de la dosis; la ataxia fue el comportamiento predominante para las dosis de 5 y 10 mg/kg de peso corporal. Los animales que recibieron una dosis de 2,5 mg/kg se recuperaron tras un período de 4 a 6 horas durante el cual se mantuvieron atáxicos. En contraste con estudios anteriores (Corso y col., 1997; Wozniak y col., 1998; Farber y col., 2002), los animales tratados con una dosis de 10 mg/Kg mostraron una recuperación limitada, la ataxia se prolongó por períodos mayores de 24 horas, con una movilidad muy limitada y disminuyeron de peso significativamente. En muchos casos los animales no se recuperaron y murieron por deshidratación e inanición. La mortalidad sobrepasó el 75% en los grupos tratados. Se decidió no repetir la administración de esta dosis por considerarla inadecuada éticamente para los estudios.

#### DETERMINACIÓN INDIRECTA DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS CALPAÍNA Y CASPASA-3

Asociado a la administración del antagonista del

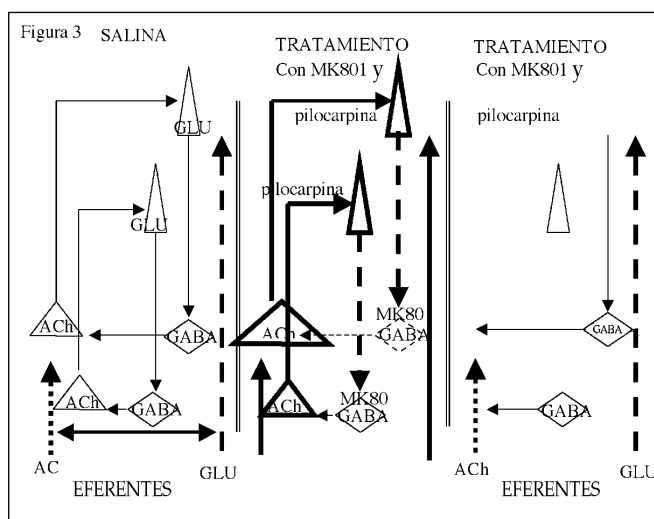


**Figura 2.** La administración de MK801 resulta en la acumulación los fragmentos de  $\alpha$ II-espectrina de 150 kDa (A) y 145 kDa (B) en la corteza piriforme y retrosplenial. Se encontró una interacción significativa entre el tratamiento y la región del cerebro analizada para los fragmentos de  $\alpha$ II-espectrina de 150 kDa [ $F(4,13)=7.00$ ,  $P<0.005$ ] y 145 kDa [ $F(4,13)=5.66$ ,  $P<0.01$ ]. Además, particularmente se encontró un incremento significativo del fragmento de 150 kDa en la corteza piriforme para 2,5 mg/Kg de MK-801 ( $P<0.01$ ). Conforme la dosis de MK801 incrementa, no se observaron diferencias en los valores de densidad óptica (OD) entre 5,0 y 10,0 mg/Kg de MK-801. Los fragmentos de 145 y 150 kDa incrementaron en la corteza piriforme a una dosis menor respecto a la corteza retrosplenial.

receptor de NMDA se determinó la acumulación de los fragmentos de 150 kDa (Fig 2A) y 145 kDa (Fig 2B) en la corteza piriforme y retrosplenial. Se determinó una interacción significativa entre estructura y tratamiento (ANOVA de 2 vías) para los fragmentos de 150 kDa ( $F(4,13)=7,00$ ,  $P<0,005$ ) y 145 kDa ( $F(4,13)=5,66$ ,  $P<0,01$ ). Particularmente se encontró un incremento significativo para el fragmento de 150 kDa en la corteza piriforme para la dosis de 2,5 mg/Kg of MK-801 ( $P<0,01$ ). No se encontraron diferencias significativas en los valores relativos de densidad óptica para las dosis de 5,0 y 10,0 mg/Kg de MK-801. El fragmento de 120 kDa de la espectrina, asociado a la actividad de la caspasa-3, se determinó en los extractos de tejido provenientes de la corteza piriforme y retrosplenial, sin embargo no se encontró un incremento significativo para ninguno de los tratamientos administrados (resultados no mostrados). Adicionalmente, tampoco se demostraron cambios significativos en los niveles de los fragmentos generados por la calpaína o caspasa-3 bajo ningún tratamiento en la corteza entorrinal y en la amígdala.

### Análisis de aminoácidos

El contenido de los aminoácidos asp, glu, gln, ser, tau y gaba se determinó en la corteza entorrinal, retrosplenial, piriforme y amígdala, en animales tra-



**Figura 3.** Propuesta del mecanismo de adaptación del sistema glutamatergico a la administración del MK801 y la pilocarpina. Neuronas piramidales glutamatergicas pueden incrementar su descarga debido a la inhibición de la influencia GABAérgica sobre los eferentes glutamatergicos y colinérgicos. La liberación prolongada del glutámico produce un incremento en la actividad enzimática de las calpaínas que degradan a la espectrina en la corteza piriforme y retrosplenial.

tados con solución salina (controles), con pilocarpina sola y/o acompañada de MK801 (tratados).

En los animales controles, la concentración de los aminoácidos en las áreas corticales estudiadas mostró un predominio particular del aminoácido glutámico, seguido de glutamina y gaba (Tabla I). En contraste, en la amígdala la concentración de aminoácidos fue similar.

En la corteza entorrinal (Tabla II), posterior a la administración de dizocilpina y de ésta en combinación con pilocarpina se demostró un incremento significativo en los aminoácidos glutámico (ANOVA una vía,  $F(2, 4)= 10,82$ ,  $P<0,0004$ ), aspártico (ANOVA ,  $F(2, 4)=5,46$ ,  $P< 0,0088$ ; y glutamina (ANOVA una vía,  $F(2, 4)= 5,78$ ,  $p< 0.0075$ ). Adicionalmente, se determinó que la pilocarpina no modificó la concentración de estos aminoácidos cuando se comparan con los contenidos de los animales tratados con salina (controles) (multicomparación con corrección de Bonferroni). Sin embargo, en un análisis más detallado del efecto del MK801 en combinación con la pilocarpina se observó que el contenido de glutámico incrementó significativamente para las dosis de 2,5 y 5 mg/Kg ( $P<0,001$  y  $P<0,05$ ) respectivamente, con respecto a los animales controles. De la misma manera, la glutamina incrementó, para la dosis de 2,5 mg/Kg de MK-801, con respecto a salina ( $P<0,01$ ) y pilocarpina ( $P<0,05$ ); este efecto sin embargo no se encuentra para la dosis de 5 mg/Kg. Por último, el contenido del aminoácido aspártico incrementó significativamente para la dosis de 5 mg/Kg de MK801

cuando se compara con salina o pilocarpina, y que el contenido de las últimas no fue diferente entre si.

El tratamiento de pilocarpina solo o en combinación con cualquiera de las dosis administradas de MK801, no produjo cambios significativos en la concentración tisular de asp, glu, gln en la corteza retrosplenial (Tabla III), corteza piriforme (Tabla IV) y amígdala (Tabla V), ni tampoco en los de serina, taurina y gaba para ninguna de las regiones estudiadas.

## Discusión

La respuesta fisiológica inmediata al bloqueo del receptor de NMDA es una disminución de la inhibición gabaérgica sobre los aferentes excitatorios de dos principales vías que ingresan a la corteza cerebral, a saber: 1. las colinérgicas que provienen del núcleo basal magnocelular; y 2. los glutamatérgicos que se originan en el tálamo. La adición en este paradigma

Tabla I  
Contenido de aminoácidos  
(ng/mg de proteínas)

Región	Aspártico	Glutámico	Glutamina	Serina	Taurina	Aminobutírico
Corteza retrosplenial	0.04 ± 0.008 (5)	0.13 ± 0.02 (5)	0.09 ± 0.03 (5)	0.010 ± 0.003 (5)	0.07 ± 0.03 (5)	0.03 ± 0.02 (5)
Corteza entorrinal	0.03 ± 0.001 (5)	0.12 ± 0.01 (5)	0.07 ± 0.01 (5)	0.013 ± 0.001 (5)	0.03 ± 0.007 (5)	0.06 ± 0.004 (5)
Corteza piriforme	0.10 ± 0.006 (5)	0.14 ± 0.016 (5)	0.22 ± 0.09 (5)	0.03 ± 0.002 (5)	0.09 ± 0.007 (5)	0.11 ± 0.02 (5)
Amígdala	0.06 ± 0.02 (4)	0.07 ± 0.02 (4)	0.02 ± 0.002 (4)	0.05 ± 0.02 (4)	0.05 ± 0.03 (4)	0.05 ± 0.03 (4)

Tabla II  
Corteza entorrinal  
(ng/mg de proteínas)

Condición	Aspártico	Glutámico	Glutamina	Serina	Taurina	Aminobutírico
Salina	0.03 ± 0.0004 (4)	0.12 ± 0.007 (4)	0.074 ± 0.0045 (4)	0.012 ± 0.0005 (4)	0.031 ± 0.0035 (4)	0.006 ± 0.002 (4)
Pilocarpina	0.079 ± 0.053 (5) NS	0.40 ± 0.26 (5) NS	0.25 ± 0.17 (5) NS	0.027 ± 0.015 (5)	0.41 ± 0.003 (5)	0.016 ± 0.005 (5)
Pilocarpina + MK801 (2.5 mg/Kg)	0.052 ± 0.004 (3) NS	0.20 ± 0.014 (3) **, ***	0.13 ± 0.020 (3) *, **	0.016 ± 0.0023 (3)	0.065 ± 0.006 (3)	0.074 ± 0.034 (3)
Pilocarpina + MK801 (5 mg/Kg)	0.059 ± 0.003 (3) *	0.17 ± 0.007 (3) *	0.010 ± 0.02 (3)	0.018 ± 0.002 (3)	0.09 ± 0.007 (3)	0.03 ± 0.005 (3)
Efecto de tratamiento o Anova 1 via	F(2, 4)=5.46, p < 0.0088	F(2, 4)= 10.82, p < 0.0004	F(2, 4)= 5.78, p < 0.0075	NS	NS	NS
Bonferroni post test	* p < 0.05 Vs salina, pilocarpina pilocarpina *** p < 0.001 Vs salina	* p < 0.05 Vs salina **p < 0.01 Vs salina	* p < 0.05 Vs pilocarpina **p < 0.01			

Tabla III  
Corteza retrosplenial  
(ng/mg de proteínas)

Condición	Aspártico	Glutámico	Glutamina	Serina	Taurina	Aminobutírico
Salina	0.04 ± 0.008 (5)	0.13 ± 0.02 (5)	0.09 ± 0.03 (5)	0.010 ± 0.003 (5)	0.07 ± 0.03 (5)	0.03 ± 0.02 (5)
Pilocarpina	0.03 ± 0.002 (5)	0.12 ± 0.02 (5)	0.07 ± 0.01 (5)	0.007 ± 0.001 (5)	0.07 ± 0.02 (5)	0.08 ± 0.08 (5)
Pilocarpina +MK801 (2.5 mg/Kg)	0.05 ± 0.03 (3)	0.12 ± 0.03 (3)	0.09 ± 0.03 (3)	0.012 ± 0.005 (3)	0.13 ± 0.03 (3)	0.04 ± 0.02 (3)
Pilocarpina +MK801 (5 mg/Kg)	0.04 ± 0.002 (3)	0.13 ± 0.02 (3)	0.08 ± 0.02 (3)	0.007 ± 0.0007 (3)	0.06 ± 0.005 (3)	0.05 ± 0.04 (3)

Tabla IV  
Corteza piriforme  
(ng/mg de proteínas)

Condición	Aspártico	Glutámico	Glutamina	Serina	Taurina	Aminobutírico
Salina	0.10 ± 0.006 (5)	0.14 ± 0.016 (5)	0.22 ± 0.09 (5)	0.03 ± 0.002 (5)	0.09 ± 0.007 (5)	0.11 ± 0.02 (5)
Pilocarpina	0.04 ± 0.01 (5)	0.07 ± 0.02 (5)	0.07 ± 0.02 (5)	0.01 ± 0.004 (5)	0.03 ± 0.02 (5)	0.06 ± 0.05 (5)
Pilocarpina +MK801 (2.5 mg/Kg)	0.04 ± 0.02 (3)	0.08 ± 0.04 (3)	0.10 ± 0.06 (3)	0.012 ± 0.007 (3)	0.03 ± 0.01 (3)	0.03 ± 0.0003 (3)
Pilocarpina +MK801 (5 mg/Kg)	0.04 ± 0.03 (3)	0.09 ± 0.04 (3)	0.22 ± 0.02 (3)	0.014 ± 0.006 (3)	0.03 ± 0.02 (3)	0.05 ± 0.02 (3)

Tabla V  
Amígdala  
(ng/mg de proteínas)

Condición	Aspártico	Glutámico	Glutamina	Serina	Taurina	Aminobutírico
Salina	0.06 ± 0.02 (4)	0.07 ± 0.02 (4)	0.02 ± 0.002 (4)	0.05 ± 0.02 (4)	0.05 ± 0.03 (4)	0.05 ± 0.03 (4)
Pilocarpina	0.04 ± 0.03 (5)	0.05 ± 0.04 (5)	0.12 ± 0.07 (5)	0.02 ± 0.01 (5)	0.03 ± 0.03 (5)	0.05 ± 0.04 (5)
Pilocarpina +MK801 (2.5 mg/Kg)	0.05 ± 0.02 (3)	0.09 ± 0.006 (3)	0.13 ± 0.003 (3)	0.03 ± 0.02 (3)	0.05 ± 0.03 (3)	0.02 ± 0.02 (3)
Pilocarpina +MK801 (5 mg/Kg)	0.05 ± 0.003 (3)	0.07 ± 0.006 (3)	0.12 ± 0.07 (3)	0.07 ± 0.04 (3)	0.04 ± 0.02 (3)	0.08 ± 0.05 (3)



experimental de un agonista muscarínico trae como consecuencia una actividad aún mayor de las neuronas corticales que son moduladas presinápticamente por los receptores muscarínicos. Como un resultado, una vez bloqueada la modulación ejercida por el neurotransmisor glutámico, se genera una hiperexcitabilidad refleja de los eferentes corticales que activan aún más a las neuronas glutamatérgicas piramidales para compensar la reducción del control del neurotransmisor glutámico, promovida por la presencia del antagonista (Figura 3).

La hipótesis de este trabajo plantea que un ingreso desregulado del ión calcio a la célula piramidal, activando a las proteasas dependientes de calcio, las calpaínas y la consecuente degradación de las proteínas del citoesqueleto, está demostrada significativamente en la corteza piriforme y retrosplenial. La evidencia de una acumulación de los fragmentos de espectrina generados por las calpaínas en la corteza piriforme y corteza retrosplenial es consistente con la hipótesis que la hipofunción del subtipo de receptor de NMDA, a consecuencia de la administración del MK801 y la hiperexcitabilidad compensatoria del sistema glutamatérgico, involucra una acumulación continuada del ión calcio que puede estar asociado a la degeneración de estas regiones corticolímbicas del cerebro de la rata.

La aproximación metodológica del uso de anticuerpos dirigidos a los epítopes generados *de novo* por la caspasa-3 y la calpaína en los fragmentos de la espectrina ha permitido la determinación de la contribución relativa de una u otra proteasa, bajo estas condiciones experimentales. Estos resultados coinciden con la utilización de anticuerpos generados contra epítopes generados *de novo* en procesos neurodegenerativos, en lesiones inducidas mecánicamente o químicamente. Adicionalmente, son consistentes con la demostración del papel de las calpaínas en procesos neurodegenerativos agudos o crónicos (Gervais y col., 1999; Ayala-Grosso y col., 2006; Ray y col., 2006; Del Río y Massieu, 2008).

En contraste con este efecto, la aparente no activación de estas proteasas y la consecuente carencia de acumulación de fragmentos de espectrina en la corteza entorrina o en el núcleo central de la amígdala, sugieren un mecanismo diferente en la respuesta de estas áreas o núcleos del cerebro.

En otros estudios se ha demostrado que la administración de antagonistas de NMDA no provoca una respuesta homogénea en todas las áreas del cerebro. De hecho, la administración de antagonistas de MK801, en dosis similares a las de este estudio (3 mg/Kg), produce una inducción de los genes c-FOS, FOS B y JUN B en la lámina III de la corteza retros-

plenial y sólo en las IV y VI de la neocorteza, mientras que KROX-24 fue inhibida en todas las láminas menos en la IV, y JUN D fue inducida homogéneamente en todas las láminas de la neocorteza. Además, en regiones subcorticales como el núcleo medial talámico c-FOS fue inducido, mientras que c-JUN y JUN D no (Gass y col., 1993), y para una dosis de 2,5 mg/Kg de Mk801 no se observó inducción de c-FOS en la amígdala (Vaisanen y col., 2004).

La administración de MK801 trae como consecuencia un incremento en la utilización de glucosa en la corteza cingulada y retrosplenial y una disminución en las láminas II y IV de la corteza somatosensorial (Kurumaji y col., 1989). Sin embargo, la inducción de genes de respuesta inmediata y temprana no se encuentra asociada con las mismas zonas en donde se encuentra hipermetabolismo o hipometabolismo, por lo que la acción del antagonista involucra una respuesta aún más compleja (Gass y col., 1993).

La heterogeneidad en los efectos promovidos por MK801 en la lámina III de la corteza cingulada y retrosplenial, puede justificar la expresión de los signos positivos como los negativos de la esquizofrenia. Los síntomas positivos pueden estar asociados con el incremento de la liberación de dopamina y una actividad disfuncional del circuito polisináptico que involucra a la corteza cingulada, los ganglios basales y la proyección tálamo-cortical, mientras que los síntomas negativos pueden estar asociados a una reducida transmisión glutamatérgica y a alteraciones en el circuito que involucra a la corteza prefrontal dorsolateral, el ganglio basal y el tálamo cortical (Thaker y Carpenter, 2001).

Los circuitos que median la excitotoxicidad pueden a su vez mediar la psicosis episódica en la esquizofrenia. Tomando en cuenta esta propuesta, los antagonistas no competitivos del receptor de NMDA como la fenciclidina bloquean los receptores en las neuronas gabaérgicas del núcleo reticular del tálamo, y en consecuencia decrece el tono inhibitorio de las neuronas de proyección talámica del núcleo anterior del tálamo. Así, las neuronas talámicas hiperactivadas sobre-estimulan a las neuronas glutamatérgicas de la corteza retrosplenial a través de receptores AMPA y kainato (Tomitaka y col., 2000).

En común con otros estudios, el uso de antagonistas de NMDA como fenciclidina, ketamina o el MK801 produce alteraciones conductuales que son comunes en los desórdenes psiquiátricos, particularmente la psicosis (Krystal y col., 1994; Lahti y col., 1995). Cuando se administran los antagonistas a la

rata se produce un comportamiento estereotipado, que se asemeja al componente negativo observado en psicosis, de ahí su utilidad como modelo animal de esta patología (Javitt y Zukin, 1991). Adicionalmente al componente asociado a la psicosis, el antagonismo de los receptores de NMDA produce un deterioro en procesos cognitivos como aprendizaje y memoria (Riedel y col., 2003; Taffe y col., 2002).

Nuestros resultados sustentan que la administración de MK801 y pilocarpina producen cambios principalmente en el metabolismo de glutámico y glutamina. La reducción de la glutamina sugiere una disminución de la liberación del neurotransmisor. Sin embargo, esta respuesta es la consecuencia de la interacción de, al menos, tres sistemas, a saber: el colinérgico, el glutamatérgico y el GABAérgico.

En la corteza entorrinal el incremento de glutámico promovido por el tratamiento con MK801 y pilocarpina se podría explicar basado en el circuito delineado arriba: la pilocarpina en los estados iniciales del tratamiento, al estimular a las neuronas piramidales, promovería una liberación aún mayor de glutámico con respecto a la liberación que ocurre durante la función normal de este sistema. Como una consecuencia, al activarse los receptores NMDA expresados sobre las neuronas gabaérgicas, éstas inhiben de forma directa e indirecta las neuronas glutamatérgicas, disminuyendo así la liberación del neurotransmisor. Las calpaínas, dentro del espectro de funciones que se les asocia, se encuentran involucradas en la regulación de la transmisión sináptica a través del clivaje de los receptores postsinápticos (Guttman y col., 2001) y sus proteínas de anclaje (Lu y col., 2001). Recientemente se ha demostrado que la activación de las calpaínas podría estar asociada a la inhibición de la liberación del neurotransmisor. En nuestro estudio, la acumulación de los aminoácidos glutámico y glutamina en la corteza entorrina es indicativa de una disminución del recambio del neurotransmisor, lo que a su vez puede estar asociado a una inhibición de su liberación. Estos hallazgos podrían coincidir con el papel regulador e inhibitorio de las calpaínas en la liberación del neurotransmisor, quizás a través del clivaje de la proteína asociada al sinaptosoma (SNAP-25) que es esencial para la exocitosis (Ando y col., 2005).

La heterogeneidad en la acumulación de los aminoácidos en algunas regiones del cerebro, así como en los fragmentos generados por la calpaína o caspasa 3, sugiere una relación compleja entre el metabolismo del aminoácido y la activación de las calpaínas y caspasa-3 posterior a la administración de la dizolcipina. En la evolución de los estudios de la patología de Alzheimer la atención hacia el sistema

colinérgico ha sido la predominante, dejando otros sistemas poco explorados. En este contexto, el ácido glutámico, el neurotransmisor más abundante en la corteza y el hipocampo, áreas del cerebro que son afectadas de manera significativa en la patología de Alzheimer, adquiere una especial relevancia. De hecho, la demostración de la atrofia cortical basada en las neuronas piramidales glutamatérgicas sugiere un papel crucial de la fisiología de este neurotransmisor en dicha patología. Aún más, resultados controversiales en cuanto a los valores de los marcadores glutamatérgicos, como reducción en la captación del aminoácido o disminución en la densidad de terminales glutamatérgicos, reducción en los receptores del neurotransmisor (Greenamyre col., 1985 y 1987), ha sido interpretado como disminución en la actividad de este sistema (Geddes y Cotman, 1986; Geddes y col., 1986). Adicionalmente, la disminución en el contenido tisular del aminoácido en autopsias de cerebros de individuos diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer sin hacer distinción entre los reservorios neuronales y metabólicos, hace que la interpretación de esta evidencia no sea trivial (Hyman y col., 1987; Greenamyre y col., 1988).

En estudios recientes se ha descrito un incremento de botones glutamatérgicos en individuos con daño cognitivo leve, pero una reducción importante en individuos diagnosticados con Alzheimer avanzado (Bell y col., 2006). Esta evidencia podría ser análoga a la evolución de la respuesta generada por la administración del antagonista del ácido glutámico. Una reducción inicial de la función del neurotransmisor trae como consecuencia un incremento en su liberación, que a la luz de la evidencia implicaría un incremento en la densidad de los botones glutamatérgicos.

El aumento en la densidad de botones presinápticos glutamatérgicos no parece ser un fenómeno inusual, ya que en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer se ha encontrado un incremento en botones colinérgicos y gabaérgicos en estadios tempranos de expresión de la patología (Bell y col., 2003; Hu y col., 2003). Coincidente con esta evidencia, se ha descrito un aumento en la actividad de la colina acetil transferasa en individuos con daño cognitivo leve (DeKosky y col., 2002). Este hallazgo podría ser mimetizado en este estudio por la administración del agonista muscarínico en los estadios previos al establecimiento de la lesión (Ikonovic y col., 2003).

La sobre-estimulación del sistema glutamatérgico puede sustentar el déficit cognitivo observado en la enfermedad de Alzheimer. La prueba conceptual de esta propuesta es que la administración de un

antagonista de baja afinidad del receptor activado de NMDA en la terapéutica actual de pacientes de larga progresión de la enfermedad de Alzheimer, mejora su ejecución en lo que respecta a independencia en el desempeño de tareas cotidianas (Sheng y col., 2006). Desde este punto de vista, una de las preguntas que se puede formular en esta situación es: ¿qué es lo que hace que el sistema glutamatérgico se exacerbe en las etapas tardías de esta patología? Este modelo experimental permite aproximarse al mecanismo que sustentaría esta respuesta fisiológica.

## Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela CDCH PG-0610-5379-05.

## Referencias bibliográficas

- Ando K, Kudo Y, Takahashi M. 2005. Negative regulation of neurotransmitter release by calpain: a possible involvement of specific SNAP-25 cleavage. *J Neurochem* 3:651-8.
- Anguelova E, Boularand S, Nowicki JP, Benavides J, Smirnova T. 2000. Up-regulation of genes involved in cellular stress and apoptosis in a rat model of hippocampal degeneration. *J. Neurosci Res* 59: 209-217.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15:961-73.
- Ayala CA. 2003. Caspase-3 and calpain activation in Alzheimer's disease and a rat model of septo-hippocampal injury. A thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research of McGill University in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy. December, 2003. Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Quebec, Canadá.
- Ayala-Grosso CA, Ng G, Roy S, Robertson G.S. 2002. Caspase-cleaved amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Brain Pathology* 12:430-441.
- Ayala-Grosso CA, Tam J, Xanthoudakis S, Bureau Y, Roy S, Nicholson DW, Robertson GS. 2004. Effects of Fimbria-Fornix Transection on Calpain and Choline Acetyltransferase Activities in the Septohippocampal Pathway. *Neuroscience* 126:927-940.
- Ayala-Grosso CA, Tam J, Xanthoudakis S, Da Costa D, Nicholson DW, Robertson GS. 2006. Caspase-3 cleaved spectrin colocalizes with neurofilament-immunoreactive neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 141:863-874.
- Ayala-Grosso CA, Urbina-Paez R. 1999. Septohippocampal adaptive GABAergic responses by AF64A treatment. *J Neurosci Res.* 55:178-186.
- Behl C, 2000. Apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 107: 1325-1344.
- Bell KF, Bennett DA, Cuello AC. 2007. Paradoxical upregulation of glutamatergic presynaptic boutons during mild cognitive impairment. *J Neurosci.* 27:10810-10817.
- Bell KF, de Kort GJ, Steggerda S, Shigemoto R, Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC 2003. Structural involvement of the glutamatergic presynaptic boutons in a transgenic mouse model expressing early onset amyloid pathology. *Neurosci Lett* 353:143-147.
- Bell KF, Ducatenzeiler A, Ribeiro-da-Silva A, Duff K, Bennett DA, Cuello AC. 2006. The amyloid pathology progresses in a neurotransmitter-specific manner. *Neurobiol Aging* 27:1644-1657.
- Braak H, Braak E. 1991b. Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol* 1:213-216.
- Braak H, Braak E. 1997. Aspects of cortical destruction in Alzheimer disease. In Hyman BT, Duyckaerts C, Christen Y, editors: *Cognition and Alzheimer's Disease*. Germany: Springer-Verlag p. 1-13.
- Brun A, Englund E. 1981. Regional pattern of degeneration in Alzheimer's disease: neuronal loss and histopathological grading. *Histopathology* 5:549-564.
- Bussiere T, Giannakopoulos P, Bouras C, Perl DP, Morrison JH, Hof PR. 2003a. Progressive degeneration of non-phosphorylated neurofilament protein-enriched pyramidal neurons predicts cognitive impairment in Alzheimer's disease: Stereologic analysis of prefrontal cortex area 9. *J Comp Neurol* 463: 281-302.
- Bussiere T, Gold G, Kovari E, Giannakopoulos P, Bouras C, Perl DP, Morrison JH, Hof PR. 2003b. Stereologic analysis of neurofibrillary tangle formation in prefrontal cortex area 9 in aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 117: 577-92.
- Cepeda C, Hurst RS, Calvert CR, Hernández-Echeagaray E, Nguyen OK, Jocoy E, Christian LJ, Ariano MA, Levine MS. 2003. Transient and progressive electrophysiological alterations in the corticostriatal pathway in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 23: 961-619.
- Chen HS, Lipton SA. 2006. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 97:1611-1626.
- Corso TD, Sesma MA, Tenkova TI, Der TC, Wozniak DF, Farber NB, Olney JW. 1997. Multifocal brain damage induced by phencyclidine is augmented by pilocarpine. *Brain Res* 752:1-14.
- Cotman CW, Anderson A.J. 1995. A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 10:19-45.
- Cowburn R, Hardy J, Roberts P, Briggs R. 1988a. Presynaptic and postsynaptic glutamatergic function in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 86:109-113.
- Cross AJ, Slater P, Simpson M, Royston C, Deakin JF, Perry RH, Perry EK. 1987. Sodium dependent D-[3H]aspartate binding in cerebral cortex in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neurosci Lett* 79: 213-217.
- Cummings BJ, Pike CJ, Shankle R, Cotman CW. 1996. Beta-amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 17:921-933.

- Cummings JL, Cole G. (2002) Alzheimer disease. *JAMA* 287(18):2335-8.
- Cummings JL, Vinters HV, Cole GM, Khachaturian ZS. 1998. Alzheimer's disease. Etiologies, pathophysiology, cognitive reserve and treatment opportunities. *Neurology* 51: S2-S17.
- Cummings JL, Vinters HV, Cole GM, Khachaturian ZS. 1998. Alzheimer's disease. Etiologies, pathophysiology, cognitive reserve and treatment opportunities. *Neurology* 51: S2-S17.
- DeKosky ST, Ikonomic MD, Styren SD, Beckett L, Wisniewski S, Bennett DA, Cochran EJ, Kordower JH, Mufson EJ. 2002. Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 51:145-155.
- DeKosky ST, Ikonomic MD, Styren SD, Beckett L, Wisniewski S, Bennett DA, Cochran EJ, Kordower JH, Mufson EJ. 2002. Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 51:145-155.
- DeKosky ST, Scheff SW. 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27:457-464.
- Del Rio P, Massieu L. 2008. Mild mitochondrial inhibition in vivo enhances glutamate-induced neuronal damage through calpain but not caspase activation: role of ionotropic glutamate receptors. *Exp Neurol* 212:179-88.
- Ellison DW, Beal MF, Mazurek MF, Bird ED, Martin JB. 1986. A postmortem study of amino acid neurotransmitters in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 20:616-21.
- Farber NB, Kim SH, Dikranian K, Jiang XP, Heinkel C. 2002. Receptor mechanisms and circuitry underlying NMDA antagonist neurotoxicity. *Mol Psychiatry* 7:32-43.
- Francis PT, Sims NR, Procter AW, Bowen DM. 1963. Cortical pyramidal neurone loss may cause glutamatergic hypoactivity and cognitive impairment in Alzheimer's disease: investigative and therapeutic perspectives. *J Neurochem* 60:1589-1604.
- García O, Almeida A, Massieu L, Bolaños JP. 2005. Increased mitochondrial respiration maintains the mitochondrial membrane potential and promotes survival of cerebellar neurons in an endogenous model of glutamate receptor activation. *J Neurochem* 92:183-90.
- Gass P, Herdegen T, Bravo R, Kiessling M. 1993. Induction and suppression of immediate early genes in specific rat brain regions by the non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. *Neuroscience* 53:749-758.
- Geddes JW, Cotman CW. 1986. Plasticity in hippocampal excitatory amino acid receptors in Alzheimer's disease. *Neurosci Res* 3:672-678.
- Geddes JW, Chang-Chui H, Cooper SM, Lott IT, Cotman CW. 1986. Density and distribution of NMDA receptors in the human hippocampus in Alzheimer's disease. *Brain Res* 399:156-161.
- Gervais F, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt J, Zhu Y, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J, LeBlanc A, Smith D, Rigby M, Shearman MS, Clarke EE, Zheng H, Van Der Ploeg LH, Ruffolo SC, Thornberry NA, Xanthoudakis S, Zamboni RJ, Roy S, Nicholson DW. 1999. Involvement of caspase in proteolytic cleavage of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  precursor protein and amyloidogenic Ab peptide formation. *Cell* 97: 395-406.
- Ginsberg SD, Martin LJ. 2002. Axonal transection in adult rat brain induces transsynaptic apoptosis and persistent atrophy of target neurons. *J Neurotrauma* 19: 99-109.
- Ginsberg SD, Portera-Cailliau C, Martin LJ. 1999. Fimbria-fornix transection and excitotoxicity produce similar neurodegeneration in the septum. *Neuroscience* 88:1059-1071.
- Greenamyre JT, Maragos WF, Albin RL, Penney JB, Young AB. 1988. Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 12:421-430.
- Greenamyre JT, Penney JB, D'Amato CJ, Young AB. 1987. Dementia of the Alzheimer's type: changes in hippocampal L-(3H)glutamate binding. *J Neurochem* 48:543-551.
- Greenamyre JT, Penney JB, Young AB, D'Amato CJ, Hicks SP, Shoulson I. 1985. Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Science* 227:1496-1499.
- Guttmann RP, Baker DL, Seifert KM, Cohen AS, Coulter DA, Lynch DR. 2001. Specific proteolysis of the NR2 subunit at multiple sites by calpain. *J Neurochem* 78:1083-93.
- Heintz N, Zoghbi HY. 2000. Insights from mouse models into the molecular basis of neurodegeneration. *Annu Rev Physiol* 62:779-802.
- Hof PR, Cox K, Morrison JH. 1990. Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. *J Comp Neurol* 301: 44-54.
- Hof PR, Duan H, Page TL, Einstein M, Wicinski B, He Y, Erwin JM, Morrison JH. 2002. Age-related changes in GluR2 and NMDAR1 glutamate receptor subunit protein immunoreactivity in corticocortically projecting neurons in macaque and patas monkeys. *Brain Res* 928:175-186.
- Honig LS, Rosenberg RN. 2000. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med* 108:317-330.
- Hu L, Wong TP, Cote SL, Bell KF, Cuello AC. 2003. The impact of Abeta plaques on cortical cholinergic and non-cholinergic presynaptic boutons in Alzheimer's disease-like transgenic mice. *Neuroscience* 121:421-432.
- Huang Y, Wang KK. 2001. The calpain family and human disease. *Trends Mol Med* 7:355-362.
- Hugon J, Terro F, Esclaire F, Yardin C. 2000. Markers of apoptosis and models of programmed cell death in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 59:125-131.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR. 1987. Alzheimer's disease: glutamate depletion in the hippocampal perforant pathway zone. *Ann Neurol* 22:37-40.
- Ikonomic MD, Mufson EJ, Wu J, Cochran EJ, Bennett DA, DeKosky ST. 2003. Cholinergic plasticity in hippocampus of individuals with mild cognitive impairment: correlation with Alzheimer's neuropathology. *J Alzheimers Dis* 5:39-48.

- Javitt DC, Zukin SR. 1991. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148: 1301-1308.
- Kolasa K, Harrell LE. 2000. Apoptotic protein expression and activation of caspases is changed following cholinergic denervation and hippocampal sympathetic ingrowth in rat hippocampus. *Neuroscience* 101: 541-546.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr, Charney DS. 1994. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry*. 51:199-214.
- Kurumaji A, McCulloch J. 1989. Effects of MK-801 upon local cerebral glucose utilisation in conscious rats and in rats anaesthetised with halothane. *J Cereb Blood Flow Metab.* 9:786-794.
- Kurumaji A, Nehls DG, Park CK, McCulloch J. 1989. Effects of NMDA antagonists, MK-801 and CPP, upon local cerebral glucose use. *Brain Res.* 496:268-84.
- Lahti AC, Koffel B, LaPorte D, Tamminga CA. 1995. 3(1):9-19. Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol* 13:9-19.
- LeBlanc AC. 2005. The role of apoptotic pathways in Alzheimer's disease neurodegeneration and cell death. *Curr Alzheimer Res* 2:389-402.
- Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. 2000. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405:360-364.
- Levine MS, Klapstein GJ, Koppel A, Gruen E, Cepeda C, Vargas ME, Jokel ES, Carpenter EM, Zanjani H, Hurst RS, Efstratiadis A, Zeitlin S, Chesselet MF. 1999. Enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knocking mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 58:515-532.
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M. 2000. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 25:402-405.
- Li H, Li SH, Yu ZX, Shelbourne P, Li XJ. 2001. Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *J Neurosci.* 21:8473-8481.
- Li BS, Sun MK, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Vinade L, Kulkarni AB, Brady RO, Pant HC. 2001. Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:12742-12747.
- Lu X, Wyszynski M, Sheng M, Baudry M. 2001. Proteolysis of glutamate receptor-interacting protein by calpain in rat brain: implications for synaptic plasticity. *J Neurochem* 77:1553-1560.
- Morrison JH, Hof PR. 1997. Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278: 412-419.
- Morrison JH, Hof PR. 2002. Selective vulnerability of corticocortical and hippocampal circuits in aging and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 136: 467-486.
- Mouatt-Prigent A, Karlsson JO, Agid Y, Hirsch EC. 1996. Increased M-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death? *Neuroscience* 73:979-987.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98-103.
- Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD. 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283: 1571-1577.
- Nath R, Davis M, Probert AW, Kupina NC, Ren X, Schielke GP, Wang KK. 2000a. Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 274:16-21.
- Nath R, Huggins M, Glantz SB, Morrow JS, McGinnis K, Nadimpalli R, Wang KK. 2000b. Development and characterization of antibodies specific to caspase-3-produced alpha II-spectrin 120 kDa breakdown product: marker for neuronal apoptosis. *Neurochem Int* 37: 351-361.
- Newcomb JK, Kampfl A, Posmantur RM, Zhao X, Pike BR, Liu SJ, Clifton GL, Hayes RL. 1997. Immunohistochemical study of calpain-mediated breakdown products to alpha-spectrin following controlled cortical impact injury in the rat. *J Neurotrauma* 14:369-83.
- Nixon RA, Saito KI, Grynspan F, Griffin WR, Katayama S, Honda T, Mohan PS, Shea TB, Beermann M. 1994. Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 747:77-91.
- Nixon RA. 1986. Fodrin degradation by calcium-activated neutral proteinase (CANP) in retinal ganglion cell neurons and optic glia: preferential localization of CANP activities in neurons. *J Neurosci* 6:1264-1271.
- Nixon RA. 2000. A "protease activation cascade" in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 924:117-131.
- Nixon RA. 2003. The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res Rev* 2:407-418.
- Olney JW, Wozniak DF, Farber NB. 1998. Glutamate Receptor Dysfunction and Alzheimer's Disease. *Restor Neurol Neurosci* 13:75-83.
- Pellegrini-Giampietro DE, Peruginelli F, Meli E, Cozzi A, Albani-Torregrossa S, Pellicciari R, Moroni F. 1999. Protection with metabotropic glutamate I receptor antagonists in models of ischemic neuronal death: time-course and mechanisms. *Neuropharmacol* 38: 1607-1619.
- Pike BR, Flint J, Dutta S, Johnson E, Wang KK, Hayes RL. 2001. Accumulation of non-erythroid alpha II-spectrin and calpain-cleaved alpha II-spectrin breakdown products in cerebrospinal fluid after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* 78:1297-1306.
- Pike BR, Zhao X, Newcomb JK, Posmantur RM, Wang KK, Hayes RL. 1998. Regional calpain and caspase-3

- proteolysis of alpha-spectrin after traumatic brain injury. *Neuroreport* 9:2437-2442.
- Procter AW, Palmer AM, Bowen DM, Murphy E, Neary D. 1987. Glutamatergic denervation in Alzheimer's disease - a cautionary note. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50:825.
- Raff MC, Whitmore AV, Finn JT. 2002. Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* 296:868-871.
- Rameau GA, Akaneya Y, Chiu L, Ziff EB. 2000. Role of NMDA receptor functional domains in excitatory cell death. *Neuropharmacol* 39:2255-66.
- Ray SK, Karmakar S, Nowak MW, Banik NL. 2006. Inhibition of calpain and caspase-3 prevented apoptosis and preserved electrophysiological properties of voltage-gated and ligand-gated ion channels in rat primary cortical neurons exposed to glutamate. *Neuroscience* 139:577-95.
- Riedel G, Platt B, Micheau J. 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140:1-47.
- Roberts-Lewis JM, Savage MJ, Marcy VR, Pinsker LR, Siman R. 1994. Immunolocalization of calpain I-mediated spectrin degradation to vulnerable neurons in the ischemic gerbil brain. *J Neurosci* 14:3934-3944.
- Saïdo TC, Yokota M, Nagao S, Yamaura I, Tani E, Tsuchiya T, Suzuki K, Kawashima S. 1993. Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain. *J Biol Chem* 268:25239-25243.
- Saïdo TC, Sorimachi H, Suzuki K. 1994. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J* 8: 814-822.
- Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA. 1993. Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:2628-2632.
- Seubert P, Ivy G, Larson J, Lee J, Shahi K, Baudry M, Lynch G. 1988. Lesions of entorhinal cortex produce a calpain-mediated degradation of brain -spectrin in dentate gyrus. I. Biochemical studies. *Brain Res*. 459: 226-232.
- Shimohama S. 2000. Apoptosis in Alzheimer's disease - an update. *Apoptosis* 5:9-16.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P. 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8:1051-1058.
- Storey E, Kowall NW, Finn SF, Mazurek MF, Beal MF. 1992. The cortical lesion of Huntington's disease: further neurochemical characterization, and reproduction of some of the histological and neurochemical features by N-methyl-D-aspartate lesions of rat cortex. *Ann Neurol* 32:526-534.
- Taffe MA, Davis SA, Gutiérrez T, Gold LH. 2002. Ketamine impairs multiple cognitive domains in rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend* 68:175-187.
- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. 2000. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407:189-194.
- Terry RD. 2000. Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:1118-1119.
- Thaker GK, Carpenter WT Jr. 2001. Advances in schizophrenia. *Nat Med* 7:667-671.
- Thompson PM, Hayashi KM, de Zubicaray G, Janke AL, Rose SE, Semple J, Herman D, Hong MS, Dittmer SS, Doddrell DM, Toga AW. 2003. Dynamics of gray matter loss in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 23:994-1005.
- Vaisanen J, Ihalainen J, Tanila H, Castrén E. 2004. Effects of NMDA-receptor antagonist treatment on c-fos expression in rat brain areas implicated in schizophrenia. *Cell Mol Neurobiol*. 24:769-780.
- Wang KK. 2000. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci*. 23:20-26.
- Wang KK, Posmantur R, Nath R, McGinnis K, Whitton M, Talanian RV, Glantz SB, Morrow JS. 1998. Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem* 273: 22490-22497.
- Wozniak DF, Dikranian K, Ishimaru MJ, Nardi A, Corso TD, Tenkova T, Olney JW, Fix AS. 1998. Disseminated corticolimbic neuronal degeneration induced in rat brain by MK-801: potential relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 5:305-322.
- Yuan J, Yankner BA. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802-809.
- Zhang C, Raghupathi R, Saatman KE, Smith DH, Stutzmann JM, Wahl F, McIntosh TK. 1998. Riluzole attenuates cortical lesion size, but not hippocampal neuronal loss, following traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Res* 52:342-349.