



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFECTO DEL ESTRÉS OXIDANTE EN EL
PROCESAMIENTO AMILOIDOGÉNICO
DE LA PROTEÍNA PRECURSORA DEL
AMILOIDE (PPA) EN EL CEREBRO DE
RATA *in vivo*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

GILDA MARÍA BALDERAS ÁVILA

Tutor: DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EFECTO DEL ESTRÉS OXIDANTE EN EL PROCESAMIENTO AMILOIDOGÉNICO DE LA PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE (PPA) EN EL CEREBRO DE RATA *in vivo*.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez en el laboratorio C5, del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

| | |
|---|-----------|
| Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez | IIB, UNAM |
| Dr. Emilio Rojas del Castillo | IIB, UNAM |
| Dr. Julio Moran Andrade | IFC, UNAM |

Se reconoce la colaboración del Dr. Emilio Rojas del Castillo, del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de cuantificación de glutatión y el ensayo de lipoperoxidación.

Se reconoce la asesoría técnica de la L.I.B.B. Karina Hernández y L.I.B.B. Ricardo Quiroz en administración i.c.v. en rata, experimentos de western blot así como obtención de las muestras de tejido.

Se reconoce a la Q.F.B. Patricia Ferrera por su apoyo para la realización de los experimentos de electroforesis y western-blot.

Se reconoce la asesoría del Q.F.B. Nahum Zepeta en los ensayos de glutatión, lipoperoxidación y especies reactivas de oxígeno.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (48663) y PAPIT-UNAM (IN217806). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

| | |
|------------|--|
| Presidente | Dr. José Pedraza Chaverri |
| Vocal | Dr. Emilio Rojas del Castillo |
| Secretario | Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte |
| Suplente | Dra. Angélica Zepeda Rivera |
| Suplente | Dr. Ignacio Camacho Arroyo |

Para mi pequeña Maylis
Espero dejarte un mundo mejor

Nuevamente me encuentro finalizando una etapa más en vida, la cual ha estado llena de increíbles experiencias que me han hecho crecer como persona en lo académico y lo personal. Esta experiencia me confirma que siempre han que seguir adelante a pesar de las circunstancias y tratar de dar lo mejor de uno.

Quisiera dedicar este espacio para agradecer a aquellas personas que contribuyeron a construir y finalizar este proyecto. Cada uno de ustedes me dejó algo en esta parte del camino

A ti, Johan, mi amor que has estado para mí cuando te he necesitado, tú sabes bien por todo lo que pase y todo lo que has compartido conmigo. Agradezco que estés a mi lado, me dejes amarte y sobre todo el haber formado una hermosa familia. Tu y Maylis son todo para mí. Je vous aime très très fort.

A ti mi hermosa Maylis que en esta última etapa haz sido la luz en el camino, agradezco el tenerte y que me regales todos los días tu hermosa sonrisa. Me haces seguir adelante y tratar de ser mejor persona.

A mis padres que siempre han estado ahí para apoyarme en todo y nunca me han dejado, gracias por ser mis papas. A mis hermanos, siempre aprendo algo de ustedes.

A la Dra. Clorinda por aceptarme en su equipo de trabajo y sobre todo por ser un excepcional ser humano. La admiro doctora.

Gracias al Dr. Emilio Rojas que me permitió trabajar en su laboratorio y ayudarme a desarrollar este proyecto.

Nahum gracias por siempre estar dispuesto a ayudarme y también escucharme.

Paulette gracias por enseñarme a que nunca hay que darse por vencido.

A la Dra. Patricia Coello, que en su momento me dio lo que muchos se niegan a dar, una oportunidad!

Davidcillo (amistad que ha sobrevivido) y a TODOS mis compañeros del laboratorio, en particular Karina y Ricardo, gracias por la ayuda que me dieron y por los momentos que compartidos.

Gracias a Dios por haber terminado este proyecto, que ha sido realmente un reto el finalizarlo.

Por último pero no menos importante a la UNAM, mi alma mater, que gracias a ella he podido crecer en todos los sentidos.

Y como alguna vez alguien me dijo, que un científico trabaja para *robarle una respuesta a la naturaleza*, espero un día poder lograrlo.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. ABREVIATURAS..... | 2 |
| 3. ANTECEDENTES | 4 |
| 3.1. Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer | 4 |
| 3.1.1. Marcadores histopatológicos..... | 5 |
| 3.1.2. El péptido β -Amiloide y metabolismo de la proteína precursora del amiloide..... | 7 |
| 3.1.3. Factores que propician el metabolismo amiloidogénico del β -amiloide | 11 |
| 3.2. Estrés oxidante y la Enfermedad de Alzheimer..... | 13 |
| 3.3. Sistemas antioxidantes cerebrales..... | 18 |
| 3.4. Metabolismo y funciones del glutatión en el cerebro | 19 |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 23 |
| 5. HIPÓTESIS | 23 |
| 6. OBJETIVOS | 24 |
| 7. METODOLOGÍA..... | 25 |
| 7.1. Obtención del tejido..... | 25 |
| 7.2. Cuantificación de proteína por el método de Lowry | 25 |
| 7.3. Cuantificación de glutatión | 26 |
| 7.4. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno..... | 26 |
| 7.5. Ensayo de lipoperoxidación..... | 27 |
| 7.6. Western blot | 27 |
| 7.7. Análisis estadístico..... | 28 |
| 8. RESULTADOS | 29 |
| 8.1. Efecto del tratamiento con el inhibidor de la síntesis de glutatión | 29 |
| 8.2. Diferencias en los niveles de APP en las regiones cerebrales analizadas..... | 31 |
| 8.3. El efecto del estrés oxidante en el contenido de APP y sAPP α | 32 |
| 8.4. Incremento de la fosfo-treonina 668 asociado con el procesamiento amiloidogénico | 33 |
| 9. DISCUSIÓN..... | 35 |
| 10. CONCLUSIONES..... | 39 |
| 11. REFERENCIAS | 40 |

1. RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que se manifiesta por pérdida neuronal y sináptica, con la presencia de placas neuríticas constituidas por el péptido β -Amiloide (β A). Los péptidos del β A son derivados del procesamiento amiloidogénico de la proteína precursora del amiloide (PPA o APP). Las causas del metabolismo alterado de la APP y la deposición del β A son desconocidas hasta el momento, pero puede estar implicada la presencia de estrés oxidante relacionado con la edad, la disminución en el metabolismo energético y la disrupción de la homeostasis del calcio. Hay evidencia que sugiere que el estrés oxidante pudiera alterar el procesamiento de esta proteína a diferentes niveles promoviendo la producción del β A. Además se ha observado que en células que son sujeto de daño oxidante, la treonina 668 de la APP se fosforila vía la cinasa C-Jun NH₂-terminal (JNK). La EA esporádica tiene como principal factor de riesgo el envejecimiento, el cual se asocia con un incremento en el estrés oxidante cerebral. Hasta el momento no se conoce completamente la participación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y el sistema antioxidante glutatión (GSH) en la producción de diversos marcadores de la EA. En el presente trabajo desarrollamos un modelo de inducción de estrés oxidante por la depleción de GSH *in vivo* en el cerebro de la rata, con el fin de caracterizar los cambios en el procesamiento de la APP en diferentes regiones cerebrales. Para esto se administró vía intracerebroventricular (i.c.v.) una dosis aguda de un inhibidor de la síntesis de GSH, la L-butionina-[S,R]-sulfoxamina (BSO) (120 mg/mL, 10 μ L/ rata) a ratas Wistar macho. 24 h después de la inyección las ratas se decapitaron y se aisló el hipocampo, la corteza y el cerebelo. Se aisló el homogenado total de cada región. Se cuantificaron los niveles de GSH total, así como la producción de ERO y lipoperoxidación. Finalmente se examinaron los niveles de APP y sus fragmentos, así como la APP y los fragmentos de la APP fosforilados en la treonina 668, por medio de western blot. Éste trabajo es el primer estudio que se realiza en un modelo *in vivo* de depleción del GSH con el fin de generar un estado de estrés oxidante e identificar cambios en el procesamiento de la APP. Demostramos que, aunque al depletar uno de los antioxidantes más importantes en el cerebro, el GSH, los niveles del APP total no se modificaron, existe una tendencia a disminuir la producción del fragmento sAPP α . Esto sugiere que la depleción del GSH se asocia con una disminución del procesamiento no amiloidogénico de la APP. Por otro lado se observó un incremento en fosforilación de la treonina 668 de la APP y de los fragmentos proteolíticos de ésta, lo que se ha asociado con la producción de β A. Esta fosforilación podría depender de la activación de JNK promoviendo la amiloidogénesis. En conclusión, nuestros datos sugieren que el estrés oxidante debido a la depleción del GSH promueve el procesamiento de la APP hacia la vía amiloidogénica.

2. ABREVIATURAS

ABAD = alcohol deshidrogenasa unida al péptido β -Amiloide

AICD = Dominio intracelular de la proteína precursora del amiloide

APOE = Apolipoproteína E

APP o PPA = Proteína precursora del amiloide

APPim = APP inmadura

APPm = APP madura

β A = péptido β -Amiloide

sAPP α = Fragmento soluble APP α

sAPP β = Fragmento soluble APP β

BACE1 = Enzima procesadora del sitio β de la APP 1

BSA = Albumina de suero bovino

BSO = L-butionina-[S,R]-sulfoxamina

C83 = Fragmento C-terminal de 83 aminoácidos

C89= Fragmento C-terminal de 89 aminoácidos

C99= Fragmento C-terminal de 99 aminoácidos

CTF = Fragmentos C-terminal

COX =Citocromo c oxidasa

Cys = Cisteína

CysGly = Cisteinilglicina

DHR = Dihidrorodamina-123

EA = Enfermedad de Alzheimer

EAAC1 = Acarreador de aminoácidos excitatorio 1

ERN = Especies reactivas de nitrógeno

ERO = Especies reactivas de oxígeno

f β A = Forma fibrilar del péptido β Amiloide

GCL = Glutamato-cisteína ligasa

Glu = Glutamato

γ GluCys = γ -glutamilcisteína

Gly = Glicina

GPx = Glutación peroxidasa

GR = Glutación reductasa

GS = Glutación sintetasa

GSH = Glutati3n
GSSG = Glutati3n disulfuro
GST = Glutati3n-S-transferasa
 γ GT = γ -glutamil transpeptidasa
HNE = 4-hidroxi-2-nonenal
H₂O₂ = Per3xido de hidr3geno
i.c.v. = intracerebroventricular
IDE = Enzima degradadora de insulina
JNK = Cinasa c-Jun NH₂-terminal
LRP =Receptor relacionada a lipoprote3na de baja densidad
Met35 = Metionina 35
MDA = Malondialdeh3do
NAC = N-acetilciste3na
NO = 3xido n3trico
3-NT = 3-nitrotirosina
O₂^{•-} = ion super3xido
OH[•] = radical hidroxilo
8OHG = 8-hidroxi-2-deoxiguanina
ONOO⁻ = ion peroxinitrito
OPT = O-ftaldialdeh3do
PBS = Amortiguador de fosfatos
PET = Tomograf3a de emisi3n de positrones
PGA = Productos de la glucosilaci3n avanzada
PHF = filamentos helicoidales apareados
PS1 = Presenilina 1
PS2 = Presenilina 2
R[•] = Radicales
ROOH = Per3xidos
SOD = Super3xido dismutasa
TACE = Factor de necrosis tumoral α convertido en enzima
TBS = Tris salino amortiguado
TBA = Acido tiobarbit3rico
Thr668 = Treonina 668
X = Compuesto que puede formar conjugados con el GSH

3. ANTECEDENTES

3.1. Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad del Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia, siendo ésta entre el 50-60% de todos los casos (Blennow et al., 2006). Se estima que afecta cerca de 30 millones de individuos a nivel mundial (Müller et al., 2008) y para el 2040 afectará a más de 80 millones (Ferri et al., 2005). En México, hay más de 350,000 personas que presentan la enfermedad y mueren por ella anualmente 2,030 pacientes (www.innn.salud.gob.mx). No hay una causa conocida que provoque la enfermedad y tampoco se conoce cura para ésta. Actualmente los fármacos aprobados para la EA solo disminuyen los síntomas por un tiempo pero no alteran la progresión general de la enfermedad (Rauk, 2008).

Clínicamente, la EA está caracterizada por un deterioro progresivo cognitivo incluyendo la pérdida de la memoria, el raciocinio y el lenguaje (Lindeboon y Weinstein, 2004). Se han descrito en estudios post-mortem los marcadores histopatológicos de la enfermedad que incluyen la presencia intraparenquimatosa de placas amiloideas (placas seniles o neuríticas) y marañas neurofibrilares intracelulares (Golde, 2003; Tanzi y Bertram, 2005), localizadas en estructuras de lóbulo temporal medial y áreas corticales del cerebro, junto con la degeneración de neuronas y sinapsis (Blennow et al., 2006).

La mayoría de los casos de la EA son esporádicos y de establecimiento tardío, cuyas causas se atribuyen a diferentes factores. Desde el punto de vista genético, la EA es una enfermedad heterogénea con ambas formas, familiar o esporádica. La EA familiar, representa menos del 1% del total de los casos, se debe a una herencia dominante autosomal con inicio antes de los 65 años de edad, ocasionado por mutaciones en el gen de la proteína precursora del amiloide (PPA o sus siglas en inglés APP) en el cromosoma 21 (Goate et al., 1991), y menos frecuentemente, mutaciones en la presenilina 1 (PS1) en el cromosoma 14 y la presenilina 2 (PS2) en el cromosoma 1 (Levy-Lahad et al., 1995; Sherrington et al., 1995). Mientras estas formas son raras con una prevalencia menor al 1% (Harvey et al., 2003), algunos genes como el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (APOE) operan como el mayor factor

de riesgo genético en el EA esporádica y modifica la edad de la aparición de la enfermedad (Meyer et al., 1995; Raber et al., 2004).

Todas las mutaciones y los factores de riesgo están asociados con la producción anormal o la eliminación de un péptido, el péptido β -Amiloide (β A), el cual es mayor componente de las placas seniles que son diagnosticadas en la EA. Además, la hipótesis de la cascada amiloidea lo postula como el primer agente causal de la EA (Hardy y Selkoe, 2002; Rauk, 2008). De acuerdo con esta hipótesis, un evento importante en la patogénesis de la enfermedad es el desbalance entre la producción y la eliminación del β A en el cerebro: el incremento en la producción del β A en la EA familiar y el incremento y/o decremento en la eliminación del β A en la EA esporádica. Los oligómeros del β A pueden inhibir directamente la potenciación a largo plazo y causar daño en la función sináptica, además de producir inflamación y favorecer el estrés oxidante causado por la agregación y la deposición del β A. La patología de Tau con la formación de marañas es considerada un evento también central en la patogénesis que correlaciona más directamente con el daño cognitivo y la muerte neuronal. Todo esto finalmente lleva a la pérdida sináptica, la degeneración neuronal y la demencia (Hardy y Selkoe, 2002).

3.1.1. Marcadores histopatológicos

Las *placas seniles*, también llamadas placas neuríticas, son depósitos extracelulares de fibrillas y agregados amorfos de β A, rodeados por terminales presinápticas degeneradas junto con astrocitos y células de microglia (Morgan et al., 2004; Weiner y Frenkel, 2006). La densidad del centro de cada placa se ha relacionado con el estadio de formación de ésta, y van desde placas recién formadas con un centro muy difuso, hasta las placas terminales con un centro denso (Vickers et al., 2000).

Se ha encontrado que las fibrillas del péptido β A no son las únicas formas neurotóxicas, sino que estas también se ensamblan en formas solubles: las protofibrillas que forman estructuras curvilíneas de 4-11 nm en diámetro y menos de 200 nm de longitud. *In vitro*, estas causan estrés oxidante que desacopla los transportadores iónicos y de glucosa en la membrana celular, y la desestabilización de la homeostasis celular del calcio. Las protofibrillas también causan cambios

electrofisiológicos lo que eventualmente conduce a la disfunción neuronal (Klein et al., 2001). Sin embargo, en trabajos recientes se han identificado que las formas solubles diméricas y triméricas del β A son las especies responsables de los déficits sinápticos característicos de la EA (Shankar et al., 2007; Shankar et al., 2008). Los dímeros del β A se han extraído de cerebros de pacientes con la EA pero no de cerebros de pacientes con otras formas de demencia que no están relacionadas con la producción del β A. El término “soluble” se refiere a cualquier forma del péptido β A que es soluble en un amortiguador acuoso y permanece en solución después de centrifugación a alta velocidad, indicando que no son fibrillas insolubles. Los agregados varían desde dímeros hasta 24-meros, o incluso aquellos con una masa molecular más grande, se han reportado como oligómeros del β A (Glabe, 2008).

Las placas difusas son estructuras amorfas, que no poseen un centro denso de β A pero por medio de anticuerpos se ha determinado que éste se encuentra presente y tal vez en un estadio temprano de agregación (Dickson, 1997). Ambos tipos de placas pueden presentarse en cerebros de personas viejas sin que necesariamente se presente demencia.

Las *marañas neurofibrilares* son agregados intracelulares insolubles en neuronas formadas por la proteína asociada a microtúbulos llamada Tau, que exhibe hiperfosforilación y modificaciones oxidativas. Tau es una proteína de citoesqueleto neuronal que se une a microtúbulos, promoviendo su unión y estabilidad (Weiner et al, 2006). Se ha demostrado que una variedad de cinasas son capaces de fosforilar a Tau *in vitro* en varios residuos de serina-treonina. No obstante, no está claro como una o más cinasas son las responsables de iniciar la hiperfosforilación de Tau *in vivo*, que lleva a la aparente disociación de los microtúbulos y a la agregación en filamentos helicoidales apareados (PHF).

Las dos lesiones clásicas de la EA, placas seniles y marañas neurofibrilares, pueden ocurrir independientemente una de otra. Se han visto depósitos del β A en cerebros de humanos adultos cognitivamente normales en virtual ausencia de marañas neurofibrilares (Selkoe, 2001).

3.1.2. El péptido β -Amiloide y metabolismo de la proteína precursora del amiloide

El β A es un péptido de 4 kDa, derivado del procesamiento proteolítico de la APP por efecto de las enzimas β - y γ -secretasa. El sitio del corte de la γ -secretasa no es preciso y el largo de los péptidos del β A varía de 39 a 43 aminoácidos. Los más abundantes son el β A (1-40) y el β A (1-42), en una proporción de alrededor de 10:1. El β A (1-42), es significativamente el más neurotóxico y el mayor componente de las placas seniles (Rauk, 2008). La concentración total del β A distribuido en cerebros con la EA es de alrededor de 31 μ g/g comparado con 2 μ g/g en cerebros de pacientes de la misma edad que no presentan la enfermedad (Cherny et al., 1999). Aunque el β A es predominantemente producido en la membrana y llevado al espacio extracelular donde se deposita formando placas seniles que son características de la EA, también se produce en membranas dentro de las neuronas y es llevado al citoplasma (LaFerla et al., 2007). Bajo condiciones normales, el β A es degradado por peptidasas como la que degrada insulina (IDE), la neprilisina y la convertidora de endotelina. El β A también es eliminado desde el cerebro en un proceso balanceado por su eflujo, mediado por la lipoproteína de baja densidad relacionada.

La secuencia del β A(1-42) es (Rauk, 2008):

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 5 | 10 | 15 | | | | | | | | | | | |
| Asp | Ala | Glu | Phe | Arg | His | Asp | Ser | Gly | Tyr | Glu | Val | His | His | Gln |
| 16 | 20 | 25 | 30 | | | | | | | | | | | |
| Lys | Leu | Val | Phe | Phe | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Ser | Asn | Lys | Gly | Ala |
| 31 | 35 | 40 | 42 | | | | | | | | | | | |
| Ile | Ile | Gly | Leu | Met | Val | Gly | Gly | Val | Val | Ile | Ala | | | |

Los primeros 16 residuos son altamente hidrofílicos. Los residuos de His13 e His14, forman un sitio de unión a Cu(II) (Rauk, 2008). La región central, β A (12-23), se identificó como el sitio de autoreconocimiento para la formación de dímeros y oligómeros (Tjernberg et al., 1996). Esta región es también el sitio de reconocimiento para el colesterol (Yao et al., 2002). El β A también se une con enzimas de alta afinidad, pero en la región β A (31-35) (Milton et al., 2001).

El papel principal del β A como mediador de la EA se deriva del hecho que se acumula en el cerebro durante muchos años antes de que la enfermedad sea evidente (Hardy y Selkoe, 2002).

La APP es miembro de las proteínas transmembranales de tipo I que se encuentra en el cromosoma 21 (Tanzi et al., 1987). Está localizada en la membrana plasmática, la red trans-Golgi, retículo endoplásmico y membranas endosomal, lisosomal y mitocondrial (Sakono y Zaco, 2010). Se han identificado más de 25 mutaciones en el gen de la APP como causa de Alzheimer familiar (Goate et al., 1991) y la amiloidosis cerebrovascular hereditaria (Levy et al., 1990). A pesar de que las mutaciones en APP son raramente encontradas en pacientes que presentan la EA de tipo esporádica, son, no obstante, importantes porque proveen evidencia sustancial y temprana de que la APP y el β A desempeñan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Thinakaran y Koo, 2008).

Se sabe que la APP es una proteína que se deriva de los 3 miembros de una pequeña familia de genes, que incluye APLP1 y APLP2, que codifican para una proteína con un largo dominio extracelular N-terminal, un dominio sencillo en la membrana y una pequeña región citoplasmática C-terminal. Notablemente, solo la APP contiene la secuencia que codifica para el dominio β A (Selkoe et al., 2003; Thinakaran y Koo, 2008).

La APP tiene principalmente 3 isoformas de 695, 751 y 770 aminoácidos. En neuronas, la APP695 es la forma expresada predominantemente y está sujeta a N- y O-glucosilación en el dominio extracelular/luminal. Las otras 2 isoformas se expresan principalmente en células no neuronales, especialmente en células gliales en el cerebro. La APP N-glucosilada está localizada en el retículo endoplásmico y Golgi, esta forma se considera la forma APP inmadura (APPim), y no es sujeta de procesamiento por las secretasas (Tomita et al., 1998). La APP N-glucosilada es posteriormente llevada dentro del aparato de Golgi y es sujeta de O-glucosilación, esta forma es designada como APP madura (APPm). Después, ambas APPm llegan a la red trans-Golgi y entran en la vía secretoria tardía, donde son sujetos del procesamiento de la α - y β -secretasa en la membrana extracelular/luminal (Small y Gandy, 2006).

La APP puede ser procesada por dos vías: la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica.

La vía no amiloidogénica implica la actividad de la α -secretasa, desintegrinas y metaloproteasas como el factor de necrosis tumoral α convertido en enzima (TACE/ADAM17) o ADAM10 (Buxbaum et al., 1998; Parvathy et al., 1998), que corta en el sitio α -secretasa, localizado dentro del dominio β A entre Lys¹⁶ y Leu¹⁷ (Allinson et al., 2003), genera un fragmento largo N-terminal soluble (sAPP α), que se libera desde la célula y el fragmento C-terminal de 83 aminoácidos (CTF83 o C83) permanece asociado a la membrana (Nixon, 2007); posteriormente C83 es sustrato del complejo γ -secretasa produciendo el dominio intracelular de la APP (AICD) y el fragmento p3 (Allinson et al., 2003) (Fig. 1). Cuando el APP sufre dicho procesamiento, no se libera el péptido β A, y el fragmento generado no se agrega y no tiene actividad amiloidogénica (Pastorino y Lu, 2006).

En la patología de la EA, la producción del péptido β A es resultado del procesamiento amiloidogénico de la APP. Éste involucra primero la actividad de la β -secretasa y después de la γ -secretasa, y requiere de la internalización de la APP desde la membrana plasmática hasta endosomas y lisosomas (Koo y Squazzo, 1994; Pérez et al., 1999). La β -secretasa, una aspartil proteasa integral de membrana identificada como β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1), corta a la APP en el inicio de la secuencia del péptido β A, generando un fragmento extracelular soluble llamado sAPP β y un fragmento intracelular C-terminal de 99 aminoácidos (CTF99 o C99). Un segundo sitio de corte de BACE1 está localizado a 10 aminoácidos del C-terminal y genera un residuo llamado CTF89 o C89 (Müller et al., 2008). Posteriormente la γ -secretasa corta al C99 en el residuo 40-43 de la secuencia del β A (Pastorino y Lu, 2006) (Fig. 1), produciendo mayoritariamente al péptido de 40 aminoácidos y en pequeñas cantidades el péptido de 42 aminoácidos (Nixon, 2007). La γ -secretasa es un complejo proteasa unido a la membrana, que consiste de por lo menos cuatro componentes esenciales: presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2), nicastrina, Pen2 y Aph-1 (St George-Hyslop, 2000).

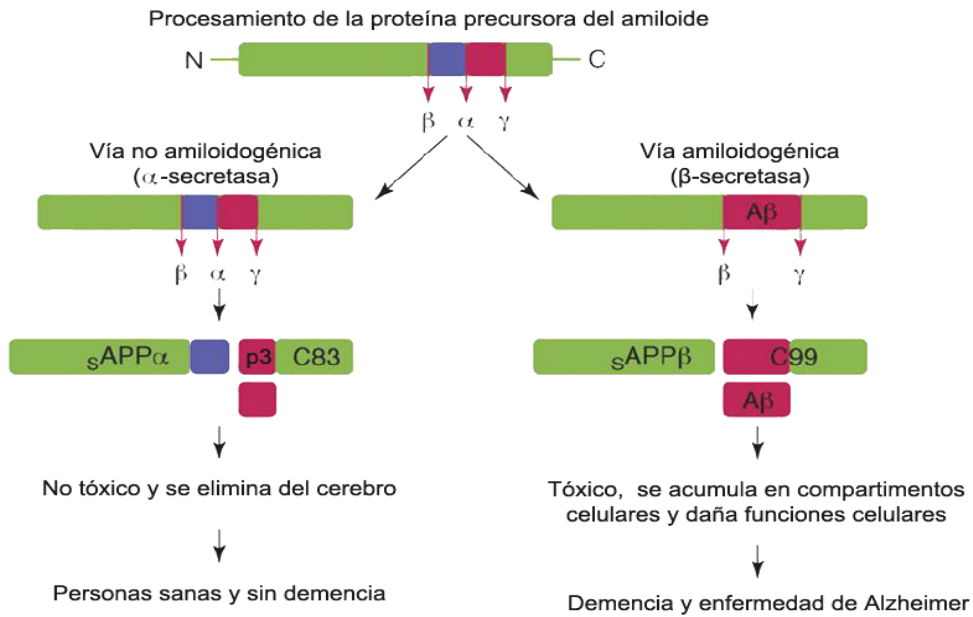


Figura 1. Procesamiento proteolítico de la APP en individuos sanos (sin demencia) y en pacientes con la EA (Reddy y Beal, 2008).

La APP tiene ocho sitios potencialmente fosforilables en los 47 residuos de aminoácidos de el dominio citoplasmático, pero la fosforilación en la treonina 668 o Thr668 (APP695) aparentemente confiere el máximo de cambios conformacionales (Ramelot y Nicholson, 2001), lo cual resulta en interacciones diferenciales con proteínas de unión que pueden regular el tráfico intracelular de APP y el procesamiento amiloidogénico. En neuronas, Cdk5 y GSK3 β fosforilan a la Thr668 en la APP_m, mientras que la cdk1/cdc2 cinasa fosforila a la Thr668 de la APP_{im} en células en división (Suzuki et al., 1994). Cuando las células son sujeto de estrés la cinasa c-Jun NH₂-terminal (JNK), también fosforila a la Thr668 (Kimberly et al., 2005). La fosforilación de este residuo induce cambios conformaciones significativos, afectando la interacción con Fe65, una proteína adaptadora específica (Ando et al., 2001). La APP es fosforilada no sólo en la APP_m si no también en los fragmentos C-terminal (Fig. 2).

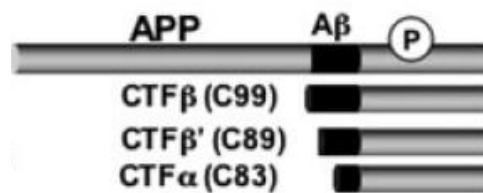


Figura 2. Fosforilación de la Thr668 en la APP, en la región citoplasmática indicada por la letra P. Algunos CTF de APP son fosforilables en la Thr668 y detectados como fosfopéptidos (pC99, pC89, pC83) (Suzuki y Nakaya, 2008).

Desde que la APP fue descubierta, se le han atribuido varias funciones, algunas únicas de ciertas isoformas, aunque su papel real todavía no es bien conocido. Es suficiente decir que un número de dominios funcionales han sido mapeados en regiones extra e intracelulares de la APP. Estos incluyen unión a metales (cobre y zinc), componentes de matriz extracelular (heparina, colágena y laminina), dominios neurotróficos y de adhesión, además APP751 y 770 tienen un dominio inhibidor de proteasas homólogo al inhibidor de tipo Kunitz (Sinha et al., 1990). La APP es constitutivamente liberada desde la células tras el procesamiento de la α -secretasa, este descubrimiento indica que la APP tiene funciones autocrinas y paracrinas en la regulación del crecimiento (Thinakaran y Koo, 2008). Además se ha demostrado que la APP estimula el crecimiento de neuritas desde una gran variedad de entornos. Este fenotipo es compatible con la regulación de la expresión de APP durante la maduración neuronal (Hung et al., 1992). El dominio N-terminal de unión a heparina de la APP también estimula el crecimiento de neuritas y promueve la sinaptogénesis (Rossjohn, 1999). Algunos estudios han implicado el papel de los fragmentos solubles de la APP en la regulación de células madre. El fragmento sAPP β induce la diferenciación de células madre neurales en astrocitos (Kwak et al., 2006).

3.1.3. Factores que propician el metabolismo amiloidogénico del β -amiloide

Una anomalía descrita que parece jugar un papel fundamental en la disfunción y muerte neuronal en la EA es el procesamiento proteolítico alterado de la APP, que resulta en un incremento de la producción y la acumulación de las formas neurotóxicas del β A en el cerebro. En la EA familiar, las mutaciones en la APP son responsables de incrementar la producción del β A. Las mutaciones en los genes de las PS1 y PS2 alteran la actividad de la γ -secretasa, y mutaciones en la APP que resultan en cambios en uno o dos aminoácidos dentro o inmediatamente adyacente al β A aumentan su procesamiento por BACE1 y γ -secretasa (Mattson, 2004). Sin embargo, las causas del metabolismo alterado de la APP en los casos de la EA esporádica no se conocen hasta el momento, pero existe evidencia de que la presencia de estrés oxidante relacionado con la edad, la disminución en el metabolismo energético y la disrupción de la homeostasis del calcio, pueden estar implicados (Mattson, 2004).

La proteína de riesgo, implicada en la EA esporádica, la ApoE4, promueve la producción de β A a través una pronunciada estimulación del reciclamiento de la APP (Ye et al., 2005). La mayor cantidad de β A puede ser generado a través de la vía endosomal como APP madura reciclada (internalizada) desde la superficie celular (Koo y Squazzo, 1994). Además la ApoE actúa como transportador del colesterol en el cerebro y este incrementa la producción de la β A afectando la actividad de la α -, β - y γ -secretasa (Bodovitz y Klein, 1996).

Debido a que muchos aspectos de la EA no se pueden explicar por la presencia de la forma fibrilar del β A ($f\beta$ A), la hipótesis de la cascada amiloidea fue modificada para el β A oligomérico, más que para la $f\beta$ A en la patogénesis de la enfermedad. Contrariamente la $f\beta$ A es menos tóxica pero incrementa la expresión y la actividad de BACE1, promoviendo la acumulación del β A lo cual contribuiría en la toxicidad.

Los mecanismos por los cuales el metabolismo de la APP está regulado por el estrés oxidante no se comprenden totalmente. Se ha sugerido que el estrés oxidante procese a la APP a diferentes niveles. En estudios previos de nuestro laboratorio y otros grupos han propuesto, en la aparición tardía de la EA, que el estrés oxidante activa a la β -secretasa (Reddy, 2006; Quiroz-Báez et al., 2009) e incrementa la expresión de ésta (Chen et al., 2008). Se ha visto que la fosforilación en la Thr668 facilita el procesamiento amiloidogénico y la secreción del β A en neuronas (Lee et al., 2003). En células de neuroblastoma, BACE1 se sobre-expresa por el mecanismo que involucra la activación de JNK (Tamagno et al., 2005; 2008). También se ha reportado la activación de la γ -secretasa dependiente de JNK en células de neuroblastoma que expresan APP695myc bajo condiciones similares de estrés (Shen et al., 2008).

En trabajos previos de nuestro laboratorio se indujo estrés oxidante por la adición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a células de neuroblastoma humano y se observó una reducción significativa de APP y $sAPP\alpha$, además de un incremento en β A, lo que sugiere que el procesamiento amiloidogénico de APP aumenta en presencia de especies reactivas de oxígeno (Quiroz-Báez et al., 2009).

3.2. Estrés oxidante y la Enfermedad de Alzheimer

Bajo condiciones fisiológicas, hay un balance entre los niveles de pro-oxidantes y antioxidantes; sin embargo, ciertos factores ambientales, estresantes o patológicos pueden causar un desbalance llevando al incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Sultana et al., 2009). Este desbalance, entre ERO y antioxidantes, está definido como estrés oxidante, el cual lleva a un potencial daño conocido como daño oxidante. Las ERO comprenden no sólo los radicales libres derivados del oxígeno, sino también a los no radicales derivados de la reducción del oxígeno, y que además son muy reactivos, como el H₂O₂ (Cárdenas y Pedraza, 2006).

Entre los órganos, el cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidante debido a la gran cantidad de oxígeno que utiliza, a la presencia de altos niveles de ácidos grasos polinsaturados y un nivel relativamente alto de iones metálicos de transición redox; además, el cerebro tiene niveles relativamente bajos de antioxidantes (Butterfield et al., 2002). Uno de los mayores daños del cerebro durante el envejecimiento es el estrés oxidante, asociado a la falta de protección contra la generación celular de ERO y la disminución de los sistemas antioxidantes en la célula.

La acumulación de productos endógenos del estrés oxidante parece contribuir a enfermedades crónicas del sistema nervioso central tales como Esclerosis Lateral Amiotrófica, enfermedad de Huntington, Parkinson y EA. A pesar que no se ha demostrado que el estrés oxidante es la causa de cada una de estas enfermedades, la acumulación de las ERO podrían participar por lo menos en el desarrollo y síntomas de dichas enfermedades.

Algunas hipótesis han propuesto explicar la patogénesis de la EA incluyendo la cascada amiloidea, excitotoxicidad, estrés oxidante e inflamación (Butterfield, 2002). Existe evidencia que sugiere que el estrés oxidante tiene un papel clave en la patofisiología de la enfermedad (Cross et al., 1987; Markesbery, 1997).

En cerebros de pacientes que presentan la EA se ha observado:

- a) Incremento en los niveles de proteínas oxidadas, como proteínas carboniladas, proteínas unidas al 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y 3-nitrotirosina (3-NT), éstas se han identificado en hipocampo y el lóbulo parietal, pero no en cerebelo, donde no se observan marcadores de la EA. Se ha observado un patrón de proteínas modificadas en cerebros que presentan la enfermedad sugiriendo una correspondencia entre los depósitos amiloideos, la formación de marañas neurofibrilares, acumulación de microglía y oxidación de tejidos (Hensley et al., 1995). Además, en cerebros de pacientes con la EA se han identificado proteínas oxidadas que participan en varias funciones como metabolismo energético, recaptura de glutamato, asimetría de los fosfolípidos, función sináptica, anomalías neuríticas, amortiguadores de pH, control del ciclo celular y alteraciones proteosomales (Butterfield et al., 2007, Sultana et al., 2009).
- b) Peroxidación de lípidos. Está catalogada por un número de marcadores incluyendo malondialdehído (MDA), acroleína y HNE. Estos productos de la lipoperoxidación son altamente reactivos y pueden unirse covalentemente a proteínas formando aductos con residuos de cisteína, lisina, o histidina. La acumulación de HNE en membranas en respuesta a daño oxidante involucra actividades biológicas como, inhibición de proteínas y síntesis de ADN, estimulación de fosfolipasas C y D, disrupción de la homeostasis de Ca^{2+} , daño membranal, activación de vías de señalización de estrés y muerte celular (Sultana et al., 2009). Algunos estudios han detectado un incremento en los niveles de isoprostanos en plasma y en cerebros de pacientes con la EA (Practico et al., 2001) así como en los niveles de MDA y HNE en fibroblastos y linfoblastos de pacientes con Alzheimer (Cecchi et al., 2002). El ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico, son los ácidos grasos más abundantes en la membrana, son el blanco más vulnerable para el ataque de radicales libres (Halliwell, 1992).
- c) Oxidación de ácidos nucleicos. El daño oxidante en el ADN puede resultar en rompimiento de hebras, unión ADN-ADN, unión ADN-proteína, e intercambio de cromatina hermana y translocación (Crawford et al., 2002). Además las bases de ADN son también atacadas por productos de la lipoperoxidación como HNE y acroleína, que lleva a la formación de aductos exocíclicos, como 8-hidroxi-2-

deoxiguanina (8OHG) (Cook, 2003). En estudios previos se ha demostrado que existe de un 30-70% de oxidación en ARNm en la corteza frontal en pacientes con la EA en comparación con el 2% de oxidación en cerebros de controles de la misma edad (Shan y Lin, 2006). También se ha observado un incremento de ARNr oxidado en el lóbulo parental inferior y, se ha reportado el aumento de 8OHG en el hipocampo y la neocorteza en cerebros con la EA, pero en cerebelo no hay cambios significativos (Ding et al., 2006).

- d) Elevadas concentraciones de hierro y cobre. La sobreacumulación de hierro en el hipocampo, corteza y núcleos basales de Meynert colocalizan con lesiones de la EA. El hierro es causa importante del estrés oxidante en la enfermedad, éste participa en la formación del radical hidroxilo (OH^{\bullet}) vía reacción de Fenton (Smith et al., 1997). El cobre es otro metal que es importante para muchas enzimas en el metabolismo del cerebro y ha sido implicado en la patogénesis de la enfermedad. En pacientes con la EA, la homeostasis del cobre es interrumpido causando estrés oxidante directa e indirectamente. La entrada de cobre al cerebro es principalmente mediado por la ceruloplasmina, una proteína de unión que juega un papel en la protección celular contra el estrés oxidante (Su et al., 2008). Mientras la ceruloplasmina se incrementa en el tejido cerebral y líquido cefalorraquídeo en la EA (Loeffler et al., 1996), los niveles neuronales de ceruloplasmina permanecen sin cambios. Por lo tanto, mientras el incremento de la ceruloplasmina puede indicar una respuesta al aumento del estrés oxidante en la EA, en caso contrario, en neuronas puede tener un papel importante en el daño catalizado por metales (Castellani et al., 1999). El βA y la APP tienen sitios de unión de gran afinidad hacia el cobre. Se ha demostrado que el cobre induce la agregación del βA . Ambos tienen una gran actividad Cu-reductasa, generando Cu^+ de Cu^{2+} . Esta reacción produce H_2O_2 . El Cu^+ en presencia de oxígeno o H_2O_2 puede catalizar la formación del OH^{\bullet} vía reacción de Fenton, de esta forma la APP o el βA asociado al Cu^+ pueden contribuir al elevado estrés oxidante característico en cerebros de pacientes con la EA (Smith et al., 1997, Valko et al., 2007).
- e) Incremento en los depósitos de los productos de la glucosilación avanzada (PGA). Los PGA, una diversa clase de modificaciones postraduccionales, son generados por reacciones no enzimáticas de azúcares reductores con los grupos amino de una proteína o aminoácidos. Éstos, en presencia de metales de

transición pueden sufrir ciclación redox con la consecuente producción de ERO (Harrington y Colaco, 1994). La acumulación de los PGA en el cerebro es una característica del envejecimiento. Los PGA representan una fuente importante de estrés oxidante en la EA (Smith et al., 1995). Los PGA colocalizan con marañas neurofibrilares (Selkoe, 2001), y se ha propuesto que la glucosilación de Tau juega un papel en la estabilización de la agregación de los PHF conduciendo a la formación de las marañas neurofibrilares (Ko et al., 1999).

- f) Disminución en el metabolismo energético y en el contenido del citocromo c oxidasa (COX). La mitocondria es el centro de la producción de las ERO. Usando la tomografía por emisión de positrones (PET) se ha demostrado la disminución del metabolismo cerebral en la EA (Minoshima et al., 1997). En las mitocondrias dañadas la producción de ATP disminuye y la de ERO aumenta, y no es coincidencia que la reducción en la producción de energía y el incremento de estrés oxidante, como también cierto daño mitocondrial, sean características de la EA. Los defectos mitocondriales más consistentes en la EA son la deficiencia en varias enzimas claves responsable del metabolismo oxidante incluyendo el α -cetoglutarato deshidrogenasa y el complejo piruvato deshidrogenasa, dos enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, y el COX, de la cadena transportadora de electrones (Gibson et al., 1998). Además se observa daño del ADN mitocondrial neuronal, y la formación de lisosomas derivados de la mitocondria y lipofuscina, que son evidentes en casi todas las neuronas de cerebros de pacientes con EA (Zhu et al., 2004). Mediciones morfométricas de diferentes tipos mitocondriales (normales, parcialmente dañadas y completamente dañadas) confirman que las neuronas en la EA presentan un porcentaje significativamente bajo de mitocondrias normales y un alto porcentaje de mitocondrias completamente dañadas (Hirai et al., 2001).
- g) Inducción de estrés oxidante por el β A. Los mecanismos involucrados en la neurotoxicidad mediada por el β A se desconocen, pero hay evidencia que sugiere que el estrés oxidante juega un papel clave (Butterfield, 2002, Hardy y Selkoe, 2002). En este sentido, en muchos estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que la agregación del β A induce estrés oxidante, y que, por otro lado el incremento de los radicales libres aumenta la producción de β A (Harkany et al., 2000). Esta curva probablemente juega un papel importante en la

progresión de la EA debido a que el estrés oxidante durante el envejecimiento es el factor de mayor riesgo en la enfermedad. La presencia de los metales de transición es un requisito para la agregación del β A y la actividad pro-oxidante. La toxicidad del β A parece ser mediada por la interacción inmediata con los metales de transición para la generación de ERO (Rottkamp et al., 2001). Otro factor importante para la actividad pro-oxidante parece ser la presencia del residuo de metionina en la posición 35 (Met35). El Cu^{2+} puede ser reducido, provocando la oxidación de la Met35 y produciendo la metionina sulfoxido, la cual modula el estrés oxidante y las propiedades neurotóxicas del β A (Valko et al., 2007).

La toxicidad del β A parece ser evidente *in vitro*, por el contrario estudios *in vivo* muestran una correlación negativa entre el estrés oxidante y la deposición del β A, indicando un papel antioxidante para el β A (Su et al., 2008). El 8OHG es un marcador de daño oxidante que se acumula rápidamente en el citoplasma neuronal en la EA. Se ha observado que cuando hay un incremento de β A en la corteza de pacientes con EA, hay un decremento de los niveles neuronales de 8OHG, indicando que disminuye el daño oxidante (Nunomura et al., 1999).

Existen otros mecanismos por los cuales se manifiesta la toxicidad del β A, que incluyen: 1) formación de poros en la membrana que causa una pérdida en la homeostasis del calcio y el influjo de Ca^{2+} hacia las neuronas (Rensink et al., 2003). Se ha demostrado que el fragmento β A (25-35) incrementa la permeabilidad del poro de transición mitocondrial y los oligómeros del β A completo parecen tener el mismo efecto (Rauk, 2008). 2) La interacción del β A con Tau, causa una rápida disociación de Tau en los microtúbulos y lleva al colapso de la estructura axonal, primero el mal funcionamiento de la sinapsa y finalmente la muerte neuronal (King et al., 2006). 3) La ApoE se une al β A (1-40) soluble (presumiblemente la forma monomérica) y promueve la internalización dentro de las neuronas vía proteína receptor relacionada a lipoproteína de baja densidad (LRP) (Gylys et al., 2003). 4) El β A se une y modifica la función de la enzima alcohol deshidrogenasa unida al péptido β A (ABAD), promoviendo disfunción mitocondrial, incrementando la producción de ERO y estrés oxidante (Chen y Yan, 2007). El β A se une a la catalasa e inhibe su función de descomposición del H_2O_2 (Milton et al., 2001).

3.3. Sistemas antioxidantes cerebrales

La exposición a radicales libres desde una gran variedad de fuentes han llevado al organismo a desarrollar una serie de defensas contra el estrés oxidante inducido por los radicales libres.

Comparado con otros órganos, el cerebro tiene algunas desventajas en la generación y detoxificación de ERO. i) Las células de cerebro humano utilizan el 20% del oxígeno consumido por el cuerpo pero constituye solo el 2% del peso del cuerpo (Clarke y Sokoloff, 1999) indicando la potencial generación de ERO durante la fosforilación oxidativa en el cerebro. ii) Se ha encontrado un alto contenido de hierro en algunas áreas del cerebro, las cuales pueden catalizar reacciones que generen ERO. iii) El cerebro es rico en lípidos como ácidos grasos poliinsaturados, blancos para lipoperoxidación (Halliwell, 1992). iv) El cerebro solo tiene, de baja a moderada, la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, y glutatión peroxidasa (GPx), comparada con el hígado y riñón (Cooper, 1997).

El cerebro tiene un nivel relativamente alto de GPx comparado con la catalasa, mientras que el hígado tiene altos niveles de los dos (Maher, 2005). Además, la pérdida de neuronas en cerebros adultos generalmente no puede ser compensada por la generación de nuevas neuronas. A pesar de lo anterior, el cerebro es capaz de funcionar durante el tiempo de vida humana, indicando la presencia de un efectivo sistema antioxidante. Es clara la evidencia de que el sistema glutatión juega un papel importante en la detoxificación de ERO (Dringen et al., 2000).

La ceruloplasmina es una proteína de unión al cobre que juega un papel en la protección celular contra el estrés oxidante y como se mencionó antes regula la entrada de cobre al cerebro. Específicamente, la ceruloplasmina es una proteína clave en la regulación del estado redox de hierro, convirtiendo Fe^{2+} a la forma menos reactiva Fe^{3+} (Su et al., 2008).

El residuo de la Met35 del β A también puede atrapar radicales libres (Soriani et al., 1994) y reducir los metales de transición hacia su forma de baja valencia pero de gran actividad, mostrando ambas propiedades anti- y pro-oxidante. Se ha observado

que cuando se incrementa el β A en la corteza de pacientes con Alzheimer, hay un decremento en los niveles neuronales de 8OHG, un marcador de daño oxidante (Nunomura et al., 1999).

3.4 Metabolismo y funciones del glutatión en el cerebro

El tripéptido glutatión (GSH; γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina) es el tiol celular más abundante en células de mamífero y está presente en concentraciones mayores a 12 mM. En el cerebro la concentración es de aproximadamente de 2-3 mM que es mucho más alto que en la sangre y líquido cefalorraquídeo (Cooper, 1997) y menor que en hígado, riñón, bazo e intestino delgado (Commandeur et al., 1995). La actividad específica de las enzimas GPx y glutatión reductasa (GR) son más bajas en el cerebro que en otros tejidos (Ushijima et al., 1986). La mayor cantidad de GSH en una célula se encuentra en el citoplasma, que es el sitio de síntesis y la mitocondria contiene entre el 5% - 15% del GSH celular (Meister, 1995). La concentración de GSH en los astrocitos del cerebro es mayor que en las neuronas.

El GSH ejerce sus funciones a través de varios mecanismos, teniendo importantes funciones como antioxidante y siendo parte de la desintoxicación xenobiótica. Durante la desintoxicación de las ERO, el GSH participa en dos tipos de reacciones: el GSH reacciona no enzimáticamente con el ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Saez et al., 1990, Winterbourn et al., 1994), óxido nítrico (NO) (Clancy et al., 1994), OH^{\cdot} (Bains y Shaw, 1997), y ion peroxinitrito ($ONOO^-$) (Koppal et al., 1999) y es donador de electrones para la reducción de H_2O_2 y otros peróxidos catalizados por la GPx (Chance et al., 1979). Adicionalmente, no hay defensa enzimática conocida contra el OH^{\cdot} , haciendo al GSH el único compuesto capaz de atrapar este radical (Bains y Shaw, 1997). El GSH sirve como cofactor esencial para numerosas enzimas, reacciona con varios compuestos endógenos y xenobioticos mediante la glutatión-S-transferasa (GST) para formar disulfuros, que son transportados fuera de la célula. (Commandeur et al., 1995). También sirve como almacenamiento y transporte de cisteína (Cooper, 1997), es importante para la proliferación y diferenciación celular (Poot et al., 1995), mantiene el potencial redox del tiol en células manteniendo los grupos sulfhídricos de las proteínas en su forma reducida (Cotgreave y Gerdes, 1998), puede servir como neuromodulador /neurotransmisor (Janaky et al., 1999) y

es capaz de regenerar la forma activa de los antioxidantes más importantes, vitamina C y E. Esta capacidad está ligada al estado redox (GSSG/2GSH) (Pastore et al., 2003).

La síntesis de GSH requiere de dos pasos enzimáticos que involucran ATP. La glutamato-cisteína ligasa (GCL), también conocida como γ Glutamylcisteína sintetasa, cataliza el primer paso, que es limitante enzimático, en la síntesis de GSH. La GCL media la primera reacción entre el glutamato y la cisteína para formar un dipéptido, γ -glutamylcisteína (γ GluCys), el cual reacciona con la glicina, catalizada por la glutatión sintetasa (GS), para producir GSH. El GSH regula su propia síntesis por retroalimentación inhibiendo a la GCL. Por lo tanto, la síntesis celular y el consumo del GSH está balanceado (Dringen, 2000).

El sistema GSH es especialmente importante para la defensa celular contra las ERO. El GSH reacciona directamente con radicales en reacciones no enzimáticas y es donador de electrones en la reducción de peróxidos catalizados por la GPx. El producto de la oxidación del GSH es glutatión disulfuro (GSSG). El GSH es regenerado del GSSG, dentro de las células, en una reacción catalizada por la flavoenzima GR. Esta enzima transfiere electrones del NADPH al GSSG, regenerando el GSH (Fig. 3).

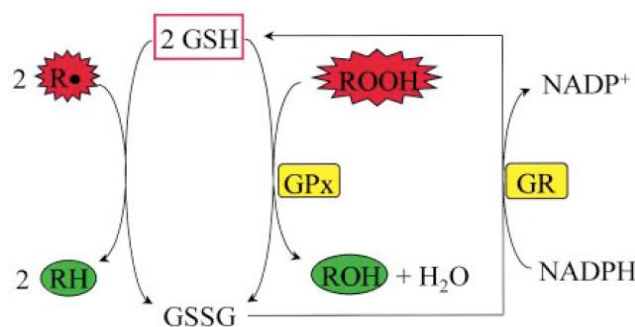


Figura 3. Funciones del GSH como antioxidante. El GSH reacciona no enzimáticamente con radicales (R^{\bullet}) y es donador de electrones para la reducción de peróxidos (ROOH) en la reacción catalizada por la GPx. El GSH es regenerado del GSSG por la GR que usa al NADPH como cofactor (Dringen et al., 2000).

Durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GR, el GSH no se consume, pero si se recicla. En contraste, durante la generación de glutatión-S-conjugados por la GST o por la liberación del GSH desde las células, el nivel total de GSH baja. El GSH extracelular y el GSH conjugado son sustratos para la ectoenzima γ -glutamyl

transpeptidasa (γ GT). Esta enzima cataliza la transferencia del γ -glutamil del GSH o a GSH conjugado en un aceptor molecular, por lo tanto genera el dipéptido cisteinilglicina (CysGly) o el conjugado CysGly, respectivamente. El CysGly puede ser hidrolizado por ectopeptidasas a cisteína y glicina, que subsecuentemente pueden servir como sustratos para la síntesis de GSH celular (Dringen, 2000) (Fig. 4).

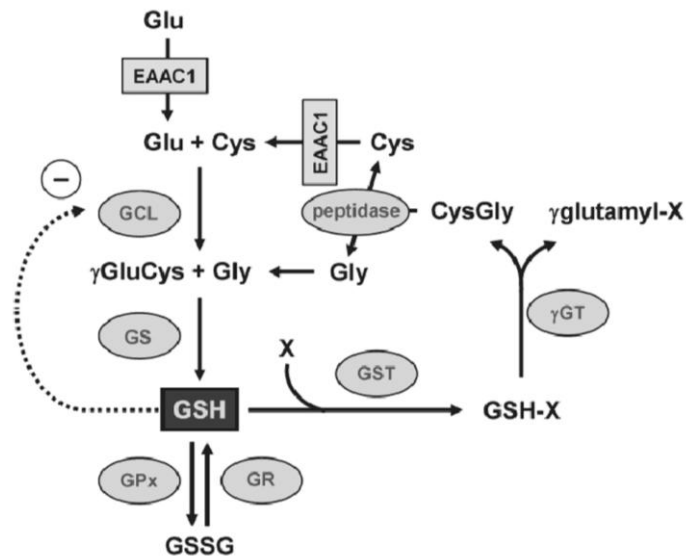


Figura 4. Metabolismo del glutatión. La síntesis del GSH requiere de 3 aminoácidos (glutamato, cisteína y glicina) y dos pasos enzimáticos que utilizan ATP. En neuronas, la toma de glutamato/cisteína es mediado por EAAC1. GCL cataliza el primer paso enzimático limitante en la síntesis de GSH. El GSH regula su propia síntesis inhibiendo la GCL. Abreviaciones: Glu: glutamato, Cys: cisteína, Gly: glicina, γ GluCys: γ -glutamilcisteína, CysGly: Cisteinilglicina, GSSG: glutatión disulfuro, X: compuesto que puede formar conjugados con el GSH, GCL: glutamato-cisteína ligasa, GS: Glutatión sintetasa, GPx: glutatión peroxidasa, GR: Glutatión reductasa, GST: glutatión-S-transferasa, γ GT: γ -glutamil transpeptidasa (Aoyama et al., 2008).

La cisteína es sustrato limitante para la síntesis de GSH neuronal, las neuronas son capaces de usar donadores de cisteína CysGly, la γ GluCys y la N-acetilcisteína (NAC) como precursores para el GSH, pero dependen principalmente de la cisteína de los astrocitos para la síntesis de GSH (Dringen et al. 1999). Casi toda la captación de la cisteína está mediada por el transportador de aminoácidos excitadores dependiente de sodio, conocido como acarreador de aminoácidos excitador 1 (EAAC1). La función de EAAC1 está regulada por el transportador de glutamina asociado a proteínas. En el sistema nervioso central, los astrocitos pueden exportar aproximadamente el 10% de su GSH intracelular en 1 h y continuamente

resintetizar GSH desde una variedad de dipéptidos que sirven como precursores. Las neuronas utilizan cisteína pero no cistina para la síntesis de GSH, mientras que la células glia utilizan ambas (Aoyama et al., 2008).

El estrés oxidante juega un papel importante en enfermedades neurodegenerativas asociadas con el envejecimiento. Éste es un factor crítico que puede modificar la homeostasis del GSH, y de hecho se ha reportado su disminución durante el envejecimiento en el cerebro (Maher, 2005). La depleción del GSH puede aumentar el estrés oxidante y puede favorecer la degeneración neuronal. En estudios previos, se exploró el mecanismo por el cual la disminución del GSH está asociada con el envejecimiento. Se encontró que la actividad de la GCL disminuye con la edad en tejidos de ratas viejas, en donde se observó una disminución en el contenido de GSH. Además se observó que las actividades de la GCL y la GS eran significativamente bajas en células sanguíneas en pacientes con la EA, sugiriendo que la depleción del GSH puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad en humanos (Liu et al., 2004).

La depleción del GSH en el cerebro lleva a incrementar la producción de $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} y de H_2O_2 (Gupta et al., 2000). El tratamiento con L-butionina-[S,R]-sulfoxamina (BSO), un inhibidor específico de la GCL, conduce a la depleción del GSH (Jain et al., 1991). La disminución de GSH intracelular debido al tratamiento con el BSO empeora el daño oxidante *in vivo* (Genovese et al., 2007).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EA esporádica tiene como principal factor de riesgo el envejecimiento, el cual se asocia con un incremento en el estrés oxidante cerebral. No se conoce completamente la participación de las ERO y del sistema antioxidante del GSH en la producción de diversos marcadores de la EA. En el presente trabajo pretendemos caracterizar, en un modelo *in vivo*, el efecto de la depleción del GSH sobre la producción de estrés oxidante y cambios en el metabolismo de la APP que favorezca la producción de β A en diferentes regiones cerebrales.

5. HIPÓTESIS

La administración vía intracerebroventricular (i.c.v.) del, inhibidor de la síntesis del GSH, BSO se acompañará de disminución en el contenido del GSH, aumento de ERO, daño oxidante y alteraciones del metabolismo de la APP que pueden conducir a un incremento en la producción del β A.

6. OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar un modelo de inducción de estrés oxidante por la depleción de GSH *in vivo* en el cerebro de la rata, con el fin de caracterizar los cambios en el procesamiento de la APP.

Objetivos particulares

1. Depletar el GSH *in vivo* por la inyección vía i.c.v. del inhibidor de la síntesis del GSH, BSO.
2. Cuantificar la concentración de GSH bajo estas condiciones en diferentes regiones cerebrales (hipocampo, corteza y cerebelo).
3. Analizar marcadores de estrés oxidante como ERO y de daño como lipoperoxidación en diferentes regiones cerebrales (hipocampo, corteza y cerebelo).
4. Analizar niveles de sAPP α , APP total y fosforilación de la APP (treonina 668) por western blot, en hipocampo, corteza y cerebelo asociados con la depleción de GSH.

7. METODOLOGÍA

7.1. Obtención del tejido

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de tres meses de edad, las cuales fueron divididas en 2 grupos, a un grupo se le administró vía i.c.v. (coordenadas: antero posterior 1, latero medial 1.4 y dorso ventral 3.3) BSO (Sigma, St Louis, MO, USA) (120 mg/mL, 10 µL/ rata) (Lin et al., 2002). Al grupo control se le administró una cantidad igual de amortiguador de fosfatos (PB) siguiendo las mismas coordenadas. 24 h después de la administración, las ratas se decapitaron y se disectaron la corteza, el cerebelo y el hipocampo de cada una. Cada tejido se homogenizó en amortiguador de lisis (50 mM tris-HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl, 1 % Nonidet P40, 0.5 % DOC, 1 pastilla de Complete Protease inhibitors cocktail (Roche), 25 ml de H₂O) y/o PBS 1x frío (dependiendo del ensayo a realizar). Posteriormente el homogenado se sonicó 5 veces durante 1 minuto cada vez, después se centrifugó durante 10 minutos a 14000 g a 4°C y se recolectó el sobrenadante para trabajar con este. Finalmente se colocaron las muestras a -20°C hasta ser usadas.

7.2. Cuantificación de proteína por el método de Lowry

Para cada tubo se colocaron 2 µl de muestra las cuales se llevaron a 100 µl con H₂O, se mezclaron y posteriormente se agregaron 100 µl de solución alcalina de tartrato de cobre (Reactivo A, BIO-RAD del kit del DC Protein Assay) y mezclaron, después se añadieron 800 µl de Reactivo de Folin (Reactivo B, BIO-RAD) y nuevamente se mezclaron. Una vez que se llevó a cabo la reacción (15-40 minutos de incubación a temperatura ambiente) se leyeron a 750 nm en el espectrofotómetro. En este ensayo se debe tomar en cuenta el tipo de amortiguador o solución en el que se encuentra la muestra al momento de preparar las reacciones para realizar la curva patrón. El reactivo S (dodecil sulfato de sodio, BIO-RAD) que se agrega al reactivo A (20 µl por mL de Reactivo A) en caso de haber usado amortiguador de lisis que contiene detergentes.

7.3. Cuantificación de glutatión

Para confirmar la disminución en los niveles de GSH, éste se cuantificó en las tres regiones cerebrales usando el método fluorométrico para GSH reducido que utiliza O-phthaldialdehído (OPT) como sustrato fluorescente. Los fluoróforos que reaccionan con el grupo amino de los péptidos permite la determinación fluorimétrica simultánea de GSH y GSSH. El OPT es ampliamente usado para formar aductos fluorescentes de GSH (Camera y Picardo, 2002).

Para dicho ensayo, de los homogenados resuspendidos en amortiguador de lisis se tomaron 50 µl de cada muestra, se agregaron 450 µl de H₂O y 500 µl de ácido metafosfórico (1.67 g de ácido metafosfórico, 100 ml de H₂O, 200 mg de EDTA, 15 g de NaCl), y se agitó. Después las muestras se centrifugaron a 10 000 g durante 2 minutos y se tomaron 50 µl del sobrenadante. Al sobrenadante, se le agregó 1 ml de amortiguador de GSH (15.8 NaH₂PO₄, 1 L de H₂O, 1.461 g EDTA y se ajusta el pH a 7.8) y 50 µl de OPT (25 mg OPT, 25 ml metanol), se mezcló bien. Posteriormente se incubaron en oscuridad durante 30 minutos y finalmente se colocaron en una placa de ELISA y se leyó a 420 nm. La cantidad de GSH se determinó a partir de una curva patrón con cantidades conocidas de GSH.

7.4. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno

Este método se basa en la oxidación de la dihidrorodamina-123 (DHR) dependiente de la cantidad de ERO para formar el compuesto fluorescente de rodamina-123, que puede ser detectado a una λ de 505 nm (Gomes et al., 2005).

Para esto, cada tejido se homogenizó y se sonicó en PBS 1x (no se centrifugó como se explica en el punto 7.1), a estos homogenados se les centrifugó 15 segundos para bajar la mayor cantidad de tejido y obtener en el sobrenadante una cantidad de células para el ensayo. Posteriormente se tomaron 20 µl del sobrenadante del homogenado y se le agregaron 80 µl de PBS 1x. Se centrifugó a 6000 g por 2 minutos con el fin de obtener un botón y se descartó el sobrenadante.

Al botón se le agregaron 360 μ l de amortiguador A (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.8 mM CaCl_2 , 5 mM glucosa, 15 mM HEPES, pH 7.4) y 40 μ l de DHR (Sigma, St Louis, MO, USA) 10 μ M. Se resuspendió y se colocó cada muestra en los pozos de una placa de ELISA, después se incubó a 37°C durante 2 minutos. Finalmente se leyó la placa en un lector de placas de ELISA a 505 nm. La cantidad de ERO se determinó a partir de una curva patrón con cantidades conocidas de Rodamina-123.

7.5. Ensayo de lipoperoxidación

El protocolo más empleado para la determinación de lipoperoxidación en sistemas biológicos es la medición de sustancias reactivas a través de la prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Garcia et al., 2005). Este ensayo se basa en la medición espectrofotométrica del aducto entre el MDA y el TBA en un intervalo de 532-535 nm.

Para esto se diluyeron las muestras que se encontraban en PBS 1x, de hipocampo [1:2], cerebelo y corteza [1:5], con el fin de tener la misma cantidad aproximadamente de cada tejido, se tomó un volumen de 100 μ l de cada una y se agregó un volumen igual de ácido tricloroacético. Se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos a 4°C, se tomó el sobrenadante y se le añadió 1 ml de reactivo TBA (0.375% TBA y 2% ácido acético, pH 4.2). Posteriormente se pusieron a ebullición en baño maría por 45 minutos a 92°C. Una vez transcurrido el tiempo de ebullición se tomaron 200 μ l de cada muestra y se colocaron en una placa de ELISA. Se leyó a 532 nm. La curva patrón de MDA se realizó con el 1, 1, 3, 3-tetraetoxipropano o MDA.

7.6. Western blot

De los homogenados de obtenidos en amortiguador de lisis, se detectó sAPP α y fosfo-Thr668 en APP. Se cargaron 25 μ g de proteína de muestra que fueron analizados por electroforesis en un gel al 10% de poliacrilamida. Las muestras se hirvieron previamente durante 10 minutos en amortiguador de carga y se corrieron a 30 mAmp aproximadamente 2 h. Después de la electroforesis, las proteínas se

transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham Bioscience, UK). Para esto el gel y la membrana se equilibraron en amortiguador de transferencia (2.97 g de glicina, 5.82 g de Tris-base, 0.37 g SDS en 800 ml de H₂O y 200 ml de metanol) durante 20 minutos a temperatura ambiente y estos se colocaron en una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad, USA). El gel se corrió a 25 volts por 30 minutos y posteriormente a 10 volts durante 40 minutos.

La membrana transferida se incubó en TBS 1x (50 mM tris-HCl, 150 mM, pH 7.6) durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente y se bloqueó con TBS 1x – 5% leche descremada durante 2 h en agitación a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Se retiró la solución de bloqueo y se lavó 3 veces con TBS 1x – 0.1% Tween-20 durante 5 minutos cada lavado. Después se incubó la membrana con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-APP A4 (22C11, Chemicon, Millipore) [1:750], el policlonal de conejo anti-fosfo-APP (Thr668) (Cell Signaling) [1:500] y el monoclonal de ratón anti-β-actina [1:750] en TBS 1x - 5% BSA - 0.1% Tween-20 y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces con TBS 1x – 0.1% Tween-20 y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado (HRP) cabra anti-IgG de ratón (Zymed, USA) [1:5000] y cabra anti-IgG de conejo (Zymed, USA) [1:10000] en TBS 1x – 5% BSA - 0.1% Tween-20 durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Nuevamente se lavó 3 veces con TBS 1x - 0.1% Tween-20; Finalmente se reveló por quimioluminiscencia (ECL kit de Amersham, Arlington Heights, IL) en películas Kodak X-Omat. El análisis densitométrico de las bandas de western blot se realizó empleando el Software NIH 1.38 x ImageJ.

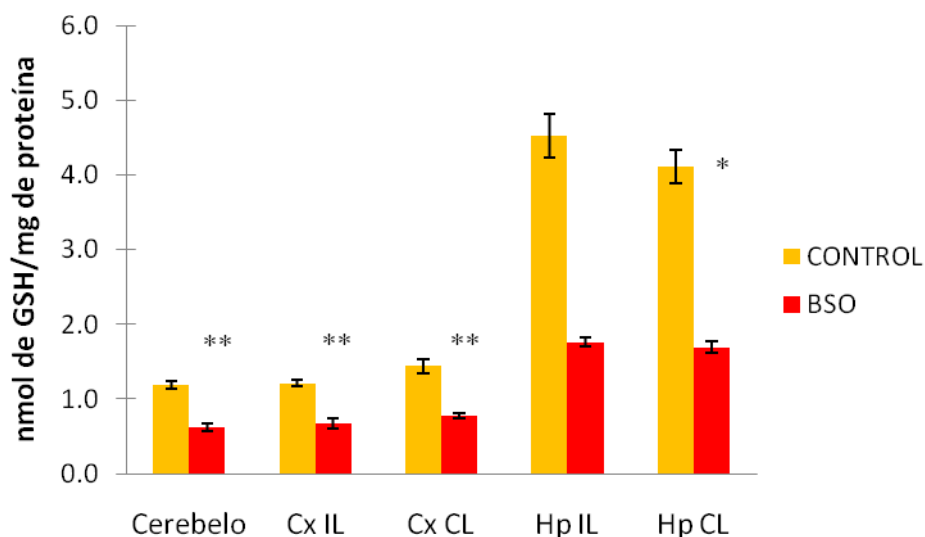
7.7. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como el promedio \pm del error estándar (EE) como se indica en la gráficas. Los resultados se analizaron usando la prueba de *t* de Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando se obtuvo $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1. Efecto del tratamiento con el inhibidor de la síntesis de glutatión

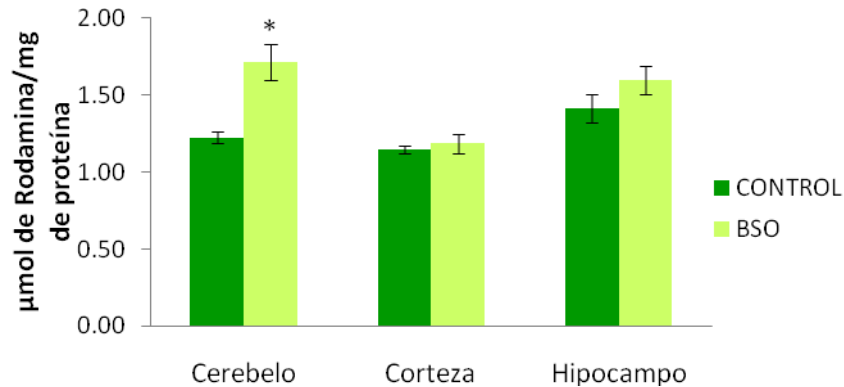
La administración vía i.c.v. del BSO disminuyó los niveles de GSH de cerebelo, corteza e hipocampo en aproximadamente el 50% en cada caso. No se observa diferencia entre el hemisferio administrado (ipsilateral) y el contralateral para corteza e hipocampo (Gráfica 1). Esto probablemente indica que este modelo de depleción del antioxidante puede funcionar para evaluar los posibles mecanismos relacionados con el incremento en el estrés oxidante y los marcadores asociados con dicho daño. Por otra parte, la cantidad de GSH en las regiones estudiadas varía. En el hipocampo el nivel de GSH es significativamente mayor que el encontrado en la corteza y el cerebelo.



Gráfica 1. Cuantificación de los niveles de GSH en cerebelo, corteza ipsilateral (Cx IL), corteza contra lateral (Cx CL), hipocampo ipsilateral (Hp IL) e hipocampo contralateral (Hp CL) 24 h después del tratamiento con BSO o PB (control). Los valores son el promedio \pm el EE de 5 determinaciones independientes realizadas por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ contra el control de cada región.

Es importante mencionar que debido a que no se observó una diferencia significativa de la reducción del GSH entre ambos hemisferios (ipsilateral y contralateral), se decidió trabajar con ambos para tener una sola muestra de cada región en cada experimento.

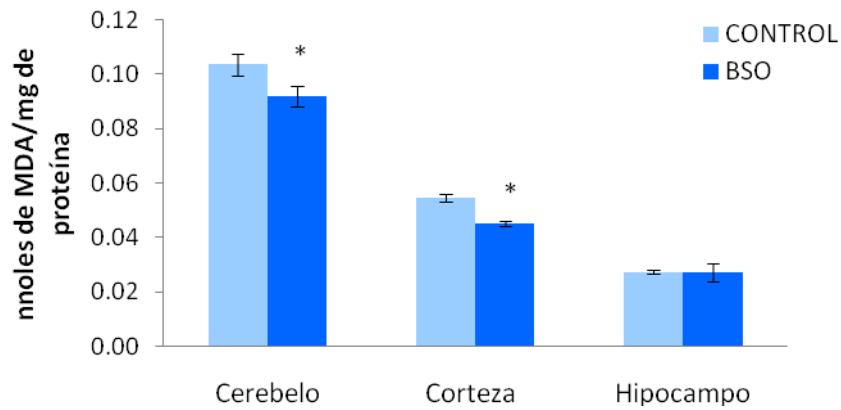
De acuerdo a la gráfica 1 se puede observar la depleción del GSH, por lo tanto se determinó si en estas condiciones se podía detectar un incremento en la cantidad de ERO con el fin de saber si el modelo de depleción efectivamente incrementaba la producción de estas, provocando un modelo *in vivo* de estrés oxidante.



Gráfica 2. Cuantificación de la producción de ERO en cerebelo, corteza e hipocampo 24 h después de ser administrado el BSO o PB (control). Los datos expresados representan el promedio \pm el EE de 6-7 experimentos independientes por duplicado. * $p < 0.05$ contra el control de cada región.

En la gráfica 2 se observa que existe una tendencia a aumentar las ERO en el hipocampo y el cerebelo aunque solo en esta última región fueron significativamente mayores con respecto a los niveles del control. Contrariamente en la corteza no se observa diferencia entre el control y la tratada con BSO. Además se observa que los niveles de las ERO en el hipocampo control son ligeramente mayores que en el cerebelo y la corteza.

Debido a las diferencias del contenido de GSH y el análisis en la producción de ERO, en los cerebros de las ratas control y las administradas con BSO, se decidió valorar un marcador de daño oxidante midiendo la lipoperoxidación en cada muestra por medio de la cuantificación del aducto entre MDA y TBA. El MDA es el aldehído más abundante que resulta de la lipoperoxidación por lo que se considera un marcador de esta y los altos niveles de MDA son indicativos de estrés oxidante. En la gráfica 3 se observa que en el cerebelo y la corteza de las ratas tratadas con BSO disminuyen ligera pero significativamente, los niveles de MDA. En hipocampo no se observa diferencia entre ambos grupos (el control y el administrado con BSO).



Gráfica 3. Niveles de lipoperoxidación en cerebelo, corteza e hipocampo 24 h después de administrarse el BSO o PB (control). Los valores expresados como el promedio \pm el EE de 6-7 experimentos independientes por duplicado. * $p < 0.05$ contra el control de cada región.

8.2. Diferencias en los niveles de APP en las regiones cerebrales analizadas

Para determinar cambios en el procesamiento amiloidogénico, medimos los niveles de APP total y el fragmento sAPP α en cerebelo, corteza e hipocampo. En la figura 5 se observa que la cantidad de APP es diferente en cada región, probablemente la modificación postraduccional que puede tener APP sea diferente en dichas regiones. La APP de la corteza parece tener un peso molecular ligeramente menor que la que hay en cerebelo e hipocampo. Adicionalmente el nivel de sAPP α en el cerebelo es mayor que en corteza e hipocampo, sugiriendo que en esta región la vía no amiloidogénica es preponderante.

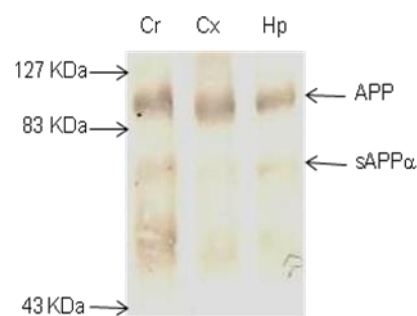


Figura 5. Western Blot representativo de la APP total y el fragmento sAPP α en cerebelo (Cr), corteza (Cx) e hipocampo (Hp) de rata control.

8.3. El efecto del estrés oxidante en el contenido de APP y sAPP α

Para estudiar el efecto del estrés oxidante, disminuimos el contenido del antioxidante GSH en cerebros de ratas de 3 meses, se examinaron los niveles de APP total y del sAPP α . En la figura 6 se observa que aparentemente no hay cambios en la cantidad de APP total en las regiones analizadas (ya sea ipsilateral o contralateral de acuerdo a cada caso) tratadas o no con el inhibidor del GSH. Aunque de manera interesante se observa una ligera tendencia a disminuir en la corteza y cerebelo.

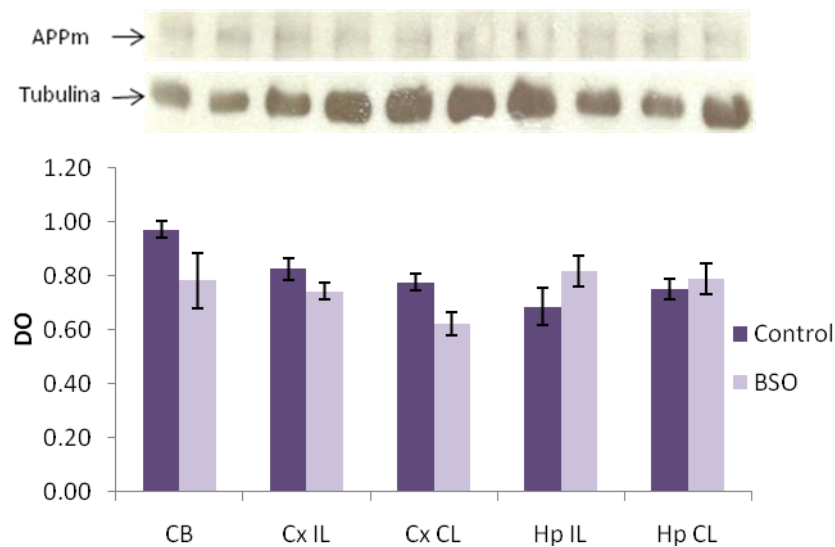


Figura 6. Análisis densitométrico y western blot representativo de los niveles del APP total (APPm) en cerebelo (CB), corteza ipsilateral (Cx IL), corteza contralateral (Cx CL) e hipocampo ipsilateral (Hp IL) y contralateral (Hp CL) 24 h después de administrarse el BSO o PB (control). Los valores del análisis densitométrico son expresados como el promedio de densidad óptica \pm el EE de 5 experimentos independientes.

En la figura 7 se observa que bajo esta condición, en el hipocampo hay una tendencia a disminuir los niveles del fragmento sAPP α , indicando que probablemente el estrés oxidante favorece el procesamiento amiloidogénico de la APP. En el caso de la corteza y el cerebelo no fue posible observar esta diferencia debido a que la cantidad de sAPP α era muy baja como para poder realizar el análisis densitométrico.

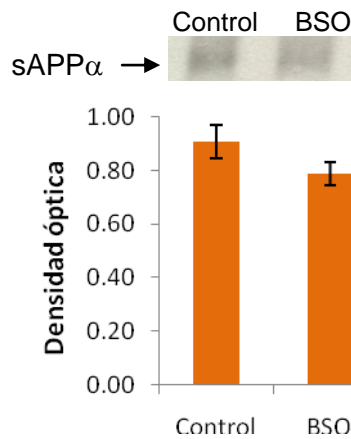


Figura 7. Análisis densitométrico y western blot representativo de los niveles del fragmento sAPP α en hipocampo 24 h después de administrarse el BSO o PB (control). Los valores son expresados como el promedio \pm el EE de 5 experimentos independientes.

8.4. Incremento de la fosfo-treonina 668 asociado con el procesamiento amiloidogénico

Para evaluar si la fosforilación del residuo de la treonina 668 de la APP se incrementa por efecto del estrés oxidante, identificamos a la APP total y a sus fragmentos proteolíticos fosforilados. Encontramos un incremento en el fosfo-epitopo tanto en el APP total como en el C99 (fragmento obtenido del procesamiento amiloidogénico). En este último caso se alcanza una diferencia significativa comparada con el control (Fig. 8). Se sabe que la aparición de la Thr668 fosforilada bajo condiciones de estrés depende principalmente de la activación de JNK (Kimberly et al., 2005; Quiroz-Baez et al., 2009).

Es importante mencionar que los resultados obtenidos se observan en las todas regiones analizadas en este trabajo pero en particular las diferencias entre las regiones tratadas con el BSO y el control se observan mejor en el hipocampo, por lo que presentamos el análisis densitométrico de esta región, que es una de las regiones con los mayores depósitos de β A presentes en la EA.

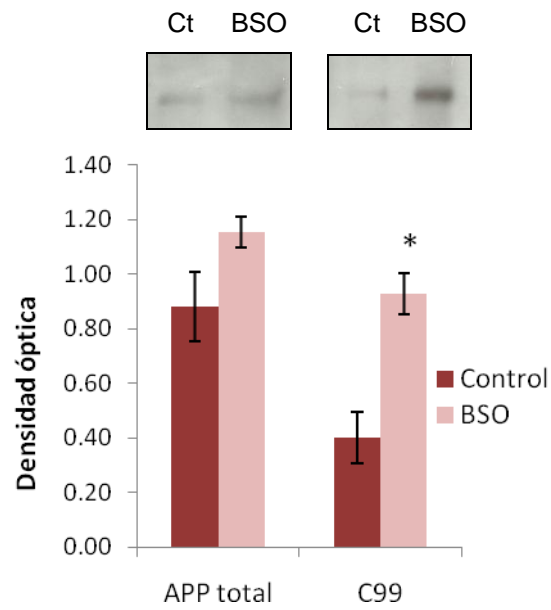


Figura 8. Análisis densitométrico y western blot representativo de los niveles de la treonina 668 fosforilada de APP total y C99 en hipocampo de rata control (Ct) y el tratado con BSO. Los valores del análisis densitométrico son expresados como el promedio de densidad óptica \pm el EE de 5 experimentos independientes. * $p < 0.05$ contra el control de cada la APP total y el fragmento C99.

9. DISCUSIÓN

A pesar de que la EA tiene una patogénesis compleja y su etiología no se comprende completamente, diversas evidencias han conducido a establecer que el metabolismo alterado de la APP es un evento clave en la generación del péptido β A que se deposita en los cerebros de pacientes con la EA y tal vez este es uno de los eventos que se asocian con la disfunción sináptica y la muerte neuronal (Selkoe, 2001). El incremento de las ERO se ha relacionado con el envejecimiento y parece estar involucrado en la generación del β A como también la toxicidad de ésta.

La disminución del antioxidante GSH después de la administración del BSO es un modelo de estrés oxidante el cual asemeja los efectos vistos en la deficiencia de la síntesis de GSH (Jain et al., 1991). Adicionalmente existe evidencia que apoya que con la edad disminuye el GSH en el cerebro lo que puede contribuir a la degeneración neuronal. De hecho en ciertas enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento, como la EA, el GSH está disminuido (Aoyama et al., 2008). En el presente estudio decidimos evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis del GSH para disminuir estos niveles en cerebelo, corteza e hipocampo empleando el BSO y, así como analizar la asociación de la disminución del GSH con un incremento en la generación de ERO. En este sentido, aunque encontramos que las ERO tienden a incrementarse ligeramente en el hipocampo y el cerebelo administrados con BSO (gráfica 2), este incremento fue significativo solamente en el cerebelo. Es posible que a los tiempos analizados y siendo las ERO altamente reactivas no pudieron haberse detectado cambios significativos en nuestro modelo. Además debe tomarse en consideración que posiblemente en este modelo agudo algunos otros sistemas antioxidantes estén participando en la eliminación de dichas moléculas, así como la participación de estas en otros eventos como de crecimiento o viabilidad celular.

El hipocampo presenta una tendencia a incrementar la producción de ERO a comparación de cerebelo y corteza de ratas control, de igual forma la cantidad de GSH es particularmente más alto en esta región, lo cual sugeriría que los altos niveles de GSH y la producción de ERO mantienen el balance redox de la célula. Probablemente debido a que el hipocampo es un sitio blanco importante por sus

características metabólicas asociadas con su alta plasticidad es que se observan estas diferencias. Además esta región parece ser particularmente susceptible a el daño excitotóxico, por isquemia, tóxicos ambientales y en procesos neurodegenerativos como la EA (Stoltenburg-Didinger, 1994).

Algunos estudios sugieren que el incremento en la lipoperoxidación es un evento temprano en la EA (Practico et al., 2002). Contrariamente, nuestros resultados muestran que hay una tendencia a disminuir este marcador de daño oxidante, esto sea probablemente a que un modelo *in vivo* es más que complejo a comparación de uno *in vitro*, donde podrían estar participando otros sistemas antioxidantes en el cerebro o que se activen otras vías o mecanismos del mismo organismo que contrarresten el daño. Sin embargo, ciertamente resulta paradójico este efecto en cerebelo y corteza y podría sugerir que en estas regiones podría existir un recambio de membranas dañadas con una mayor eficiencia aunque, ciertamente el apoyo a esta posibilidad requerirá un análisis detallado. También es posible que en este modelo agudo, de existir, sean otros los principales blancos de daño oxidante como podrían proteínas oxidadas u oxidación de ADN. Se ha demostrado que la toxicidad del β A esta mediada por medio del daño a membranas celulares provocado por radicales libres (Halliwell, 1992). Consistentemente con el proceso de producción de radicales libres, el β A causa lipoperoxidación en membranas celulares del cerebro y este efecto es inhibido por antioxidantes (Butterfield et al., 2002).

Notablemente la toxicidad del β A parece ser solamente evidente en experimentos *in vitro*, ya que en estudios *in vivo* se demuestra una correlación negativa entre el estrés oxidante y la deposición del β A, indicando un papel antioxidante para el β A. El 8OHG es un marcador de daño oxidante que se acumula rápidamente en el citoplasma neuronal en los cerebros de pacientes con la EA. Se ha observado que cuando hay un incremento de β A en la corteza de pacientes con EA, hay un decremento de los niveles neuronales de 8OHG, indicando que disminuye el daño oxidante (Nunomura et al., 1999). Esto podría sugerir que ocurre el mismo efecto negativo en este modelo para observar la lipoperoxidación como un marcador de estrés oxidante.

La acumulación de productos endógenos del daño oxidante parece contribuir a enfermedades crónicas del sistema nervioso central como la EA. A pesar que no se ha demostrado que el estrés oxidante sea la causa de esta enfermedad, la acumulación de las ERO podrían participar en el desarrollo y síntomas de dicha enfermedad. Actualmente se sabe que bajo condiciones pro-oxidantes el procesamiento de la APP es regulada principalmente por la expresión y activación de la BACE1 (Quiroz-Baez et al., 2009; Tamagno et al., 2005; 2008) y la activación de la γ -secretasa (Jin et al., 2008; Shen et al., 2008).

Aunque no pudimos observar de manera concluyente que en la depleción del GSH *in vivo* estuviera asociada con la aparición de marcadores de estrés oxidante, en el presente trabajo se observó que la APP que se expresa en la corteza parece ser de un peso molecular un poco más bajo que las que se encuentra en el cerebelo e hipocampo. En cerebelo hay un mayor nivel de sAPP α , esto sugiere que en condiciones normales en dicha región el procesamiento de la APP está favorecido hacia la vía no amiloidogénica, lo cual podría correlacionar con el hecho de la nula aparición de placas seniles en cerebelo. Por otro lado, bajo condiciones de estrés oxidante en los cerebros de rata, no hay diferencias entre la expresión de APP total con o sin efecto del inhibidor pero si hay una tendencia a disminuir los niveles de sAPP α . En estudios previos en el laboratorio, se demostró que en células de neuroblastoma humano en presencia de H₂O₂ y FeCl₂ hay un decremento en los niveles de sAPP α y un aumento de la expresión de BACE1 (Quiroz-Báez et al., 2009), lo cual favorece el procesamiento amiloidogénico.

No se conoce el mecanismo por el cual los niveles de BACE1 y la γ -secretasa están incrementados en algunos casos de la EA esporádico, pero existe una posibilidad de que este aumento este mediado a través de NF κ B, el cual es un factor de transcripción en respuesta al estrés oxidante (Lezoualc'h et al., 2000).

A pesar de la controversia que existe alrededor del papel de la fosforilación de la Thr668 en el procesamiento amiloidogénico de la APP (Lee et al., 2003; Sano et al., 2006), observamos en este modelo *in vivo*, que la depleción de los niveles de GSH se asocian con la fosforilación de este residuo, particularmente en el fragmento C99

(resultado de la vía amiloidogénica) el cual podría sugerir un aumento en la producción del péptido β A. El estado de fosforilación de la APP en la Thr668 se observa en células en división y en procesos de estrés (Suzuki y Nakaya, 2008). Cuando las células son sujeto de estrés, la cinasa JNK fosforila a la Thr668 (Kimberly et al., 2005). En el laboratorio, se demostró que la regulación río arriba de la fosfo-Thr668 es mediada por JNK durante estrés oxidante y puede participar en el procesamiento de la APP por la BACE1 (Quiroz-Báez et al., 2009). En este sentido probablemente la participación de JNK en la fosforilación de la APP y los fragmentos proteolíticos sea a través de la activación de esta cinasa. Aunque este modelo no se evaluó la activación de esta cinasa, este tipo de análisis será necesario en el futuro para dilucidar el mecanismo de fosforilación de la APP durante una disminución aguda del GSH.

10. CONCLUSIONES

Evidencia creciente sugiere que el desbalance entre la producción de las ERO y las defensas antioxidantes, así como la generación del β A, a través del procesamiento secuencial de la APP por la β - y γ -secretasa, están relacionados con el envejecimiento y la patogénesis de la EA. Este trabajo es el primer estudio que se realiza en un modelo *in vivo* la depleción del antioxidante GSH con el fin de generar un estado de estrés oxidante, en donde nuestros resultados sugieren que esta condición promueve el procesamiento amiloidogénico de la APP.

11. REFERENCIAS

Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *Journal of Neuroscience Research* 74, 342–352.

Ando, K., Lijima, K.I., Elliot, J.I., Kirino, Y., Suzuki, T. (2001) Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of beta-amyloid. *Journal of Biological Chemistry* 276, 40353-40361.

Aoyama, K., Watabe, M., Nakaki, T. (2008) Regulation of neuronal glutathione synthesis. *Journal of Pharmacological Sciences* 108, 227-238.

Bains, J.S., Shaw, C.A. (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research Review* 25, 335–358.

Blennow, K., de Leon, M.J., Zetterberg, H. (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* 368, 387-403.

Bodovitz, S., Klein, W. L. (1996) Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* 271, 4436–4440.

Butterfield, D.A. (2002) Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implication for neurodegeneration in Alzheimer disease brain. A review. *Free Radical Research* 36, 1307-1313.

Butterfield, D.A. Castgna, A. Lauderback, C.M., Drake, J. (2002) Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiology of aging* 23, 655-664.

Butterfield, D.A., Reed, T., Newman, S.F., Sultana, R. (2007) Roles of amyloid β -peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radical Biology & Medicine* 43, 658-677.

Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P. and Black, R.A. (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *Journal of Biological Chemistry* 273, 27765-27767.

Camera, E., Picardo, M. (2002) Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *Journal of chromatography B* 781, 181-206.

Cardenas-Rodriguez, N., Pedraza-Chaverri, J. (2006) Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17(2), 161-171.

Castellani, R.J., Smith, M.A., Nunomura, A., Harris, P.L., Perry, G. (1999) Is increased redox-active iron in Alzheimer disease a failure of the copper-binding protein ceruloplasmin? *Free Radical Biology & Medicine* 26, 1508–1512.

Cecchi, C., Fiorillo, C., Sorbi, S., Latorraca, S., Nacmias, B., Bagnoli, S., Nassi, P., Liguri, G. (2002) Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 1372-1379.

Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* 59, 527–605.

Chen, J.X., Yan, S.D. (2007) Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction. *Journal of Alzheimer's disease* 12, 177–184.

Chen, L., Na, R., Gu, M., Richardson, A., Ran, Q. (2008) Lipid peroxidation up-regulates BACE1 expression in vivo: a possible early event of amyloidogenesis in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 107, 197-207.

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

Clarke, D.D., Sokoloff, L. (1999) Circulation and energy metabolism of the brain. In: Sigel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K., Uhler, M.D. (Eds.), *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 637-669.

Clancy, R.M., Levartovsky, D., Leszczynska-Piziak, J., Yegudin, J., Abramson, S.B. (1994) Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 3680–3684.

Commandeur, J.N., Stijntjes, G.J., Vermeulen, N.P. (1995) Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacological Reviews* 47, 271–330.

Cook, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17, 1195-1214.

Cooper, A.J.L. (1997) Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg, R.N., Prusiner, S.B., DiMauro, S., Barchi, R.L., Kunk, L.M. (Eds.) *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 1195-1230.

Cotgreave, I.A., Gerders, R.G. (1998) Recent trends in glutathione biochemistry – glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242, 1-9.

Crawford, D.R., Suzuki, T., Sesay, J., Davies, K.J. (2002) Analysis of gene expression following oxidative stress. *Methods in Molecular Biology* 196, 155-162.

Dickson, D.W. (1997) The pathogenesis of senile plaques. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56, 321-339.

Ding, Q., Markesbery, W.R., Cecarini, V., Keller, J.N. (2006) Decrease RNA, and increased RNA oxidation, in ribosomes from early Alzheimer's disease. *Neurochemical Research* 31, 705-710.

Dringen, R., Pfeiffer, B., Hamprecht, B. (1999) Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *Journal of Neuroscience* 19, 562–569.

Dringen, R. (2000) Metabolism and function of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 62, 649-671.

Dringen, R., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J. (2000) Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European Journal of Biochemistry* 267, 4912-4916.

Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Sczufca, M. (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112-2117.

García, Y.J., Rodríguez-Malaver, A.J., Peñalosa, N. (2005) Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *Journal of Neuroscience Methods* 144, 127-135.

Genovese, T., Mazzon, E., Esposito, E., Muia, C., Di Paola, R., Di Bella, P., Bramanti, P., Cuzzocrea, S. (2007) Role of endogenous glutathione in the secondary damage in experimental spinal cord injury in mice. *Neuroscience Letters* 423, 41–46.

Gibson, G.E., Sheu, K.F., Blass, J.P. (1998) Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *Journal of Neural Transmission* 105, 855–870.

Glabe, C.G. (2008) Structural classification of toxic amyloid oligomers. *Journal of Biological Chemistry* 283, 29639–29643.

Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M., Hardy, J. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.

Golde, T.E. (2003) Alzheimer disease therapy: Can the amyloid cascade be halted? *Journal of Clinical Investigation* 111, 11-18.

Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.F.C. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of biochemical and biophysical methods* 65, 45-80.

Gupta, A., Gupta, A., Datta, M., Shukla, G.S. (2000) Cerebral antioxidant status and free radical generation following glutathione depletion and subsequent recovery. *Molecular and Cellular Biochemistry* 209, 55–61.

Gylys, K.H., Fein, J.A., Tan, M., Cole, G.M. (2003) Apolipoprotein E enhances uptake of soluble but not aggregated amyloid- β protein into synaptic terminals. *Journal of Neurochemistry* 84, 1442–1451

Halliwell, B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 59, 1609-1623.

Hardy, J., Selkoe, D. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.

Harkany, T., Abraham, I., Konya, C., Nyakas, C. Zarandi, M., Penke, B., Luiten, P.G. (2000) Mechanisms of beta-amyloid neurotoxicity: perspectives of pharmacotherapy. *Reviews in Neurosciences* 11, 329-382.

Harrington, C.R., Colaco, C.A. (1994) Alzheimer's disease: a glycation connection. *Nature* 370, 215-221.

Harvey, R.J., Skelton-Robinson, M., Rossor, M.N. (2003) The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 74, 1206-1209.

Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M., Gabbita, S.P. Wu, J.F. Carney, J.M., Lovell, M., Markesbery, W.R., Butterfield, D.A. (1995) Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *Journal of Neurochemistry* 65, 2146-2156.

Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R.L., Atwood, C.S., Johnson, A.B., Kress, Y., Vinters, H.V., Tabaton, M., Shimohama, S., Cash, A.D., Siedlak, S.L., Harris, P.L., Jones, P.K., Petersen, R.B., Perry, G., Smith, M.A. (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 21, 3017–3023.

Hung, A.Y., Koo, E.H., Haass, C., and Selkoe, D.J. (1992) Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 9439–9443.

Jain, A., Martensson, J., Stole, E., Auld, P.A., Meister, A. (1991) Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1913–1917.

Janaky, R., Ogita, K., Pasqualotto, B.A., Bains, J.S., Oja, S.S., Yoneda, Y., Shaw, C.A. (1999) Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *Journal of Neurochemistry* 73, 889–902.

Jin, S.M., Cho, H.J., Jung, E.S., Shim, M-Y., Mook-Jung, I. (2008) DNA damage-inducing agents elicit γ -secretase activation mediated by oxidative stress. *Cell Death and Differentiation* 15, 1375-1384.

Kimberly, W.T., Zheng, J.B., Town, T., Flavell, R.A., Selkoe, D.J. (2005) Physiological regulation of the beta-amyloid precursor protein signaling domain by c-Jun N-terminal kinase JNK3 during neuronal differentiation. *Journal of Neurosciences* 25, 5533-5543.

King, M.E., Kan, H.M., Baas, P.W., Erisir, A., Glabe, C.G., Bloom, G.S. (2006) Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar β -amyloid, *Journal of Cell Biology* 175, 541–546.

Klein, W.L., Kraft, G.A., Finch, C.E. (2001) Targeting small $A\beta$ oligomers: the solution to an Alzheimer disease conundrum? *Trends in Neurosciences* 24, 219-224.

Ko, L.Z., Ko, E.C., Nacharaju, P., Lui, W.K., Chang, E., Kenessey, A., Yen, S.H. (1999) An immunochemical study on tau glycation in paired helical filaments. *Brain Research* 830, 301-313.

Koo, E.H., Squazzo, S.L., (1994) Evidence that the production and release of amyloid β protein involves the endocytic pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 17386-17389.

Koppal, T., Drake, J., Yatin, S., Jordan, B., Varadarajan, S., Bettenhausen, L., Butterfield D.A. (1999) Peroxynitrite-induced alterations in synaptosomal membrane proteins: insight into oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 72, 310–317.

Kwak, Y. D., Brannen, C. L., Qu, T., Kim, H. M., Dong, X., Soba, P., Majumdar, A., Kaplan, A., Beyreuther, K., and Sugaya, K. (2006) Amyloid precursor protein regulates differentiation of human neural stem cells. *Stem Cells and Development* 15, 381–389.

LaFerla, F.M., Green, K.N., Oddo, S. (2007) Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews. Neuroscience* 8, 499–509.

Lee, V.M., Auinn, P.A., Jennings, S.C. (2003) NADPH oxidase activity in preclampsia con limphoblasts uses a model. *Hypertension* 41, 925-931.

Levy, E., Carman, M.D., Fernandez-Madrid, I.J., Power, M.D., Lieberburg, I., van Duinen, S.G., Bots, G.T., Luyendijk, W., and Frangione, B. (1990). Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 248, 1124–1126.

Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., Crowley, A.C., Fu, Y-H., Guenette, S.Y., Galas, D., Nemens, E., Wijsman, E.M., Bird, T.D., Schellenberg, G.D., Tanzi, R.E. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973-977.

Lezoualc'h, F., Engert, S., Berning, B., Behl, C. (2000) Corticotropin-releasing hormone-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with the increased release of non-amyloidogenic amyloid β precursor protein and with the suppression of nuclear factor- κ B. *Molecular Endocrinology* 14, 147-159.

Lin, A.M.Y., Chen, C.F., Ho, L.T. (2002) Neuroprotective effect of intermittent hypoxia on iron-induced oxidative injury in rat brain. *Experimental Neurology* 176, 328-335.

Lindeboom, J., Weinstein, H. (2004) Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment. *European Journal of Pharmacology* 490, 83–86.

Liu, H., Wang, H., Shenvi, S., Hagen, T.M., Liu, R.M. (2004) Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 346-349.

Loeffler, D.A., LeWitt, P.A., Juneau, P.L., Sima, A.A., Nguyen, H.U., DeMaggio, A.J., Brickman, C.M., Brewer, G.J., Dick, R.D., Troyer, M.D., Kanaley, L. (1996) Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders. *Brain Research* 738, 265–274.

Maher, P. (2005) The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Research Reviews* 4, 288–314.

Markesbery, W.R. (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 23, 134-147.

Mattson, M.P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430, 631-639.

Meister, A. (1995) Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta* 1271, 35–42.

Meyer, M.R., Tschanz, J.T., Norton, M.C., Welsh-Bohmer, K.A., Steffens, D.C., Wyse, B.W., Breitner, J.C. (1998) APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nature Genetics* 19, 321-322.

Milton, N.G., Mayor N.P., Rawlinson, J. (2001) Identification of amyloid-[beta] binding sites using an antisense peptide approach. *NeuroReport* 12, 2561–2566.

Minoshima, S., Giordani, B., Berent, S., Frey, K.A. Foster, N.L. Kuhl, D.E. (1997) Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 42, 85-94.

Morgan, C., Colombres, M., Nuñez, M.T. y Inestrosa, N.C. (2004) Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* 74, 323-349.

Müller, T. Meyer, H.E., Egensperger, R., Marcus, K. (2008) The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics—Relevance for Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* 85, 393-406.

Nixon, R.A. (2007) Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *Journal of Cell Science* 120, 4081-4091.

Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, et al. (1999) RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *Journal of Neurosciences* 19, 1959–1964.

Parvathy, S., Karran, E.H., Tuner, A.J. Hooper, N.M. (1998) The secretases that cleave angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein are distinct from tumor necrosis factor-alpha convertase. *FEBS Letters* 431, 63-65.

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinical Chimica Acta* 333, 19-39.

Pastorino, L., Lu, K.P. (2006) Pathogenic mechanisms in Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology* 545, 29-38.

Perez, R.G. Soriano, S., Hayes, J.D. Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D.J., Chen, X., Stokin, G.B., Koo, E.H. (1999) Mutagenesis identifies new signals for betaamyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *Journal of Biological Chemistry* 274, 18851-18856.

Poot, M., Teubert, H., Rabinovitch, P.S., Kavanagh, T.J. (1995) De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *Journal of Cell Physiology* 163, 555–560.

Practico, D., Uryu, K., Leight, S., Trojanoswki, J.Q., Lee, V.M. (2001) Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *Journal of neuroscience* 21, 4183-4187.

Quiroz-Baez, R., Rojas, E., Arias, C. (2009) Oxidative stress promotes JNK-dependent amyloidogenic processing of normally expressed human APP by differential modification of α -, β - and γ -secretase expression. *Neurochemistry International* 7, 662-670.

Raber, J., Huang, Y., Ashford, J.W. (2004) ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiology of Aging* 25, 641-650.

Ramelot, T.A., Nicholson, L.K. (2001) Phosphorylation-induced structural changes in the amyloid precursor protein cytoplasmic tail detected by NMR. *Journal of Molecular Biology* 307, 871-884.

Rauk, A. (2008) Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? *Dalton transactions*, 1273-1282.

Reddy, P.H. (2006) Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 1, 1–13.

Reddy, P.H., Beal, M.B. (2008) Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine* 14, 45-53.

Rensink, A.A.M., deWaal, M.W., Kremer, B., Verbeek, M.M. (2003) Pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy. *Brain Research Reviews* 43, 207–223.

Rossjohn, J., Cappai, R., Feil, S.C., Henry, A., McKinstry, W.J., Galatis, D., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Parker, M.W. (1999) Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature Structural Biology* 6, 327–331.

Rottkamp, C.A., Raina, A.K., Zhu, X., Gaier, E., Bush, A.I., Atwood, C.S., Chevion, M., Perry, G., Smith, M.A. (2001) Redox-active iron mediates amyloid-beta toxicity. *Free Radical Biology & Medicine* 30, 447–450.

Sakono, M., Zako, T. (2010) Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. *FEBS Journal* 277, 1348-1358.

Sano, Y., Nakaya, T., Pedrini, S., Takeda, S., Lijima-Ando, K., Mathews, P.M., Itohara, S., Gandy, S., Suzuki, T. (2006) Physiological mouse brain A β levels are not related to the phosphorylation state of threonine-668 of Alzheimer's APP. *PLoS One*, e51.

Selkoe, D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81, 741-766.

Shan, X., Lin, C.L. (2006) Quantification of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 27, 657-662.

Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., Sabatini, B.L. (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *Journal of Neuroscience* 27, 2866–2875.

Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., Selkoe, D.J. (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine* 14, 837–842.

Shen, C., Chen, Y., Liu, H., Zhang, T., Lin, A., Jing, N. (2008) Hydrogen peroxide promotes A β production through JNK-dependent activation of γ -secretase. *Journal of Biological Chemistry* 283, 17721-17730.

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J-F., Bruni, A.C., Montesi M.P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R.J., Wasco, W., Da Silva, H.A.R., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens, J.M., St George-Hyslop, P.H. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.

Sinha, S., Dovey, H. F., Seubert, P., Ward, P. J., Blacher, R. W., Blaber, M., Bradshaw, R.A., Arici, M., Mobley, W.C., Lieberburg, I. (1990) The protease inhibitory properties of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* 265, 8983–8985.

Small, S.A. and Gandy, S. (2006) Sorting through the Cell Biology of Alzheimer's Disease: intracellular pathways to Pathogenesis. *Neuron* 52, 15-31.

Smith, M.A., Sayre, L.M., Monnier, V.M., Perry, G. (1995) Radical AGEing in Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences* 18, 172-176.

Smith, M.A., Harris, P.L., Sayre, L.M., Perry, G. (1997) Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 9866-9868.

Soriani, M., Pietraforte, D., Minetti, M. (1994) Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 312, 180–188.

St George-Hyslop, P. (2000) Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 7, 546-548.

Stoltenburg-Didinger, G. (1994) Neuropathology of the hippocampus and its susceptibility to neurotoxic insult. *Neurotoxicity* 15, 445-450.

Su, B., Wang, X., Nunomura, A., Moreira, P.I., Lee, H., Perry, G., Smith, M.A., Zhu, X. (2008) Oxidative stress signaling in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* 5, 525-532.

Sultana, R., Perluigi, M., Butterfield, D.A. (2009) Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animals models of AD: role of Abeta in pathogenesis. *Acta Neuropathologica* 118, 131-150.

Suzuki, T., Oishi, M., Marshank, D.R., Czernik, A.J., Nairn, A.C., Greengard, P. (1994) Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein. *EMBO J.* 13, 1114-1122.

Suzuki, T. Nakaya, T. (2008) Regulation of Amyloid β -Protein Precursor by phosphorylation and protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 283. 44, 29633-29637.

Tamagno, E., Guglielmotto, M., Giliberto, L., Vitali, A., Borghi, R., Autelli, R., Danni, O., Tabaton, M. (2008) JNK y ERK1/2 pathways have a dual opposite effect on the expression of BACE1. *Neurobiology of Aging* 10, 1563-1573.

Tamagno, E., Parola, M., Bardini, P., Piccini, A., Borghi, R., Guglielmotto, M., Santoro, G., Davit, A., Danni, O., Smith, M.A., Perry, G., Tabaton, M. (2005) β -site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *Journal of Neurochemistry* 92, 628-636.

Tanzi, R.E., Gusella, J.F., Watkins, P.C., Bruns, G.A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M.L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D.M., and Neve, R.L. (1987) Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880-884.

Tanzi, R.E., Bertram, L. (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120, 545–555.

Tjernberg, L.O., Naslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlstrom, A.R., Thyberg, J., Terenius, L., Nordstedt, C. (1996) Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *Journal of Biological Chemistry* 271, 8545–8548.

Tomita, S. Kirino, Y., Suzuki, T. (1998) Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6277-6284.

Thinakaran, G. Koo, E.H. (2008) Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. *Journal of Biological Chemistry* 44, 29615-29619.

Ushijima, K., Miyazaki, H., Morioka, T. (1986) Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in the brain of the rat. *Resuscitation* 13, 97-105.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & cell Biology* 39, 44-84.

Vickers, J., Dickinson, R., Adlard, P., Saunders, H., King, C., y McCormack, G. (2000) The cause of neural degeneration in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* 60, 139-165.

Weiner, H.L. Frenkel, D. (2006) Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nature Reviews. Immunology* 6, 404-416.

Winterbourn, C.C., Metodiewa, D. (1994) The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 314, 284–290.

Yao, Z.X., Papadopoulos, V. (2002) Function of β -amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB Journal* 16, 1677–1679.

Ye, S., Huang, Y., Mullendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E.C., Cohen, F.E., Kuntz, I.D., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. (2005) Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid b peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 18700–18705.

Zhu, X., Smith, M.A., Perry, G., Aliev, G. (2004) Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias* 19, 345–352.