



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA Ciencias Bioquímicas

**Relaciones entre la toxicidad inducida por homocisteína,  
colesterol y  $\text{Cu}^{2+}$  en presencia del péptido  $\beta$ -amiloide:  
implicaciones para la Enfermedad de Alzheimer**

### T E S I S

**Que para obtener el grado de:  
Maestra en Ciencias**

**P r e s e n t a**

**LIBB Aydé Mendoza Oliva**

**Directora de tesis:**

**Dra. Ana Clorinda Arias Álvarez**



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.





*Si yo pudiera enumerar cuánto debo a mis grandes  
antecesores y contemporáneos, no me quedaría mucho en  
propiedad*

*Johann W. Goethe*

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la **Dra. Clorinda Arias Álvarez** en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. La realización de este trabajo recibió apoyo de CONACYT 48663.

Agradecemos a la **QFB. Patricia Ferrera Boza** su asesoría y ayuda técnica durante la realización de este trabajo.

Agradecemos a los sinodales: **Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dr. José Pedraza Chaverri, Dr. Emilio Rojas del Castillo, Dr. Armando Tovar Palacio** y al **Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo**, sus comentarios y sugerencias durante la revisión de este trabajo.

	<b>Pág.</b>
<b><i>Abreviaturas</i></b>	<b><i>I</i></b>
<b><i>Resumen</i></b>	<b><i>II</i></b>
<b><i>Introducción</i></b>	<b><i>8</i></b>
<i>La Enfermedad de Alzheimer</i>	<i>8</i>
<i>Mecanismos bioquímicos de la enfermedad de Alzheimer</i>	<i>9</i>
<i>El péptido <math>\beta</math>-amiloide y la proteína Tau: proteínas asociadas a la EA</i>	<i>9</i>
<i>Daño neuronal en Alzheimer inducido por estrés oxidante</i>	<i>11</i>
<i>El cobre y su relación con la EA</i>	<i>13</i>
<i>El péptido <math>\beta</math>-amiloide y el cobre</i>	<i>14</i>
<i>El colesterol y el Alzheimer</i>	<i>15</i>
<i>Metabolismo del colesterol en el cerebro</i>	<i>16</i>
<i>La Hcy y su relación con la demencia de Alzheimer</i>	<i>19</i>
<i>Metabolismo de la Hcy y sus posibles alteraciones</i>	<i>19</i>
<i>Neurotoxicidad mediada por Hcy</i>	<i>20</i>
<i>Participación de la Hcy en el estrés oxidante</i>	<i>21</i>

<i>La Hcy y el péptido <math>\beta</math>-amiloide</i>	22
<i>Relación de la Hcy en el metabolismo del colesterol</i>	23
<b><i>Justificación</i></b>	24
<b><i>Planteamiento del problema</i></b>	24
<b><i>Hipótesis</i></b>	24
<b><i>Objetivo general</i></b>	25
<i>Objetivos particulares</i>	25
<b><i>Metodología</i></b>	26
<i>Mantenimiento del cultivo de neuronas</i>	26
<i>Ensayos de viabilidad celular</i>	26
<i>Cuantificación de la formación de ERO</i>	27
<i>Detección de colesterol en células</i>	27
<i>Cuantificación de colesterol</i>	28
<i>Análisis Estadístico</i>	29
<b><i>Resultados</i></b>	30
<b><i>Discusión</i></b>	43

*Conclusiones generales*

48

*Referencias*

50

APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora del amiloide
A $\beta$	Proteína $\beta$ -amiloide
Col	Colesterol
CuCl <sub>2</sub>	Cloruro de cobre
EA	Enfermedad de Alzheimer
ERO	Especies reactivas de oxígeno
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
Hcis	Homocistina
Hcy	Homocisteína
HMGCoAR	3-hidroxi-3metilglutaril-CoA reductasa
MSN	Células de neuroblastoma humano
MTT	3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolio
SNC	Sistema Nervioso Central

Recientemente se ha relacionado a la homocisteína (Hcy) como un factor de riesgo para la Enfermedad de Alzheimer (EA) debido a las altas concentraciones de este metabolito y el daño en el tejido nervioso encontrado en estos pacientes. La Hcy puede potenciar la toxicidad de la proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) implicada en la EA incrementando la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Sin embargo, el mecanismo por el cual la Hcy contribuye al desarrollo de la enfermedad no se conoce. Además de su implicación para la EA, también se ha relacionado a la Hcy con la acumulación de colesterol en algunos tipos celulares. El estudio de esta relación en el SNC resulta interesante debido a que se ha sugerido que alteraciones en la concentración de colesterol en el cerebro pueden incrementar la producción de  $A\beta$ . Además se ha planteado que las altas concentraciones de colesterol pueden contribuir al estrés oxidante en las células, participando en reacciones redox entre el  $A\beta$  y metales como el cobre ( $Cu^{2+}$ ). Debido a que existe evidencia de una posible relación entre la Hcy y su influencia en el metabolismo de colesterol, en el presente trabajo analizamos las relaciones que existen entre estos factores, Hcy, colesterol y  $Cu^{2+}$  en la toxicidad del  $A\beta$ .

Utilizando un modelo de neuroblastoma humano (MSN) encontramos que la Hcy puede inducir la formación de ERO y potenciar la toxicidad del  $Cu^{2+}$  y del colesterol. Nuestros resultados indican que la Hcy promueve la síntesis y/o acumulación de colesterol. Por otro lado, el colesterol potencia la toxicidad de  $A\beta$ , y la co-incubación con  $A\beta$ - $Cu^{2+}$ -colesterol incrementa de manera adicional la muerte neuronal. Estos resultados sugieren relaciones importantes entre la Hcy, que es capaz de incrementar el colesterol neuronal, y la presencia de complejos  $A\beta$ - $Cu^{2+}$  que a su vez pueden promover la producción de ERO a partir del colesterol y aumentar la muerte neuronal.

### *La Enfermedad de Alzheimer*

Fue hace más de cien años cuando el médico alemán Alois Alzheimer describió por primera vez el caso de Auguste D, una mujer de 51 años que había ingresado al hospital cinco años antes de morir con una serie de síntomas que incluían problemas graves de memoria, comprensión, lenguaje, desorientación, alucinaciones y comportamiento. Alzheimer describió también las características neuropatológicas de la enfermedad que hoy lleva su nombre (Alzheimer, 1907). Desde entonces esta patología se ha convertido en un serio problema de salud para las personas de la tercera edad.

Con el aumento de la esperanza de vida el número de personas que padecen esta enfermedad ha crecido considerablemente, ya que el principal factor de riesgo es el envejecimiento por lo cual la EA es ahora también en un problema epidemiológico, social y económico, particularmente en los países con una alta expectativa de vida (para revisión ver Gelmacher *et al.*, 1996; Llibre, 1999 )

La EA es la forma más común de demencia neurodegenerativa, es una afección cerebral progresiva que presenta deterioro cognitivo y trastornos conductuales. La alteración de la memoria es una característica necesaria para el diagnóstico de esta o de cualquier otro tipo de demencia. También se debe presentar cambio en una de las siguientes áreas: lenguaje, capacidad de la toma de decisiones, juicio, atención y otras áreas de la función mental. La velocidad de progresión de la enfermedad es diferente para cada persona (para revisión ver Moore, 2004; Rakel, 2005).

La EA se puede clasificar de acuerdo a la edad de comienzo en: presenil o de inicio precoz, la cual aparece antes de los 65 años y senil o de inicio tardío, que aparece después de los 65 años. De acuerdo a la presencia o ausencia de antecedentes familiares de la enfermedad se clasifica en EA familiar y EA esporádica, respectivamente (para revisión ver López-Pousa, 1998).

La causa de la EA no se conoce, pero se cree que abarca tanto factores genéticos como ambientales, por lo que es difícil establecer su prevención. Además de la edad existen otros factores de riesgo para padecer la enfermedad los cuales incluyen: los antecedentes familiares con EA, presión arterial alta por mucho tiempo, las dietas muy altas en grasas, antecedentes de

traumatismo craneal, niveles altos de metabolitos como Hcy y el colesterol, una vida sedentaria y la estimulación cognoscitiva pobre (Clarke *et al.*, 1998; Kalaria *et al.*, 2002; Vermeer *et al.*, 2002; Breteler, 2000; Sadowski *et al.* 2004; Meyer *et al.*, 2000; Schonknecht *et al.*, 2002)

### ***Mecanismos bioquímicos de la enfermedad de Alzheimer***

Existen numerosas teorías acerca de la etiología de la EA, entre las cuales se encuentran la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide, el estrés oxidante, el daño cerebrovascular por homocisteinemia y colesterolemia, la hiperfosforilación de la proteína Tau, entre otras. En este trabajo pondremos especial atención a las primeras cuatro, debido a que existe evidencia de su posible interrelación durante el envejecimiento y en la EA. Comenzaremos con una breve descripción de estos factores asociados a la EA y los posibles mecanismos patológicos involucrados.

#### ***El péptido $\beta$ -amiloide y la proteína Tau: proteínas asociadas a la EA***

Más de setenta años después de la primera descripción de la EA los investigadores Glenner y Woong (1984) identificaron la naturaleza química de una de las sustancias que se deposita en el cerebro de pacientes con esta enfermedad: el péptido  $\beta$ -amiloide. A partir de entonces muchos trabajos al respecto han encontrado una asociación entre la EA y la presencia de esta proteína en el cerebro. Sin embargo, hasta el momento se desconoce de que manera participa, que genera su sobreproducción y acumulación en esta enfermedad. Lo que queda claro es que su presencia provoca importantes cambios morfológicos en las terminales sinápticas (DeKosky *et al.*, 1996; Mungarro-Menchaca *et al.*, 2002). La pérdida excesiva de sinapsis neuronales en la EA parece ser responsable de los defectos cognitivos que caracterizan a esta enfermedad. Algunos datos sugieren que las sinapsis son posiblemente los sitios en los que la cascada de degeneración inicia y de hecho la pérdida de la proteína sinaptofisina (asociada a las sinapsis) se ha usado como un marcador de neurodegeneración (Masliah *et al.*, 1991). En animales transgénicos que expresan la proteína APP mutada también se ha observado la formación de placas amiloidogénicas en las sinapsis con la progresiva degeneración de éstas (Cole *et al.*, 1999). Algunas evidencias sustentan la idea de que ciertos eventos que provocan la muerte neuronal en EA pueden iniciarse con la activación local de caspasas en las regiones sinápticas a través del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Mattson *et al.*, 2000). La degeneración progresiva de las neuronas observada en la EA puede provenir tanto de la toxicidad del  $\beta$ -amiloide como de otra proteína llamada Tau, la cual también se altera bioquímicamente y provoca la muerte de las neuronas. Estas proteínas se acumulan y se

manifiestan como lesiones neuropatológicas que consisten en placas neuríticas compuestas por depósitos extracelulares de  $\beta$ -amiloide (placas de  $\beta$ -amiloide) y/o de ovillos intraneuronales formados por neurofibrillas de filamentos enrollados de la proteína Tau (tau-PHF) (Kidd, 1963; Wisniewski *et al.*, 1976).

La formación de ovillos neurofibrilares se inicia en la región del hipocampo en la que reside la función de la gestión de la memoria. Los microtúbulos y sus proteínas asociadas juegan un papel importante en el transporte axonal, en la morfología, plasticidad y degeneración neuronal (Vale *et al.*, 1985; Dinsmore y Solomon, 1991; Arias *et al.*, 1993). Se ha propuesto que el daño a los microtúbulos es suficiente para inducir la muerte neuronal (Bonfoco *et al.*, 1996; Mercado-Gómez *et al.*, 2004). Las Tau son proteínas microtubulares cuya función es la de estabilizar a los microtúbulos axonales a través de su interacción con tubulina. Se caracterizan por fosforilarse fácilmente, permitiendo con esta reacción regular el tráfico en los axones de las neuronas. En la EA se produce un fenómeno de hiperfosforilación anormal que provoca la formación de los complejos proteínas tau-PHF que afectan el flujo axoplásmico, la morfología y el funcionamiento normal de las neuronas favoreciendo la neurodegeneración (Wisniewski *et al.*, 1988; Ksiazek-Reding *et al.*, 1992; Alonso *et al.*, 1994; Alonso *et al.*, 1996; Poorkaj *et al.*, 1998).

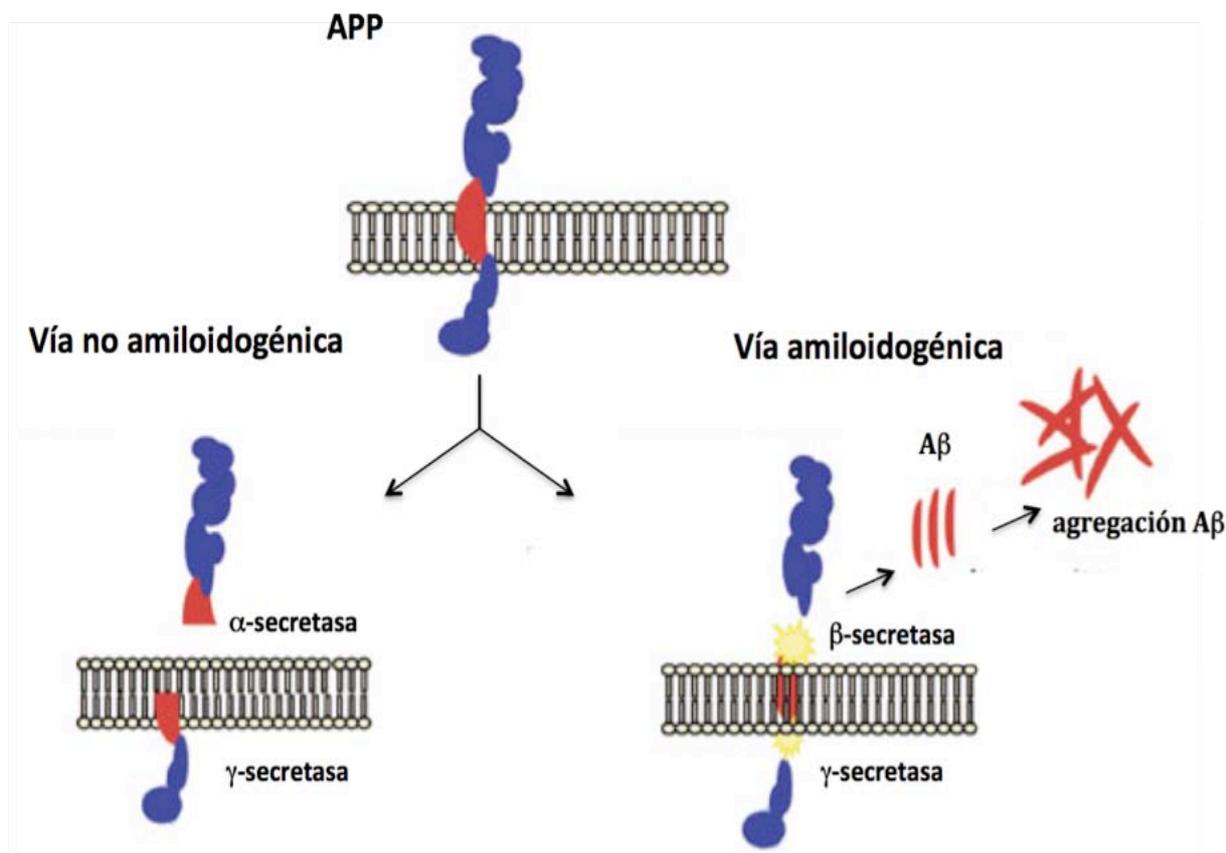
El péptido principal de las placas neuríticas es el  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) (Miller, 1993). El  $A\beta$  es un péptido hidrofóbico con una longitud variable de 39-43 residuos de aminoácidos. La isoforma de 42 aminoácidos ( $A\beta$ -42) es el péptido que presenta mayor toxicidad (Vigo-Pelfrey, 1993). El péptido  $A\beta$  es derivado de una proteína transmembranal, la proteína precursora de amiloide (APP) (Kang, 1987). La APP es codificada por un gen localizado en el cromosoma 21 y tiene las características estructurales de las proteínas de membrana, un largo segmento extracelular amino terminal y un corto segmento intracelular carboxilo terminal (Robakis, 1987; Rossonjohn *et al.*, 1999). El gen *app* contiene 18 exones y origina una familia de al menos 10 isoformas transmembranales diferentes, las cuales se diferencian por la presencia o ausencia de los exones 7, 8, 9 y 15. Las neuronas expresan principalmente la isoforma APP<sub>695</sub> (Coulson *et al.*, 2000). La función de APP aún no se conoce, pero se piensa que interviene como receptor ligado a proteínas G, por medio de las cuales envía señales químicas al interior de la célula (Murayama *et al.*, 1996). En algunos trabajos se ha sugerido que APP funciona como receptor de iones de cobre para transportarlos al interior celular (White *et al.*, 1999).

Después de que es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, la APP atraviesa por el aparato de Golgi donde es glicosilada y empaquetada en vesículas de transporte para atravesar el citoplasma y por último, insertarse en la membrana celular. La APP es procesada mediante la acción de diversas proteasas, mediante un mecanismo donde se compete por la misma parte de la proteína. La primera vía, la más común, conocida como la vía no amiloidogénica, se previene la formación del péptido A $\beta$ , y se impide la formación de depósitos. En esta una proteasa, conocida como  $\alpha$ -secretasa, realiza un corte en la APP de manera que libera un fragmento extracelular, soluble, de unos 695 aminoácidos. La parte que queda integrada en la membrana es procesada después mediante la acción de una segunda enzima,  $\gamma$ -secretasa, que libera la parte carboxilo terminal de la proteína, posiblemente dentro de vesículas lisosomales para su posterior degradación (para revisión ver Hardy, 1992 y Hardy, *et al.*, 1996.) (Fig. 1).

Sin embargo, una parte de la APP es procesada de manera diferente en la vía que se conoce como amiloidogénica en la cual, otra secretasa,  $\beta$ -secretasa, corta la APP liberando un fragmento carboxilo terminal más largo, que tras ser procesado por la  $\gamma$ -secretasa, libera el péptido A $\beta$  (Fig. 1). Este péptido tiene una solubilidad limitada y forma autoagregados que constituyen las fibras insolubles que se encuentran en las placas seniles. La acción de la  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa produce diversos tipos de péptidos. La forma más común, relativamente soluble, tiene 40 aminoácidos (A $\beta$ -40), mientras que otras formas tienen una longitud de 42 o 43 residuos (A $\beta$  42-43). Estas últimas son mucho más insolubles que las primeras y forman fibras con características cinéticas mucho más rápidas (Hardy, 1992 y Hardy, *et al.*, 1996.).

### ***Daño neuronal en Alzheimer inducido por estrés oxidante***

El estrés oxidante se define como la perturbación en el balance prooxidante-antioxidante de la célula. La generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) como el anión superóxido (O $_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrogeno (H $_2$ O $_2$ ), el oxígeno en singulete ( $^1$ O $_2$ ), el radical hidroxilo (HO $\cdot$ ) y el radical peroxil (ROO $\cdot$ ) proceden de daño tóxico o se forman durante procesos metabólicos normales como en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. Bajo condiciones fisiológicas normales, enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa, y las catalasas previenen la formación o acumulación de estos metabolitos derivados del oxígeno. Sin embargo, la sobreproducción de oxidantes o la disfunción de las defensas antioxidantes pueden resultar en estrés oxidante, y en el mayor de los casos dañar a las macromoléculas biológicas (para revisión ver Ceccatlli *et al.*, 2007).



**Fig. 1 Procesamiento de APP.** Vía no amiloidogénica: normalmente, la proteína APP es procesada por la acción secuenciada de dos enzimas: la  $\alpha$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa. Vía amiloidogénica: la APP es procesada por una tercera enzima, la  $\beta$ -secretasa, realiza un corte en la APP de tal manera que, tras la sucesiva actuación de la  $\gamma$ -secretasa se origina el péptido A $\beta$  (Modificado de: De Jesus *et al.*, 1999).

El estrés oxidante está implicado en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos de el sistema nervioso como el envejecimiento y algunas condiciones neurodegenerativas en las que se incluyen las enfermedades de Parkinson, Alzheimer y Huntington (para revisión ver Emerit *et al.*, 2004). Esto podría deberse a que el sistema nervioso es particularmente vulnerable al estrés oxidante debido a su alta tasa del metabolismo energético neuronal. Además, el cerebro presenta una disminución de las actividades enzimáticas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) en comparación con otros tejidos y presenta una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados que pueden ser oxidados (Ceccatli *et al.*, 2007).

La investigación en este campo ha revelado la presencia de productos de la oxidación de proteínas, lípidos y DNA en tejidos de pacientes con la EA, lo cual es un indicativo del

incremento en el estrés oxidante (Subbarao *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1997; Butterfield y Lauderback, 2002; Butterfield y Boyd-Kimball, 2004). Apoyando esta idea en estudios *in vitro* se demostró que el A $\beta$  promueve el estrés oxidante y la lipoperoxidación en sinaptosomas y en cultivos neuronales (Mark *et al.*, 1997; Keller *et al.*, 1997; Yatin *et al.*, 1999).

En estudios recientes se demostró que el daño oxidante en la EA puede resultar de la interacción entre metales de transición altamente reactivos como el cobre (Cu<sup>2+</sup>) y de moléculas endógenas reductoras y/o oxidantes en el cerebro. Dentro de estas moléculas se encuentran el colesterol y la Hcy. Estudios epidemiológicos han señalado a la Hcy y al colesterol como factores de alto riesgo en la EA, además se ha sugerido su participación en la sobreproducción y toxicidad de A $\beta$ . A pesar de que se sabe mucho acerca del metabolismo de estos agentes no se conoce el mecanismo por el cual contribuyen al desarrollo de la enfermedad. En el presente trabajo decidimos analizar cuales son las relaciones tóxicas entre estos agentes y el péptido A $\beta$ .

### ***El cobre y su relación con la EA***

Nuevas evidencias han sugerido la participación de iones metálicos en la progresión de enfermedades neurodegenerativas como es el caso de EA. El cerebro es particularmente susceptible al déficit o al exceso de cobre, ya que es extremadamente sensible al estrés oxidante (para revisión ver Brewer, 2003).

El cobre funciona como cofactor de algunas proteínas, cataliza reacciones de transferencia de electrones en el metabolismo celular. El exceso de este metal puede resultar en la oxidación excesiva de proteínas, lípidos, DNA y otros componentes celulares con subsecuente daño a los tejidos. El cobre también se puede unir a residuos de histidinas y cisteínas en las proteínas, provocando la inactivación de éstas (Balamurugan y Schaffner 2006).

La absorción de cobre de la dieta se lleva a cabo en el duodeno en el intestino delgado y es removido de la circulación por los hepatocitos en el hígado, el órgano con la mayor concentración de cobre. La excreción biliar es el principal mecanismo fisiológico para la eliminación de cobre (Gitlin, 2003). La proteína plasmática hCtrl1 es la encargada de transportar el cobre al cerebro y está presente en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica.

El transporte de cobre es dependiente del estado de oxidación de éste, solamente el cobre reducido puede ser transportado. El metabolismo intracelular de cobre es dependiente de

ATPasas transportadoras de cobre como Atp7a y Atp7b (Petris *et al.*, 1996). La concentración de cobre en el cerebro es de 0.36 mg/100 g y se distribuye de manera diferencial siendo los ganglios basales, la corteza, el hipocampo y el cerebelo las estructuras donde más se acumula dicho metal.

### ***El péptido $\beta$ amiloide y el cobre***

La APP y el péptido A $\beta$  están estrechamente relacionadas al metabolismo de cobre. Se ha sugerido la participación de APP como una proteína transportadora de cobre (White, 1999). La APP tiene dos sitios de unión al cobre, incluyéndose un sitio en la secuencia del péptido A $\beta$ . La APP une Cu<sup>2+</sup> mediante dos histidinas conservadas en una región rica en cisteínas y que muestra alta homología estructural con chaperonas de cobre (Atwood *et al.*, 1998; Barnham *et al.*, 2003). La sobreexpresión de APP en ratones transgénicos parece reducir los niveles de cobre en el cerebro, lo que sugiere que APP participe en el transporte de este metal (Maynard *et al.*, 2002; White *et al.*, 1999). En levaduras, la presencia de APP también produce el flujo de cobre hacia el interior celular (Treiber *et al.*, 2004).

En el cerebro de pacientes con EA se han encontrado concentraciones elevadas de cobre, especialmente en las placas  $\beta$ -amiloide (0.4 mM) (Lovell *et al.*, 1998). Se ha identificado que las placas de A $\beta$  son un reservorio de varios metales como el hierro y el zinc además del cobre y se ha considerado que el cobre en estas placas está disponible para la producción de ERO y la contribución al daño neuronal (Bush, 2000).

Existe evidencia que la mayor fuente de ERO asociado a la toxicidad del A $\beta$  son los complejos A $\beta$ -Cu<sup>2+</sup>. Estos complejos están involucrados en reacciones redox que producen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir del oxígeno molecular (Barnham *et al.*, 2004; Smith, 2007). Sin embargo los resultados son contradictorios, por un parte se propone que el Cu<sup>2+</sup> puede ser reducido por el propio A $\beta$ , donde el residuo Met 35 participa como el donador de electrones, por otra parte datos obtenidos por medio de espectroscopía de rayos X demostraron que el A $\beta$  no es capaz de reducir al cobre por si solo, lo que sugiere que esta reducción requiere de la participación de otros agentes biológicos (Huang *et al.*, 1999; Opazo *et al.*, 2002; Streltsov y Varghese 2008).

De acuerdo con experimentos *in vitro*, APP participa como transportador de electrones al Cu<sup>2+</sup>. La reducción de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup> por APP resulta en la oxidación de las cisteínas 144 y 158 en APP con la formación de un puente disulfuro. Esta reacción es muy específica ya que APP no une ni reduce otros metales en dichas posiciones (Multhaup *et al.*, 1996). Una vez que el Cu<sup>+</sup> es

formado, puede producir ERO en presencia de peróxidos como en la siguiente reacción tipo Fenton:



Se sabe que a nivel molecular, todos los aminoácidos son blanco del ataque del radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), sin embargo los aminoácidos Pro, Arg y Lys son preferidos para su oxidación, de estos aminoácidos oxidados se ha visto un incremento en el hipocampo de cerebros de pacientes con Alzheimer (Multhaup *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1996).

En algunos estudios se ha probado la eficacia de quelantes de cobre en la disminución de los cambios bioquímicos y de comportamiento en EA, confirmando el papel del cobre en la patogénesis de esta enfermedad e indicando una nueva terapéutica en la prevención y tratamiento (Cherny *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2002).

### ***El colesterol y el Alzheimer***

Basados en diferentes estudios *in vitro* se ha postulado que la mayor cantidad de ERO en EA se forma en los complejos  $\text{A}\beta\text{-Cu}^{2+}$  a partir de la oxidación de compuestos endógenos de la célula, que funcionan como fuente de electrones en reacciones de óxido-reducción. Algunas evidencias sugieren que el colesterol es el sustrato en la formación de ERO en vista de la abundancia de este compuesto en el SNC (Barnham *et al.*, 2004).

Además de esta propuesta en algunos trabajos se ha demostrado que existe relación estrecha entre esta enfermedad y el daño vascular en el cerebro (Sparks *et al.*, 1990; Sparks *et al.*, 2000). La hipertensión, antecedentes de infarto, la diabetes mellitus y la hipercolesterolemia son factores de alto riesgo para padecer esta enfermedad (De la Torre *et al.*, 2004; Kalaria 2002; Vermeer *et al.*, 2002.) Existe también evidencia creciente que un incremento en la liberación de colesterol provoca la degeneración de las sinapsis (Schonknecht *et al.*, 2002). De hecho, la presencia en humanos del alelo  $\epsilon 4$  de la apolipoproteína E, la cual está asociada a altos niveles de colesterol es otro factor de riesgo de desarrollar esta enfermedad (Notkola *et al.*, 1998). Se ha descrito que el uso de estatinas, una clase de fármacos que bajan los niveles de colesterol también disminuyen el riesgo de sufrir EA (Jick *et al.*, 2000).

El factor crítico en el análisis de estos datos es tener en cuenta que el cerebro obtiene el colesterol principalmente de la síntesis *de novo*. Debido a esto es probable que los estudios sobre

el colesterol plasmático no se correlacionen de manera sustancial con la EA. Sin embargo los estudios epidemiológicos, genéticos, metabólicos y de laboratorio indican que muchos factores de regulación del metabolismo del colesterol están involucrados en la fisiopatología de la EA. El factor de riesgo más prevalente identificado a la fecha es la apolipoproteína E4 (apo  $\epsilon$ 4), que existe tanto en el cerebro como en la periferia.

### ***Metabolismo del colesterol en el cerebro***

El metabolismo del colesterol cerebral es regulado de forma independiente del de la periferia. El colesterol plasmático fluctúa significativamente según la ingesta y su vida media es de horas. Por el contrario, el colesterol del SNC es metabolizado de manera lenta, con una vida media de 6 meses en las ratas y de casi 1 año en los seres humanos. El cerebro es el órgano más rico en colesterol. El colesterol forma parte esencial como componente de las membranas celulares y tiene un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento de la plasticidad y función celular. La homeostasis del colesterol en el cerebro es mantenida por una serie de procesos interdependientes que incluyen la síntesis, almacenamiento, transporte y remoción (para revisión ver Pfrieger, 2003).

Las células gliales y las neuronas pueden sintetizar colesterol de *novo*, además el colesterol puede ser reciclado de sitios extracelulares en el SNC. Esencialmente todo el colesterol utilizado en el cerebro es sintetizado en el SNC. Durante el desarrollo las neuronas sintetizan la mayor parte del colesterol necesario para su crecimiento y sinaptogénesis (Pfrieger, 2003). Las neuronas maduras reducen la síntesis de colesterol endógeno y son dependientes del colesterol sintetizado y secretado por las células gliales (Poirier, 1993). Esta reducción de la síntesis de colesterol endógena en el cerebro adulto tiene como resultado un aumento en el requerimiento de este metabolito, así como de la necesidad de mecanismos energéticos regulados eficientemente, debido a que la síntesis de colesterol involucra una vía con más de 20 reacciones e intermediarios.

La enzima 3-hidroxi-3metilglutaril-CoA reductasa (HMGCoAR) cataliza la formación de mevalonato. Este es el paso limitante en la biosíntesis de colesterol y es un blanco farmacológico importante. Ya que el mevalonato es formado en una etapa temprana, la inhibición de HMGCoAR por estatinas puede reducir el gasto celular energético hasta por 100 moléculas de ATP. Sin embargo la interrupción de este paso puede disminuir la formación de varios productos intermedios con importantes funciones metabólicas. Por ejemplo los isoprenoides, incluyendo a

los farsenil fosfato que son importantes precursores de moléculas involucradas en la señalización celular y la respuesta inflamatoria (Arnaud *et al.*, 2005).

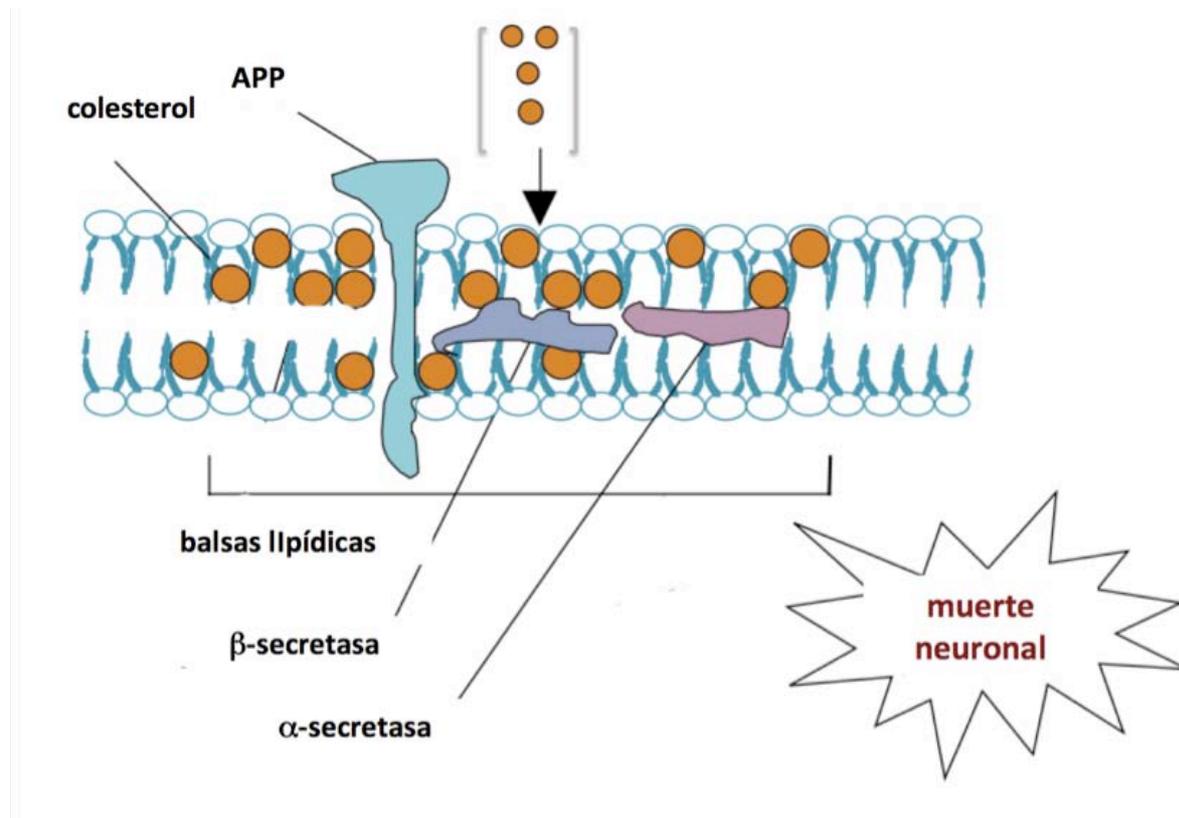
El colesterol es transportado y almacenado en el SNC por varias vías. Los astrocitos además de sintetizar el colesterol también pueden internalizarlo y reciclarlo. El colesterol forma complejos con la apolipoproteína E (APOE) y fosfolípidos y es internalizado por las neuronas para la formación de nuevas membranas y sinapsis. La proteína APOE une al colesterol y se une a su receptor de tipo endocítico. El hígado es el sitio donde se sintetiza la mayor parte de APOE, después de éste el SNC contiene la mayor parte de APOE; siendo esta la lipoproteína que más prevalece en el cerebro. El endosoma que resulta de la internalización del complejo APOE-colesterol- fosfolípidos se fusiona con lisosomas, los cuales contienen las enzimas hidrolíticas necesarias para permitir la liberación intracelular de colesterol libre. El colesterol liberado de esta forma regula negativamente a la HMGCoAR y reduce la síntesis de colesterol endógeno, mientras que la esterificación por la acil-CoA-colesterol aciltransferasa (ACAT) permite su almacenamiento de manera más eficiente (Shobab *et. al.*, 2005)

El paso del colesterol desde la periferia al cerebro es normalmente prevenido por la barrera hematoencefálica, pero cuando su integridad ésta comprometida por daño vascular la entrada de colesterol al SNC se desregula. Las consecuencias de este hecho aún no se comprenden del todo, pero se propone que puede incrementar la concentración de colesterol en las membranas produciendo un efecto adverso en las enzimas secretasas que procesan a la APP.

Mientras que el colesterol sin modificar no atraviesa la barrera hematoencefálica, dos de sus metabolitos oxidados el 27-hidroxicolesterol y el 24-hidroxicolesterol si lo pueden hacer. Los niveles de 24-hidroxicolesterol son mucho mayores en el cerebro y de hecho es el único sitio de síntesis en el cuerpo. Las concentraciones de 27-hidroxicolesterol en el cerebro son diez veces menores que las de 24-hidroxicolesterol y mayores en el plasma sanguíneo. Cuando la barrera hematoencefálica sufre alguna lesión este equilibrio de concentraciones se afecta.

El colesterol influye en la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de la APP durante la producción de A $\beta$ . En estudios realizados en animales se demostró que el exceso de colesterol en la dieta acelera la acumulación de A $\beta$  en el cerebro (Refolo *et al.*, 2000; Shie *et al.*, 2002; Sparks *et al.*, 2000). El mecanismo por el cual el colesterol afecta la producción de A $\beta$  y su metabolismo no está del todo claro. Se piensa que un cambio en las propiedades de la membrana, incluyendo rigidez y fluidez, influyen las actividades de las proteínas y de las

enzimas incluyendo a las  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas, las cuales se encuentran unidas a la membrana en regiones conocidas como balsas lipídicas. El alto contenido de colesterol en las balsas lipídicas facilita el reclutamiento de la  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas con sus sustratos en una óptima configuración, de ésta manera se promueven los rompiamientos patogénicos de la APP (Racchi *et al.*, 1997; Bodovitz *et al.*, 1996) (Fig. 2).



**Fig. 2. El colesterol en la sobreproducción de A $\beta$ .** El colesterol influye en la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de APP durante la producción de A $\beta$  influenciando la actividad de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas, las cuales se encuentran unidas a la membrana en regiones conocidas como balsas lipídicas promoviendo de esta manera la muerte neuronal (Modificado de Shobab *et al.*, 2005).

En trabajos recientes, se ha demostrado que añadiendo péptidos sintéticos de A $\beta$  a cultivos neuronales conteniendo altas concentraciones de colesterol se potencia la neurotoxicidad del A $\beta$ , con un incremento de los niveles de ERO y de lipoperoxidación (Ferrera *et al.*, 2008). Sin embargo, el sustrato real de cual se genera el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en EA aún no se conoce; algunas evidencias sugieren que el colesterol es el sustrato en la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en vista de la abundancia de este compuesto en el SNC. Sustentando esta idea en experimentos *in vitro* ha demostrado que en presencia de colesterol y A $\beta$ -Cu<sup>2+</sup> se lleva a cabo la reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Barnham *et al.*, 2004; Smith, 2007).

En 2003, Sparks y Schreurs demostraron que la combinación de cobre con altos niveles de colesterol incrementa los depósitos de placas A $\beta$  en un modelo de EA en conejos. Dichas placas fueron inducidas a niveles de cobre más bajos que el nivel permitido en el agua de consumo (Sparks y Schreurs 2003).

### ***La Hcy y su relación con la demencia de Alzheimer***

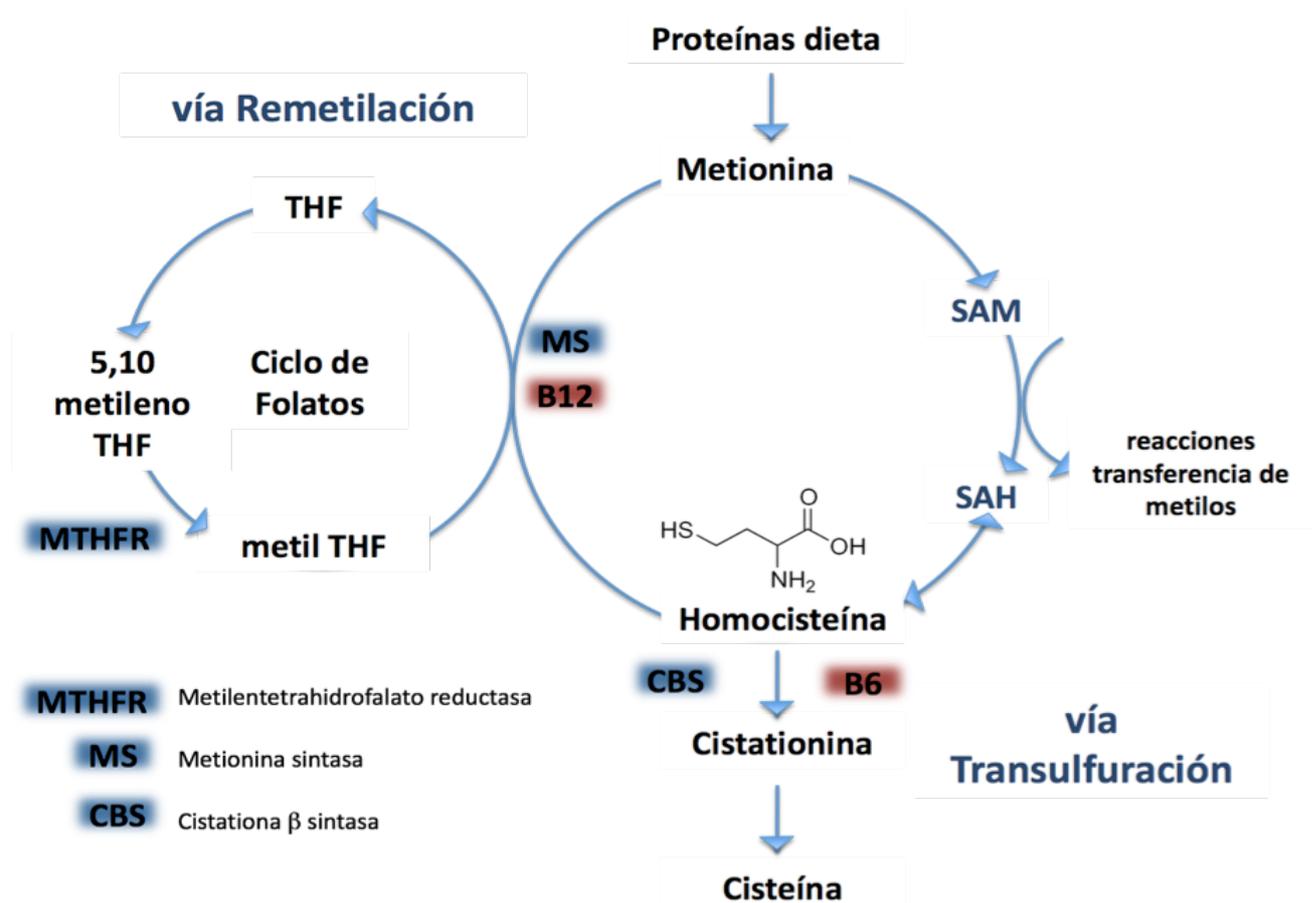
La Hcy es un aminoácido no proteínico presente en el cuerpo. Su metabolismo está unido al de las vitaminas del grupo B, especialmente el ácido fólico, la vitamina B6 y la vitamina B12. Cuando hay deficiencia de alguna de estas vitaminas, los niveles de Hcy en sangre aumentan, esta alteración en el metabolismo se conoce como hiperhomocisteinemia (para revisión ver Pietrzik *et al.*, 1997). Se ha puesto de manifiesto que los niveles sanguíneos elevados de Hcy pueden aumentar el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y recientemente se ha asociado como un factor de alto riesgo en demencias como el Alzheimer (Ravaglia *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2006).

Con base en estudios epidemiológicos enfocados en la asociación de homocisteinemia y el Alzheimer se ha sugerido que el daño vascular puede contribuir al comienzo y progreso de la enfermedad (Seshadri *et al.*, 2006). En reportes en los que los niveles de Hcy están elevados y los de folatos disminuídos, se ha observado una reducción en el número de microvasos sanguíneos, daño en los capilares cerebrales y disfunción de la barrera hematoencefálica de pacientes con EA (Zhu *et al.*, 2007).

### ***Metabolismo de la Hcy y sus posibles alteraciones***

La Hcy es un aminoácido sulfurado, que se forma del metabolismo de la metionina. La Hcy se transforma a cisteína por la vía de transulfuración con la intervención de dos enzimas dependientes de la vitamina B6 (cistationina  $\beta$  sintasa y cistationasa) o puede ser remetilada a metionina, proceso en el que interviene la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) dependiente del ácido fólico y de vitamina B12. Esta enzima cataliza la conversión de 5,10 metilentetrahidrofolato, en una reacción dependiente de NADPH, a 5-metiltetrahidrofolato; este metabolito que se produce en una reacción fisiológica irreversible es uno de los tres dadores del grupo metilo en la conversión de Hcy a metionina por la enzima metionina sintasa (Pietrzik *et al.*, 1997) (Fig. 3).

Hasta el momento no se conoce con exactitud cómo la hiperhomocisteinemia contribuye al desarrollo de la enfermedad cardiovascular. Además los altos niveles de Hcy en plasma están asociados comúnmente a desórdenes genéticos (atrofia de la corteza cerebral) como son mutaciones de las enzimas que participan en su metabolismo y las deficiencias en las vitaminas B6 y B12 (Snowdon *et al.*, 2000).

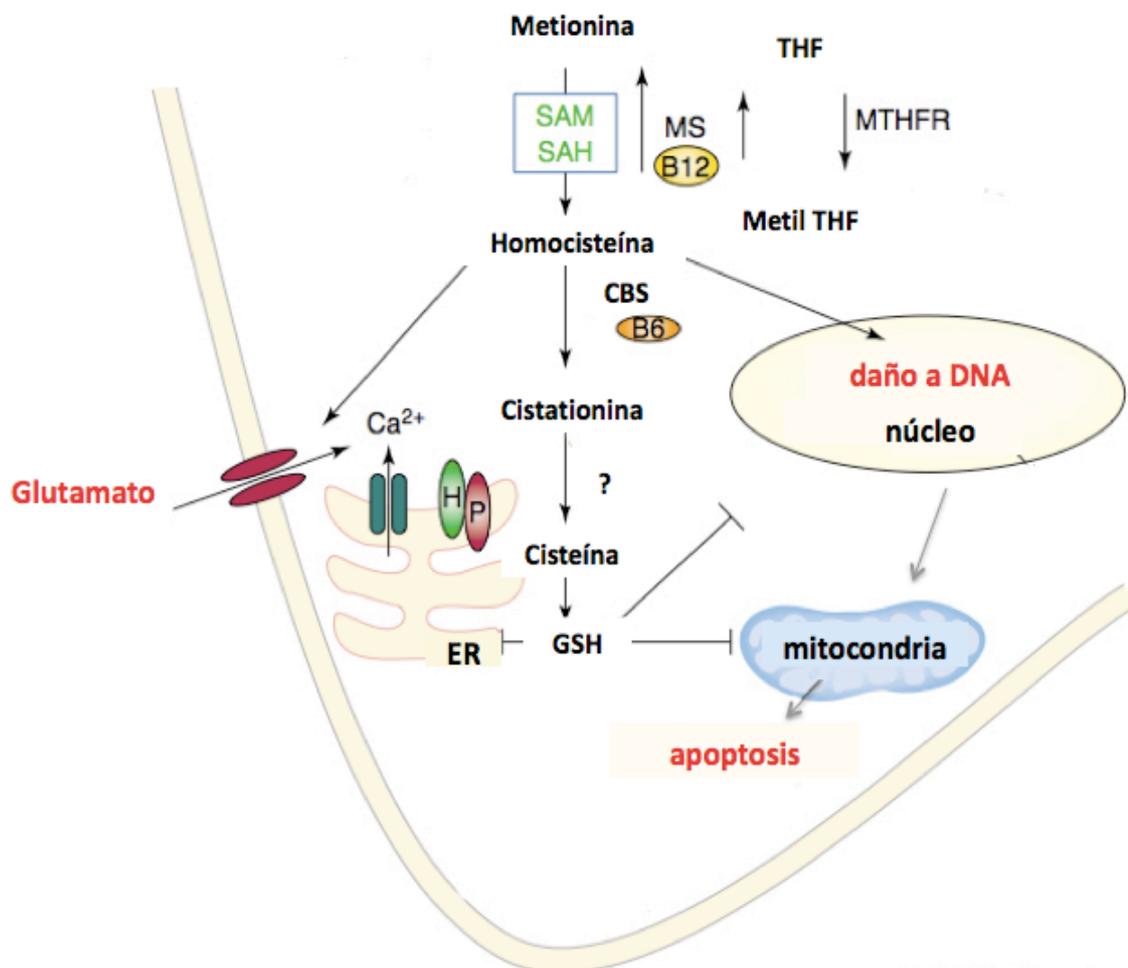


**Fig. 3. Metabolismo de la Hcy.** La Hcy es un aminoácido producto intermedio del metabolismo de la metionina y la cisteína. La Hcy es metabolizada por dos vías: transulfuración y remetilación. La transulfuración de la Hcy a cisteína es catalizada por la CBS, un proceso que requiere fosfato de piridoxal (B6) como cofactor. Por otro lado, la remetilación de la Hcy produce metionina. Esta reacción es catalizada por la MS. La cobalamina (B12) es cofactor de la metionina sintasa.

### *Neurotoxicidad mediada por Hcy*

En los últimos años se ha puesto atención a la relación entre la acumulación de Hcy y el daño a células neuronales a través de diversos mecanismos de toxicidad tales como: generación de ERO, incremento en la toxicidad de la proteína β-amiloide, la activación de apoptosis, hiperactivación de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), fosforilación de proteínas del

citoesqueleto (entre ellas Tau) y la acción sinérgica del aminoácido con cobre, entre otros (Fig. 4) (Kruman *et al.*, 2000, Ho *et al.*, 2001a; Zieminska y Lazarewickz, 2006; Ho *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2003)



**Fig. 4 Mecanismos de muerte neuronal por Hcy.** La Hcy puede producir la muerte neuronal a través de mecanismos que involucran el daño a DNA, la activación de señales que inducen apoptosis, alteraciones en la función mitocondrial como la liberación de citocromo c y la activación de caspasas, así como disminución de la respuesta antioxidante de la célula. Puede también ejercer acciones directas sobre los receptores de glutamato con aumento en el influjo de calcio. Investigaciones recientes han señalado que la Hcy induce estrés del retículo endoplásmico, el cual puede contribuir a su mecanismos patogénicos (Modificado de Mattson y Shea, 2003).

#### ***Participación de la Hcy en el estrés oxidante***

Algunas investigaciones han encontrado una relación entre el estrés oxidante y la hiperhomocisteinemia. En estudios *in vitro* se ha demostrado que la Hcy incrementa los niveles de lipoperoxidación, además de que disminuye los niveles de enzimas antioxidantes en un modelo de hipocampo de rata (Streck *et al.*, 2003).

Algunos efectos biológicos de Hcy *in vitro* pueden ser reproducidos por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otros agentes que contienen grupos sulfhidrilo, pero estos efectos son inhibidos por catalasas (Starkebaum *et al.*, 1986). Algunos resultados indican que la Hcy promueve el daño mitocondrial y que la Hcy influencia la reparación de DNA promoviendo la acumulación de daño en el DNA (Kruman *et al.*, 2002). Otros experimentos realizados en monocitos mostraron que la alta concentración de Hcy disminuye los niveles de la enzima EC-SOD (superóxido dismutasa extracelular), aumenta los niveles ésteres de colesterol y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la formación de las células espumosas en el daño vascular (Yideng *et al.*, 2008).

### ***La Hcy y el péptido β-amiloide***

La neurotoxicidad de Hcy debido a la deficiencia de folatos compromete la homeostasis neuronal y aumenta la sensibilidad a la toxicidad del β-amiloide en modelos de EA en ratones y en experimentos *in vitro* con cultivos neuronales. En algunos estudios se ha observado que la Hcy es capaz de potenciar la neurotoxicidad inducida por el β-amiloide como el incremento en la acumulación de calcio citosólico, la generación de especies reactivas y la apoptosis (Kruman *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2001a; White *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2003).

La homeostasis en los niveles de Hcy parecen ser importantes en el proceso de metilación del DNA que es un mecanismo de regulación de la expresión génica (Yideng *et al.*, 2007). En este aspecto es de especial interés la regulación de los genes que participan en el procesamiento de la proteína APP.

Los niveles de S-adenosilmetionina (SAM), el principal donador de metilos, están disminuidos en pacientes con EA (Beyer *et al.*, 2003). Estos datos hipotetizan que las alteraciones en el ciclo SAM/Hcy (produciendo la acumulación Hcy) son responsables del bajo nivel de SAM y por lo tanto de la reducción de metilación del DNA (Medina *et al.*, 2001). La Hcy provoca la acumulación de S-adenosilhomocisteína (SAH) debido a que la reacción que convierte SAH a Hcy y adenosina (Ado) es reversible, de esta forma se favorece la síntesis de SAH. La reacción procede hacia la formación de SAM, solo si la Hcy y la Ado son removidas (Chiang *et al.*, 1996).

El SAH es un inhibidor de las metiltransferasas de DNA, lo cual tiene como consecuencia la hipometilación del DNA y la activación o sobreexpresión de genes involucrados en la patología de Alzheimer. De acuerdo con lo anterior las alteraciones del ciclo SAM/Hcy incrementan la producción de las γ y β secretasas, las enzimas involucradas en la generación del β-amiloide

(Fuso *et al.*, 2005).

Además de su relación tóxica con el péptido A $\beta$  se ha demostrado que la Hcy puede inducir excitotoxicidad sobreactivando receptores de glutamato del tipo NMDA provocando una cascada de señalización que produce la fosforilación de proteínas del citoesqueleto (Lipton *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 2002, Loureiro *et al.*, 2008).

### ***Relación de la Hcy en el metabolismo del colesterol***

Se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de Hcy y los de colesterol en el plasma de pacientes y de modelos animales con homocisteinemia. Basados en estudios epidemiológicos, la elevación de Hcy parece correlacionar con los niveles de colesterol y de triglicéridos en estos pacientes. En un estudio en que se suplementó con piridoxina, folato, cobalamina, colina, riboflavina la dieta de pacientes que habían sufrido un infarto agudo al miocardio se observó una reducción en los niveles de Hcy, colesterol, triglicéridos y de apolipoproteína B100 (Olszewski *et al.* 1989). Actualmente, la investigación en este campo se ha encaminado a esclarecer los eventos bioquímicos que llevan a la acumulación de colesterol mediada por Hcy. Por ejemplo en modelo de hepatocitos (HepG2) la Hcy incrementó la actividad de HMGCoAR con un aumento en la producción y secreción de colesterol (Karmin *et al.*, 1998). En otros experimentos realizados en monocitos se demostró que la Hcy aumenta los niveles ésteres de colesterol durante la formación de células espumosas en el daño vascular (Yideng *et al.*, 2008).

Con base en lo planteado anteriormente, se tiene suficiente evidencia para considerar a la Hcy un factor de alto riesgo para la EA, debido a sus efectos en el metabolismo del colesterol, a que potencia los efectos tóxicos del  $\beta$ -amiloide y por su posible participación en la sobreproducción de este péptido.

Existe suficiente evidencia para considerar que existe relación estrecha en la toxicidad del péptido A $\beta$  y el metabolismo de ciertos agentes como la Hcy, el colesterol y el cobre. Sin embargo hasta el momento aún queda por aclarar su participación en las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

En el presente trabajo pretendemos contribuir al estudio de la EA con vistas a conocer los posibles mecanismos etiopatológicos que nos permitan entender ciertas condiciones de riesgo relacionadas con el incremento en la vulnerabilidad neuronal y que se asocian a esta patología.

---

## *Planteamiento del Problema*

La acumulación del péptido A $\beta$  por si misma no parece generar un daño importante a las neuronas. Dado que para la EA se consideran factores de riesgo la homocisteinemia y la acumulación de colesterol, resulta importante valorar como estas condiciones favorecen la toxicidad del A $\beta$  en presencia de complejos con Cu<sup>2+</sup> capaces de catalizar la producción de ERO en el SNC.

---

## *Hipótesis*

La Hcy participa en el metabolismo del colesterol favoreciendo de esta manera los efectos pro-oxidantes del péptido A $\beta$  en presencia de cobre, lo que tendría por resultado un aumento en la muerte neuronal.

## *Objetivo General*

---

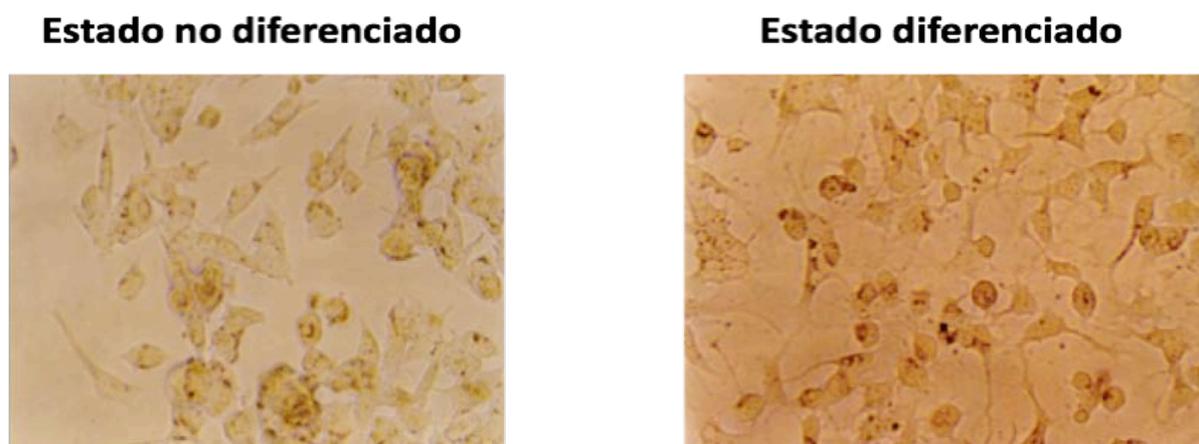
Evaluar en un modelo de neuroblastoma humano (MSN) las relaciones entre la toxicidad individual del exceso de Hcy, colesterol y cobre en presencia y ausencia de A $\beta$ .

### *Objetivos particulares:*

- 1.- Evaluar la muerte neuronal inducida por Cu<sup>2+</sup> en presencia y ausencia de Hcy y A $\beta$  en neuroblastoma humano.
- 2.- Evaluar el efecto de la adición de colesterol en la toxicidad neuronal en presencia de Hcy, Cu<sup>2+</sup> y A $\beta$ .
- 3.- Estudiar el efecto de la Hcy sobre la acumulación de colesterol en células de neuroblastoma humano.
- 4.- Estudiar la producción de ERO en las condiciones experimentales propuestas.

### ***Mantenimiento del cultivo de neuronas***

Para llevar a cabo los experimentos se utilizó una línea celular no comercial de neuroblastoma humano (MSN) que se mantuvo creciendo en medio RPMI 1640 y que contiene aminoácidos no esenciales al cual se le agregó suero fetal de cabra 10% (Gibco) (Reynolds *et al.*, 1986). Las células se cultivaron en placas multipozos en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> / 95 O<sub>2</sub> a 37 °C y a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/pozo. Después de 24 horas las células se diferenciaron agregando al cultivo ácido retinoico (10 µM) y NGF (50 ng/ml) (Sigma) y se dejaron incubando durante 5 días más hasta obtener una densidad celular apropiada. Al final de este periodo el medio de incubación se reemplazó por medio fresco y las neuronas se expusieron a las condiciones experimentales planteadas, en presencia de Hcy, CuCl<sub>2</sub>, colesterol, o Aβ 1-42 (Sigma). Estos experimentos se realizaron en células diferenciadas (Fig. 5). Para cada caso se realizaron curvas de concentración y se determinó la viabilidad celular.



**Fig. 5 Neuroblastoma humano (MSN).** Esta línea celular es capaz de diferenciarse a neurona por la adición de factores solubles al medio de cultivo como ácido retinoico (10 µM) y factor de crecimiento neural (50 ng/ml). Imágenes obtenidas por microscopía de luz (contraste de fases) (10X). Donada por Patricia Ferrera.

### ***Ensayos de viabilidad celular***

Para analizar la toxicidad de los agentes, se utilizó un procedimiento en el cual se cuantifica la viabilidad de las células (Mosmann, 1983). En dicho ensayo se evalúa la capacidad reductora de la mitocondria después de exponer las células a los tratamientos (generalmente 24 horas después). Este método mide la actividad redox de la mitocondria a través de la conversión del

compuesto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2-5-bromuro de difenil-tetrazolio (MTT) (Sigma) a cristales de formazán durante las reacciones de la cadena respiratoria. De manera breve, el MTT se disolvió en PBS 1X a una concentración de 5 mg/ml y se agregó al cultivo de MSN en una razón de 1/10 (v/v). Las células se incubaron con el MTT durante una hora a 37 °C. Al término de este tiempo, el medio fue retirado y los cristales de formazán se solubilizaron con alcohol isopropílico (0.8 ml). La absorbencia de cada muestra se cuantificó usando un espectrofotómetro a 570 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). Los resultados de estos experimentos se compararon con el control y entre los diferentes tratamientos.

### ***Cuantificación de la formación de ERO***

La formación de ERO se determinó utilizando un ensayo fluorométrico modificado. El principio de este método está basado en la oxidación del compuesto dihidrorodamina-123 (DHR) (Sigma, St. Louis, MO, USA) dependiente de la cantidad de ERO, para formar el compuesto fluorescente rodamina 123 (Gomes *et al.*, 2005). Las células expuestas a los tratamientos se lavaron con PBS 1X y posteriormente se resuspendieron en PBS 1X más 0.5% inhibidores de proteasas (Complete<sup>tm</sup>, Boehringer Mannheim). De cada muestra se tomó una alícuota de 100 µl con aproximadamente 100,000 células, las cuales se recolectaron por centrifugación (1,200 rpm por 30 s). Posteriormente el botón de células se resuspendió en 180 µl de amortiguador A que contenía en mM: 140 NaCl, 5 KCl, 0.8 MgSO<sub>4</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 5 glucosa, 15 de HEPES, y 20 µl de DHR (1 µM). Las muestras se incubaron en una placa de ELISA durante 2 minutos a 37 °C. El producto fluorescente rodamina 123 se midió usando un espectrofotómetro a 505 nm (microplate reader 550, BioRad). Los resultados se expresan como niveles de fluorescencia de rodamina 123 con respecto al control.

### ***Detección de colesterol en células***

En este ensayo las células se tiñeron con filipina una prueba de color azul fluorescente que es muy usada para el estudio de la distribución de colesterol no esterificado. La filipina emite fluorescencia cuando la molécula es impresionada por la luz ultravioleta, tiene la capacidad de unirse de forma específica al colesterol libre y por lo tanto, mediante la utilización de un microscopio, puede observarse el acumulo de este metabolito (Kruth, 1984). En estos experimentos las células diferenciadas se expusieron durante cinco días a Hcy (50 µM) y colesterol (50 µM). Al final de este tiempo las células se lavaron 2 veces con PBS 1X durante 5 minutos, se fijaron con metanol (-20 °C) por 5 minutos y se permeabilizaron con PBS 1X/ Tritón

0.25% por otros 20 minutos. Las células se lavaron nuevamente con PBS 1X y posteriormente se incubaron con 500  $\mu$ l de filipina (Sigma) diluida a una concentración de 50 ng/ml en PBS 1X durante 45 minutos a 37 °C en oscuridad. Al final las células se lavaron nuevamente con PBS 1X, las muestras se coloraron sobre portaobjetos y posteriormente se observaron bajo el microscopio de fluorescencia utilizando un filtro a 360 nm. (Axiocam, Zeiss). Las imágenes se procesaron en Adobe PhotoShop 7, Machintosh.

### ***Cuantificación de colesterol***

La determinación de la concentración de colesterol se realizó mediante un ensayo colorimétrico enzimático (Amplex Red Cholesterol Assay kit, Invitrogen), esta tecnología puede detectar una concentración de colesterol de 200 nM (80 ng/mL) o menos y se puede utilizar para detectar colesterol libre y esterificado. Los ésteres de colesterol son hidrolizados por la colesterol esterasa liberando colesterol el cual es sustrato de la colesterol oxidasa; dicha reacción produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una cetona correspondiente. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es detectado con el reactivo 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (Amplex Red Reagent). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de Amplex Red Reagent y la Peroxidasa de Horseradish (HPR) en una estequiometría 1:1 reacciona para dar el compuesto fluorescente resorufina la cual tiene poca interferencia con la autofluorescencia de la mayoría de las muestras biológicas.

De manera breve, para este experimento las células se mantuvieron en tratamiento durante 5 días, al término de este tiempo las células de neuroblastoma MSN se recolectaron en un amortiguador de lisis (tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Nonidet P40 1%, desoxicolato 0.5%, cocktail de inhibidores de proteasas (Complete<sup>tm</sup>, Boehringer Mannheim) y se sometieron a 3 ciclos de sonicado. Cada ciclo consistió de 10 segundos de descargas a 40 kHz y 2 min de reposo, esto se realizó en hielo (4 °C). Una vez sonicadas las muestras, se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry modificado (Lowry, 1951). Por cada condición se utilizaron 50  $\mu$ g de proteína total para la cuantificación de colesterol.

El experimento se realizó en oscuridad, las muestras se diluyeron en el amortiguador de reacción después de que un volumen equivalente que contenía al reactivo Amplex Red Reagent y el cocktail de enzimas se agregó (300 mM Amplex Red, 2 U/ml de colesterol oxidasa, 2 U/ml de colesterol esterasa y 2 U/ml de peroxidasa de Horseradish). Posteriormente las muestras se colocaron en placas de ELISA y se incubaron durante 30 min a 37 °C en oscuridad. La absorbencia de la resorufina que es el producto final de la reacción se midió a 535 nm en un

espectrofotómetro (microplate reader 550, BioRad). Los valores de colesterol se calcularon usando las concentraciones de colesterol conocidas y se normalizaron los valores por el contenido de proteína.

### *Análisis Estadístico*

El análisis de los datos se realizó utilizando el Software GraphPad Prism 4 mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey. Los valores están expresado en porcentaje y se grafica promedio  $\pm$  error estándar (ES).

### *Toxicidad del $\beta$ -amiloide en presencia de agentes asociados con la EA.*

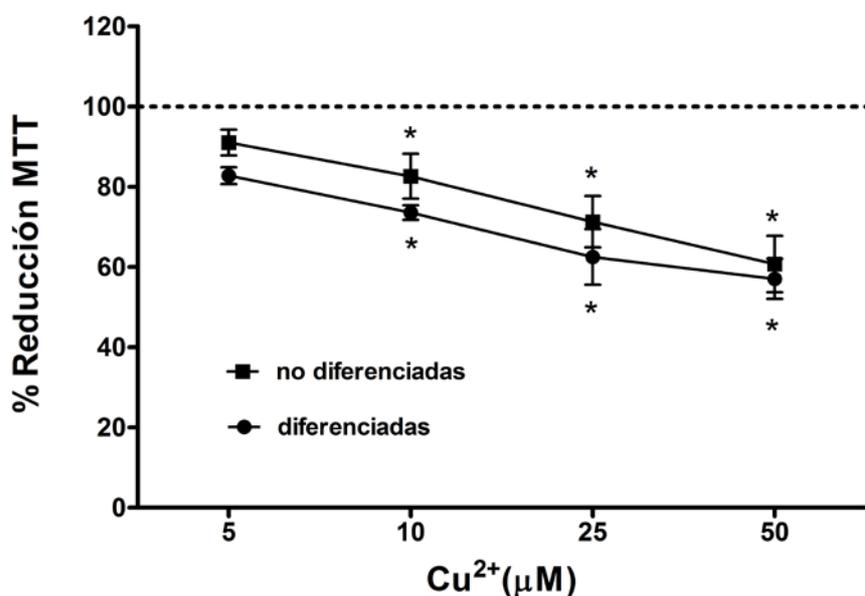
En este trabajo evaluamos la toxicidad del A $\beta$  en presencia de diversos agentes que pudieran favorecer la muerte neuronal como: el colesterol, la Hcy y el metal cobre, los cuales se encuentran incrementados en el envejecimiento patológico. Utilizando un modelo de neuroblastoma humano (MSN) evaluamos la toxicidad en diversas condiciones que pudieran estar presentes en el cerebro de pacientes con EA.

En algunos ensayos previos realizados en el laboratorio se ha demostrado que las células diferenciadas de MSN son más susceptibles al daño que las células sin diferenciar, por lo cual para iniciar la caracterización de estas diferencias algunos experimentos se llevaron a cabo tanto en células diferenciadas como en indiferenciadas. Los primeros ensayos consistieron en realizar curvas dosis-respuesta para Hcy y Cu<sup>2+</sup> con el fin de determinar una concentración que presentara un daño significativo pero no extenso. En el caso de colesterol y A $\beta$  (1-42) utilizamos concentraciones usadas previamente en el laboratorio (Ferrera *et al.*, 2008).

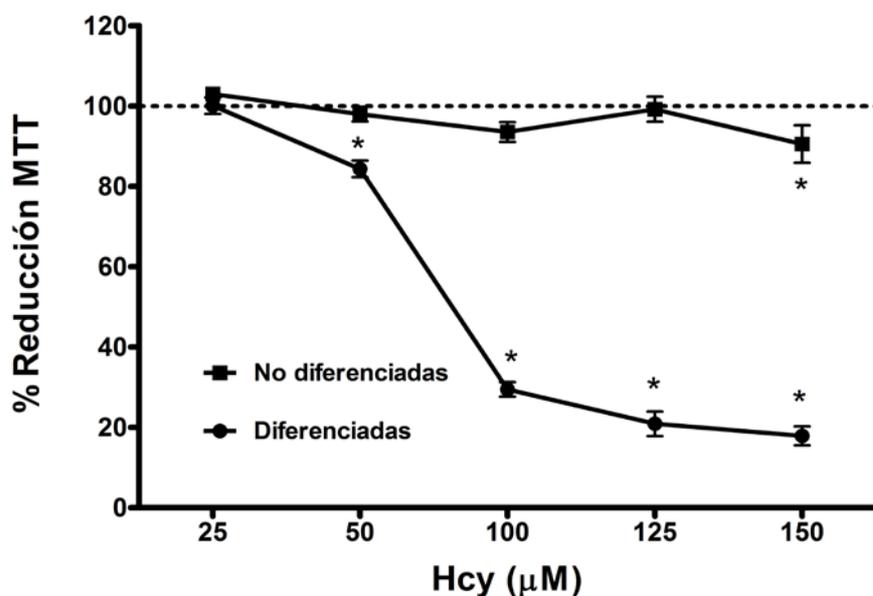
Las células fueron expuestas durante 24 horas a distintos tratamientos, utilizando las siguientes concentraciones: Hcy (50 mM), CuCl<sub>2</sub> (10  $\mu$ M), colesterol (50  $\mu$ M) y A $\beta$  (1-42) (10  $\mu$ M). Transcurrido el tiempo de incubación se determinó la viabilidad celular por medio de la cuantificación del MTT reducido.

Los resultados obtenidos confirman la toxicidad del cobre y de la Hcy. Se observa que las células expuestas a cobre (50  $\mu$ M) reducen aproximadamente 40% menos MTT con respecto al control en células indiferenciadas (Fig. 6), este efecto es mayor en células diferenciadas que reducen aproximadamente 50% menos MTT a la misma concentración de cobre (50  $\mu$ M) (Fig. 6).

Por otro lado, la Hcy parece no tener efecto sobre las células sin diferenciar (Fig. 7), sin embargo las células diferenciadas son más susceptibles y reducen menos MTT aproximadamente 80% menos con respecto al control a una concentración de 150  $\mu$ M de Hcy.

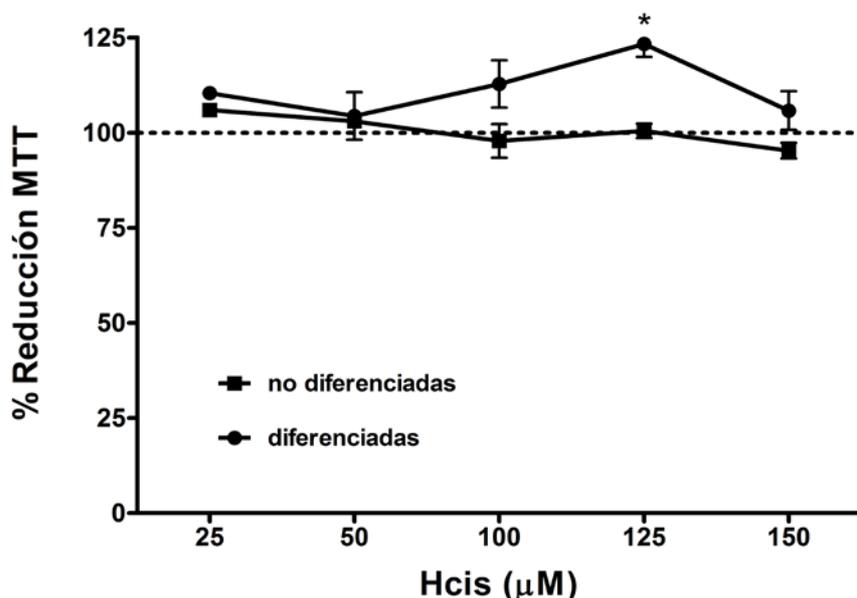


**Fig. 6 Efectos del Cu<sup>2+</sup> sobre la actividad reductora de la mitocondria en células MSN.** Las células se expusieron a diferentes concentraciones de Cu<sup>2+</sup> (5-50 µM) durante 24 horas. Los datos expresan los porcentajes con respecto a la condición control (línea superior punteada) en la reducción de MTT. Se grafica el promedio obtenido de cada condición y el error estándar de 4-6 experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $P < 0.05$  vs control.



**Fig. 7 Efectos de la Hcy sobre la actividad reductora de la mitocondria en células MSN.** Las células se expusieron a diferentes concentraciones de Hcy (25-150 µM) durante 24 horas. Los datos expresan los porcentajes con respecto al control (línea superior punteada) en la reducción de MTT. Se grafica el promedio obtenido de cada condición y el error estándar de 4-5 experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $P < 0.05$  vs control.

En estos experimentos también realizamos una curva dosis-respuesta con homocistina, (Hcis) un compuesto producido por oxidación de la Hcy. La Hcis no induce citotoxicidad a concentraciones menores (Fig. 8).



**Fig. 8 Efectos de la Hcis sobre la actividad reductora de la mitocondria en células MSN.** Las células se expusieron a diferentes concentraciones de Hcis (25-150  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Los datos expresan los porcentajes con respecto al control (línea superior punteada) en la reducción de MTT. Se grafica el promedio obtenido de cada condición y el error estándar de 4 experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $P < 0.05$  vs control.

### ***Potenciación de la neurotoxicidad por la interacción entre diversos agentes relacionados con la EA.***

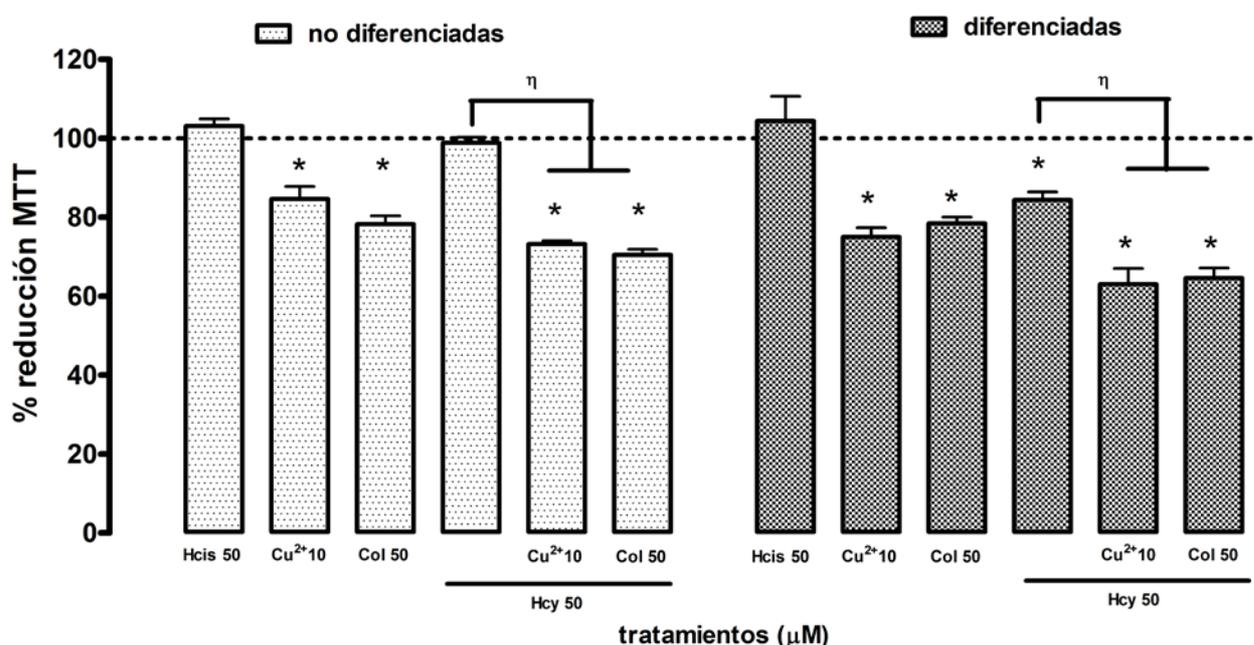
Para examinar la posibilidad de una interacción que resultara en la potenciación de daño neuronal entre los diversos agentes descritos anteriormente, analizamos diversas condiciones que pudieran estar presentes en la EA.

### ***El $\text{Cu}^{2+}$ y colesterol potencian la toxicidad de Hcy***

Cuando las células se incubaron con concentraciones de Hcy (50  $\mu\text{M}$ ) y cobre (10  $\mu\text{M}$ ), la muerte neuronal causada por la combinación de los tratamientos fue mayor que aquella provocada solamente por Hcy o cobre (Fig. 9). Las células no diferenciadas presentaron una viabilidad de 73% con respecto al control, mientras que en células diferenciadas la viabilidad fue de 63% con respecto al control. En esta última condición se observó que la muerte celular fue

significativa con respecto a la provocada por Hcy (Fig. 9). La incubación con Hcis (50  $\mu\text{M}$ ) y cobre no fue diferente a aquella observada solamente con cobre (datos no presentados).

Continuando con estos experimentos determinamos la citotoxicidad mediada por colesterol en presencia de Hcy. Las células fueron expuestas a Hcy (50  $\mu\text{M}$ ), a colesterol (50  $\mu\text{M}$ ) y a Hcy/colesterol (50  $\mu\text{M}$  / 50  $\mu\text{M}$ ). El colesterol disminuye la viabilidad celular a niveles comparables en células diferenciadas y no diferenciadas (21% aproximadamente). Para el caso de la co-incubación con Hcy observamos que en ambos estados las células son susceptibles a la combinación de ambos tratamientos con una disminución en la viabilidad de 35% en células diferenciadas y 30% en no diferenciadas (Fig. 9). La interacción tóxica de Hcy con colesterol y cobre aumenta la muerte celular.



**Fig. 9 Efectos de la Hcy, colesterol y  $\text{Cu}^{2+}$  sobre la actividad reductora de la mitocondria en células MSN.** Las células se trataron con Hcy (50  $\mu\text{M}$ ),  $\text{Cu}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ ) y/o colesterol (50  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Los datos expresan los porcentajes con respecto al control (línea superior punteada) en la reducción de MTT. En las columnas se grafica el promedio obtenido de cada condición y el error estandar de 4-6 experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $P < 0.05$  vs control,  $\eta P < 0.05$  vs Hcy 50  $\mu\text{M}$ .

### ***Efectos de la Hcy, $\text{Cu}^{2+}$ y colesterol en la toxicidad de $\text{A}\beta$***

Se ha propuesto que el daño neuronal en la EA es causado por la presencia del péptido  $\text{A}\beta$ . En estudios *in vitro* se ha demostrado que la toxicidad mediada solamente por  $\text{A}\beta$  es reducida (Ferrera *et al.*, 2008), sin embargo se ha postulado que esta toxicidad puede ser incrementada por la presencia de metales altamente reactivos como el cobre y de moléculas altamente oxidantes

como la Hcy y el colesterol.

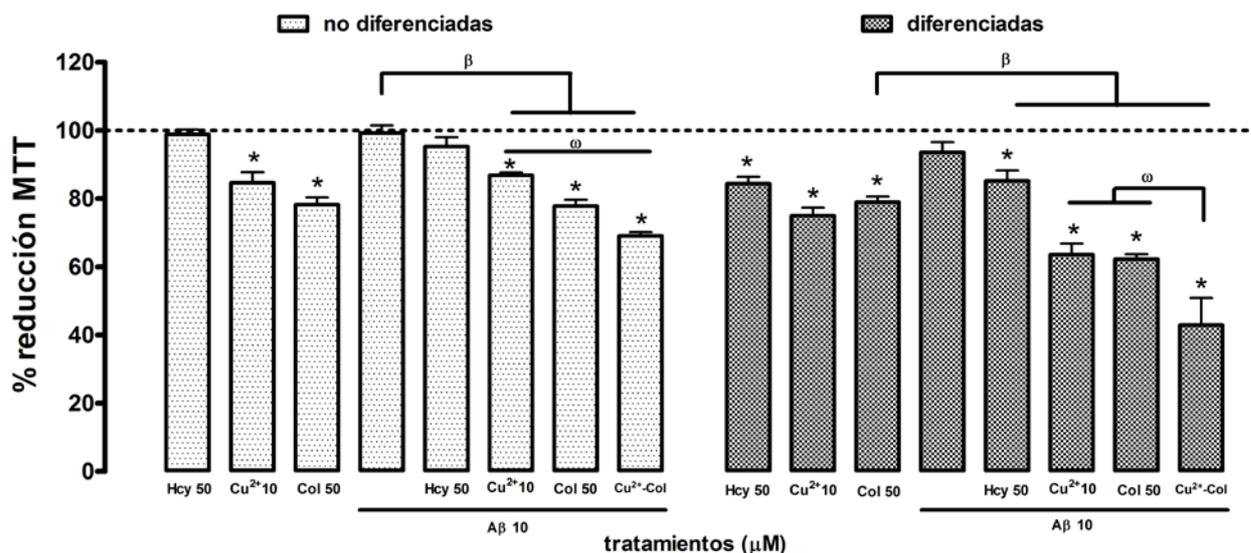
Con el fin de examinar si la Hcy puede incrementar la toxicidad mediada por el péptido A $\beta$ , las células se expusieron a diferentes condiciones: en presencia de 10  $\mu$ M de A $\beta$ 1-42 y 50  $\mu$ M de Hcy. El A $\beta$  no resultó tóxico para las células no diferenciadas y su toxicidad es reducida en las células diferenciadas (7%) (Fig. 10). En las células diferenciadas se observa que en combinación con Hcy aumenta la toxicidad (15%) con respecto al control.

También se evaluó la toxicidad inducida por cobre y colesterol en presencia del péptido A $\beta$ . En este caso las condiciones examinadas fueron las siguientes: en presencia de 10  $\mu$ M de A $\beta$ 1-42 y/o 10  $\mu$ M de cobre y 50  $\mu$ M de colesterol.

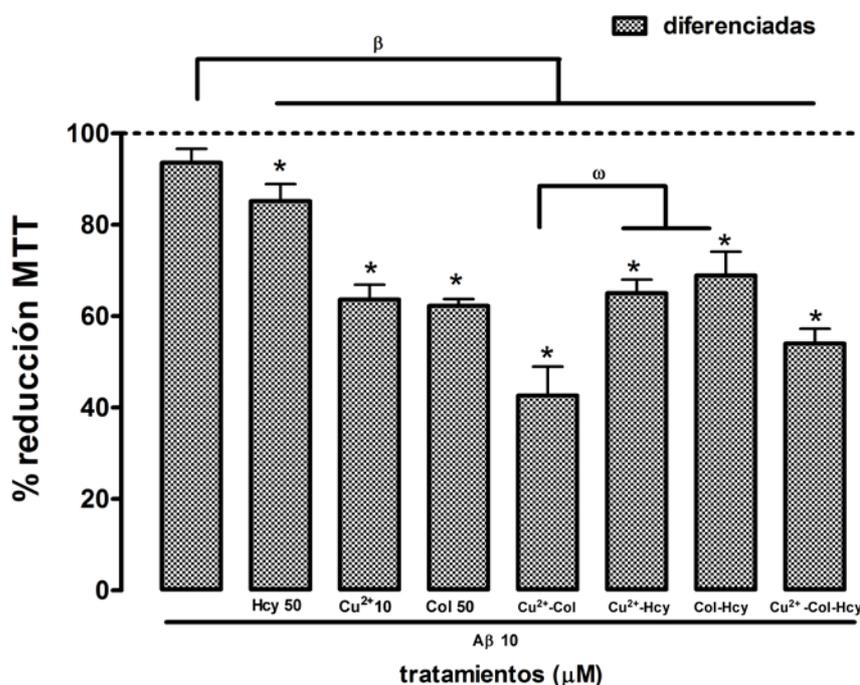
Se observó que la toxicidad inducida en la condición de A $\beta$ Cu<sup>2+</sup> y A $\beta$ Col aumenta en ambos estados celulares presentándose un efecto mayor en las células diferenciadas con una viabilidad del 63% y 62%, respectivamente. De forma interesante la condición A $\beta$ Cu<sup>2+</sup>-Col incrementa la toxicidad dramáticamente en aproximadamente 57% con respecto al control. La muerte que se presentó en esta condición fue diferente a las condiciones A $\beta$ Cu<sup>2+</sup> y A $\beta$ Col (Fig. 10).

Además de las condiciones anteriormente señaladas también se evaluaron otras interacciones que resultaron interesantes en cuanto a la toxicidad que presentaron. Encontramos que las condiciones A $\beta$ Cu<sup>2+</sup>-Hcy, A $\beta$ Col-Hcy también presentan una toxicidad importante (35% y 32%), respectivamente. Esta disminución es diferente a la que se presenta en la condición A $\beta$ Cu<sup>2+</sup>-Col (Fig. 11). La condición en la cual se presentan los cuatro agentes A $\beta$ Cu<sup>2+</sup>-Col-Hcy ya no parece incrementar la toxicidad (47%) más allá de los niveles presentados en A $\beta$ Cu<sup>2+</sup>-Col.

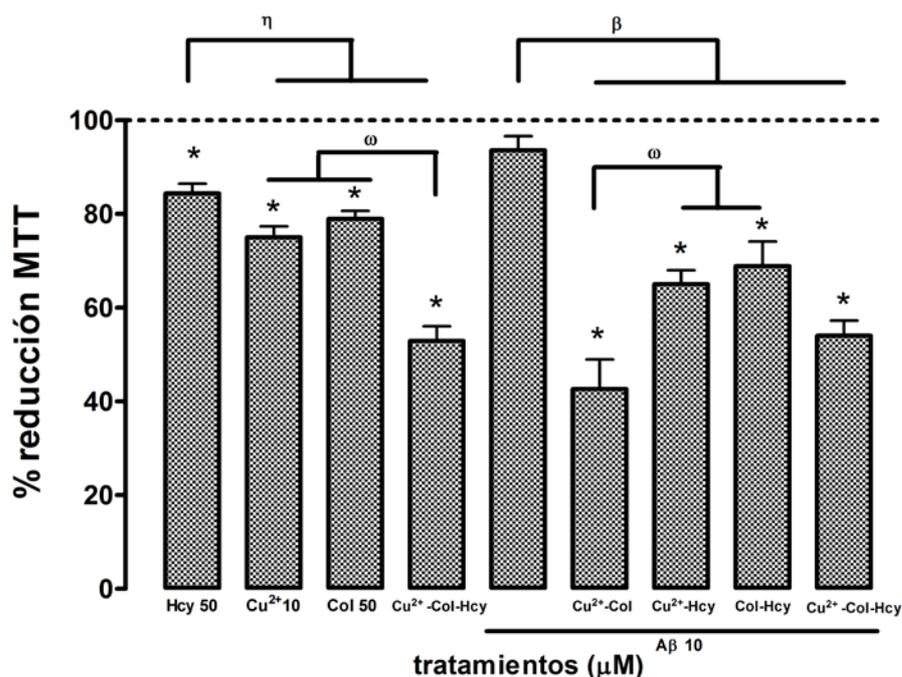
En resumen, los experimentos de viabilidad celular se realizaron en células no diferenciadas y diferenciadas, siendo estas últimas más sensibles al daño. A continuación presenta una gráfica que representa las interacciones tóxicas de estos agentes en las células diferenciadas (Fig. 12). Probamos que la Hcy, el cobre y colesterol presentan una toxicidad significativa en las células de neuroblastoma. El cobre y colesterol tiene un efecto sinérgico en la muerte neuronal provocada por la Hcy y el péptido A $\beta$ . De manera interesante las condiciones que presentan mayor toxicidad son Hcy-Cu<sup>2+</sup>-Col, A $\beta$ Cu<sup>2+</sup>-Col y A $\beta$ Cu<sup>2+</sup>-Col-Hcy.



**Fig. 10** Efectos del A $\beta$ , Hcy, colesterol Cu<sup>2+</sup> sobre la actividad reductora de la mitocondria en células MSN. Las células se trataron con A $\beta$  1-42 (10  $\mu$ M), Hcy (50  $\mu$ M), Cu<sup>2+</sup> (10  $\mu$ M), Col (50  $\mu$ M), durante 24 horas. Los datos expresan los porcentajes con respecto al control (línea superior punteada) en la reducción de MTT. En las columnas se grafica el promedio obtenido de cada condición y el error estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $P < 0.05$  vs control,  $\beta P < 0.05$  vs A $\beta$  10  $\mu$ M,  $\omega P < 0.05$  vs grupos señalados.



**Fig. 11.** Efectos tóxicos del A $\beta$  y agentes asociados a la EA. Las células se trataron con A $\beta$  1-42 (10  $\mu$ M), Hcy (50  $\mu$ M), Cu<sup>2+</sup> (10  $\mu$ M), Col (50  $\mu$ M), durante 24 horas. Los datos expresan los porcentajes con respecto al control (línea superior punteada) en la reducción de MTT. En las columnas se grafica el promedio obtenido de cada condición y el error estándar de 3-4 experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $P < 0.05$  vs control,  $\beta P < 0.05$  vs A $\beta$  10  $\mu$ M,  $\omega P < 0.05$  vs grupos señalados.



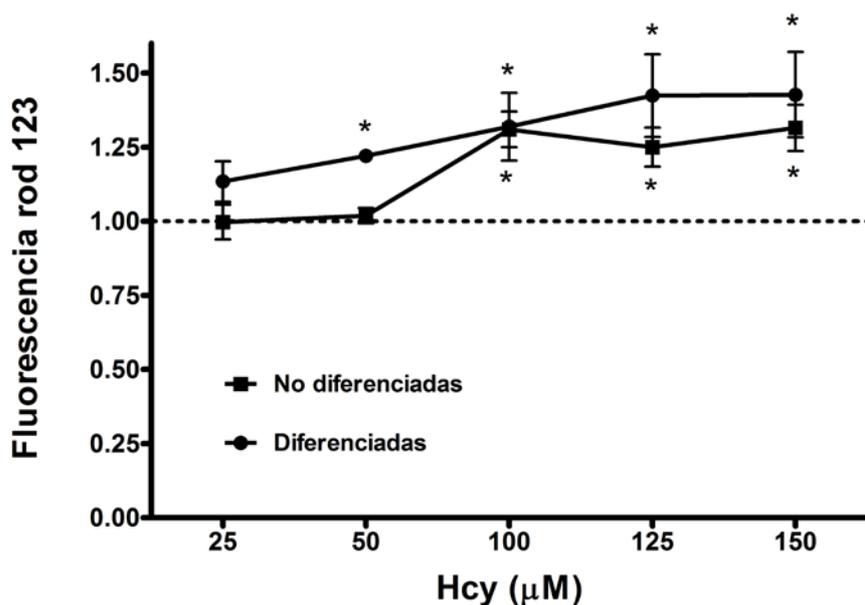
**Fig. 12 Relaciones de toxicidad entre A $\beta$ , Hcy, colesterol y Cu<sup>2+</sup> en células MSN.** Las células se trataron con A $\beta$  1-42 (10  $\mu$ M), Hcy (50  $\mu$ M), Cu<sup>2+</sup> (10  $\mu$ M), Col (50  $\mu$ M), durante 24 horas. Los datos expresan los porcentajes con respecto al control (línea superior punteada) en la reducción de MTT. En las columnas se grafica el promedio obtenido de cada condición y el error estándar de 3-6 experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $P < 0.05$  vs control,  $\eta$   $P < 0.05$  vs Hcy 50  $\mu$ M,  $\beta$   $P < 0.05$  vs A $\beta$  10  $\mu$ M,  $\omega$   $P < 0.05$  vs grupos señalados.

### ***Inducción de ERO como mecanismo de muerte neuronal en MSN***

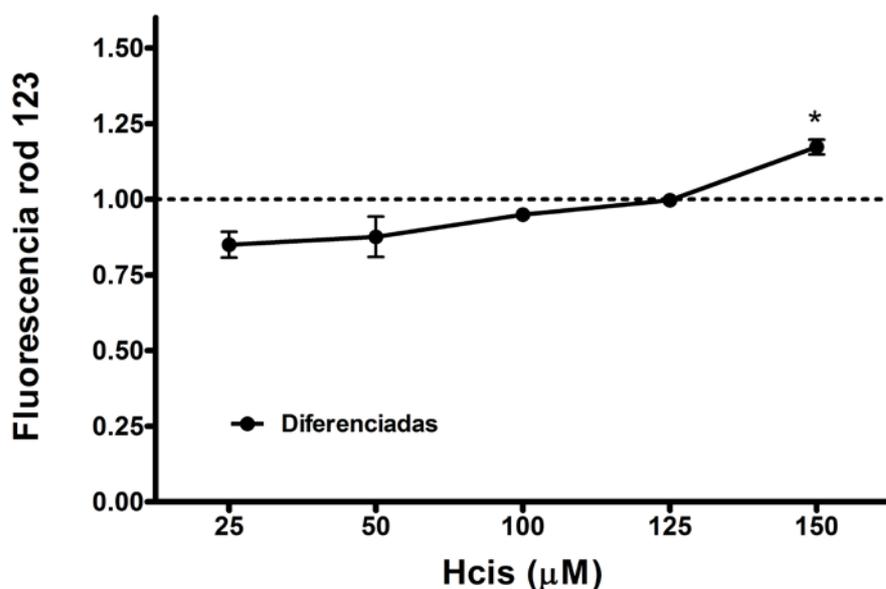
Para determinar si el estrés oxidante está involucrado en la muerte neuronal observada en nuestros tratamientos, se determinó la formación de ERO mediante un ensayo de oxidación de DHR. Cuando DHR es oxidada en presencia de ERO, particularmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce un compuesto fluorescente rodamina 123 que se puede cuantificar. Las células control tienen un nivel basal de ERO el cual se indica como 1 en las gráficas.

En estos experimentos determinamos los niveles de ERO a diferentes concentraciones de Hcy en ambos estados celulares. En las células no diferenciadas los niveles de ERO aumentan a concentraciones elevadas de Hcy, sin embargo las células son capaces de contener con la formación de ERO y la viabilidad celular no se disminuye en dichas condiciones (Fig. 13). En las células diferenciadas la generación de ERO esta relacionada con la toxicidad que se incrementa a diferentes concentraciones de Hcy (Fig. 13).

Para estudiar los efectos diferenciales de la Hcy y Hcis en estos experimentos también determinamos la formación de ERO por Hcis. Encontramos que solamente una concentración elevada de Hcis (150  $\mu\text{M}$ ) en células diferenciadas puede aumentar los niveles de ERO (Fig. 14).



**Fig. 13 Efectos de la Hcy en la formación de ERO en MSN.** Las células se expusieron a diferentes concentraciones de Hcy (25-150  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Los cambios en la fluorescencia de rodamina 123 están expresados como niveles de incremento con respecto al control (línea superior punteada). Se grafica el promedio obtenido de cada condición y el error estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $P < 0.05$  vs control.

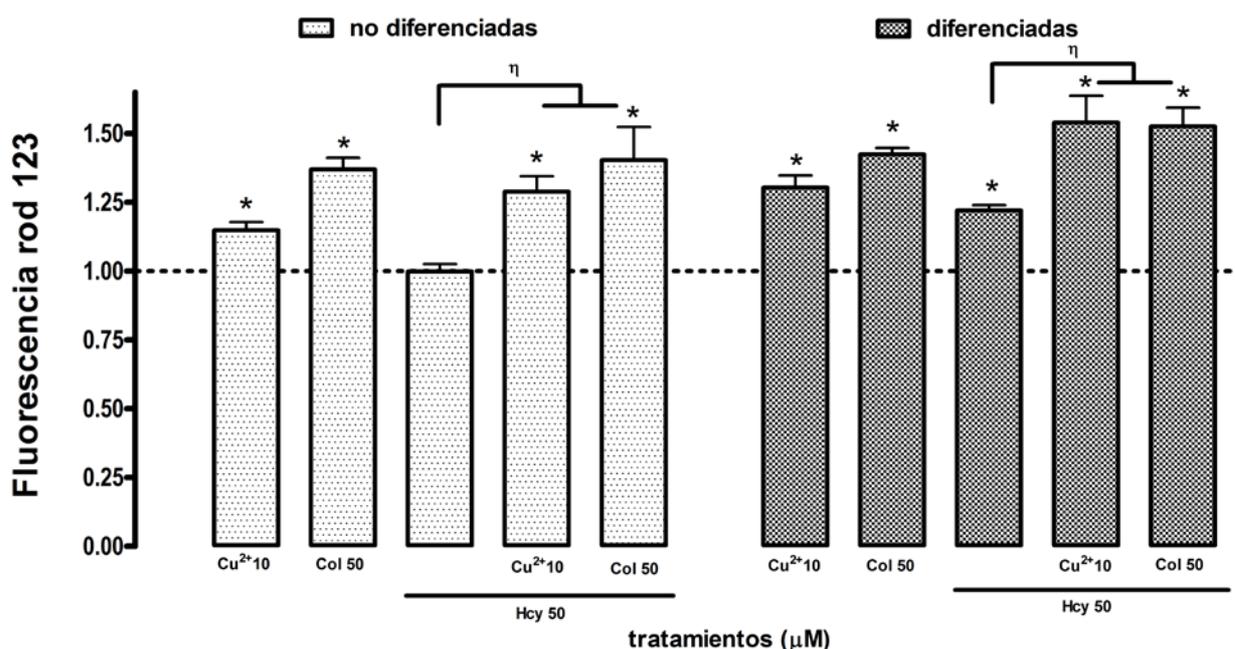


**Fig. 14 Efectos de la Hcis en la formación de ERO en MSN.** Las células se expusieron a diferentes concentraciones de Hcis (25-150  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Los cambios en la fluorescencia de rodamina 123 están expresados como niveles de incremento con respecto al control (línea superior punteada). Se grafica

el promedio obtenido de cada condición y el error estándar de 3-4 experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $P < 0.05$  vs control.

### ***Efecto de Hcy, cobre y colesterol en la formación de ERO***

El cobre y colesterol por si mismos aumentan la formación de ERO, sin embargo los efectos son mayores en las células diferenciadas (Fig. 15). El cobre aumenta los niveles de ERO en 1.14 y 1.30 en células no diferenciadas y diferenciadas, respectivamente. En presencia de colesterol los niveles aumentan en 1.37 y 1.42. El efecto sinérgico de Hcy con colesterol o cobre en la toxicidad neuronal está relacionado con el estado redox de la célula. Los niveles de ERO inducidos por Hcy en presencia de cobre aumentaron en 1.28 y 1.54. En presencia de colesterol aumentaron en 1.40 y 1.52 en células no diferenciadas y diferenciadas, respectivamente (Fig. 15).

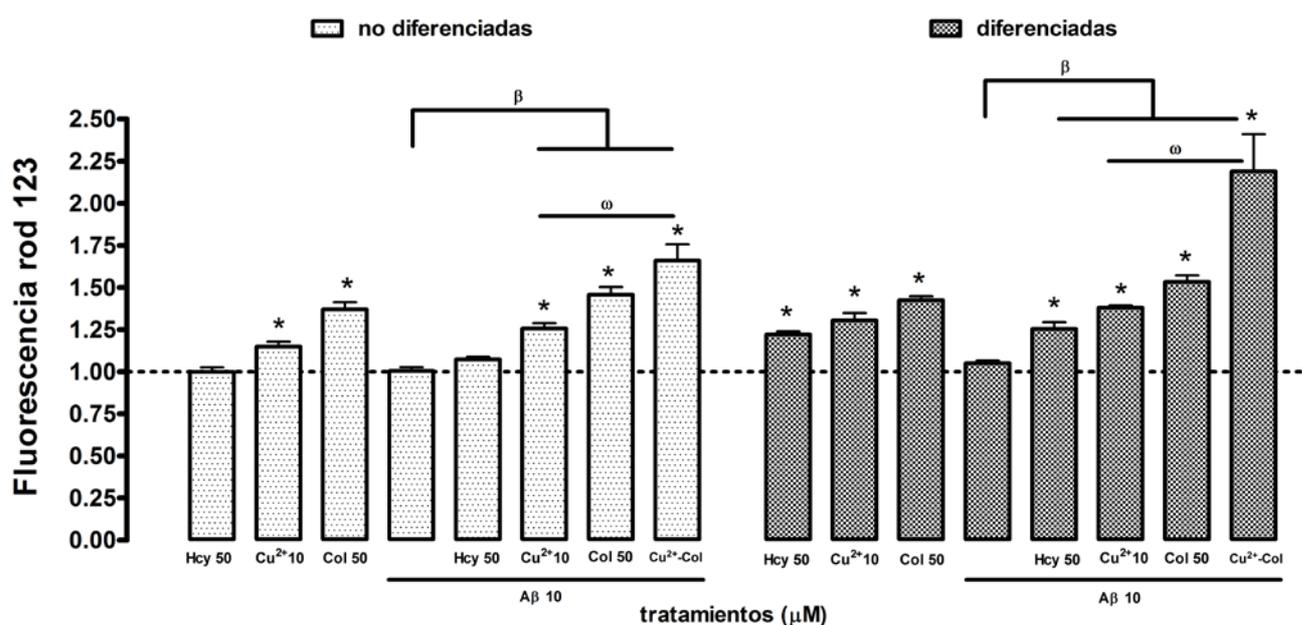


**Fig. 15 Efectos de la Hcy, colesterol y Cu<sup>2+</sup> sobre la formación de ERO en células MSN.** Las células se trataron con Hcy (50 µM), Cu<sup>2+</sup> (10 µM) y/o colesterol (50 µM) durante 24 horas. Los cambios en la fluorescencia de rodamina 123 están expresados como niveles de incremento con respecto al control (línea superior punteada). En las columnas se grafica el promedio obtenido de cada condición y el error estándar de 3-4 experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $P < 0.05$  vs control,  $\eta P < 0.05$  vs Hcy 50 µM.

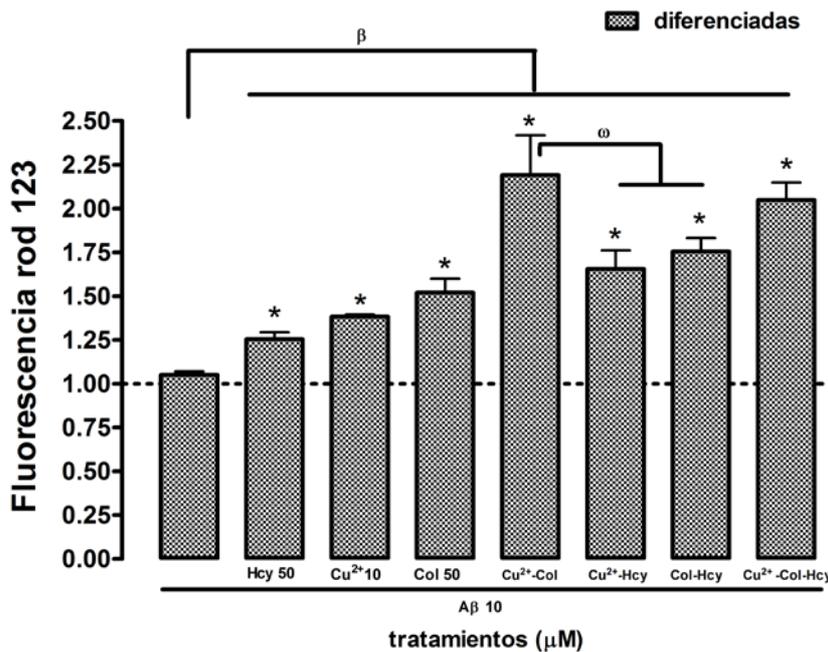
## Generación de ERO en la toxicidad inducida por A $\beta$ en presencia de agentes asociados con la EA

En los experimentos de viabilidad celular observamos que la toxicidad de A $\beta$  es limitada, este efecto correlaciona con los bajos niveles de ERO que se producen en su presencia. Si bien el A $\beta$  por si solo no aumenta la formación de ERO, en presencia de cobre y colesterol los niveles aumentan de manera importante y son mayores cuando se combinan estos agentes A $\beta$ -Cu<sup>2+</sup>-Col (Fig. 16). Esta condición resultó indujo la mayor toxicidad y formación de ERO, tanto en células no diferenciadas como diferenciadas.

Los niveles de ERO se evaluaron también en las interacciones que presentaron mayor toxicidad, la condición A $\beta$ -Cu<sup>2+</sup>-Hcy produce ERO en un nivel de 1.65, A $\beta$ -Col-Hcy en 1.75. En presencia de todos los agentes involucrados A $\beta$ -Cu<sup>2+</sup>-Col-Hcy se incrementan los niveles en 2.04 (Fig. 17).



**Fig. 16** Efectos del A $\beta$ , Hcy, colesterol Cu<sup>2+</sup> sobre la formación de ERO en células MSN. Las células se trataron con A $\beta$  1-42 (10  $\mu$ M), Hcy (50  $\mu$ M), Cu<sup>2+</sup> (10  $\mu$ M), Col (50  $\mu$ M), durante 24 horas. E. Los cambios en la fluorescencia de rodamina 123 están expresados como niveles de incremento con respecto al control. En las columnas se grafica el promedio obtenido de cada condición y el error estándar de 3-4 experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $P < 0.05$  vs control,  $\beta$   $P < 0.05$  vs A $\beta$  10  $\mu$ M,  $\omega$   $P < 0.05$  vs grupos señalados.



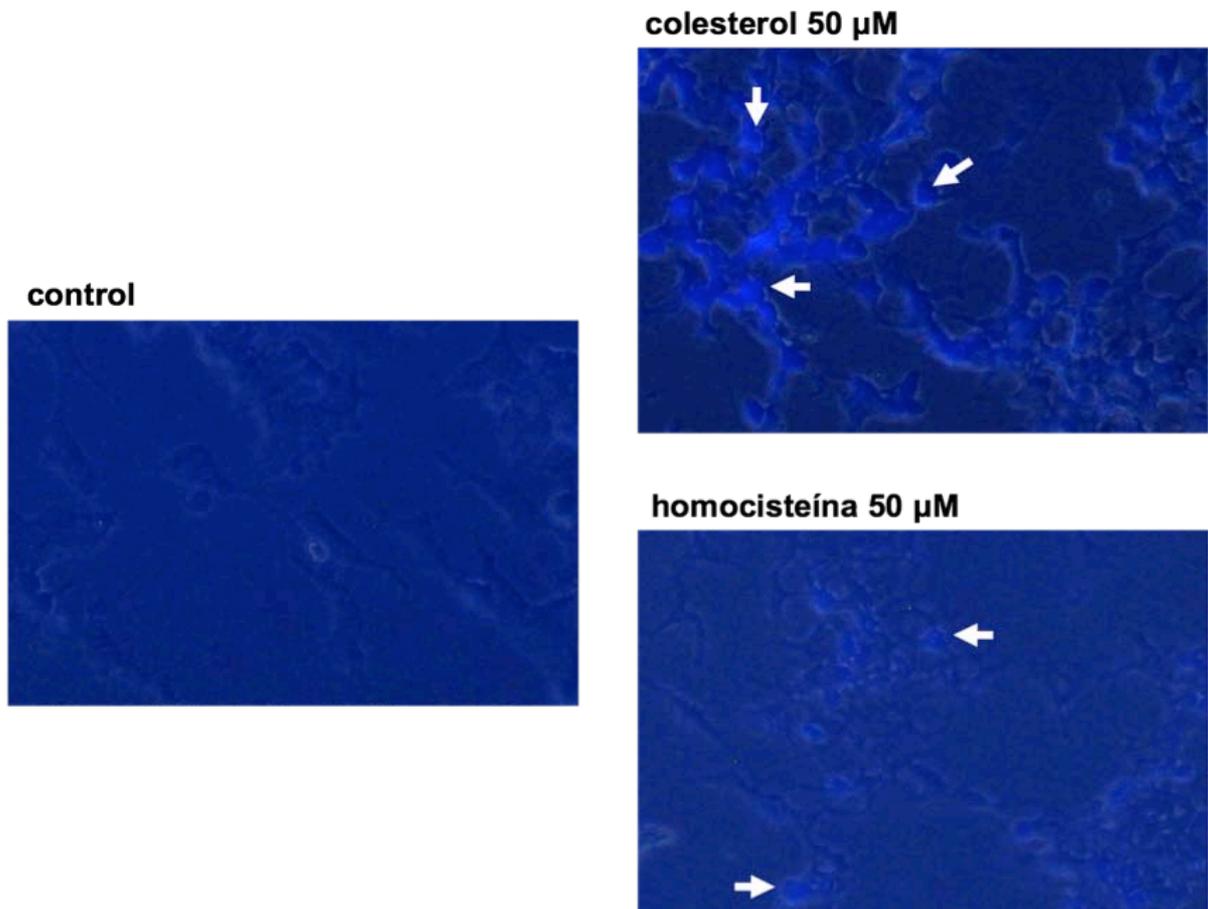
**Fig. 17 Efectos tóxicos del Aβ y agentes asociados a la EA.** Las células se trataron con con Aβ 1-42 (10 µM ), Hcy (50 µM), Cu<sup>2+</sup> (10 µM), Col (50 µM), durante 24 horas. Los datos expresan los porcentajes con respecto al control en la reducción de MTT. En las columnas se grafica el promedio obtenido de cada condición y el error estándar de 3-4 experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $P < 0.05$  vs control,  $\beta P < 0.05$  vs Aβ 10 µM,  $\omega P < 0.05$  vs grupos señalados.

Estos resultados indican que los posibles mecanismos mediante los cuales ocurre la muerte de las células neuronales en las condiciones asociadas incluyen un estado de estrés oxidante. En este trabajo demostramos que ciertas condiciones como Aβ-Cu<sup>2+</sup>-Col producen un efecto sinérgico en la formación de ERO y la muerte celular. Analizar los mecanismos de muerte celular en estas condiciones nos permitirán comprender la posible relación entre el estado redox alterado y la neurodegeneración observada en la EA.

### ***Efecto de la Hcy sobre la acumulación de colesterol en MSN***

Debido a que existe evidencia de la influencia de la Hcy en el metabolismo del colesterol decidimos examinar si la Hcy es capaz de inducir la acumulación de colesterol en nuestro modelo de estudio. Para ello incubamos a las células durante 5 días bajo las siguientes condiciones Hcy (50 µM), colesterol (50 µM). Terminado este lapso de tiempo las células se fijaron y tiñeron con filipina, un compuesto fluorescente que detecta hidroxisteroles, principalmente colesterol. Posteriormente las muestras se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia.

En estos experimentos el control positivo son las células tratadas con colesterol (50  $\mu$ M) (Fig. 18) donde se observa la tinción con filipina. La incubación de las células con Hcy durante un periodo relativamente largo (5 días) incrementa la síntesis y/o acumulación de colesterol en neuroblastoma (Fig. 18). Estos experimentos también se realizaron por 24 horas sin embargo a este tiempo no se observó ningún cambio (datos no presentados).

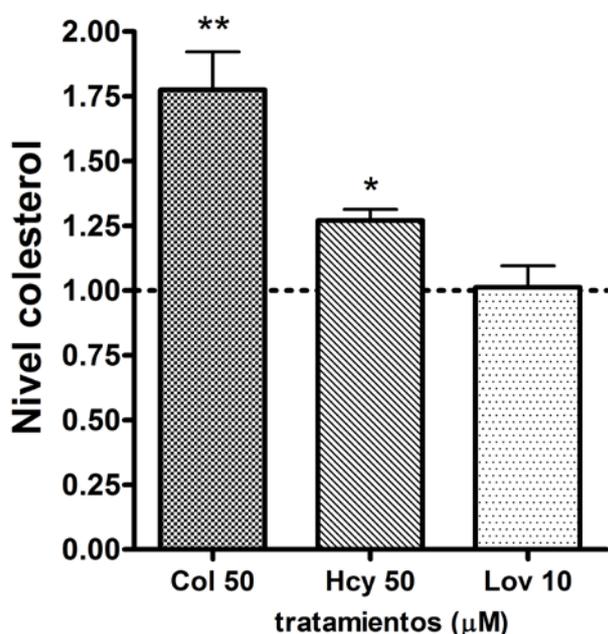


**Fig. 18 Efecto de la Hcy en la acumulación de colesterol.** Las células de MSN diferenciadas teñidas con filipina después de la incubación con Hcy (50  $\mu$ M) o colesterol (50  $\mu$ M) durante 5 días en las condiciones señaladas. Se presentan las imágenes de la fluorescencia y el campo claro sobrelapadas. Las flechas blancas señalan a las células que presentan tinción marcada con filipina (20X).

Para corroborar estos resultados decidimos determinar el aumento en la concentración de colesterol en las neuronas después del tratamiento con Hcy utilizando un método colorimétrico-enzimático. Brevemente el método consistió en obtener lisados completos de las células incubadas bajo estas condiciones. Los niveles de colesterol se determinaron usando el sistema Amplex Red (Invitrogen). Los valores de colesterol se calcularon usando soluciones conocidas de colesterol y normalizando por contenido de proteína. En estos experimentos, las células

tratadas con Hcy presentaron un índice de colesterol mayor que las células control, indicando que la Hcy tiene un efecto positivo en la síntesis y/o acumulación de colesterol en las células neuronales.

En estos experimentos también decidimos evaluar el efecto de estatinas (lovastatina) un inhibidor de la enzima HMGCoAR con el fin de examinar su efecto inhibitor sobre la síntesis de colesterol en nuestro modelo de estudio. Los niveles de colesterol en las células tratadas con Hcy aumentan con respecto al nivel basal que presenta el control (1.27). Los mayores niveles de colesterol se detectan cuando las células son incubadas con este compuesto (1.77). Cuando se incuban las células con lovastatina los niveles de colesterol se mantienen en forma similar al basal (1.01) (Fig. 19).



**Fig. 19 Determinación de acumulación de colesterol en MSN.** Las células se trataron con colesterol (50 µM), Hcy (50 µM), o lovastatina (10 µM) durante 5 días. Los niveles de colesterol se determinaron usando el sistema Amplex Red (Invitrogen). Los datos expresan los cambios en el nivel de colesterol con respecto a la condición control (línea superior punteada). Se grafica el promedio obtenido de cada condición y el error estándar de 9 experimentos independientes realizados por triplicado. \* P < 0.05 vs control, prueba de Wilcoxon.

La EA es un padecimiento neurodegenerativo en el cual se presenta una pérdida progresiva de la memoria y un deterioro cognitivo como resultado de la pérdida sináptica y la muerte neuronal. La causa de la EA aún no se conoce, pero se cree que están involucrados tanto factores genéticos como ambientales, por lo cual es difícil establecer con exactitud medidas de prevención. Una gran parte de las evidencias indican que el metabolismo celular y el estado redox neuronal se encuentra alterado en esta patología. Sin embargo todavía no se han podido determinar cuales son los mecanismos que activan la cascada de neurodegeneración.

El factor de riesgo mejor establecido para la EA es la edad, sin embargo recientemente se han asociado otros factores que están involucrados en alteraciones en el metabolismo celular. Estas alteraciones tienen como resultado la acumulación de agentes neurotóxicos los cuales también pueden inducir un estado de estrés oxidante en las células. Dentro de estos se ha considerado como factor de riesgo a Hcy debido a la relación que existe entre las altas concentraciones de este metabolito y el daño en el tejido nervioso encontrado en estos pacientes (Pietrzik *et al.*, 1997; Ravaglia *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2006). Otro de los hallazgos importantes que relacionan a la Hcy con la EA es la potenciación de la toxicidad de proteína  $\beta$ -amiloide a través del incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno (Kruman *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2002; White *et al.*, 2001). Pero hasta ahora el mecanismo por el cual la Hcy contribuye al desarrollo de la enfermedad aún se desconoce.

La presencia de estrés oxidante en esta patología se ha estudiado y se ha demostrado que en pacientes con EA existe una relación estrecha entre el daño al tejido cerebral y la presencia de marcadores de oxidación entre los que se mencionan el incremento en la oxidación de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Behl y Moosmann 2002; Butterfield, 2002)

El  $A\beta$  además de ser una proteína característica de la EA también se ha evidenciado que participa en la neurotoxicidad del SNC. En muchos estudios se ha comprobado que el  $A\beta$  ejerce su toxicidad ligado a la producción de estrés oxidante. Sin embargo el mecanismo por el cual genera ERO aún no queda claro.

Se ha planteado que el estrés oxidante en EA puede resultar de interacciones entre el  $A\beta$  y metales altamente reactivos como el cobre. Los efectos del cobre en el SNC se están estudiando y se ha encontrado que con la edad los transportadores que unen  $Cu^{2+}$  disminuyen por lo que se ha sugerido que de esta forma el  $Cu^{2+}$  libre se uniría al  $\beta$ - amiloide el cual presenta un sitio de unión específico para dicho metal (Multhaup *et al.*, 1996; Atwood *et al.*, 1998). La unión de

$\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{A}\beta$  promueve la agregación del péptido y la formación de complejos  $\text{A}\beta\text{-Cu}^{2+}$  (Miura *et al.*, 2000). Las reacciones llevadas a cabo en estos complejos se han estudiado *in vitro* y se ha mostrado que son una fuente generadora de ERO (Puglielli *et al.*, 2005).

Además de la relación entre el metabolismo de la Hcy y del colesterol en la EA también se ha determinado que estas moléculas contribuyen de manera importante al daño oxidante presente en esta enfermedad. En este sentido se ha sugerido al colesterol como un sustrato de electrones para la reacción de óxido-reducción de los complejos  $\text{A}\beta\text{-Cu}^{2+}$  en vista de la abundancia de este compuesto en el cerebro (Recuero *et al.*, 2009) En el caso de la Hcy se ha visto que este aminoácido puede potenciar la toxicidad de  $\text{A}\beta$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (White *et al.*, 2001).

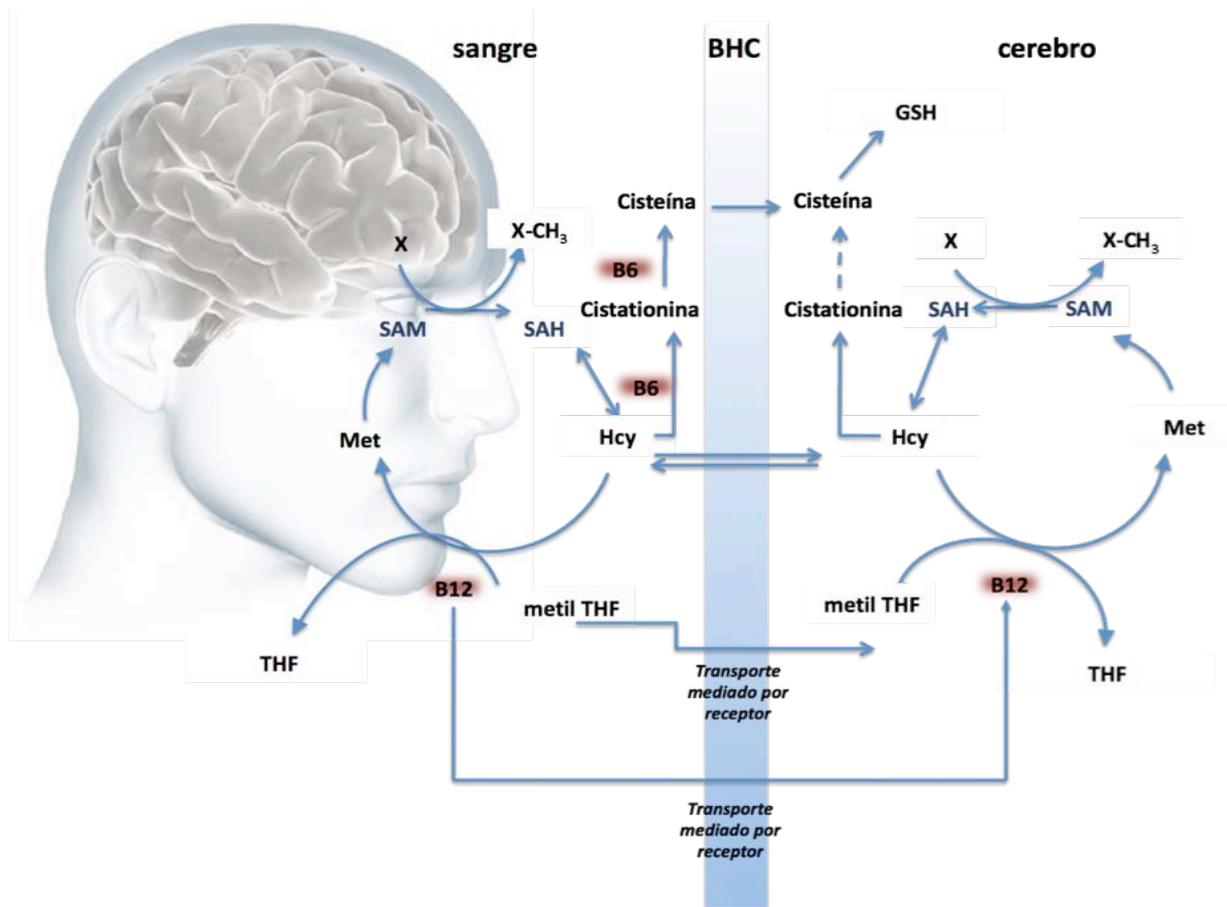
En este trabajo determinamos la contribución individual de estas moléculas al daño neuronal y su interacción con la toxicidad del péptido  $\text{A}\beta$  en un modelo de neuroblastoma humano diferenciado. Analizamos la toxicidad de las condiciones pro-oxidantes que se han sugerido y de otras que podrían estar presentes en la EA.

Estos resultados demuestran que la toxicidad ejercida por  $\text{A}\beta$  en las neuronas es limitada como se ha reportado en varios trabajos. La potenciación de su toxicidad depende de una interacción con Hcy y/o colesterol las cuales son moléculas endógenas en el cerebro con características oxidantes y cuyos niveles se encuentran incrementados en el envejecimiento patológico. Además de que colesterol potencia la toxicidad de la  $\text{A}\beta$ , mostramos en un modelo neuronal que la co-incubación con  $\text{A}\beta\text{-Cu}^{2+}$ -colesterol incrementa de manera importante la muerte neuronal y esta condición pro-oxidante es la más tóxica en cuanto a formación de ERO.

Los estudios llevados a cabo para esclarecer el papel de la Hcy en esta enfermedad han mostrado que ésta, además de producir daño a las neuronas como resultado de la generación de ERO y del incremento de la toxicidad del péptido  $\text{A}\beta$ , también es capaz de inducir la activación de apoptosis, la hiperactivación de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), y la fosforilación de proteínas del citoesqueleto (Tau) entre otros (Lipton *et al.*, 1997; Kruman *et al.*, 2000, Ho *et al.*, 2001, Zieminska y Lazarewickz 2006; Ho *et al.*, 2002, Loureiro *et al.*, 2008).

Las concentraciones de Hcy pueden aumentar entre otras causas, como, por ejemplo, si las concentraciones de ácido fólico, vitaminas B6 y B12 se encuentran por debajo de los límites normales. El cerebro es particularmente sensible al daño producido por la Hcy pues además de sobreactivar a los receptores NMDA la vía de transulfuración no se encuentra activa en las

células neuronales por lo cual éstas dependen de la cisteína glial para la regeneración de glutatión, una molécula antioxidante muy importante en el sistema nervioso (Fig. 20) (Para revisión ver Obeid y Wolfgang 2006 ).



**Fig. 20 Metabolismo de la Hcy en el SNC.** SAM, S-adenosil metionina; SAH, S-adenosilhomocisteína; Met, metionina; THF, tetrahidrofolato; GSH, glutatión.

La homeostasis de la concentración de este aminoácido es de gran trascendencia para el metabolismo celular pues además de ser neurotóxico se ha considerado como un factor aterogénico en diversas patologías cardiovasculares. Muchos de los estudios encaminados a esclarecer el papel de la Hcy en estas alteraciones han indicado una relación muy estrecha entre la presencia de altas concentraciones de Hcy y el aumento de colesterol en algunos tipos celulares (Karmin *et al.*, 1998; Yideng *et al.*, 2008). En este trabajo decidimos estudiar esta relación en células del sistema nervioso debido a que nuevas investigaciones han puesto de manifiesto que el metabolismo del colesterol también se encuentra alterado en la fisiopatología de la EA (De la Torre *et al.*, 2004; Kalaria, 2002; Vermeer *et al.*, 2002).

En este sentido se sabe que alteraciones en la concentración de colesterol en el cerebro pueden influenciar la expresión de la APP y la producción de A $\beta$  (Sparks, 1990; Racchi *et al.*, 1997; Bodovitz *et al.*, 1996; Refolo *et al.*, 2000; Shie *et al.*, 2002; Sparks *et al.*, 2000; Sparks y Schreurs, 2003). Además de este trabajo existe evidencia en la literatura que indica que el colesterol también puede contribuir a la neurotoxicidad producida por el péptido A $\beta$ , mediante el aumento de estrés oxidante en modelos neuronales (Ferrera *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2009). La presencia en humanos del alelo  $\epsilon 4$  de la apolipoproteína E que se asocia a altos niveles de colesterol es de hecho uno de los factores de riesgo más reconocidos para desarrollar esta enfermedad (Notkola *et al.*, 1998). Además de que se ha reportado que el uso de estatinas que son fármacos que bajan los niveles de colesterol disminuyen el riesgo de sufrir EA (Jick *et al.*, 2000).

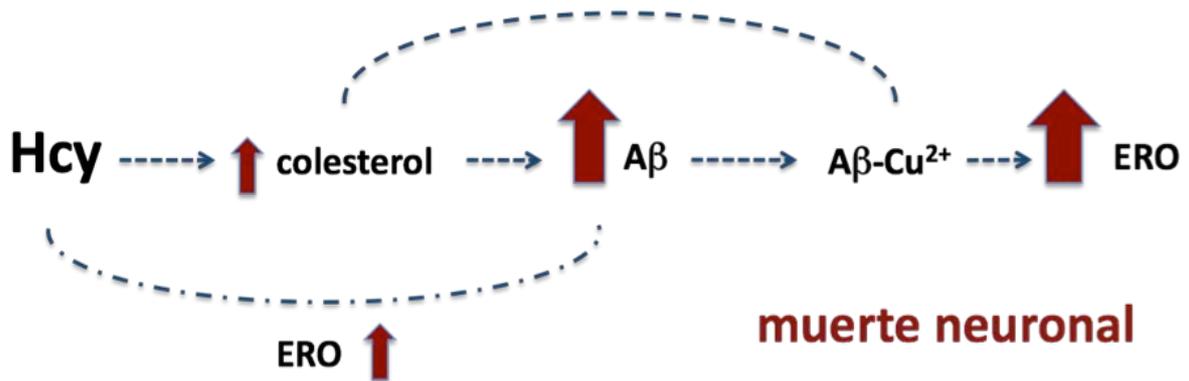
Las evidencias que sugieren una relación entre el metabolismo del colesterol y la EA son extensas, sin embargo el factor crítico para el análisis de estos hallazgos debe tener en cuenta que el cerebro obtiene el colesterol principalmente de la síntesis de novo debido a que el paso del colesterol desde la periferia al cerebro está limitado por la barrera hematoencefálica. Es por eso que estudiar los mecanismos neuronales involucrados en el aumento de colesterol permitirán un mejor entendimiento de su papel patogénico.

Como un primer acercamiento para determinar como es que se acumula el colesterol en las neuronas en este trabajo mostramos que una condición patológica como es la concentración elevada de Hcy es capaz de aumentar el estrés oxidante y la acumulación de colesterol intraneuronal. A la fecha y sustentando nuestra investigación han surgido informes que sugieren la participación del estrés oxidante como un mecanismo de inducción de la vía de síntesis de colesterol en el sistema nervioso (Recuero *et al.*, 2009).

Nuestro hallazgo es interesante debido a que representa una condición que está presente en la EA y a que se ha demostrado que puede inducir la expresión de enzimas y factores transcripcionales involucrados en la vía de síntesis de colesterol en modelos celulares no neuronales (Karmin, 1998; Geoff *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2005; Yideng *et al.*, 2008). Es importante señalar que el cambio en el nivel de colesterol se observó después de un tratamiento crónico con Hcy por lo que sugerimos que el posible mecanismo involucrado sea el de inducción de la vía de síntesis de colesterol que Usuario de Office 2004 Test Drive Página 46 09/03/2011 actualúa a nivel génico. Sin embargo se requiere realizar futuros estudios para corroborar esta idea.

Con base en los resultados obtenidos consideramos que existe relación estrecha en la toxicidad del péptido A $\beta$  y la presencia de colesterol, Hcy y cobre. Esto permite indicar que hay relaciones de toxicidad importantes entre la Hcy que por un lado es capaz de incrementar el

colesterol intraneuronal y la presencia de complejos  $A\beta-Cu^{2+}$  que pueden promover la producción de ERO a partir del colesterol y aumentar la muerte neuronal (Fig. 21). Pretendemos continuar con el estudio del papel de la Hcy como factor de riesgo en la muerte neuronal que ocurre en la EA. Particularmente nos enfocaremos en estudiar el efecto de la Hcy sobre el metabolismo del colesterol y su relación tanto con la toxicidad como sobreproducción del péptido  $\beta$ -amiloide.



**Fig. 21 Toxicidad de Hcy en MSN: modelo.** La Hcy incrementa el colesterol neuronal el cual contribuye a la sobreproducción  $A\beta$ . En presencia de los complejos  $A\beta-Cu^{2+}$  se incrementa la generación de ERO a partir del colesterol y la muerte neuronal.

En realidad a poco más de cien años de la primera descripción de la EA aún no se entiende completamente la causa de esta enfermedad, pero es probable que se desarrolle a partir de una compleja serie de sucesos asociados al envejecimiento patológico (acumulación de colesterol, Hcy, metales, etc) que tienen lugar en el cerebro actuando de manera crónica. Muchos estudios además del presente están explorando los factores que influyen en la causa y el desarrollo de la EA.

En resumen, los resultados de este trabajo complementan otros reportes acerca de las condiciones pro-oxidantes que contribuyen a la muerte neuronal presente en la EA y también abren una nueva perspectiva acerca del papel que tiene la Hcy en el metabolismo del colesterol neuronal como posible mecanismo patogénico de la EA.

- Utilizando un modelo de neuroblastoma humano encontramos que la Hcy, el cobre y el colesterol son tóxicos para las células en una forma dependiente de la concentración.
- Las células MSN diferenciadas son más susceptibles que las células no diferenciadas al daño producido por los tratamientos.
- La homocistina, un compuesto oxidado derivado de la homocisteína no produce muerte neuronal.
- El cobre y el colesterol pueden inducir la formación de ERO y potenciar la toxicidad de la Hcy.
- El colesterol potencia la toxicidad de la A $\beta$  y la co-incubación con A $\beta$ -Cu<sup>2+</sup>-colesterol incrementa de manera adicional la muerte neuronal con un aumento en la formación de ERO.
- El tratamiento crónico con Hcy permite la acumulación de colesterol en las células MSN diferenciadas.

- Alonso, A. C., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2, 783-787.
- Alonso, A. C., Zaidi T., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5562–5566.
- Alzheimer, A. (1907). Über einen eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medizin* 64, 146–148. (An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* (1995) 8, 429-431.
- Arias, C., Sharma, N., Davies, P., Shafit-Zagardo, B. (1993) Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 61, 673-682.
- Arnaud, C., Mach, F. (2005). Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis: role on endothelial function, inflammation and immunomodulation. *Arch Mal Coeur Vaiss* 98, 661-666.
- Atwood, C. S., Moir, R. D., Huang, X., Scarpa, R. C., Bacarra, N.M., Romano, D. M., Hartshorn, M. A., Tanzi, R.E., Bush, A. I. (1998) Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem* 273, 12817-12826.
- Balamurugan, K., Schaffner, W. (2006) Cooper homeostasis in eukaryotes: teetering on atightrope. *Biochim Biophys Acta* 1763, 737-46.
- Barnham, K. J., Masters C. L., and Bush, A. I. (2004) Linking lipids to Alzheimer's. *Nat Rev Drug Discovery* 3, 205-214.
- Barnham, K. J., McKinstry, W. J., Multhaup, G., Galatis, D., Morton, C. J., Curtain, C. C., Williamson, N. A., White, A. R., Hinds, M. G., Norton, R. S., Beyreuther, K. Masters, C. L., Parker, M. W., Cappai, R. (2003) Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper-binding domain. *J Biol Chem* 19, 17401-17407.
- Behl, C., Moosmann, B. (2002) Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radical Biol Med* 33, 182-191.
- Beyer, K., Lao, J. I., Latorre, P., Riutort, N., Matute, B., Fernandez-Figueras, M.T., Mate, J.L., Ariza, A. (2003) Methionine synthase polymorphism is a risk factor for Alzheimer disease. *Neuroreport* 14,

1391-1394.

- Bodovitz, S., Klein, W.L. (1996) Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 271, 4436-4440.
- Bonfoco, E., Leist, M., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A., Nicotera, P. (1996) Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. *J Neurochem* 67, 2484 -2493.
- Bowling, A. C., Mutisya, E.M., Walker, L.C., Price, D.L., Cork, L.C., Beal, M.F. (1993) Age-dependent impairment of mitochondrial function in primate brain. *J Neurochem* 60, 1964-1967.
- Breteler, M. M. (2000) Vascular involvement in cognitive decline and dementia: epidemiologic evidence from the Rotterdam study and the Rotterdam scan study. *Ann N Y Acad Sci* 903, 457- 465.
- Brewer, G. J. (2003) Copper in medicine. *Curr Opin Chem Biol* 7, 207-212.
- Bush, A.I. (2000) Metals and neuroscience. *Curr Opin Chem Biol* 4,184-191
- Butterfield, D. A. (2002) Amyloid  $\beta$ -peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radical Res* 36, 1307-1313.
- Butterfield, D. A., Boyd-Kimball, D. (2004) Amyloid  $\beta$ peptide (1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain. *Brain Pathol* 14, 426-432.
- Butterfield, D. A., Bush, A.I., (2004) Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide (1-42) involvement of methionine residue 35 in the oxidative stress and neurotoxicity of this peptide. *Neurobiol Aging* 25, 563-568.
- Butterfield, D. A., Lauderback, C.M. (2002) Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid  $\beta$ -peptide associated free radical oxidative stress. *Free Radical Biol Med* 32, 1050-1060.
- Ceccatlli, S., Christopher, T., Zhang, Q., Ming, Chen. (2007) Mechanisms and modulation of neural cell damage induced by oxidative stresses. *Physiol Behav* 92, 87-92.
- Cherny, R. A., Atwood, C. S., Xilinas, M. E., Gray, D. N., Jones, W. D., McLean, C. A., Barnham, K. J., Volitakis, I., Fraser, F. W., Kim, Y. S., Huang, X., Goldstein, L. E., Moir, R. D., Lim, J. T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R. E., Masters, C. L., and Bush, A. I. (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits transgenic mice. *Neuron* 30, 665-676.

- Chiang, P. K., Gordon, R. K., Tal, J., Zeng, G. C., Doctor, B.P., Pardhasaradhi, K., McCann, P. P. (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* 10, 471- 480.
- Clarke, R., Smith, A. D., Jobst, K. A., Refsum, H., Sutton, L., Ueland P. M. (1998) Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 55, 1449-1455.
- Cole, G. M., Yang, F., Chen, P. P., Frautschy, S. A., Hsiao, K. (1999) Caspase activation in dystrophic neurites in Alzheimer's disease and aged HuA-PPsw transgenic mice. In: Iqbal K, Swaab DF, Winbland B, Wisniewski HM, editors. *Alzheimer's disease and related disorders: etiology, pathogenesis, and therapeutics*. New York: Wiley & Sons 363-369.
- Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K., Masters, C.L. (2000) What the evolution of the amyloid protein precursor supergen family tells us about its function. *Neurochem Int* 36, 175-184.
- De la Torre, J. C. (2004) Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *Lancet Neurol* 3, 184-190.
- DeKosky, S.T., Scheff, S.W., Styren, S. D. (1996) Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration* 5, 417– 421.
- Dinsmore, J. H., Solomon, F. (1991) Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neural differentiation. *Cell* 64, 817-826.
- Emerit, J., Edeas, M., Bricaire, F. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 58, 39-46.
- Fernández, A., Llacuna, L., Fernández-Checa, J. C., Colell, A. (2009) Mitochondrial cholesterol loading exacerbates amyloid  $\beta$  peptide-induced inflammation and neurotoxicity. *J Neurosci* 29, 6394 – 6405.
- Ferrera, P., Mercado-Gomez, O., Silva-Aguilar, M., Valverde, M., Arias, C. (2008). Cholesterol potentiates  $\beta$ -amyloid-induced toxicity in human neuroblastoma cells: involvement of oxidative stress. *Neurochem Res* 8, 1509-1517.
- Fraser, F. W., Kim, Y. S., Huang, X., Goldstein, L. E., Moir, R. D., Lim, J. T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R. E., Masters, C. L., Bush, A. I. (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits transgenic mice. *Neuron* 30, 665-676.
- Fuso, A., Seminara, L., Rosaria, A., Cavallaro, Fabrizio, D'Anselmi., Sigfrido, S. (2005) S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol Cell Neurosci* 28,

195- 204.

- Gelmacher, D., White, P. (1996) Evaluation of dementia. *New Engl J Med* 335(5), 331-336.
- Geoff, H., Werstuck, S. R., Lentz, S. D., Gazi, S., Hossain, S. K. Sood, Y. Y., Shi, J., Zhou, N. M., Skaidrite, K., Krisans, M. R., Richard, C. A. (2001) Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* 107, 1263-1273.
- Gitlin, J. D. (2003) Wilson disease. *Gastroenterol* 125, 1868-1877.
- Glennner, G. G., Woong, C. W. (1984) Alzheimer's Disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Comm* 120 (3), 885-890.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* 31, 45-80.
- Hardy, J. A. (2006) Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved? *Curr Alzheimer Res* 3, 71-73.
- Hardy, J. A., Higgins, G. A. (1992) The amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.
- Ho, P. I., Ashline, D., Dhitavat, S., Ortiz, D., Collins, S., Shea, T. B., Rogers, E. (2003) Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 14, 32- 42.
- Ho, P. I., Ashline, D., Dhitavat, S., Ortiz, D., Collins, S., Rogers, E., Shea, T.B., (2001a) Homocysteine potentiates  $\beta$ -amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem*, 78, 249-253.
- Ho, P.I., Ortiz, D., Rogers, E., Shea, T.B. (2002) Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res.* 70 (5), 694-702.
- Huang, X., Atwood, C. S., Hartshorn, M. A., Multhaup, L. E., Goldstein, R. C., Scarpa, M. P., Gray, D. N., Lim, J., Moir, R. D., Tanzi, R. E., Bush, A. I. (1999) The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry*, 38, 7609-7616.
- Jick, H., Zornberg, G. L., Jick, S. S., Seshadri, S., Drachman, D. A. (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356, 1627-1631.

Cerebrovasc Dis 13 (2), 48-52.

- Kang, J. (1987) The precursors of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Karmin, O., Edward, G., Lynn, Y. H., Chung, Y.L., Ricky, Y. K., Man, P. C., Choy. (1998) Homocysteine stimulates the production and secretion of cholesterol in hepatic cells. *Biochim Biophys Acta* 1393, 317-324
- Keller, J. N., Pang, Z., Geddes, J. W., Begley, J. G., Germeyer, A., Waeg, G., Mattson, M. P. (1997). Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by  $\beta$ -peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem* 69, 273-284.
- Kidd, M. (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 92-93.
- Kruman, I. I., Culmsee, C., Chan, S., Kruman, Y., Guo, Z., Penix, L., Mattson, M. P. (2000). Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 20, 6920 -6926.
- Kruman, I. I., Kumaravel, T. S., Lohani, A., Pedersen, W. A., Cutler, R. G., Kruman, Y. (2002) Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22, 1752-1762.
- Kruth, H. S. (1984) Filipin-positive, oil red O-negative particles in atherosclerotic lesions induced by cholesterol feeding. *Lab Invest* 50, 87-93.
- Ksiezak-Reding, H., Liu, W. K., Yen, S. (1992) Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res* 597, 209-219.
- Shobab, L. A., Hsiung, R., Feldman, H. H. (2005) Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 4, 841-52.
- Lipton, S. A., Kim, W. K., Choi, Y. B., D'Emilia, D. M., Rayudu, P. V., Arnelle, D. R., Stamler, J. S. (1997) Neurotoxicity associated with dual action of homocysteine at the N-methyl-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 5923-5928.
- Llibre, J., (1999). Epidemiology of dementia and Alzheimer's disease. *Ann Int Psych Basic and Clinical Neuroscience* 7,1-7.

- López-Pousa, S. (1998) Epidemiología de las demencias. En: Alberca R, López-Pousa, S. eds. Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Madrid:IM&C;137-148.
- Loureiro, S. O., Heimfarth, L., Pelaez, P. L., Vanzin, C. S., Viana, L., Wyse, A.S., Pessoa-Pureur, R. (2008) Homocysteine activates calcium-mediated cell signaling mechanisms targeting the cytoskeleton in rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci*, 26 (5), 447-455.
- Lovell, M. A, Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L., Markesbery, W. R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* 158, 47-52.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randal, R. J. (1951) Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Mark, R. J., Geddes, J. W., Uchida, K., Mattson, M. P. (1997). Amyloid  $\beta$ -peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: Involvement of membrane lipid peroxidation. *J Neurosci* 17, 1646-1654.
- Masliah, E., Terry, R. D., Alford, M., De Teresa, R., Hansen, L. A. (1991). Cortical and subcortical patterns of synaptophysin-like immunoreactivity in Alzheimers disease. *Am J Pathol* 138, 235-246.
- Mattson, M. P., Shea, T.B. (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 26 (3), 137-146.
- Mattson, M. P., LaFerla, F. M., Chan, S. L., Leissring, M. A., Shepel, P. N., Geiger, J. D. (2000) Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 23, 222–229.
- Maynard, C. J., Cappai, R., Volitakis, I., Cherny, R. A., White, A. R., Beyreuther, K., Masters, C. L., Bush, A. I., and Li, Q. X. (2002). Overexpression of Alzheimer's disease amyloid-beta opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *J Biol Chem* 277, 44670-44676.
- Medina, M., Urdiales, J. L., Amores-Sanchez, M. I. (2001). Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions. *Eur J Biochem* 268, 3871-3882.
- Mercado-Gomez, O., Ferrera, P., Arias, C. (2004) Histopathologic changes induced by the microtubule-stabilizing agent taxol in the rat hippocampus in vivo. *J Neurosci Res* 78, 553-562.
- Meyer, J. S., Rauch, G., Rauch, R. A., Haque, A. (2000) Risk factors for cerebral hypoperfusion, mild cognitive impairment, and dementia. *Neurobiol Aging* 21, 161-69.

- Miller, D. L., Papayannopoulos, I. A., Styles J., Bobin, S. A., Lin, Y. Y., Bieman, K., Igbal, K. (1993) Peptide composition of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 301, 40-52.
- Miura, T., Suzuki, K., Kohata, N., Takeuchi, H. (2000) Metal binding modes of Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide in insoluble aggregates and soluble complexes. *Biochemistry* 39, 7024-7031.
- Moore, D. P., Jefferson, J. W. (2004) *Handbook of Medical Psychiatry*. 2 ed. St. Louis, Mo: Mosby.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol Meth* 65, 55-63.
- Multhaup, G., Ruppert, T., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Colin L. M., Beyreuther, K. (1997) Reactive Oxygen Species and Alzheimer's Disease. *Biochem Pharmacol* 54, 533-539.
- Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C. L., Beyreuther K. (1996) The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science* 271, 1406-1409.
- Mungarro-Menchaca, X., Ferrera, P., Moran, J., Arias, C. (2002).  $\beta$ -amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine. *J Neurosci Res* 68, 89 -96.
- Murayama, Y., Takeda, S., Yonezawa, K., Giambarella, U., Nishimoto, I., Ogata, E. (1996) Cell surface receptor function of amyloid precursor protein that activates Ser/Thr Kinases. *Gerontology* 42 (1), 2-4.
- Notkola, I. L., Sulkava, R., Pekkanen, J. (1998) Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17, 14-20.
- Obeid, R., Wolfgang, H. (2006) Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Letters* 580, 2994-3005.
- Olszewski, A. J., Szostak, W. B., Bialkowska, M., Rudnicki, S., McCully, K. S. (1989) Reduction of plasma lipid and homocysteine levels by pyridoxine, folate, cobalamin, choline, riboflavin, and troxerutin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 75, 1-6.
- Opazo, C., Huang, X., Cherny, R. A., Moir, R. D., Roher, A. E., White, A. R. Cappai, R. C., Masters, L. R., Tanzi, E., Inestrosa, N. C. Bush, A. I. (2002) Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease beta-amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 277, 40302-40308.

- Petris, M. J., Mercer, J. F., Culvenor, J. G., Lockhart, P., Gleeson, P. A., Camakaris, J. (1996) Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase eZux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *EMBO J* 15, 6084-6095.
- Pfriege, F. W. (2003) Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 60, 1158-1171.
- Pietrzik, K., Bronstrup, A. (1997) Causes and consequences of hyperhomocysteinemia. *Int J Vitam Nutr Res* 67, 389-395.
- Poirier, J., Baccichet, A., Dea, D., Gauthier, S. (1993) Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 55, 81-90.
- Poorkaj, P., Bird, T. D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R. M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W. C., Raskind, M., Schellenberg, G. D. (1998) Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 43, 815-825.
- Puglielli, L., Friedlich, A. L., Setchell, K. (2005) Alzheimer disease  $\beta$ -amyloid activity mimics cholesterol oxidase. *J Clin Invest* 115, 2556–2563.
- Racchi, M., Baetta, R., Salviati, N. (1997) Secretory processing of amyloid precursor protein is inhibited by increase in cellular cholesterol content. *Biochemistry* 322, 893-98.
- Rakel, P., (2005) *Conn's Current Therapy* 57 ed. Philadelphia, Pa: Saunders.
- Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, M. (2005) Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 82, 636-643.
- Recuero, M., Vicente, M. C., Martínez-García, A., Ramos M. C., Carmona-Saez, P., Sastre., S., Aldudo, J., Vilella, E., Frank., A., Bullido, M. J., Valdivieso., F. (2009) A free radical-generating system induces the cholesterol biosynthesis pathway: a role in Alzheimer's disease. *Aging Cell* 8, 128-139.
- Refolo, L. M., Malester, B., LaFrancois, J. (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7, 321-331.
- Robakis, N.K. (1987) Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding  $\beta$ -amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet* 1, 384-385.
- Rossi, L., Squitti, R., Pasqualetti, P., Marchese, E., Cassetta, E., Forestiere, E., Rotilio, G., Rossini, P. M., Finazzi Agrò, A. (2002) Red blood cell copper, zinc superoxide dismutase activity is higher in

- Alzheimer's disease and is decreased by D-penicillamine. *Neurosci Lett* 329, 137-140.
- Rossonjohn, J., Cappai R., Feli, S. C., Henry, A., McKinstry, W. J., Galatis, D. (1999) Crystal structure of the N-terminal growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol* 6, 327-331.
- Sadowski, M., Pankiewicz, J., Scholtzova, H. (2004) Links between the pathology of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurochem Res* 29, 1257-1266.
- Schonknecht, P., Lutjohann, D., Pantel, J. (2002) Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls. *Neurosci Lett* 324,83-85.
- Seshadri, S. (2006) Elevated plasma homocysteine levels: risk factor or risk marker for the development of dementia and Alzheimer's disease? *J Alzh Dis* 9, 393-98.
- Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P. F., Rosenberg, I. H., D'Agostino, R. B., Wilson, P. W., Wolf, P. A. (2002) Plasma homocystein as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Eng J Med* 346, 476- 483.
- Shie, F. S., Jin, L. W., Cook, D. G., Leverenz, J. B., LeBoeuf, R. C. (2002) Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain amyloid-beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13, 455-459.
- Smith, D. G., Cappai, R., Barnham, K. J. (2007) The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta* 1768, 1976-1990.
- Smith, M. A., Harris, R., Sayre, P. L., Beckman, L. M., Perry, J. S. (1997) Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17, 2653-2657.
- Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F., Kowal, N. (1996) Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 382, 120-121.
- Snowdon, D. A., Tully, C. L., Smith, C. D., Riley, D., Markesbery, W. (2000) Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun Study. *Am J Clin Nutr* 71, 993-998.
- Sparks, D. L., Hunsaker, J.C., Scheff, S.W., Kryscio, R. J., Henson, J. L. Markesbery, W. R. (1990). Cortical senile plaques in coronary artery disease, aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 11, 601-607.
- Sparks, D. L., Schreurs, B. G. (2003) Trace amounts of copper in water induce  $\beta$ -amyloid plaques and

- learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 11065-11069.
- Sparks, D. L., Kuo, Y. M., Roher, A., Martin, T., Lukas, R. J. (2000) Alterations of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation: preliminary observations. *Ann N Y Acad Sci* 903, 335-44.
- Starkebaum, G., Harlan, J. M. (1986). Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 77, 1370-1376.
- Streck, E. L., Vieira, P. S., Wannmacher, C. M., Dutra-Filho, C. S., Wajner, M., Wyse, A. T. (2003) In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 18, 147-154.
- Streltsov, V. A., Varghese J. N. (2008) Substrate mediated reduction of copper-amyloid- $\beta$  complex in Alzheimer's disease. *The Royal Society of Chemistry 2008 Chem Commun* 3169–3171-3169.
- Subbarao, K. V., Richardson, J. S., Ang, L. C. (1990) Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J Neurochem* 55, 342-345.
- Vale, R. D., Reese, T. S., Sheetz, M. P. (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42, 39 -50.
- Vermeer, S. E., Koudstaal, P. J., Oudkerk, M., Hofman, A., Breteler, M. M. (2002) Prevalence and risk factors of silent brain infarcts in the population-based Rotterdam Scan Study. *Stroke* 33, 21-25.
- Vigo-Pelfrey, C. (1993) Characterization of  $\beta$ -amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 61, 1965-1968.
- White, A. R., Huang, X., Jobling, M. F., Barrow, C. H., Beyreuther, K., Masters, C. L., Bush, A. I., Cappai, R. (2001) Homocysteine potentiates copper and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J Neurochem* 76, 1509 -1520.
- White, A. R., Multhaup, G., Maher, F., Bellingham, S., Camakaris, J., Zheng, H., Bush, A. I., Beyreuther, K., Masters, C. L., Cappai, R. (1999) The Alzheimer's disease amyloid precursor protein modulates copper-induced toxicity and oxidative stress in primary neuronal cultures. *J Neurosci* 19, 9170-9179.

- White, A. R., Reyes, R., Mercer, J. F., Camakaris, J., Zheng, H., Bush, A. I., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Cappai, R. (1999). Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice. *Brain Res* 842, 439–444.
- Wischik, C. M., Novark, M., Edwards, P.C., Klug A., Tichelaar, W., Crowther, R. A. (1988) Structure and characterization of the core of the helical paired filaments of Alzheimer Disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 4884-4888.
- Wisniewski, H. M., Narang, H. K., Terry, R. D. (1976) Neurofibrillary tangles of helical paired filaments. *J Neurol Sci* 27, 173-181.
- Yatin, S. M., Varadarajan, S., Link, C. D., Butterfield, D. A. (1999) In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide (1–42). *Neurobiol Aging* 20, 325-330.
- Yideng, J., Jianzhong, J., Xiong, J., Cao, J., NanLi, G. L., Wang, S. (2008) Homocysteine-induced extracellular superoxide dismutase and its epigenetic mechanisms in monocytes. *J Exp Biol* 211, 911-920
- Yideng, J., Jianzhong, Z., Ying, H., Juan, S., Jinge, Z., Shenglan, W., Xiaoqun, H. and Shuren, W. (2007) Homocysteine-mediated expression of SAHH, DNMTs, MBD2, and DNA hypomethylation potential pathogenic mechanism in VSMCs. *DNA Cell Biol* 26, 603-611.
- Zhu, X., Smith, M. A., Honda, K. (2007) Vascular oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neurol Sci* 257, 240-246.
- Zieminska, E., Lazarewicz, J. W. (2006) Excitotoxic neuronal injury in chronic homocysteine neurotoxicity studied in vitro: the role of NMDA and group I metabotropic glutamate receptors. *Acta Neurobiol Exp* 66 (4), 301-309.