



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO  
NEUROTÓXICO DEL PÉPTIDO A $\beta$ 11(pE)-42  
EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**  
VANESSA JEANETH IBARRA BRACAMONTES

Tutor: DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN



MÉXICO, D. F.

MAYO 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROTÓXICO DEL PÉPTIDO A $\beta$ 11(pE)-42 EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dra. Gohar Gevorgyan Markosian	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Romina Rodríguez Sanoja	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. José Raúl Mena, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de inmunohistoquímica.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 16 de Junio de 2010

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. Romina Rodríguez Sanoja	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Suplente	Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Suplente	Dra. María de Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más frecuente de demencia neurodegenerativa en las personas de edad avanzada y se caracteriza por un progresivo e irreversible deterioro cognoscitivo, así como trastornos en el comportamiento. Una de las alteraciones patológicas características de la EA es la generación de placas amiloides en ciertas regiones del cerebro formadas por agregados extracelulares del péptido beta-amiloide (AB), principalmente la especie de 42 aminoácidos denominada AB1-42. Recientemente, se ha demostrado la existencia de formas amino terminal truncadas del péptido AB1-42 en depósitos amiloides naturales, entre ellas la especie AB11(pE)-42 que se encuentra modificada en el glutamato del extremo amino terminal. Debido a la creciente evidencia de que los oligómeros de AB son capaces de interferir en la función sináptica, así como a la escasa información de los mecanismos de neurotoxicidad mediados por las formas amino truncadas/modificadas del péptido AB11(pE)-42, es importante evaluar las alteraciones inducidas por estos agregados, así como su papel en la patogénesis de la EA.

Este trabajo está encaminado a evaluar los efectos tóxicos inducidos por la exposición a los oligómeros del péptido AB11(pE)-42 en las líneas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y e IMR-32. Primeramente, se caracterizó la formación *in vitro* de los agregados del péptido AB11(pE)-42 por medio de western blot y se determinó que las especies oligoméricas predominantemente formadas son trímeros, tetrámeros y oligómeros de doce monómeros en adelante. Por otro lado, se generaron anticuerpos policlonales de conejo contra el péptido AB11(pE)-42 y por inmunohistoquímica se observó que estos anticuerpos reconocieron agregados amiloides en tejido de cerebros de pacientes con EA, demostrándose la existencias de estas especies en agregados naturales. Posteriormente, se evaluó el efecto neurotóxico de los agregados del péptido AB11(pE)-42 en las líneas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y e IMR-32 y por medio de citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia se demostró que estos agregados son capaces de inducir externalización de fosfatidilserina, aumentar la permeabilidad de la membrana celular, provocar la fragmentación del DNA, inducir la activación de caspasa 3 y caspasa 7, promover la formación de especies reactivas de oxígeno y aumentar los niveles de calcio intracelular. Estos resultados demuestran que los agregados de AB11(pE)-42 tienen un efecto toxico en las células de neuroblastoma.

## ABREVIATURAS

ADDLS:	Ligandos Difusibles del Péptido $\beta$ -Amiloide u oligómeros.
ApoE:	Apoliproteína E.
APP:	Proteína Precursora del Amiloide.
A $\beta$ :	Péptido $\beta$ -Amiloide.
DMSO:	Dimetil sufoxido.
EA:	Enfermedad de Alzheimer.
EAE:	Enfermedad de Alzheimer Esporádica o Tardía.
EAF:	Enfermedad de Alzheimer Familiar o temprana
MNF:	Marañas Neurofibrilares.
PS1:	Presenilina 1.
PS2:	Presenilina 2.
FAD:	<i>Familial Alzheimer Disease.</i>
NFTs:	<i>Neurofibrillary Tangles.</i>
SD:	Síndrome de Down.
BACE:	$\beta$ -Site APP-Cleaving Enzyme.
QC:	Glutaminil Ciclasa.

## **CONTENIDO**

Carátula  
Reconocimientos  
Resumen  
Abreviaturas  
Antecedentes  
Planteamiento del Problema  
Hipótesis  
Objetivos  
Materiales y Métodos  
Resultados y Discusión  
Conclusiones  
Referencias

# CONTENIDO

<b>CONTENIDO</b>	1
<b>ANTECEDENTES</b>	3
<i>Generalidades de la enfermedad de Alzheimer</i>	3
<i>Enfermedad de Alzheimer familiar</i>	4
<i>Enfermedad de Alzheimer esporádica</i>	4
<i>Factores de riesgo</i>	4
<i>Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer</i>	5
<i>Procesamiento de la proteína precursora amiloide</i>	5
<i>Péptido <math>\beta</math>-amiloide</i>	6
<i>Especies N-terminal truncadas del péptido <math>\beta</math>-amiloide</i>	7
<i>Especies modificadas del péptido <math>\beta</math>-amiloide</i>	8
<i>Agregación del péptido <math>\beta</math>-amiloide</i>	9
<i>Neurotoxicidad del péptido <math>\beta</math>-amiloide</i>	10
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	12
<b>HIPÓTESIS</b>	12
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	13
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	14
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	21
<b>CONCLUSIONES</b>	34
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	35

## ANTECEDENTES

### Generalidades de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más frecuente de demencia neurodegenerativa en las personas de edad avanzada y se caracteriza por un progresivo e irreversible deterioro cognoscitivo, así como trastornos en el comportamiento, pérdida de la autovalía y la funcionalidad (1). Su prevalencia aumenta con la edad, afectando a menos del 1 por ciento de los individuos con edades comprendidas entre los 60-64 años, y hasta el 40 por ciento de los adultos mayores de 85 años (1). Actualmente, 4.5 millones de personas en los Estados Unidos la padecen y se calcula que ese número aumente por lo menos a 14 millones de pacientes en el año 2050 (2).

El diagnóstico definitivo sólo puede ser obtenido después de la autopsia, pero un diagnóstico preliminar sobre la base de la evaluación clínica por un neurólogo experto es exacto en un 90 por ciento de los casos. Dicha evaluación se apoya en los análisis bioquímicos del líquido cefalorraquídeo (LCR) y las técnicas de neuroimagen, pero depende principalmente de una historia médica completa, junto con una exploración neurológica básica (3).

Los síntomas clínicos son el resultado de la degradación de dominios cognoscitivos específicos, en particular los relacionados con la memoria [4]. El cerebro de un paciente con EA a menudo muestra una marcada atrofia, predominante en las áreas de asociación, pero con relativa preservación de las áreas motora primaria, somatosensorial y visual. La degeneración cortical es responsable del deterioro de las funciones del sistema nervioso y de las modificaciones de la personalidad. La afectación y desaferenciación del hipocampo y de las células colinérgicas explican la relevancia de los trastornos amnésicos [5]. Microscópicamente, existe una significativa pérdida de neuronas, además de la contracción de las neuronas corticales. Muchos investigadores creen que la pérdida de sinapsis asociado al encogimiento de las dendritas, es el signo patológico más crítico [5,6].

Se conocen dos tipos de EA, la primera es de tipo familiar (FAD-del inglés familiar Alzheimer disease) o hereditario y tiene un comienzo temprano, alrededor de los 35 años. La segunda es de origen esporádico y de comienzo tardío, entre los 60-65 años de edad [7].

#### Enfermedad de Alzheimer familiar

Alrededor del 10 por ciento de los casos de la enfermedad son de tipo familiar ya que tienen una transmisión autosómica dominante. Tres genes son responsables de más del 90 por ciento de estos casos de aparición familiar: el gen de la presenilina-1 en el cromosoma 14, el gen de presenilina-2 en el cromosoma 1 y el gen de la proteína precursora amiloide (APP) en el cromosoma 21 [1, 8, 9].

#### Enfermedad de Alzheimer esporádica

La importancia del gen de la apolipoproteína E (ApoE) en el cromosoma 19 ha recibido una significativa atención como un importante factor de riesgo de la susceptibilidad genética para el desarrollo de EA “esporádica”, el tipo más típico de la enfermedad. ApoE, una proteína implicada en el transporte de colesterol y, probablemente, en la reparación neuronal, altera el riesgo de EA, pero no causa la enfermedad por sí mismo. El gen de la ApoE tiene tres alelos comunes ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ ) que codifican para las tres isoformas diferentes (ApoE2, ApoE3 y ApoE4, respectivamente). Varios estudios han demostrado que los sujetos con dos copias del alelo  $\epsilon 4$  (homocigotos) tienen un mayor riesgo de contraer la enfermedad en comparación con aquellos con una copia (heterocigotos). Por otro lado, el papel del alelo  $\epsilon 2$  en la enfermedad es un asunto de controversia, ya que varios estudios han reportado una disminución en la frecuencia de EA en pacientes  $\epsilon 2$  homocigotos, lo que sugiere un efecto protector [10-12].

#### Factores de Riesgo

Existen varios factores de riesgo para el desarrollo de EA esporádica, uno de los más importantes es la edad avanzada. Además de los factores de riesgo genéticos ya mencionados, se han sugerido factores de riesgo ambientales, tales como traumatismos

de cráneo con pérdida de conocimiento, aterosclerosis, y la exposición a metales como aluminio y mercurio [1].

## Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer

Hoy en día la comprensión de los fundamentos moleculares de la patogénesis de la EA se basa en la neuropatología descrita a principios del siglo XX. Histológicamente, existen dos alteraciones patológicas en el cerebro de una persona con EA, explicadas por primera vez por el médico alemán Alois Alzheimer en 1907. Estas dos lesiones representan el sello característico de la enfermedad, y su observación durante el examen postmortem es todavía necesaria para su diagnóstico [4, 13, 14].

Alzheimer describió una “sustancia peculiar” que se produce como depósitos extracelulares en regiones específicas del cerebro, que ahora se denominan “placas amiloides”. El componente principal de las placas amiloides asociadas a EA es el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), descrito por primera vez por Glenner y Wong en 1984, el cual es generado a partir de la proteína precursora amiloide (APP) a través de vías endoproteolíticas catalizadas por una serie de complejos enzimáticos llamados secretasas [13, 15, 16].

La segunda lesión descrita por Alzheimer, las marañas neurofibrilares (NFTs - neurofibrillary tangles), se producen intraneuronalmente. A fines del decenio de 1980, se descubrió que las NFTs se componen de agregados de la proteína tau, que se hiperfosforila anormalmente [4, 17].

Además de las placas amiloides y NFTs, el cerebro con EA muestra marcada atrofia, así como pérdida neuronal, pérdida de sinapsis y gliosis. Neuritas distróficas son lo más comúnmente encontrado en las proximidades de las placas. Además en la mayoría de los cerebros con EA se ve angiopatía amiloide en las paredes de los vasos sanguíneos grandes e intermedios.

## Procesamiento de la proteína precursora amiloide

La proteína precursora amiloide (APP) es una glicoproteína transmembranal de aproximadamente 120 kDa, la cual tiene funciones en la adhesión y en el movimiento celular, aunque también ha sido localizada en la región trans-Golgi, retículo endoplásmico (ER) y en las membranas endosomales, lisosomales y mitocondriales. La liberación del péptido A $\beta$  ocurre donde se localiza tanto APP como el complejo de secretasas; por tanto, es probable que esto ocurra en varios compartimentos celulares [4, 16].

Se ha visto que APP se expresa ubicuamente en todos los tejidos y las células poseen la maquinaria enzimática necesaria no sólo para producir A $\beta$ , sino también para su degradación. Este hecho sugiere que la producción de A $\beta$  a partir de APP puede tener una función biológica normal [16, 18].

El procesamiento de APP por los complejos de la enzima secretasa, da origen a dos vías, una no amiloidogénica y una amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, APP es escindida por la  $\alpha$ -secretasa en la posición del aminoácido 83 del extremo carboxilo (C), o entre los residuos 16 y 17 de A $\beta$ , produciendo un gran ectodominio amino (N)-terminal (sAPP $\alpha$ ) que es secretado en el medio extracelular. El fragmento de 83 aminoácidos C-terminal (conocido como C83) resultante es retenido en la membrana y, posteriormente, dividido por la  $\gamma$ -secretasa, produciendo un fragmento corto denominado p3. Es importante destacar que el corte por  $\alpha$ -secretasa ocurre dentro de la secuencia de A $\beta$ , con lo que se excluye la formación de este péptido [4, 19, 20].

La vía amiloidogénica es un procesamiento alternativo para la APP lo que da lugar a la generación de A $\beta$ . La proteólisis inicial es mediada por la  $\beta$ -secretasa en una posición situada en el aminoácido 99 C-terminal. Este corte se traduce en la liberación de sAPP $\beta$  en el espacio extracelular, y deja el fragmento de 99 aminoácidos C-terminal (C99) dentro de la membrana, con el recién generado término amino correspondiente al primer aminoácido de A $\beta$ . Posteriormente, la división hecha por  $\gamma$ -secretasa se lleva a cabo en diferentes puntos cerca de la terminación carboxilo de A $\beta$ , entre los residuos 38 y 43 [4, 16, 19, 20].

## Péptido $\beta$ -amiloide

La mayor parte del péptido A $\beta$  secretado de longitud completa es de 40 residuos de longitud (A $\beta$ 40), mientras que una pequeña proporción (aproximadamente el 10%) es una variante de 42 residuos (A $\beta$ 42). Debido a que la variante A $\beta$ 42 es más hidrofóbica, se agrega más rápidamente y es más propensa a la formación de fibrillas que A $\beta$ 40, por tanto, es la isoforma predominantemente encontrada en las placas cerebrales de pacientes con EA [4, 8, 20].

Históricamente, A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) han sido el principal foco de la investigación, debido a que son las especies más frecuentemente encontradas en la corteza cerebral del paciente con EA. Sin embargo, está bien establecido que las formas N- y C-terminal truncadas o modificadas de los péptidos A $\beta$  también existen en cerebros con EA. La variabilidad de las especies A $\beta$  C-terminal truncadas puede deberse a la acción de diferentes  $\gamma$ -secretasas [19, 20, 22]. Por otro lado, se ha confirmado una mayor heterogeneidad de las especies N-terminal truncadas de A $\beta$  en el núcleo de las placas amiloides [23].

## Especies N-terminal truncadas del péptido $\beta$ -amiloide

La pérdida de la parte hidrofílica N-terminal de A $\beta$ , aumenta la hidrofobicidad de este péptido, lo que aumenta la tendencia a la agregación y deposición. Diversas técnicas de investigación (espectrometría de masas, purificación bioquímica, inmunohistoquímica) muestran que estas formas están presentes en el tejido cerebral de pacientes con EA y síndrome de Down (SD), en etapas tempranas de estas enfermedades. Estudios *in vitro* revelan que estos péptidos truncados tienen la capacidad de agregarse y de ejercer efectos neurotóxicos (19).

Se ha propuesto que las especies truncadas en el extremo amino terminal de A $\beta$  desempeñan un papel importante en la patogenia de la EA. Un pequeño aumento en la síntesis fisiológica de estas especies puede ser suficiente para desencadenar procesos neurotóxicos que inducen cambios en las proteínas del citoesqueleto de las neuronas.

Además, o alternativamente, pueden actuar como nido para la agregación de otras especies neurotóxicas de A $\beta$ , que llegan a predominar en el núcleo de las placas neuríticas típicas de la EA [19].

En estudios de cerebros con EA y SD, las tres principales especies de A $\beta$  que se han identificado por espectrometría de masas son la forma de longitud completa A $\beta$ (1-42) que tiene una masa molecular relativa de 4.5 kDa, y dos péptidos N-terminal truncados en el residuo 3 (3-42) o en el residuo 11 (11-42) con masas moleculares relativas de 4.2 kDa y 3.5 kDa, respectivamente [20, 24-27].

#### Péptido A $\beta$ (11-42)

Las especies A $\beta$ (11-42) son generadas por la enzima BACE ( $\beta$ -site APP-cleaving enzyme). Dos isoformas de esta familia están involucradas, BACE1 y BACE2, sin embargo se ha establecido que BACE1 es la principal proteasa neuronal requerida para romper a APP en los sitios 1 y 11 del péptido A $\beta$  [26, 28-32].

BACE1 es una glicoproteína integral de membrana tipo I que exhibe todas las propiedades esperadas de una  $\beta$ -secretasa. Por ejemplo, su pH óptimo es levemente ácido, está localizada en compartimentos celulares donde A $\beta$  es generado, y divide a sustratos sintéticos de APP en el sitio de división  $\beta$  con una alta afinidad por el Swedish APP (swAPP), una mutación de APP asociada a EA familiar, conocida por aumentar la producción de A $\beta$ . Por último, está presente en las células secretoras de A $\beta$  y es altamente expresada en las neuronas [29, 30].

Además de cortar a APP entre los sitios Met596 y Asp597 (es decir, Asp1 de A $\beta$ ), BACE1 también corta a APP entre Tyr10 y Glu11 de A $\beta$  in vitro. Los fragmentos A $\beta$ (11-40) y A $\beta$ (11-42) que se han detectado en cultivos primarios neuronales de ratas y células N2a de ratón, sugieren que son productos normales de APP generados en las neuronas. Significativamente, estos fragmentos cortos de A $\beta$  también han sido identificados como especies principales en cerebros con EA y en cerebros con envejecimiento normal por

medio de análisis bioquímico, así como en cerebros con SD con patología de EA por estudios de inmunohistoquímica [29-34].

La sobre-expresión de BACE1 en células cultivadas, resulta principalmente en la secreción de A $\beta$ (11-40) y A $\beta$ (11-42). La relación de A $\beta$ (11-40/42) y A $\beta$ (1-40/42) depende de la relación de BACE1 con respecto a APP [26]. Esto se ha explicado con experimentos en donde se aumenta la expresión de BACE1, y el resultado es un aumento de la secreción de A $\beta$ (11-40) y A $\beta$ (11-42), concomitante a una disminución en los niveles de A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42), lo que sugiere que la sobre-expresión de BACE1 o la prolongada asociación entre APP y BACE1 podría dar lugar a una mayor producción de A $\beta$ 11-40 y A $\beta$ 11-42 a expensas de A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42. Además, se ha visto que A $\beta$ (11-40/42) se puede generar tanto de APP de longitud completa, como de su fragmento C-terminal (C99), ya que éstos son sustratos para la escisión en Glu11 por BACE1, lo que indica que una sola molécula de APP puede ser dividida por BACE1, ya sea una vez (en Asp1 o Glu11) o dos veces (en Asp1 y Glu11). Estos resultados indican que la deposición de A $\beta$ 11-40 y A $\beta$ 11-42 en el SNC y su posible papel en la patogénesis AD tienen que ser reevaluados [26, 35].

#### Especies modificadas del péptido $\beta$ -amiloide

Para varios péptidos bioactivos, se ha descrito un residuo piroglutamil N-terminal, que se forma postraduccionalmente a partir de un precursor de glutamina. La Glutaminil ciclasa (QC; EC 2.3.2.5) es una metaloenzima dependiente de zinc que cataliza la ciclación de la glutamina N-terminal en piroglutamato (pE), con una concomitante liberación de amoníaco. Recientemente, se ha demostrado que la QC también es capaz de producir la conversión del glutamato N-terminal a pE. La función principal que se le atribuye a la formación del residuo pE es la estabilización de las proteínas mediante la prevención de la degradación de N-terminal por aminopeptidasas y, por tanto, prolonga su vida media biológica [36]. El glutamato normalmente presente en las posiciones 3 y 11 de A $\beta$  puede someterse a deshidratación intramolecular por la QC para generar especies A $\beta$  que comienzan con piroglutamato (pE) en las posiciones 3 o 11 [27, 37].

Existen publicaciones que han demostrado que la QC se expresa en diferentes tejidos, con una marcada abundancia en cerebro, por ejemplo, corteza cerebral, hipotálamo, hipocampo, así como en las glándulas periféricas como la tiroides y el timo y en linfocitos B humanos [36, 38].

Mediante ciclación de glutamato N-terminal, A $\beta$  adquiriría resistencia a la mayoría de las aminopeptidasas, lo que podría explicar su acumulación en el cerebro con AD [38,39]. Se ha demostrado que tanto A $\beta$ (11-40) no modificado como A $\beta$ 11(pE)-40 modificado se detectan en depósitos amiloideos vasculares, mientras que las especies A $\beta$ 11(pE)-42 modificadas existen predominantemente en núcleos de placas seniles maduras en secciones de cerebro con EA [26].

#### Agregación del péptido $\beta$ -amiloide

Cambios conformacionales y agregación de ciertas proteínas son características centrales en la EA, así como en varias otras enfermedades neurodegenerativas. Una característica común a varias de las mutaciones que causan enfermedades neurodegenerativas es que conducen a la expresión de variantes de proteínas con una tendencia incrementada a la agregación.

Actualmente, existe evidencia de que monómeros de A $\beta$  no son tóxicos para las células y tienen un efecto protector sobre las neuronas al estrés oxidativo [40]. Sin embargo, existen múltiples reportes que indican que los oligómeros de A $\beta$ , a los que también se les denomina ADDLs, son aún más tóxicos que las fibrillas de A $\beta$  [41]. La toxicidad mediada por oligómeros de A $\beta$  (ADDLs) fue descrita por Klein y sus colaboradores, donde observaron que los oligómeros causan muerte neuronal en cortes de hipocampo a concentraciones nanomolares [42].

#### Neurotoxicidad del péptido $\beta$ -amiloide

En los más de 20 años transcurridos desde que el péptido A $\beta$  fue identificado como un importante constituyente de los depósitos amiloides y como un factor trascendental que contribuye directamente al desarrollo de la enfermedad, aún son inciertos los

mecanismos de neurotoxicidad mediados por él. Varios posibles mecanismos se han propuesto, entre ellos el procesamiento amiloidogénico de APP vía  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa que produce A $\beta$  con el potencial de producir neurodegeneración mediante la inhibición de la actividad mitocondrial, la generación de estrés oxidativo, activación de calcio, hiperfosforilación de tau y disfunción proteasómica y sináptica [4, 18, 43].

Las mitocondrias son esenciales para la función neuronal debido a que la limitada capacidad glucolítica de estas células las hace altamente dependientes a la fosforilación oxidativa aeróbica para sus necesidades energéticas. En cerebros con EA se ha llegado a observar una disminución en la utilización de la glucosa cerebral, así como un decremento en la masa mitocondrial y en el contenido de ADNmt. Lo anterior, se ha demostrado ser un signo patológico muy temprano en el progreso de la enfermedad, incluso previo a la aparición de NFT. Recientemente, en un estudio con un modelo de ratón transgénico, se demostró que la APP interactúa con el motor mitocondrial de importación de proteínas, pero el transporte no es completo, causando la disfunción mitocondrial y la inhibición de la síntesis de ATP [18, 43].

La funcionalidad de las neuronas en el cerebro depende de la maquinaria celular sofisticada que controla el transporte de orgánulos, ARNm y proteínas a lo largo de los axones de las neuronas. En este sistema están implicados principalmente la red de microtúbulos de la célula, las proteínas de las superfamilias de dineína y quinesina, y varias proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP), incluida tau. Existe evidencia que indican que el transporte axonal es perturbado considerablemente en EA. La funcionalidad normal de tau en la estabilización de la red de microtúbulos, requiere que tau se encuentre parcialmente fosforilada, pero una hiperfosforilación de tau conduce a la pérdida de su función normal, debido a que en estas condiciones tiene la capacidad de secuestrar tau normal y a otras MAPs de la red de microtúbulos. De ahí, pocas dudas hay de que el metabolismo anormal de tau contribuye a la disminución del transporte axonal evidente en EA, pero menos claro es si A $\beta$  contribuye a la disminución de transporte axonal [18].

Por otro lado, el mecanismo de estrés oxidativo mediado por A $\beta$  puede ser de forma directa o indirecta. Por ejemplo, la funcionalidad de la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial es particularmente susceptible a la inhibición por A $\beta$ , y la inhibición de la CTE es la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la célula. Estudios recientes en cultivos celulares soportan la idea de que la producción de ERO estimulada por A $\beta$  es un posible mecanismo para la neurodegeneración. Este mecanismo requiere la orientación y la activación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), lo cual provoca un rápido aumento en los niveles de calcio neuronales, debido a la capacidad de estos receptores para movilizar calcio en las neuronas [44, 45].

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la creciente evidencia de que los oligómeros de A $\beta$  son capaces de interferir en la función sináptica y contribuir significativamente en las alteraciones patológicas de la EA, así como a la escasa información de los mecanismos de neurotoxicidad mediados por las formas amino truncadas/modificadas del péptido A $\beta$ 11(pE)-42, es importante evaluar las alteraciones inducidas por estos agregados, así como su papel en la patogénesis de la EA, lo que hará que aumente considerablemente nuestra comprensión de la enfermedad y nos proporcionará conocimientos fundamentales necesarios para el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces.

## HIPÓTESIS

La exposición a oligómeros de especies amino truncadas/modificadas del péptido A $\beta$ , como A $\beta$ 11(pE)-42, causa alteraciones estructurales en células neuronales similares a las provocadas por las especies de longitud completa A $\beta$ 1-42 en la enfermedad de Alzheimer.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos tóxicos inducidos por la exposición a los oligómeros del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 en las líneas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y e IMR-32.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar la formación de oligómeros del péptido A $\beta$ 11(pE)-42.
2. Analizar si los anticuerpos anti-A $\beta$ 11(pE)-42 reconocen agregados amiloides presentes en cerebros humanos con EA.
3. Estudiar los efectos tóxicos de los oligómeros del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 en las líneas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y e IMR-32, por medio de:
  - a. Ensayos de viabilidad celular.
  - b. Análisis de translocación de fosfatidilserina y permeabilidad membranal.
  - c. Detección de ADN fragmentado.
4. Corroborar la activación de caspasas promovida por la presencia de los agregados de A $\beta$ 11(pE)-42.
5. Determinar la producción de especies reactivas de oxígeno inducida por la acción de los oligómeros de A $\beta$ 11(pE)-42.

Cuantificar el aumento en los niveles de calcio intracelular durante la exposición de las células de neuroblastoma a los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 y western blot.

La formación de los agregados, también conocidos como ligandos oligoméricos solubles del beta amiloide (ADDLs - del inglés amyloid-beta derived diffusible ligands), se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Klein [42]. Brevemente, para obtener una solución de monómeros, el péptido sintético A $\beta$ 11(pE)-42 (*AnaSpec, San Jose, CA, USA*) se diluyó en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) a una concentración de 1 mM. Se hicieron alícuotas de la solución de péptido-HFIP en microtubos y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, las alícuotas se liofilizaron por tres días para remover cualquier traza de HFIP. El resultado fue una película delgada del péptido estable durante varios meses almacenada a -20 °C. Para la formación de los agregados se resuspendió la película del péptido en dimetilsulfóxido anhidro (DMSO, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) a una concentración de 5 mM. Esta solución del péptido se diluyó en buffer salino de fosfatos modificado por dulbecco (dPBS) 1X a una concentración final de 100  $\mu$ M y se incubó a 37 °C por 24 horas. Los agregados así formados se corrieron en un gel de gradiente de poliacrilamida NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. El análisis de los agregados se realizó mediante inmunoblot utilizando el anticuerpo 4G8 (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) que reconoce la región 17-24 del péptido A $\beta$  silvestre. Por último, el revelado se llevó a cabo con el kit de quimioluminiscencia *Super Signal West Dura Extended Duration Substrate* (*Pierce, Rockford, IL, USA*).

Anticuerpos policlonales anti-A $\beta$ 11(pE)-42.

Previamente en el laboratorio se llevó a cabo la producción de anticuerpos policlonales anti-A $\beta$ 11(pE)-42 de conejo y se demostró que reconocen mimótopos de epítomos presentes en la región amino terminal (aminoácidos 11-15) y en una región

intermedia (aminoácidos 20-24) del péptido A $\beta$ 11(pE)-42. A grandes rasgos, se inmunizaron conejos albinos de raza Nueva Zelanda de tres meses de edad por vía subcutánea en intervalos de catorce días con 200  $\mu$ g de oligómeros de A $\beta$ 11(pE)-42 humano preparados a 37 °C, como se describió en el apartado anterior, pero a una concentración final de 220  $\mu$ M. Para la primera inmunización se utilizó adyuvante completo de Freund, seguido por tres inyecciones de refuerzo con adyuvante incompleto de Freund. Los animales fueron sangrados en el día 0 y después de la tercera inmunización de refuerzo. Los sueros fueron almacenados a -20 °C hasta su uso. Se obtuvo la fracción de IgG a partir del suero de conejo, precipitándose con sulfato de amonio 1.7 M y dializándose contra dPBS. Posteriormente, esta solución se purificó utilizando columnas de sefarosa-proteína G (*Zymed, San Francisco, CA, USA*) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con dPBS para eliminar las proteínas no unidas, y la fracción de IgG se eluyó con buffer de elución (0.2 M de glicina, pH 2.8 ajustado con HCl). Después de dializar contra agua, los anticuerpos fueron liofilizados y almacenados a -20 °C.

#### Tejido cerebral.

El tejido cerebral examinado fue proporcionado por el Banco de Cerebros del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, dirigido por el Dr. José Raúl Mena. Se utilizaron cortes de cerebro de seis pacientes con EA, de entre 47-90 años de edad, obtenidos de 2-6 horas *postmortem*. El tejido fue fijado y mantenido en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS a 4 °C.

#### Análisis inmunohistoquímico.

Se cortaron secciones de corteza temporal de 50  $\mu$ m de espesor en un micrótopo de congelación y se utilizaron para analizar el reconocimiento de los anticuerpos anti-

A $\beta$ 11(pE)-42 a agregados naturales del péptido. Las muestras fueron pre-tratadas con ácido fórmico puro (*Merck, Darmstadt, Germany*) durante 3 minutos a temperatura ambiente para inducir la exposición de los sitios antigénicos presentes en el tejido y se lavaron con tris-buffer salino (TBS). Para el bloqueo de los sitios inespecíficos, las muestras se incubaron en una solución de albúmina libre de inmunoglobulinas G al 0.2% (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) en TBS-tritón al 0.2% por 20 minutos a temperatura ambiente. Se dio un lavado de 3 minutos con TBS-tritón al 0.2% y se realizó una doble inmunotinción con una combinación de los anticuerpos anti-A $\beta$ 11(pE)-42 (1:200) y BAM10 (1:200), como anticuerpos primarios, diluidos en TBS-tritón al 0.2%. Se incubó durante toda la noche a 4 °C. Posterior a la incubación, se realizaron lavados de 3 minutos, primero con TBS-tritón al 0.2% y después con PBS-tritón al 0.2%. En seguida, las muestras fueron incubadas con los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo acoplado a FITC y anti-IgG de ratón acoplado a TRITC (*Jackson Immuno. Res. Lab. Inc., West Grove, PA, USA*) durante 90 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad a una concentración de 1:100 en PBS-tritón al 0.2%. Por último, las muestras fueron lavadas varias veces con PBS-tritón al 0.2%, montadas con medio Vectashield (*Vector Labs., Burlingame, CA, USA*) y analizadas mediante microscopia confocal con un sistema Leica TCP-SP2 (*Leica, Heidelberg, Germany*) utilizando los objetivos 20x y 100x (de inmersión). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron: para FITC (488 y 525 nm) y para TRITC (540 y 570 nm).

Ensayo de inhibición por inmunohistoquímica.

Para confirmar la especificidad de los anticuerpos anti-A $\beta$ 11(pE)-42 en el tejido cerebral de pacientes con EA, se efectuó una pre-incubación con soluciones 5  $\mu$ M de A $\beta$ 35-25, A $\beta$ 11(pE)-42, A $\beta$ 3(pE)-42 y A $\beta$ 1-42, por separado, con los anticuerpos anti-A $\beta$ 11(pE)-42 en TBS-tritón al 0.2% a 37 °C durante 2 horas. Ulteriormente se realizó la inmunohistoquímica, como se describió arriba.

Cultivo celular.

Se usaron células de las líneas SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) e IMR-32 (ATCC CCL-127) cultivadas en medio MEM/F12 (1:1) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomicina y anfotericina) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. En todos los experimentos de exposición a los agregados del péptido Aβ11(pE)-42, las células fueron previamente diferenciadas durante 7 días. La línea SH-SY5Y se diferenció con 10 μM de ácido retinoico (All-trans, Sigma, St. Louis, MO, USA) y la línea IMR-32 con 10 μM de N<sup>6</sup>,2'-O-dibutiriladenosin-3',5'-monofosfato cíclico (dBAC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), en 0.5% de DMSO. Para ambos casos, se realizaron cambios de medio cada dos días.

Ensayo de XTT para viabilidad celular.

Para este ensayo se utilizó un método colorimétrico cuantitativo basado en la reducción de sales sódicas de tetrazolium (XTT, Roche, Indianapolis, IN, USA). Se sembraron 8x10<sup>3</sup> células IMR-32 por pozo en placas de 96 pozos y se diferenciaron durante 7 días, como se describió previamente. Las células fueron tratadas con oligómeros de Aβ11(pE)-42 y Aβ1-42 en medio MEM/F12 sin rojo de fenol y sin SFB, a concentraciones de 10 y 20 μM durante 48 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al término del tratamiento, las células se cargaron con una mezcla del reactivo de XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-metoxo-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) y el reactivo acoplador de electrones (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate), a una relación 50:1 y se incubaron por 4 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, la reacción fue leída en un lector de ELISA a 500 nm.

Ensayo de Anexina V/7 amino actinomicina D (7AAD).

Para este estudio, se sembraron 2x10<sup>5</sup> células SH-SY5Y por pozo en placas de 24 pozos y se diferenciaron por siete días. Las células fueron tratadas con Aβ1-16 y Aβ11(pE)-42 a una concentración de 10 μM en medio MEM/F12 sin rojo de fenol y sin SFB, durante 24h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después del tratamiento, el sobrenadante fue recuperado y las células fueron lavadas con dPBS (que se colectó junto con el sobrenadante) y tripsinizadas

con 0.25% de tripsina-EDTA (Gibco, Invitrogen, New York, NY, USA). Se recuperó el tripsinizado celular junto con los sobrenadantes anteriores, se centrifugó a 300 G por 5 minutos y el pellet se lavó tres veces con buffer binding (HEPES, 10 mM; NaCl, 140 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM). A continuación, las células fueron resuspendidas en 100 µL de buffer binding y se incubaron con 2 µL de AnexinaV-FITC (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) durante 40 minutos en oscuridad a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se lavaron las células dos veces con buffer binding y se resuspendieron en 400 µL del mismo buffer con 1 µL de 7 amino actinomicina D (7AAD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Finalmente, se adquirieron 10000 eventos en un citómetro de flujo (BD FACSCalibur™ Flow Cytometer, NJ, USA) y leídas en FL1 (excitación 488 nm y emisión 525 nm) para Anexina V-FITC y FL3 (excitación 380 nm y emisión 320 nm) para 7AAD. Los datos obtenidos fueron analizados con el software WinMDI 2.9 (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry).

Para el análisis por microscopía de epifluorescencia, se sembraron 1x10<sup>5</sup> células SH-SY5Y en portaobjetos de vidrio de 8 pozos (Lab-Tek II Chamber Slide w/Cover RS Glass Slide, Nalgene Nunc International). En este caso, las células fueron tratadas con Aβ<sub>35-25</sub>, Aβ<sub>11(pE)-42</sub> y Aβ<sub>1-42</sub> bajo las mismas condiciones antes descritas. Posterior al tratamiento, las células fueron lavadas con buffer binding e incubadas en 100 µL de este buffer con 2 µL de AnexinaV-FITC y 1 µL de 7AAD durante 40 minutos en oscuridad a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al término de la incubación, se lavaron dos veces con buffer binding, se fijaron con paraformaldehído al 4% en dPBS y se montaron con el reactivo ProLong Gold Antifade con DAPI (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA). Las imágenes se obtuvieron en un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS.

Ensayo de TUNEL para marcaje de ADN fragmentado.

Para medir la fragmentación nuclear de ADN, se utilizó el kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI, USA). Se sembraron 1x10<sup>5</sup> células SH-SY5Y en portaobjetos de vidrio de 8 pozos Lab-Tek, se dejaron diferenciar por siete días y se trataron con oligómeros del péptido Aβ<sub>11(pE)-42</sub> a una concentración de 20 µM en medio MEM/F12 sin rojo de fenol y sin SFB durante 20 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego

del tratamiento las células se fijaron en paraformaldehído al 4% en dPBS durante 25 minutos a 4 °C y se realizaron lavados de 5 minutos con dPBS. A continuación las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% en dPBS y nuevamente se dieron lavados de 5 minutos con dPBS. Seguido de esto, la reacción se equilibró con buffer de equilibrio (suministrado en el kit) por 10 minutos a temperatura ambiente y se cargaron las células con 50 µL de buffer de incubación (45 µL de buffer de equilibrio, 5 µL de mezcla de nucleótidos y 1 µL de enzima rTdT) durante 60 minutos a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en cámara de humedad evitando la exposición a la luz. Se detuvo la reacción lavando con buffer salino de citratos (SSC, incluido en el kit) 2X durante 15 minutos y se lavó varias veces con dPBS. Las células se montaron con medio ProLong Gold Antifade y las imágenes se obtuvieron en un microscopio invertido de epifluorescencia OLYMPUS.

#### Activación de Caspasas 3 y 7.

La actividad de caspasas se monitoreó utilizando Image-iT™ LIVE Green Caspase-3 and -7 Detection Kit (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA). Para este ensayo se sembraron  $1 \times 10^5$  células SH-SY5Y en portaobjetos de 8 pozos Lab-Tek. Después de diferenciarse durante 7 días, las células fueron expuestas a los agregados de A $\beta$ 11(pE)-42 a concentraciones de 10 y 20 µM en MEM/F12 sin rojo de fenol ni SFB por 4 horas a 37°C y en atmósfera de CO<sub>2</sub>. Las células fueron lavadas con MEM/F12 sin rojo de fenol ni SFB y cargadas con el reactivo poli-caspasas FAM-VAD-FMK durante 60 minutos a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, según instrucciones del fabricante. Posteriormente, se lavaron dos veces con buffer wash (incluido en el kit) y se fijaron con paraformaldehído al 4% en dPBS. Las células fijadas se montaron con medio ProLong Gold Antifade y se analizaron por microscopía de epifluorescencia en microscopio invertido de epifluorescencia OLYMPUS.

#### Inducción de especies reactivas de oxígeno (ERO).

La formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) se monitoreó utilizando un derivado de fluoresceína reducida, el reactivo 5-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (CM-H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA). Para este análisis se sembraron  $2 \times 10^5$  células SH-SY5Y por pozo en placas de 24 pozos y se

diferenciaron por 7 días. Las células fueron tratadas con A $\beta$ 35-25, A $\beta$ 1-42 y A $\beta$ 11(pE)-42 a una concentración de 10  $\mu$ M en medio MEM/F12 sin rojo de fenol y sin SFB durante 4 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después del tratamiento, el sobrenadante fue recuperado, las células fueron lavadas con dPBS y tripsinizadas con 0.25% de tripsina-EDTA. Se recuperó el tripsinado celular junto con los sobrenadantes anteriores, se centrifugó a 300 G por 5 minutos y el pellet se lavó dos veces con solución HBSS/Ca/Mg (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A continuación, las células fueron cargadas con el reactivo CM-H<sub>2</sub>DCFDA a una concentración de 2.5  $\mu$ M en HBSS/Ca/Mg y se incubaron durante 40 minutos en oscuridad a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se lavaron las células dos veces con HBSS/Ca/Mg y se adquirieron 10000 eventos en un citómetro de flujo (BD FACSCalibur™ Flow Cytometer, NJ, USA), leídas en FL1 (excitación 488 nm y emisión 525 nm). Los datos obtenidos fueron analizados con el software WinMDI 2.9 (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry).

Por otro lado, también se realizó el análisis por microscopía de epifluorescencia y para esto se sembraron 1x10<sup>5</sup> células SH-SY5Y previamente diferenciadas en portaobjetos de 8 pozos Lab-Tek. Después de tratar las células durante 4 horas a 37 °C y en atmósfera de CO<sub>2</sub> con 10  $\mu$ M de los agregados de A $\beta$ 11(pE)-42, se lavaron con HBSS/Ca/Mg y se incubaron por 40 minutos a 37°C con una solución 2.5  $\mu$ M del reactivo CM-H<sub>2</sub>DCFDA en el mismo buffer. Después de la incubación, las células fueron lavadas nuevamente con HBSS/Ca/Mg e inmediatamente después fueron analizadas en un microscopio invertido de epifluorescencia.

Cuantificación de calcio intracelular.

Para la cuantificación de los niveles de calcio intracelular por citometría de flujo, se sembraron 2x10<sup>6</sup> células en frascos F25, tanto de la línea IMR-32 como de la línea SH-SY5Y, y se diferenciaron durante 7 días, como se describió anteriormente. Para el tratamiento, las células fueron lavadas con dPBS y tripsinizadas con 0.25% de tripsina-EDTA. Aproximadamente 3x10<sup>6</sup> células fueron cargadas con buffer de carga (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM Hepes, 10 mM glucosa a pH de 7.4)

suplementado con 2.5  $\mu\text{M}$  de Fluo-4 AM (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA), 0.25% de ácido plurónico F-127 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) y 1.5% de BSA. Se incubó por 15 min a 37 °C y se realizó un lavado con buffer de carga para eliminar el exceso. Posteriormente, se trataron las células durante 15 minutos con el péptido 35-25 y los oligómeros de A $\beta$ 11(pE)-42 a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  en buffer de carga. Inmediatamente después de la incubación con los tratamientos, se hizo la adquisición de diez mil eventos en un citómetro BD FACSCalibur™ Flow Cytometer en FL1 (excitación 488 nm y emisión 525 nm) y los datos obtenidos fueron examinados con el programa WinMDI 2.9.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de la formación de los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42.

Previamente se ha demostrado que la disfunción neuronal no se correlaciona con la distribución y densidad de las fibrillas tanto en humanos con EA como en modelos animales [46]. En este sentido, existen muchos reportes que demuestran que las especies más tóxicas son los oligómeros de A $\beta$ , también llamados ADDLs, los cuales son fuertes inhibidores de la potenciación a largo plazo (LTP - del inglés long-term potentiation) y han sido asociados a pérdida de la sinapsis y fallo de la memoria en modelos de ratones transgénicos de EA [47]. Debido a la información anterior, se decidió determinar la composición de los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 después de formarlos *in vitro* mediante el método reportado por Klein [42]. Es importante señalar que dicho método genera agregados similares a los observados en cerebros de pacientes con EA, así como en modelos de animales transgénicos. La formación de los agregados se caracterizó por western blot (WB) utilizando el anticuerpo 4G8, el cual reconoce la región 17-24 del péptido A $\beta$ , lo que implica que reconoce a A $\beta$ 11(pE)-42. Los agregados de A $\beta$ 11(pE)-42 fueron preparados a una concentración de 100  $\mu$ M e incubados a 4 y 37 °C por 24 horas. El revelado mostró tres bandas mayoritarias de peso molecular aproximado a 3, 9 y 11 kDa (Figura 1, carriles 3 y 4), que corresponden a monómeros, trímeros y tetrámeros. Así mismo, para el caso de los agregados incubados a 37 °C, se observa un barrido a partir de los 40 kDa correspondiente a oligómeros de doce monómeros en adelante. Además de los agregados de A $\beta$ 11(pE)-42, se corrieron en el gel muestras de agregados de los péptidos A $\beta$ 1-42 y A $\beta$ 3(pE)-42, elaborados bajo las mismas condiciones, pero incubados solo a 4 °C. Para los agregados de A $\beta$ 1-42, se observaron tres bandas mayoritarias de pesos moleculares relativos a 4.5, 12 y 16 kDa (Figura 1, carril 1); y para los agregados de A $\beta$ 3(pE)-42, las bandas correspondieron a pesos moleculares de 4, 11 y 14 kDa. Dichas bandas son, como en el caso de A $\beta$ 11(pE)-42, monómeros, trímeros y tetrámeros. Estas observaciones demuestran que la formación de agregados sigue el mismo patrón y que las especies oligoméricas predominantes son trímeros y tetrámeros para las tres especies de

A $\beta$ . En resumen, estos datos indican que bajo nuestras condiciones experimentales de formación de agregados, tenemos oligómeros de A $\beta$ 11(pE)-42, los cuales son apropiados para estudios posteriores de toxicidad del péptido.

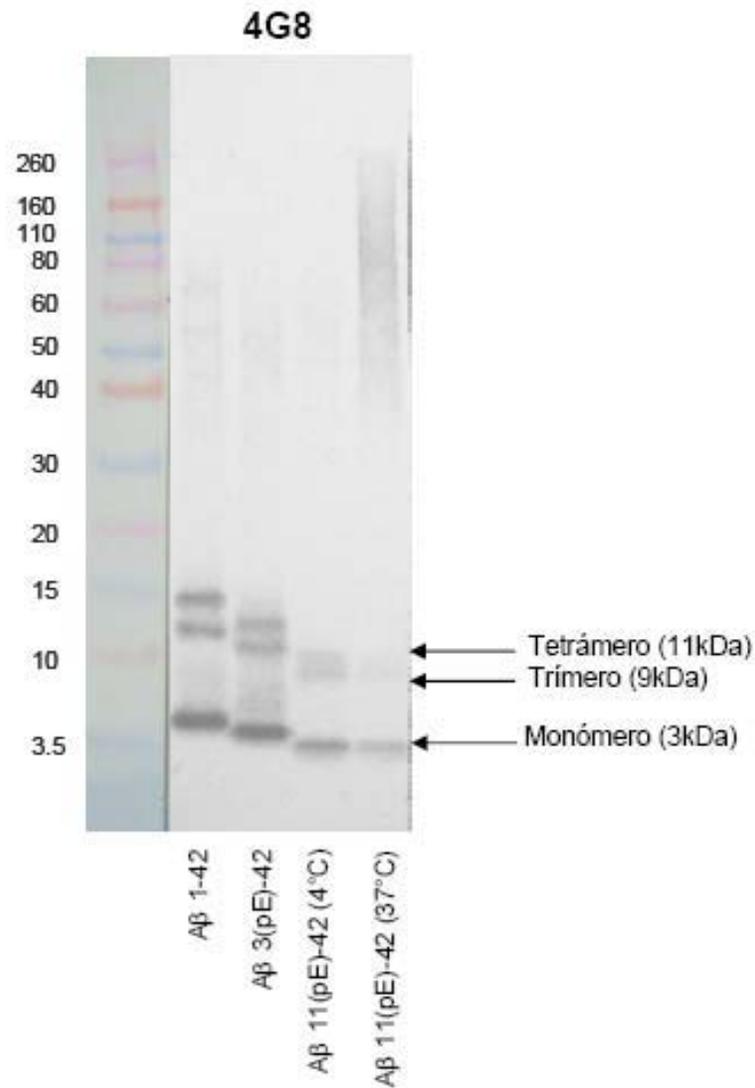


Figura 1. Caracterización de la formación de agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 por PAGE y WB utilizando un anticuerpo monoclonal anti-A $\beta$  (4G8) que reconoce la región central 17-24 del péptido A $\beta$ .

**Reconocimiento de agregados amiloides naturales por anticuerpos anti-A $\beta$ 11(pE)-42 en cortes de cerebro de pacientes con EA.**

En los últimos años ha surgido evidencia que resalta el papel de las especies amino truncadas/modificadas del péptido A $\beta$  en el desarrollo de EA. Aunque su importancia patológica no es del todo comprendida, se ha demostrado que estas formas cortas de A $\beta$  se agregan a una mayor velocidad y muestran una mayor resistencia a la degradación en comparación con las formas completas del péptido [38, 48]. Además, se han encontrado depósitos de estas especies amino truncadas/modificadas en cerebros de pacientes con EA familiar y esporádica, así como en pacientes con síndrome de Down. Por lo tanto, es evidente que estas especies amino truncadas/modificada del péptido A $\beta$  tiene que ser blanco de nuevos tratamientos para la enfermedad.

En la última década, las estrategias de inmunoterapia contra el péptido A $\beta$  han demostrado ser capaces de desagregar depósitos existente, bloquear la agregación, atenuar la toxicidad del péptido, así como promover su eliminación en el sistema nervioso central. Los acercamientos inmunoterapéuticos, como la inmunización activa con el péptido A $\beta$  y la transferencia pasiva de anticuerpos anti-A $\beta$ , han demostrado ser eficaces terapéuticos en varios modelos de ratón transgénico para APP que desarrollan una patología parecida a la EA, así como en modelos de amiloidosis en caninos y primates [49]. Sin embargo, la mayoría de los estudios anteriores utilizaron como blanco a los péptidos de longitud completa A $\beta$ 1-40 o A $\beta$ 1-42, lo que indujo la producción de anticuerpos contra la parte amino-terminal de A $\beta$  (epítipo EFRH), de la que las formas amino truncadas/modificadas de A $\beta$  carecen. Es por esto que estudios en nuestro laboratorio están enfocados en la búsqueda de inmunoreactivos dirigidos contra las especies amino truncadas/modificadas de A $\beta$ . Se generaron anticuerpos policlonales inmunizando conejos con el péptido A $\beta$ 11(pE)-42 y evaluamos las propiedades de estos anticuerpos. Análisis inmunohistoquímico en cerebros de pacientes con EA, demostró que nuestros anticuerpos reconocieron agregados amiloides naturales (Figura 2, Panel A y B). Es importante mencionar que se observa una clara afinidad por el núcleo de agregados amiloides, fortaleciendo la idea de que las especies amino truncadas pueden ser los centros de nucleación durante la formación de las placas amiloides.

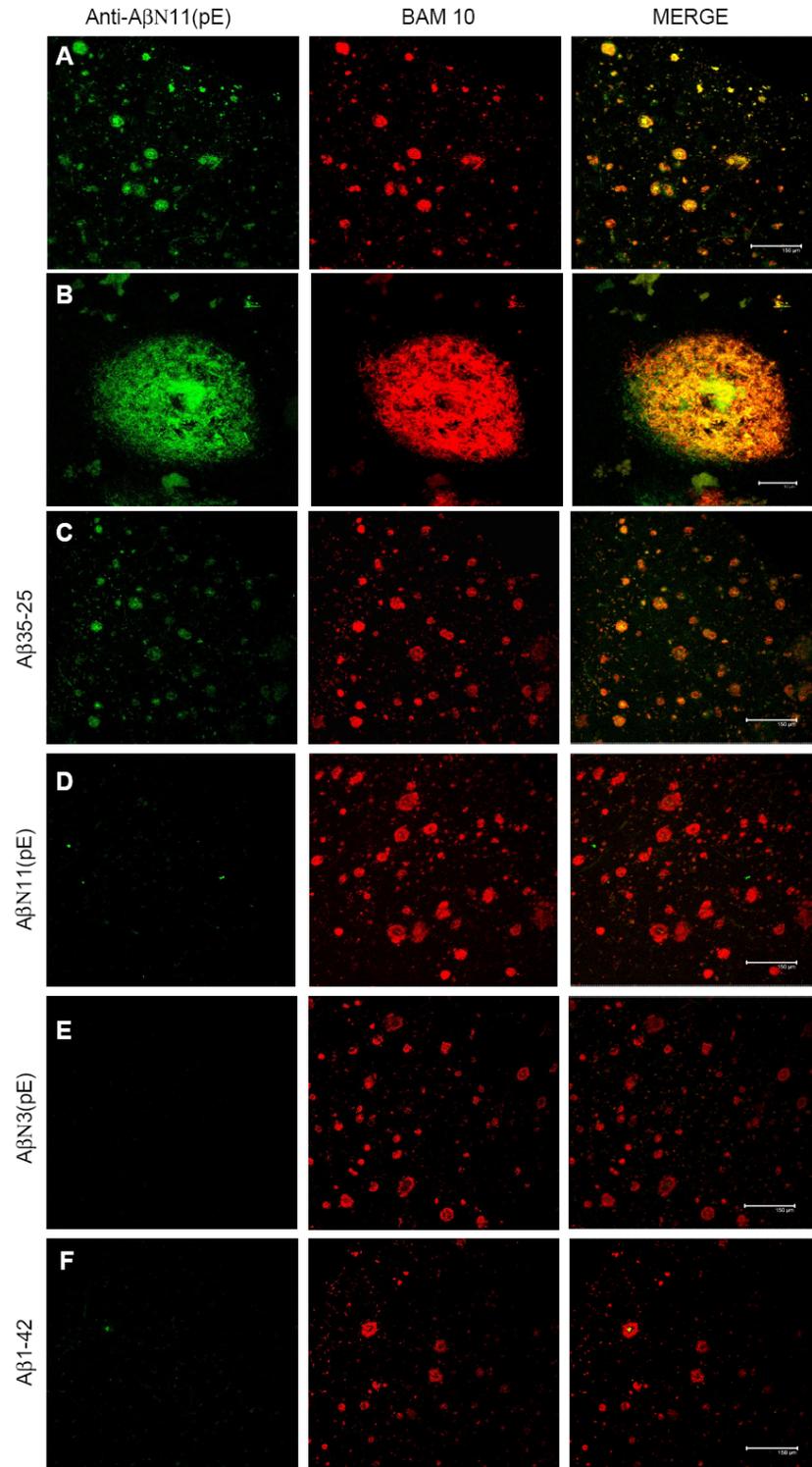


Figura 2. Anticuerpos anti-A $\beta$ 11(pE)-42 unidos a agregados amiloides en secciones de tejido de la corteza cerebral temporal de pacientes con EA (A, B). Esta unión es inhibida por A $\beta$ 11(pE)-42 (D), A $\beta$ 3(pE)-42 (E) y A $\beta$ 1-42 (F), pero no por A $\beta$ 35-25 (C). A, C-F:20x, B:100x.

Para confirmar la especificidad de los anticuerpos anti-A $\beta$ 11(pE)-42, en uno de los experimentos, previo a la inmunotinción, los anticuerpos fueron incubados con soluciones 5  $\mu$ M de A $\beta$ 35-25, A $\beta$ 11(pE)-42, A $\beta$ 3(pE)-42 y A $\beta$ 1-42. La inmunohistoquímica mostró que el reconocimiento de los anticuerpos es inhibido en la presencia de los péptidos A $\beta$ 11(pE)-42, A $\beta$ 3(pE)-42 y A $\beta$ 1-42, pero no del péptido control A $\beta$ 35-25.

Como control positivo, se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón, anti-A $\beta$  BAM10 (Sigma-Aldrich, MO, USA), que reconoce la región amino-terminal del péptido A $\beta$ , entre los residuos de aminoácidos 1 al 12, y es utilizado en todos los trabajos anteriores para identificar depósitos amiloides en cerebros de animales transgénicos, así como en cerebros de pacientes con EA.

En conclusión, los anticuerpos dirigidos contra A $\beta$ 11(pE)-42, son capaces de unirse a agregados amiloides naturales presentes en cerebros de pacientes con EA, lo que sugiere que la inmunoterapia dirigida a este péptido, puede ser prometedora para atacar la enfermedad.

Debido a que no hay en la literatura ninguna información acerca de los mecanismos de toxicidad de A $\beta$ 11(pE)-42, en este trabajos se realizaron los primeros estudios para esclarecer algunos de los procesos involucrados. Para esto, en este estudio se utilizaron células diferenciadas de neuroblastoma, SH-SY5Y e IMR-32, ya que han sido ampliamente usadas en informes anteriores como modelo *in vitro* por sus propiedades bioquímicas de neuronas humanas y porque muestran ser sensibles a la degeneración provocada por el péptido A $\beta$ .

### **Estudio de la citotoxicidad de los agregados de A $\beta$ 11(pE)-42 en células de neuroblastoma IMR-32.**

Se ha demostrado previamente que los agregados de A $\beta$  disminuyen la viabilidad de células *in vitro*. Para demostrar si los oligómeros del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 también

pueden causar un efecto similar, realizamos el siguiente experimento basado en la reducción de sales sódicas de tretazolium (XTT) debido al transporte de electrones durante el metabolismo activo celular, el cuál es útil como indicador de viabilidad celular. A las células IMR-32 previamente diferenciadas, se les trató con los agregados de los péptidos A $\beta$ 1-42 y A $\beta$ 11(pE)-42 a dos concentraciones, 10 y 20  $\mu$ M. Después de 48 horas de tratamiento, se observó una disminución en la viabilidad de las células, siendo el daño provocado por los agregados de A $\beta$ 1-42 (44-79% de viabilidad) mayor que el inducido por A $\beta$ 11(pE)-42 (71-87%) (Figura 3). Así mismo, se demostró que esta disminución en la viabilidad es dependiente de la dosis. Estos resultados nos indican que los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 son capaces de disminuir la viabilidad celular *in vitro*.

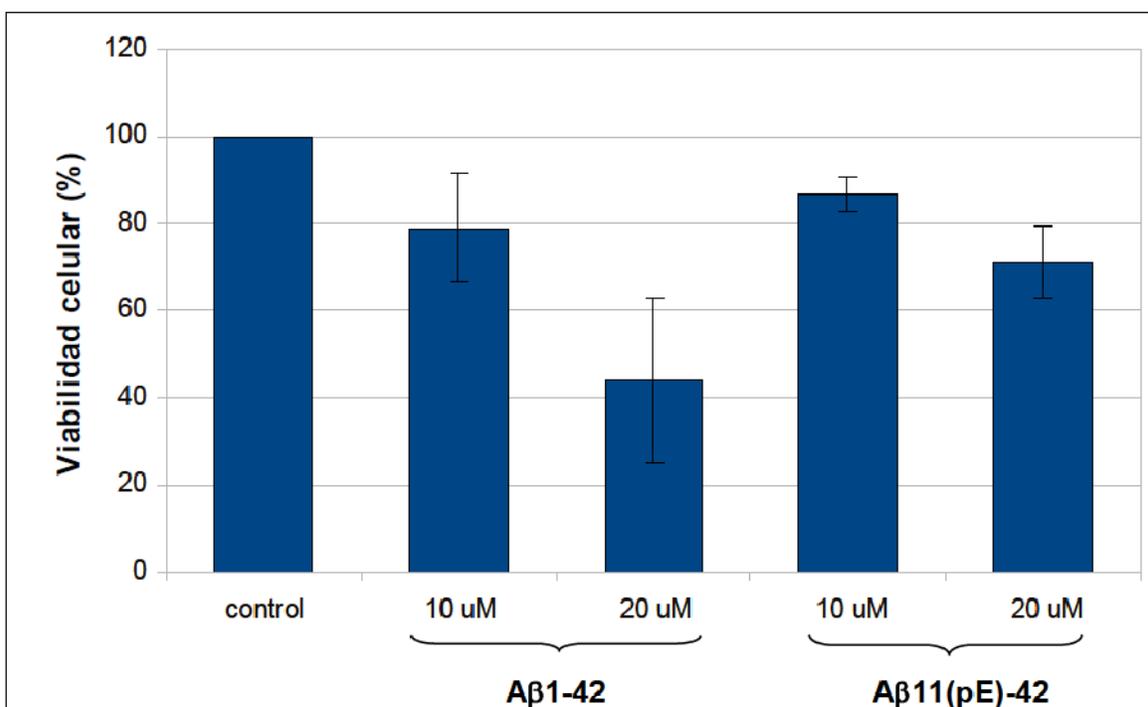


Figura 3. Ensayo de viabilidad celular en células IMR-32 expuestas a concentraciones de 10 y 20  $\mu$ M de los agregados A $\beta$ 1-42 y A $\beta$ 11(pE)-42.

## **Los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 inducen externalización de fosfatidilserina (PS) y aumentan la permeabilidad de la membrana celular.**

Para evaluar los mecanismos de muerte celular inducidos por los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42, se realizó una doble tinción utilizando anexina V y 7AAD para diferenciar entre células vivas, células en apoptosis temprana y necrosis/apoptosis tardía. Se sabe que en las células que sufren apoptosis, la fosfatidilserina (PS) transloca de la cara interna de la membrana plasmática a la superficie de la célula y se puede unir a anexina V (Vermes et al, 1995). Por otro lado, 7AAD es un agente fluorescente de unión al ADN e impermeable a la célula y se utiliza para evaluar la integridad de la membrana celular. Es por ello que células SH-SY5Y diferenciadas durante 7 días fueron tratadas con 10  $\mu$ M de los agregados de A $\beta$ 11(pE)-42 durante 24 horas. Las células se tiñeron como se describió previamente y se analizaron por citometría de flujo. La exposición a los agregados mostró una disminución en el número de células viables (24%) en comparación con las células no tratadas (84%) y las células tratadas con el control negativo A $\beta$ 1-16 (89%) (Figura 4). Del mismo modo, la exposición a agregados de A $\beta$ 11(pE)-42 se asoció con un aumento de dos veces en el número de células en apoptosis temprana (anexina V positivas y 7AAD negativas) en comparación con las células control no tratadas. Se observó, un triple aumento del número de células apoptóticas tardías o necróticas (anexina V positivas y 7AAD positivas), en comparación con el control de las células sin tratar o tratadas con el péptido A $\beta$ 1-16. Los mismos mecanismos de toxicidad fueron observados en el análisis por microscopía de epifluorescencia. Las células tratadas con oligómeros de A $\beta$ 1-42 y A $\beta$ 11(pE)-42, mostraron tanto la externalización de PS (color verde), como la internalización de 7AAD (Figura 5). Al mismo tiempo, las células tratadas con el control negativo A $\beta$ 35-25 fueron anexina V/7AAD negativo. Los datos aquí mostrados muestran que efectivamente las células SH-SY5Y son susceptibles a la toxicidad de los oligómeros de A $\beta$ 1-42, tal como previamente se ha demostrado en otros estudios, y que la exposición a los agregados de A $\beta$ 11(pE)-42 tiene un efecto similar. El control positivo ionomicina, muestra un daño mucho más agresivo en ambos análisis.

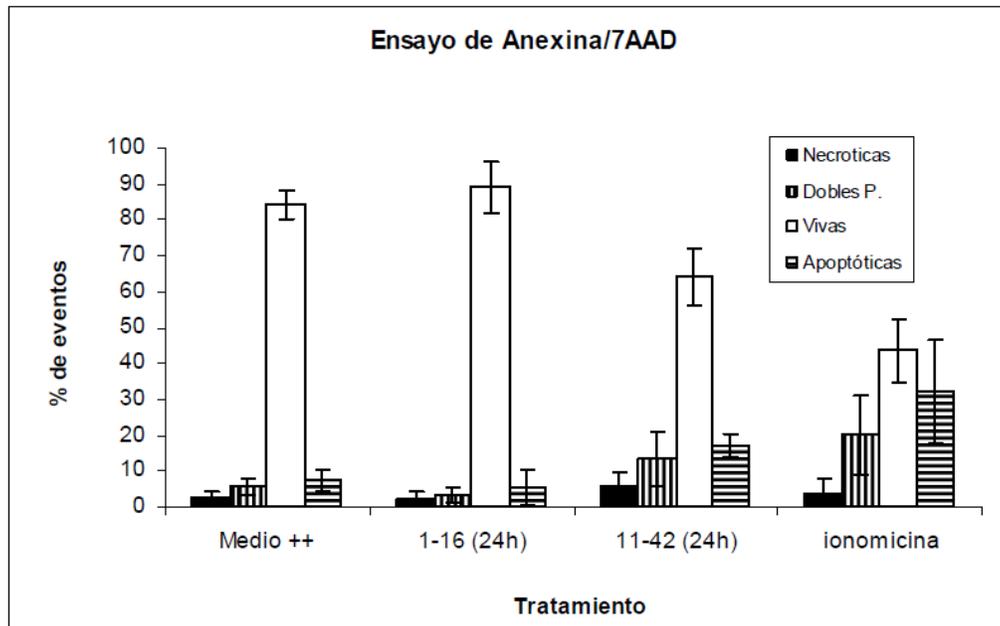


Figura 4. Externalización de fosfatidilserina (PS) y aumento de la permeabilidad de la membrana celular inducida por los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 medida por citometría de flujo.

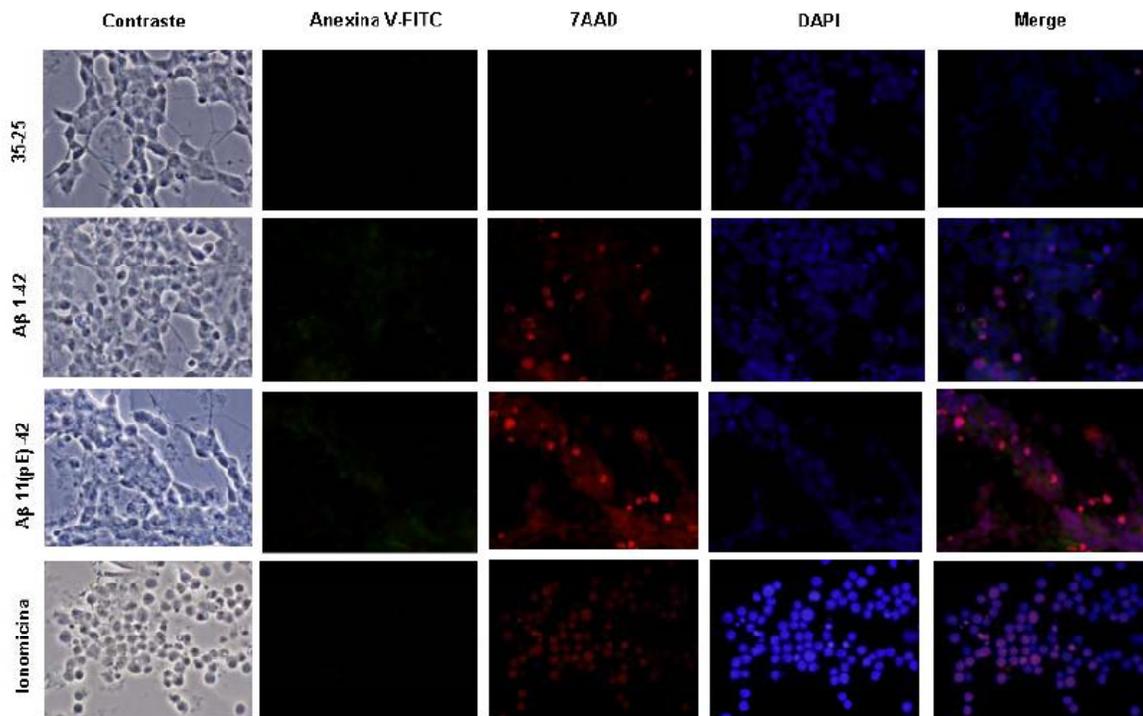


Figura 5. Externalización de fosfatidilserina (PS) y aumento de la permeabilidad de la membrana celular inducida por los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 analizada por microscopía de epifluorescencia.

## Los oligómeros de A $\beta$ 11(pE)-42 inducen fragmentación del ADN sobre las células SH-SY5Y.

Para detectar si la muerte celular inducida por los agregados de A $\beta$ 11(pE)-42 es de tipo apoptótica, se llevó a cabo el método de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling). La valoración de la apoptosis por el método de marcaje del DNA fragmentado o técnica de TUNEL tiene su fundamento en la detección de la rotura del DNA internucleosomal, típica de la apoptosis. Se trataron las células con los oligómeros de A $\beta$ 11(pE)-42 a una concentración 10  $\mu$ M por 20 horas. Después del tratamiento las células fueron cargadas con el reactivo de TUNEL y fijadas para analizarse por microscopía de epifluorescencia. Las imágenes muestran una marcada fluorescencia en las células tratadas con los oligómeros de A $\beta$ 11(pE)-42, pero no en las células control sin tratamiento y las tratadas con el péptido A $\beta$ 35-25 (Figura 6). Con estos ensayos se evidenció la fractura del ADN, confirmando la presencia de apoptosis inducida por los agregados de A $\beta$ 11(pE)-42.

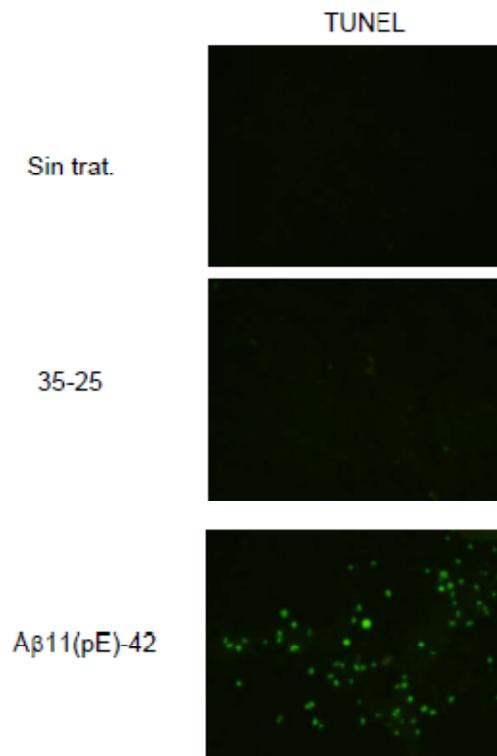


Figura 6. Marcaje de la fragmentación del ADN inducida por los oligómeros de A $\beta$ 11(pE)-42.

## **Activación de caspasas 3 y 7 en células expuestas a los oligómeros de A $\beta$ 11(pE)-42.**

Un rasgo distintivo de las primeras etapas de la apoptosis es la activación de caspasas. En varios estudios con el péptido A $\beta$ 1-42, se ha visto que la muerte inducida por éste péptido es de tipo apoptótica y debido a que no existen trabajos para el péptido A $\beta$ 11(pE)-42, consideramos de suma importancia evaluar la actividad de caspasas como indicador temprano de apoptosis, en células SH-SY5Y. Las células tratadas con 10 y 20  $\mu$ M de los agregados de A $\beta$ 11(pE)-42 durante 4 horas, fueron cargadas con el reactivo FLICA durante 60 minutos, el cual es una molécula fluorescente capaz de unirse a una secuencia específica de aminoácidos (DEVD) presente tanto en caspasa 3 como en caspasa 7. Después de ser fijadas y analizadas por microscopía de epifluorescencia, se observó activación de caspasas dosis dependiente en las células tratadas con A $\beta$ 11(pE)-42 (Figura 7).

## **Formación de especies reactivas de oxígeno (ERO).**

Estudios previos han demostrado que A $\beta$ 1-42 ejerce su efecto tóxico mediante la formación de especies reactivas de oxígeno [18]. Con la finalidad de observar la formación de ROS en células SH-SY5Y, se utilizó el reactivo CM-H<sub>2</sub>DCFDA, el cual al ser oxidado por esterasas intracelulares fluoresce y puede ser monitoreado por citometría de flujo y microscopía. Las células tratadas con el control negativo 35-25 de A $\beta$  exhiben una fluorescencia basal debida a la producción endógena de ROS. Para el caso de los agregados de A $\beta$ 1-42 y A $\beta$ 11(pE)-42, éstos muestran un aumento de 3 y 3.5 veces, respectivamente. Este marcado aumento en la fluorescencia por la formación de ROS debida a la exposición de los agregados es confirmado por el análisis en microscopía de epifluorescencia (Figura 8 y 9).

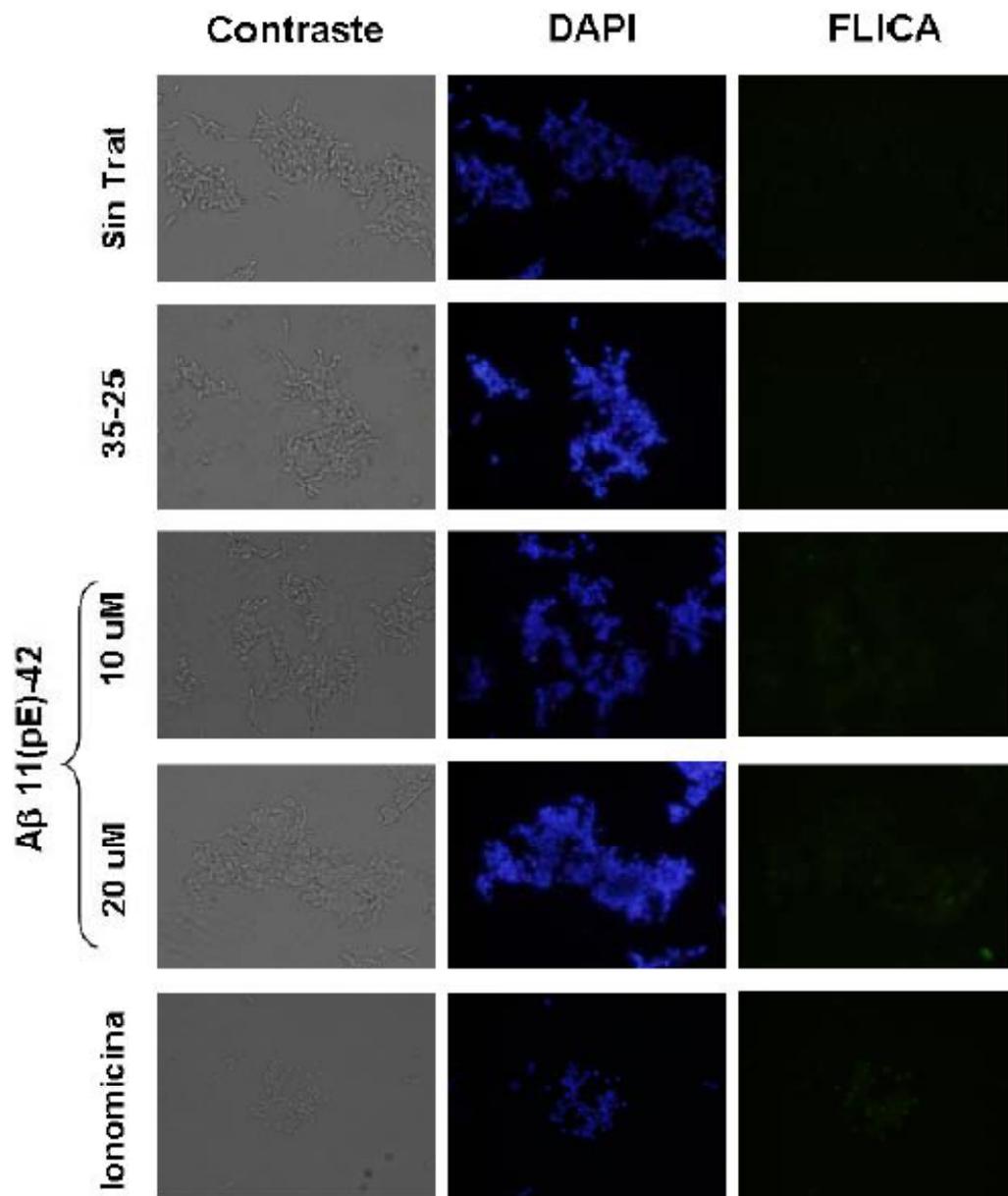


Figura 7. Activación de caspasas 3 y 7 inducida por los agregados del péptido Aβ11(pE)-42.

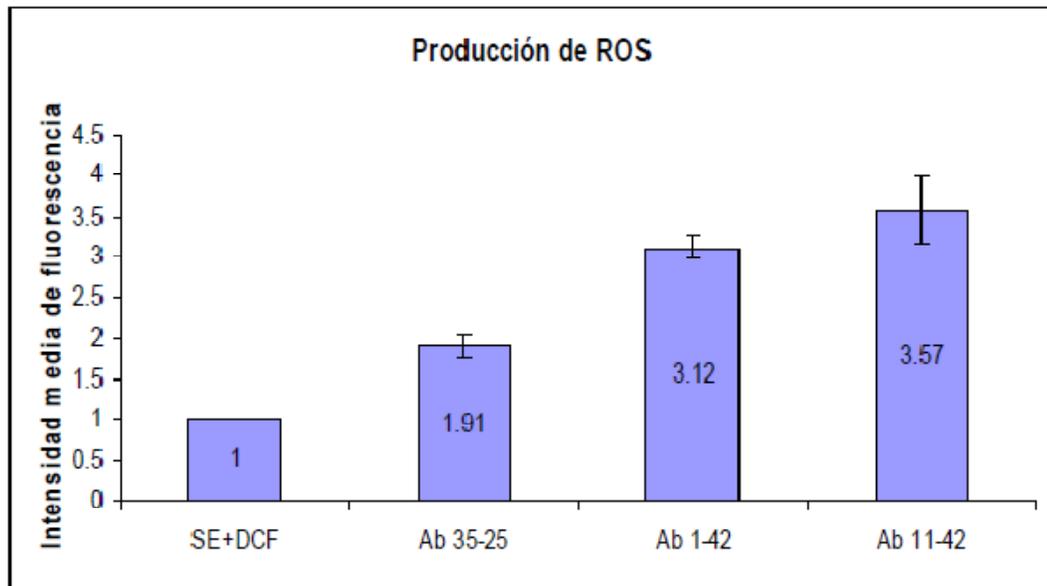


Figura 8. Formación de especies reactivas de oxígeno promovida por los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42, analizada por citometría de flujo.

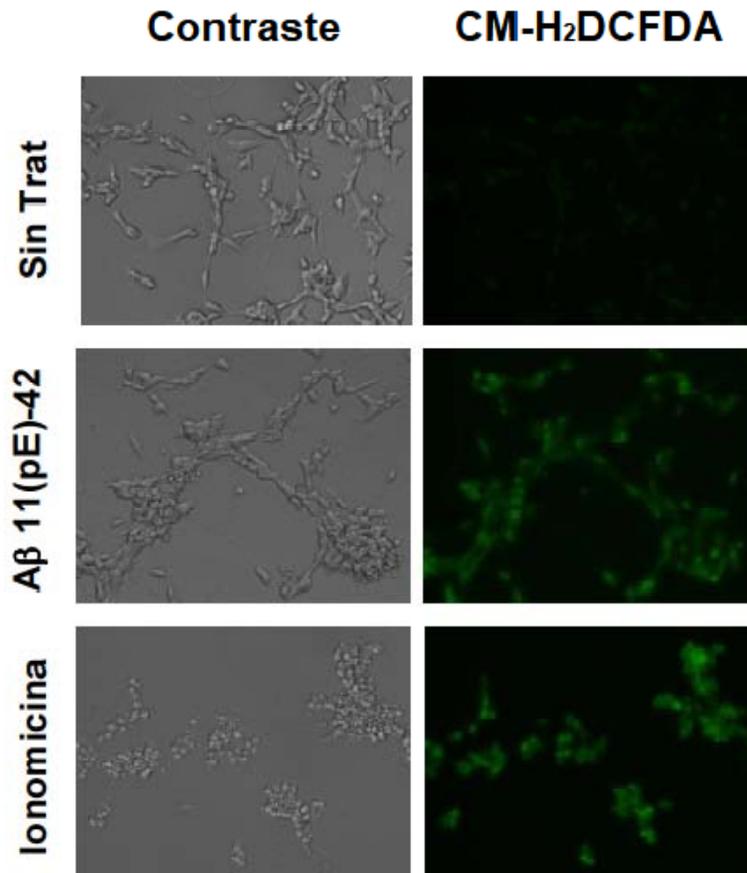


Figura 9. Formación de especies reactivas de oxígeno promovida por los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42, analizada por microscopía de epifluorescencia.

## Incremento en los niveles de calcio intracelular inducido por los oligómeros de A $\beta$ 11(pE)-42 en las líneas celulares IMR-32 y SH-SY5Y.

Es reconocido que A $\beta$  altera la homeostasis de calcio e incrementa los niveles intraneuronales de iones Ca<sup>2+</sup>. Mediciones directas de calcio intracelular mostraron que la exposición de células al péptido A $\beta$ 1-42 provoca un aumento en la concentración de iones Ca<sup>2+</sup>, [43], esto ha llevado a pensar en la posibilidad de que A $\beta$  podría ser un formador de canales iónicos. Por tal motivo, se decidió medir, por citometría de flujo, los cambios en los niveles intracelulares de calcio provocados por la exposición de las líneas celulares de neuroblastoma a los oligómeros del péptido A $\beta$ 11(pE)-42. Para esto se utilizó el reactivo Fluo-4 AM, el cual exhibe una gran intensidad de fluorescencia al unirse a Ca<sup>2+</sup>. Los datos obtenidos mostraron un claro incremento en las intensidades medias de fluorescencia de las células. Para la línea celular SH-SY5Y (Figura 10), el incremento, comparado con las células tratadas sólo con el vehículo y el control negativo 35-25, fue de aproximadamente el 50%, resultado que es estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, en la línea IMR-32 (Figura 11) el incremento en la fluorescencia fue del 30%, como resultado del flujo intracelular de calcio provocado por estos péptidos.

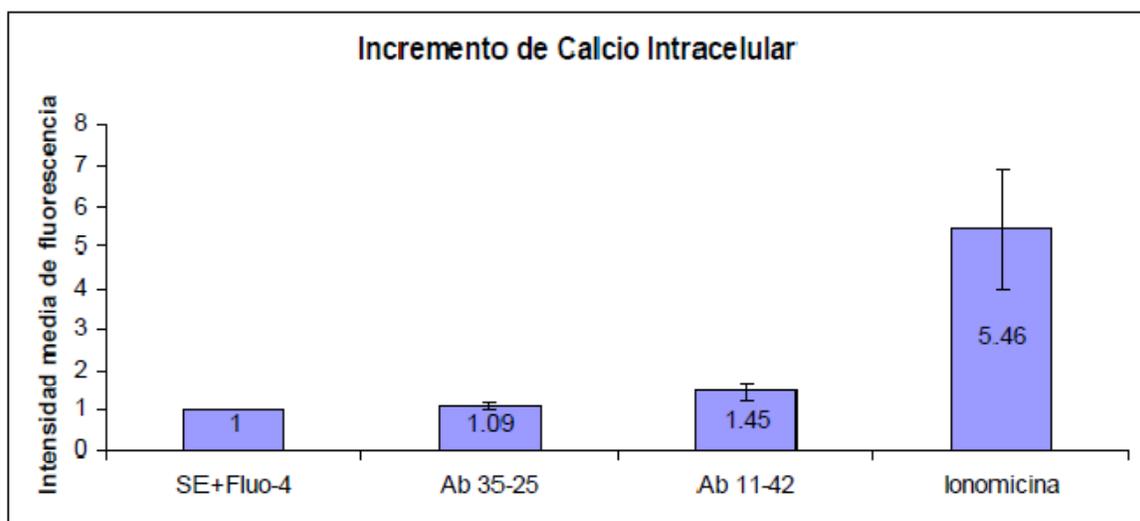


Figura 10. Incremento de calcio intracelular en las células SH-SY5Y.

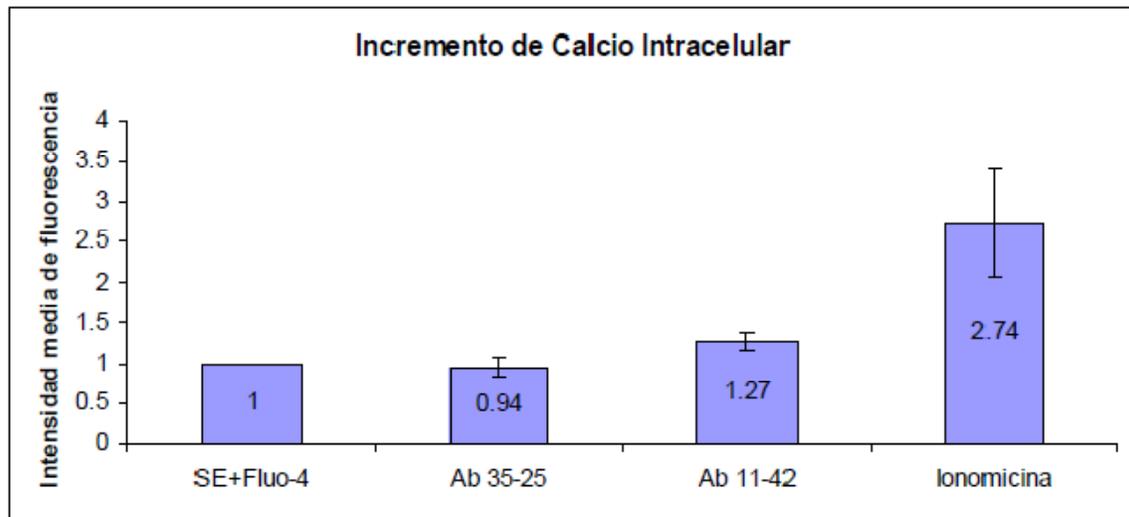


Figura 11. Incremento de calcio intracelular en las células IMR-32.

## CONCLUSIONES

- La caracterización de la formación de agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42, mostró que bajo nuestras condiciones de trabajo, se generan principalmente trímeros, tetrámeros y oligómeros mayores a 40 kDa.
- Se generaron anticuerpos, utilizando como inmunógeno al péptido A $\beta$ 11(pE)-42, que reconocieron agregados naturales tanto del péptido de longitud completa A $\beta$ 1-42, como a los péptidos amino truncados/modificados en tejido cerebral de pacientes con EA.
- La exposición a los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 provocó una disminución en la viabilidad celular dosis dependiente en células IMR-32.
- Se demostró por primera vez que los oligómeros del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 promueven la externalización de fosfatidilserina, aumentan la permeabilidad membranar e inducen fragmentación de ADN en las células SH-SY5Y.
- Se mostró por primera vez que los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 inducen la activación de caspasas 3 y 7, lo que sugiere que se trata de una muerte de tipo apoptótica.
- Los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno en células de neuroblastoma SH-SY5Y.
- Se observó por primera vez, que los agregados del péptido A $\beta$ 11(pE)-42 causan un aumento en los niveles intracelulares de calcio.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Yaari, R. and J. Corey-Bloom, *Alzheimer's disease*. Semin Neurol, 2007. **27**(1): p. 32-41.
2. Slooter, A.J. and C.M. van Duijn, *Genetic epidemiology of Alzheimer disease*. Epidemiol Rev, 1997. **19**(1): p. 107-19.
3. Hebert, L.E., et al., *Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census*. Arch Neurol, 2003. **60**(8): p. 1119-22.
4. LaFerla, F.M., K.N. Green, and S. Oddo, *Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(7): p. 499-509.
5. Tsai, J., et al., *Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches*. Nat Neurosci, 2004. **7**(11): p. 1181-3.
6. Hoyer, S., *The aging brain. Changes in the neuronal insulin/insulin receptor signal transduction cascade trigger late-onset sporadic Alzheimer disease (SAD). A mini-review*. J Neural Transm, 2002. **109**(7-8): p. 991-1002.
7. Masters, C.L. and K. Beyreuther, *Alzheimer's centennial legacy: prospects for rational therapeutic intervention targeting the A $\beta$  amyloid pathway*. Brain, 2006. **129**(Pt 11): p. 2823-39.
8. Haass, C. and D.J. Selkoe, *Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(2): p. 101-12.
9. Kim, J., J.M. Basak, and D.M. Holtzman, *The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease*. Neuron, 2009. **63**(3): p. 287-303.
10. Okuizumi, K., et al., *Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease*. Nat Genet, 1995. **11**(2): p. 207-9.
11. Herz, J. and U. Beffert, *Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease*. Nat Rev Neurosci, 2000. **1**(1): p. 51-8.
12. Koudinov, A.R. and T.T. Berezov, *Alzheimer's amyloid-beta (A $\beta$ ) is an essential synaptic protein, not neurotoxic junk*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2004. **64**(1): p. 71-9.
13. Enserink, M., *First Alzheimer's diagnosis confirmed*. Science, 1998. **279**(5359): p. 2037.
14. Butterfield, D.A. and C.M. Lauderback, *Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(11): p. 1050-60.
15. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **120**(3): p. 885-90.
16. Thinakaran, G. and E.H. Koo, *Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29615-9.
17. Crouch, P.J., et al., *Mechanisms of A $\beta$  mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(2): p. 181-98.

18. Larner, A.J., *Hypothesis: amyloid beta-peptides truncated at the N-terminus contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 1999. **20**(1): p. 65-9.
19. Youssef, I., et al., *N-truncated amyloid-beta oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis*. Neurobiol Aging, 2007.
20. Luhrs, T., et al., *3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(48): p. 17342-7.
21. Vanderstichele, H., et al., *Amino-truncated beta-amyloid42 peptides in cerebrospinal fluid and prediction of progression of mild cognitive impairment*. Clin Chem, 2005. **51**(9): p. 1650-60.
22. Naslund, J., et al., *Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(18): p. 8378-82.
23. Piccini, A., et al., *beta-amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease*. J Biol Chem, 2005. **280**(40): p. 34186-92.
24. Liu, K., et al., *Characterization of Abeta11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated Abeta species in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 2006. **112**(2): p. 163-74.
25. Harigaya, Y., et al., *Amyloid beta protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(2): p. 422-7.
26. Shirotani, K., et al., *Generation of amyloid beta peptide with pyroglutamate at position 3 in primary cortical neurons*. Neurosci Lett, 2002. **327**(1): p. 25-8.
27. Russo, C., et al., *Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AbetaN3(pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival*. J Neurochem, 2002. **82**(6): p. 1480-9.
28. Willem, M., et al., *beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 increases amyloid deposition in brain parenchyma but reduces cerebrovascular amyloid angiopathy in aging BACE x APP[V717I] double-transgenic mice*. Am J Pathol, 2004. **165**(5): p. 1621-31.
29. Sun, A., et al., *Localization of beta-secretase memapsin 2 in the brain of Alzheimer's patients and normal aged controls*. Exp Neurol, 2002. **175**(1): p. 10-22.
30. Sun, X., G. He, and W. Song, *BACE2, as a novel APP theta-secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome*. Faseb J, 2006. **20**(9): p. 1369-76.
31. Farzan, M., et al., *BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): p. 9712-7.
32. Andrau, D., et al., *BACE1- and BACE2-expressing human cells: characterization of beta-amyloid precursor protein-derived catabolites, design of a novel fluorimetric assay, and identification of new in vitro inhibitors*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25859-66.
33. Huse, J.T., et al., *Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 16278-84.

34. Fukumoto, H., et al., *Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease*. Arch Neurol, 2002. **59**(9): p. 1381-9.
35. Liu, K., R.W. Doms, and V.M. Lee, *Glu11 site cleavage and N-terminally truncated A beta production upon BACE overexpression*. Biochemistry, 2002. **41**(9): p. 3128-36.
36. Cynis, H., et al., *Inhibition of glutaminyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1764**(10): p. 1618-25.
37. Schilling, S., et al., *Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology*. Nat Med, 2008. **14**(10): p. 1106-11.
38. Canevari, L., A.Y. Abramov, and M.R. Duchen, *Toxicity of amyloid beta peptide: tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress*. Neurochem Res, 2004. **29**(3): p. 637-50.
39. Shelat, P.B., et al., *Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons*. J Neurochem, 2008. **106**(1): p. 45-55.
40. Resende, R., et al., *Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(12): p. 2051-7.
41. Klein, W.L., *Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets*. Neurochem Int, 2002. **41**(5): p. 345-52.