

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Facultad de Medicina  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Instituto de Fisiología Celular

**Producción de especies reactivas de oxígeno y muerte neuronal apoptótica en presencia de distintos fragmentos del péptido  $\beta$ -amiloide coordinados con  $\text{Cu}^{2+}$**

## TESIS

Que para obtener el título de  
Licenciada en Investigación Biomédica Básica

Presenta  
Sharlen Yared Moore Corona

Directora de tesis  
Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo

México D.F., Julio 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo, en el Departamento de Neuropatología Molecular de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria.

El proyecto fue financiado parcialmente por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M PAPIIT IN211710) y por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF PIFUTP08-161).

« Los hombres deberían saber que sólo del cerebro se originan las alegrías, los placeres y las risas, así como las tristezas, las penas, el dolor y las lamentaciones. Es por el cerebro, de manera especial, que adquirimos sabiduría y conocimientos, y vemos y oímos, y sabemos qué es correcto o incorrecto, qué es dulce o insípido [...] y por ese mismo órgano podemos sufrir locura o delirio, y nos asaltan miedos y terrores [...]. Por eso creo que el cerebro ejerce el mayor poder en el hombre ».

Hipócrates, *Sobre la enfermedad sagrada*, siglo IV a.C.

« [...]Lull'd in the countless chambers of the brain,  
Our thoughts are link'd by many a hidden chain.  
Awake but one, and lo, what myriads rise!  
Each stamps its image as the other flies!  
Each, as the various avenues of sense  
Delight or sorrow to the soul dispense,  
Brightens or fades; yet all, with magic art,  
Control the latent fibres of the heart[...] ».

Samuel Rogers, *The pleasures of memory*, 1792.

« The finest set of verses of our modern time describes how the poet gazed on the 'happy autumn fields', and remembered the 'days that were no more'. After all, a man's real possession is his memory. In nothing else is he rich, in nothing else is he poor ».

Alexander Smith, *Dreamthorp: Essays written in the Country*, 1863.

« La memoria es la base de la personalidad individual, así como la tradición lo es de la personalidad colectiva de un pueblo. Se vive en el recuerdo y por el recuerdo, y nuestra vida espiritual no es, en el fondo, sino el esfuerzo de nuestro recuerdo por perseverar, por hacerse esperanza, el esfuerzo de nuestro pasado por hacerse porvenir ».

Miguel de Unamuno, *Del sentimiento trágico de la vida*, 1913.

*A mis padres, a Mami y a Aquiles,  
por todo su amor, apoyo y entusiasmo.*

# Índice

---

TEMA	PÁGINA
VOTO APROBATORIO.....	i
ABREVIATURAS.....	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
El cerebro.....	1
Envejecimiento.....	3
Estrés oxidante, especies reactivas de oxígeno y radicales libres.....	5
<i>Superóxido</i> .....	9
<i>Peróxido de hidrógeno</i> .....	11
<i>Generación de ERO por complejos <math>\beta</math>A-Cu</i> .....	14
Enfermedad de Alzheimer.....	16
<i>Clasificación y descripción general</i> .....	16
<i>Antecedentes</i> .....	17
<i>Factores de riesgo</i> .....	18
<i>Histopatología de la enfermedad</i> .....	19
<i>Hipótesis actuales</i> .....	22
Papel del cobre en el cerebro y su relación con la EA.....	26
Péptidos $\beta$ -amiloide.....	35
<i>Características de los fragmentos usados</i> .....	41
Muerte neuronal inducida por el $\beta$ A.....	43
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	47
HIPÓTESIS.....	48
OBJETIVOS.....	48
METODOLOGÍA.....	49
RESULTADOS.....	56
DISCUSIÓN.....	70
CONCLUSIONES.....	75
REFERENCIAS.....	77
AGRADECIMIENTOS.....	87



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA  
COORDINACIÓN

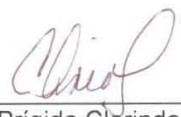
**DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS**  
DIRECTOR  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
PRESENTE.


Por este conducto, le informamos que la tesis titulada: **“Producción de especies reactivas de oxígeno y muerte neuronal apoptótica en presencia de distintos fragmentos del péptido  $\beta$ -amiloide coordinados con  $\text{Cu}^{2+}$ ”**, que presenta la alumna **SHARLEN YARED MOORE CORONA**, con número de cuenta **305501790** cumple los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos Miembros del Jurado, otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Iván Velasco Velázquez

  
\_\_\_\_\_  
Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Wilhelm Hansberg Torres

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Liliana Quintanar Vera

## ABREVIATURAS

---

<b>AIF</b>	Factor inductor de la apoptosis
<b>Apaf-1</b>	Factor activador de proteasas 1
<b>ApoE</b>	Apolipoproteína E
<b>APP</b>	Proteína precursora amiloide
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>ATP7A</b>	ATPasa de tipo P transportadora de cobre
<b><math>\beta</math>A</b>	Beta-amiloide
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>Casp-3</b>	Caspasa 3
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CitC</b>	Citocromo C oxidasa
<b>CQ</b>	Clioquinol
<b>Ctr1</b>	Proteína transportadora de cobre 1
<b>CuBD</b>	Dominio de unión a cobre
<b>CuZnSOD</b>	Cobre Zinc Superóxido Dismutasa
<b>DHE</b>	Dihidroetidio
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EAE</b>	Enfermedad de Alzheimer Esporádica
<b>EAF</b>	Enfermedad de Alzheimer Familiar
<b>EAIP</b>	Enfermedad de Alzheimer de inicio precoz
<b>EAIT</b>	Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío
<b>ERO</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>GABA</b>	Ácido gamma amino butírico
<b>GSSG-R</b>	Glutatió Reductasa
<b>GSH-Px</b>	Glutatió Peroxidasa
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>MAC</b>	Complejo de ataque membranal
<b>MnSOD</b>	Manganeso Superóxido Dismutasa
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenín dinucleótido
<b>Prp</b>	Proteína priónica
<b>PS</b>	Placas seniles
<b>PSEN</b>	Presenilina
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutasa
<b>STP</b>	Estaurosporina



### **El cerebro**

El cerebro humano es el órgano más complejo del cuerpo, y también el más eficiente en cuanto a procesamiento de información se refiere; nos permite filtrar información y procesar estímulos externos para poder interactuar de manera adecuada con nuestro entorno. Es el encargado de mediar procesos que van desde la percepción sensorial hasta el aprendizaje y la memoria. Su función principal es la de integrar una enorme cantidad de señales en un movimiento, sentimiento o comportamiento específico y apropiado, como respuesta a un estímulo. Esta serie de funciones son sumamente complicadas y rara vez tomamos conciencia de su complejidad.

El cerebro humano está formado por más de  $10^{11}$  neuronas (células nerviosas) y muchas más células gliales (de soporte). Las neuronas tienen características celulares únicas que permiten al cerebro funcionar de manera distinta a la que la hacen otros órganos. Éstas presentan una forma celular distintiva con estructuras especializadas en la transmisión de información. Las sinapsis se conforman de tres regiones celulares: el cuerpo celular (soma neuronal), las dendritas y el axón. El soma contiene el núcleo celular y la maquinaria para la síntesis de proteínas y otras moléculas. Las dendritas son extensiones que se ramifican alrededor de los somas para formar conexiones, por lo tanto permiten la recepción de información en la célula. El axón es la estructura que permite la comunicación con otras neuronas, se extiende a partir del soma y es la vía por la cual las señales viajan a larga distancia desde el soma, incluso a lugares fuera del cerebro [1,2].

La corteza cerebral es la capa más externa del cerebro y constituye aproximadamente el 80% del volumen total de este órgano [1]. Tiene un aspecto característico debido a sus pliegues y circunvoluciones y es conocida también como neocorteza por ser una estructura relativamente nueva en la evolución del cerebro. En ella radican una serie de importantes funciones cerebrales como la cognición, la imaginación, la visión y la habilidad lingüística [1]. Muchas de estas funciones se deterioran con la edad y correlacionan con algunos de los padecimientos que presentan las personas con demencia senil o con un probable diagnóstico de Alzheimer, siendo éstos últimos proclives en un 50% a desarrollar un déficit del volumen total del cerebro y de la corteza [3].

El cerebro, como todos los órganos, se ve afectado por el proceso del envejecimiento. En el sistema nervioso, se asocia con la disminución de varias funciones cognitivas en cierto grado [4]. Las neuronas se vuelven vulnerables al estrés por una serie de mecanismos que ocasionan que pierdan la homeostasis (algunos de los cuales se abordarán más adelante) y que empiecen a presentar cambios morfológicos que contribuyen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

## Envejecimiento

El envejecimiento está caracterizado por un declive progresivo de las funciones fisiológicas y un incremento en la susceptibilidad a enfermedades y a la muerte [5].

Se ha distinguido al envejecimiento como un proceso de tres etapas: alteraciones metabólicas, daño y patología celular [6]. Los procesos metabólicos que ocurren en condiciones fisiológicas generan toxinas que se van acumulando con la edad, causando daño celular. Son especialmente vulnerables las células post-mitóticas de larga vida, como las neuronas. Algunos productos tóxicos de degradación impiden el recambio mitocondrial llevando a la acumulación de orgánulos deficientes en la producción energética pero que generan especies reactivas del oxígeno (ERO) [5]. Este tipo de eventos comprometen a las células y pueden desencadenar señales que conducen a la muerte celular.

Actualmente, una de las explicaciones más aceptadas sobre el por qué envejecemos es la *teoría del envejecimiento por los radicales libres mitocondriales*, propuesta por Harman en 1972, siendo ésta una adaptación de su teoría inicial propuesta en 1956: *teoría del envejecimiento por radicales libres* [7]. En ésta última, se propone que el daño inducido por los radicales libres a las macromoléculas celulares y la incapacidad del organismo de contrarrestar estos cambios usando los sistemas antioxidantes endógenos tiene como consecuencia la presencia de enfermedades y procesos que llevan al envejecimiento. Posteriormente, propuso que la fuente generadora de esas especies es la mitocondria, debido a su importante papel en el consumo del oxígeno (aproximadamente 90% del O<sub>2</sub> celular) en la membrana interna, en la cual se lleva a cabo la fosforilación oxidante, proceso que genera una cantidad creciente del radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>).

Una gran cantidad de procesos celulares y estructuras cerebrales se ven alteradas en el envejecimiento (revisado en [4]), por ejemplo, una disminución del volumen y del peso del cerebro, cambios en el comportamiento, alteración del número de sinapsis, acumulación de agregados proteicos, anormalidades en las vías de señalización, pérdida de la homeostasis iónica de  $\text{Ca}^{2+}$ , declive de las funciones neuroendocrinas, disfunción vascular, cambios en la expresión genética, disminución de las defensas antioxidantes, disfunción mitocondrial que promueve la generación de  $\text{O}_2^{\cdot -}$ , entre otros.

## **Estrés oxidante, especies reactivas de oxígeno y radicales libres**

Se le llama *estrés oxidante* a la serie de reacciones dañinas para diversos componentes celulares, que son generadas por distintas especies tóxicas de oxígeno que se originan principalmente por la falta de defensas antioxidantes. Es uno de los eventos más importantes a los que está sometido el cerebro, especialmente durante el envejecimiento. Éste es un órgano muy vulnerable a este tipo de daño ya que consume aproximadamente el 20% del oxígeno que circula por el cuerpo y tiene una tasa de producción de adenosín trifosfato (ATP) muy alta. A su vez, contiene muchos ácidos grasos poliinsaturados que son fácilmente peroxidables, presenta baja actividad de la enzima catalasa (CAT) y una moderada cantidad de enzimas antioxidantes endógenas [8].

Por lo anterior, se cree que el estrés oxidante está asociado con diversas patologías neurodegenerativas, como la Esclerosis Lateral Amiotrófica<sup>1</sup>, la enfermedad de Huntington<sup>2</sup>, la enfermedad de Parkinson<sup>3</sup> y la enfermedad de Alzheimer (EA) (definición, ver página 16). Un argumento a favor de esta hipótesis es el hecho de que se ha demostrado la presencia de distintos productos derivados de la oxidación de componentes celulares, como proteínas, lípidos y ADN en cerebros postmortem de pacientes que padecen EA [9,10].

Así mismo, se han encontrado niveles elevados de glutatión peroxidasa (GSH-Px), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GSSG-R) y CAT en algunas zonas de

---

<sup>1</sup> Enfermedad neuromuscular degenerativa que afecta a las neuronas motoras, provocando parálisis muscular que conlleva a la muerte.

<sup>2</sup> Padecimiento neurodegenerativo hereditario, de inicio temprano, caracterizado por alteraciones cognitivas y movimientos exagerados no controlados.

<sup>3</sup> Trastorno neurodegenerativo causado por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* en el que se presentan alteraciones motrices, cognitivas y/o demencia.

cerebros de pacientes con EA, donde se encontró también elevada la lipoperoxidación [10]. El aumento en la actividad de estas enzimas antioxidantes sugiere un mecanismo compensatorio en respuesta al incremento en la formación de ERO.

Actualmente, no existe duda de que el estrés oxidante juega un papel muy importante en la progresión de la EA. Sin embargo, no ha sido completamente elucidado si es un efector de la misma o si resulta como un mecanismo secundario a otro tipo de cambios en el cerebro enfermo. Por esto, es relevante entender la temporalidad de los sucesos que favorecen este tipo de estrés y su correlación con la neurodegeneración. Algunos estudios [11,12] ya se han enfocado en elucidar la cronología del incremento de las ERO en la EA usando cerebros de pacientes en diferentes etapas de la enfermedad, sugiriendo que el daño oxidante es un evento temprano y se ve reducido conforme progresa la patología, se da incluso antes de la aparición de las placas amiloides, signo característico de la EA (ver más adelante). Debido a que todos los seres humanos, al envejecer, sufrimos estrés oxidante, pero no todos desarrollan patologías incapacitantes, y tomando en cuenta los resultados del trabajo de Nunomura *et al.* [11], en el que se concluye que la EA está asociada con una serie de cambios compensatorios a largo plazo que reducen el daño de las ERO generadas de manera temprana en la patología, resulta interesante el estudio de los mecanismos encargados de reducir los procesos oxidantes a los que se ve sometido el cerebro en el envejecimiento, ya que éstos podrían estar implicados en la progresión de la enfermedad.

Las ERO son subproductos de la respiración aeróbica y de algunos otros procesos celulares, que incluyen tanto radicales ( $O_2^{\cdot -}$  y  $OH^{\cdot}$ ), como no radicales ( $H_2O_2$ ,  $HOCl$  y  $O_3$ ), capaces de generar reacciones deletéreas en las células. El dioxígeno molecular es un aceptor de electrones ya que contiene dos electrones desapareados con espines paralelos.

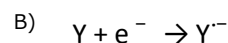
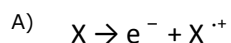
Para ser reducido en agua, debe aceptar  $4e^-$  secuencialmente, lo que da lugar a un tren de intermediarios reactivos por reducciones incompletas [13].

Las ERO en altas concentraciones tienen la capacidad de dañar los componentes celulares, como proteínas, lípidos [14] y DNA nuclear y mitocondrial [15,16] y por lo tanto, contribuyen al desarrollo de enfermedades relacionadas con el daño oxidante. A su vez, en cantidades normales, las ERO son especies de gran importancia para algunas funciones biológicas (revisadas en [17]), por ejemplo, mantienen la homeostasis redox y además intervienen en las defensas del organismo ante agentes infecciosos, pueden activar cascadas de señalización, median la proliferación y diferenciación celular, entre otras.

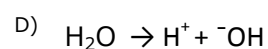
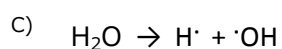
La generación de ERO puede ser inducida por estímulos tanto endógenos como exógenos y una gran cantidad de las ERO que se producen intracelularmente son generadas en la cadena respiratoria de la mitocondria [18].

Se sabe que la mayoría de los efectos dañinos del oxígeno se pueden atribuir a la formación de radicales libres. Un *radical libre* es cualquier especie capaz de existir de manera independiente y que contiene un electrón desapareado en el orbital más externo [19]. Los radicales libres son capaces de reaccionar con otras moléculas, capturando electrones de ellas y produciendo desapareamiento electrónico en las otras, que por ende, las vuelven radicales libres. Estos procesos no terminan hasta que dos radicales libres reaccionan creando un enlace covalente o hasta que son inactivados enzimáticamente.

Los radicales se pueden formar de una especie no-radical por la pérdida de un solo electrón (A) o por la ganancia de un solo electrón de una especie no-radical (B) [20].



Otra manera de producción es mediante la ruptura de un enlace covalente, dependiendo si se da una *fisión homolítica*, en la que cada átomo se queda con un electrón de los que formaban el enlace (C) o una *fisión heterolítica*, en la que un sólo átomo recibe ambos electrones (D) [20].



Se ha calculado que el cerebro humano produce diariamente más de  $10^{11}$  radicales libres. Aproximadamente del 1 al 3% del oxígeno consumido se convierte en superóxido, lo que generaría un total de 1.72 Kg/año de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  para un adulto en reposo de 70 Kg, asumiendo que utiliza 3.5 mL  $\text{O}_2/\text{Kg}/\text{minuto}$  [19]. El adecuado control y eliminación de estos radicales es un proceso fundamental para el cerebro ya que su producción se ve aumentada durante el envejecimiento. Hasta la fecha no ha sido posible revertirlo, por lo tanto, es importante el estudio de los factores que influyen en el incremento patológico de su producción.

Está reportado que en la EA existe disfunción mitocondrial [21,22], que podría incrementar la producción de superóxido en esta patología. Así mismo, los péptidos beta amiloides ( $\beta\text{A}$ ), que se acumulan en la EA (ver página 35), alteran la actividad redox de la mitocondria [23], contribuyendo al aumento de la producción de este radical en la EA, que podría estar implicado en el daño neuronal asociado con la enfermedad.

Los  $\beta\text{A}$  también son capaces de aumentar la producción de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en líneas celulares clonales [24] y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a su vez promueve la acumulación de  $\beta\text{A}$  en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y/APP695myc [25], creando un ciclo de retroalimentación positiva en el que se generan más especies reactivas y se acumula más  $\beta\text{A}$  promoviendo la progresión de la enfermedad de Alzheimer.



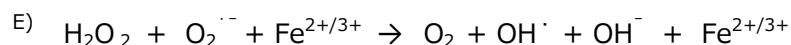
### ***Superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ )***

Este anión es conocido como la ERO primaria, ya que sirve como precursor de otras. El superóxido es el producto de la reducción del dióxígeno molecular por un electrón y su difusión a través de la membrana está limitada, sin embargo es capaz de pasar a través de canales aniónicos [26]. Puede funcionar como un agente reductor u oxidante dependiendo de los radicales que se encuentren en su ambiente.

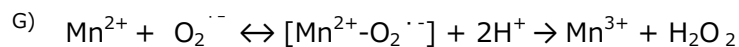
Se produce principalmente en la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, en la matriz mitocondrial. Se debe a la fuga de electrones de los complejos I (NADH deshidrogenasa) y IV (citocromo oxidasa) hacia el oxígeno. La cadena respiratoria está conformada de cuatro complejos enzimáticos y dos factores ubicados en la membrana interna mitocondrial. Acopla el transporte de electrones a la generación de un gradiente de  $H^+$  en el espacio intermembranal, para producir ATP y agua. El complejo I es el punto de entrada de los electrones del nicotinamida adenín dinucleótido reducido (NADH) a la cadena respiratoria y el complejo IV dona  $4 e^-$  al  $O_2$  para convertirlo en agua. Sin embargo, no sólo los complejos I y IV pueden generar  $O_2^{\cdot -}$ , otros complejos mitocondriales pueden hacerlo también [27].

El  $O_2^{\cdot -}$  es muy reactivo en medios orgánicos pero es inocuo en soluciones acuosas. Tiene diversas funciones dañinas en el cuerpo humano, por ejemplo, reacciona con el complejo NADH deshidrogenasa de la cadena transportadora de electrones, inactivándolo. También es capaz de reaccionar con el radical óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), el cual es una especie oxidante y citotóxica [20]. La disminución del  $NO^{\cdot}$ , por su parte, puede inducir hipertensión. Por otro lado, el  $O_2^{\cdot -}$  puede producir daño en los tejidos ya que participa en reacciones de oxidación de lípidos, proteínas y DNA catalizadas

por metales, como la reacción de Fenton (reacción E) que será discutida más ampliamente en la siguiente sección.



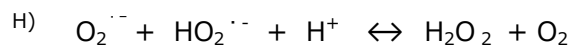
La mitocondria tiene una serie de defensas que la protegen del estrés oxidante, en este caso, el  $\text{O}_2^{\cdot -}$  es eliminado rápidamente por la enzima Manganese Superóxido Dismutasa (MnSOD) que es específica de la matriz mitocondrial y se expresa en condiciones de estrés, a diferencia de la Cobre-Zinc Superóxido Dismutasa (CuZnSOD) que principalmente es citosólica y constitutiva. La MnSOD cataliza la dismutación del superóxido al peróxido como se muestra en la reacción (F-G).



Se han reportado alteraciones en la regulación de la MnSOD en la EA. En el estudio de De Leo *et al.* [28] se encontró un aumento en los niveles del mRNA de la MnSOD en linfocitos de pacientes diagnosticados con EA, lo cual no necesariamente representa un factor primario de la patología, sino que sirve como un marcador periférico de estrés oxidante, contribuyendo al mismo tiempo a la patofisiología de la enfermedad.

En condiciones fisiológicas, ocurre también otro tipo de dismutación no enzimática, espontánea, cuando el superóxido y la forma protonada del anión superóxido ( $\text{HO}_2^\cdot$ ) se encuentran en concentraciones similares (reacción H). No resulta ser predominante, ya

que a pH fisiológico, su tasa es varios órdenes de magnitud menor que la de la dismutación enzimática [26].



Así como este es un mecanismo para evitar la acumulación de superóxido, tiene la desventaja de convertirse también en una reacción que promueve la formación del radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) a partir de peróxido (reacción E), que es uno de los radicales más reactivos pues tiene la capacidad de reaccionar con prácticamente todas las biomoléculas que se encuentran a su alrededor [19]. De esta manera, una vez que los sistemas antioxidantes fallan y se altera la homeostasis redox celular, es difícil encontrar mecanismos capaces de interrumpir la serie de reacciones que dan lugar al estrés oxidante.

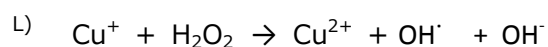
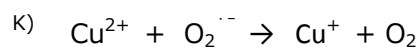
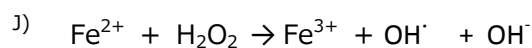
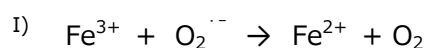
### ***Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )***

El peróxido de hidrógeno es una especie reactiva del oxígeno, no radical, estable, sin carga y fácilmente difusible. También funciona como segundo mensajero y su generación en el cerebro es alta. Uno de sus blancos más importantes es la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y al oxidarla, bloquea la glicólisis interfiriendo con el metabolismo energético celular [19]. Tiene importantes funciones (revisadas en [29]) en la regulación de la defensa del organismo ante agentes patógenos, biosíntesis oxidante, proliferación y supervivencia celular, eventos vasculares y otra serie de cascadas de señalización. Así mismo, es posible que esta ERO sea la encargada del incremento global del daño oxidante [30].

Existen dos fuentes principales de generación de peróxido de hidrógeno, la enzimática, que involucra diversas oxidasas, como la superóxido dismutasa y la xantina oxidasa, y la no enzimática como la autooxidación de las catecolaminas o la reacción (H) mostrada anteriormente. De la misma manera, cuando se unen  $2e^-$  a una molécula de oxígeno y ésta a su vez, acepta  $2H^+$  se forma peróxido de hidrógeno. La formación de esta ERO también se ha asociado a la cadena transportadora de electrones.

La vía del daño oxidante causado por el peróxido de hidrógeno más aceptada en la actualidad es la reacción de Fenton (reacción J), que se refiere a la oxidación de sustratos orgánicos por el peróxido de hidrógeno y Fe(II), que puede ser catalizada inicialmente por superóxido y Fe(III) (reacción I) [19,31]. Esta reacción es un ejemplo del daño celular causado por el radical hidroxilo, catalizado por metales de transición.

En presencia de peróxido y  $Fe^{2+}$  se forman el radical hidroxilo capaz de oxidar a una gran variedad de moléculas orgánicas. Otros metales de transición, como el Cu(II), son capaces de llevar a cabo la misma reacción (reacción K-L) [20].



La reacción de Fenton genera el radical  $\text{OH}^\cdot$ , siendo éste una de las moléculas más oxidantes, capaz de reaccionar con todas las biomoléculas de manera rápida. Uno de los daños más importantes que produce son los rompimientos de doble cadena del DNA que las células no pueden reparar fácilmente [20,31].

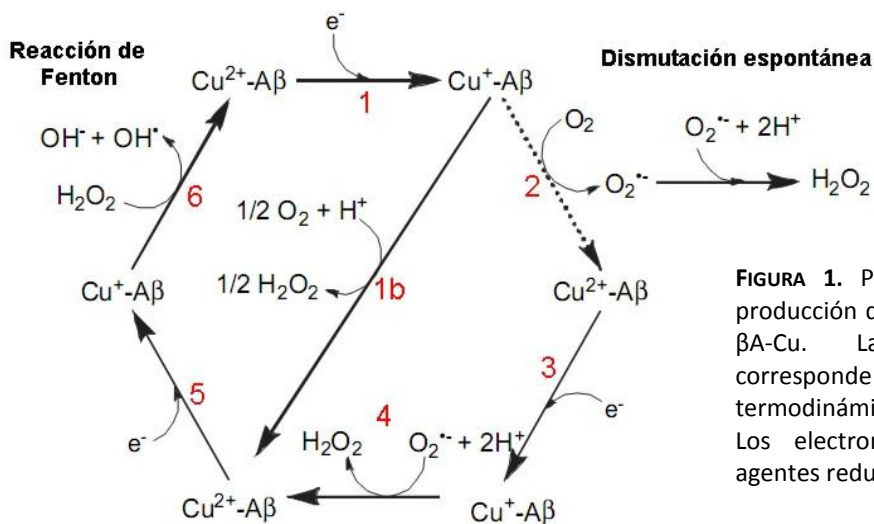
El  $\text{H}_2\text{O}_2$  mitocondrial es eliminado principalmente por la GSH-Px, y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que difunde lo es por la CAT, que se encuentra en los peroxisomas. Esta última enzima está presente en todos los tipos celulares de mamífero y se encarga de la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno [32].

La glutatión peroxidasa cataliza la reacción de peróxido de hidrógeno con glutatión para formar disulfuro de glutatión y agua. La acción de esta enzima es complementaria con la catalasa y se encuentra principalmente en el citosol y una pequeña cantidad en la mitocondria.

La CuZnSOD, la GSH-Px y la CAT son las tres enzimas principales involucradas en la protección celular del daño oxidante causado por las ERO. Así como se ha visto aumentada su expresión en cerebros de pacientes con EA, también se ha reportado un incremento significativo de estas tres enzimas en los eritrocitos de pacientes diagnosticados con EA comparados con los controles de su misma edad [33]. Lo mencionado anteriormente, demuestra la importancia de estudiar los procesos oxidantes asociados a la EA.

### Generación de ERO por complejos $\beta$ A-Cu

Como se verá más adelante, se ha propuesto que la generación de las ERO por los péptidos beta amiloide ( $\beta$ A) es a través de la química de los ciclos redox de algunos metales [34]. De acuerdo con la evidencia encontrada hasta el momento, Hureau y Faller [35] crearon un diagrama de los ciclos redox que lleva a cabo el cobre coordinado a los  $\beta$ A, para ejemplificar las vías y los tipos de especies que se producen en estos procesos y que podrían contribuir al daño neuronal. En la FIGURA 1 se puede observar que los productos finales de este ciclo son  $\text{OH}^-$  y  $\text{OH}^\cdot$ . Según el trabajo antes mencionado, que resume lo revisado por Smith *et al.* [36], estas especies se generan mediante distintos pasos que involucran tres reducciones del ion  $\text{Cu(II)}$  (pasos 1, 3 y 5) y las reducciones sucesivas de  $\text{O}_2$  a  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (paso 2) y de éste a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (paso 4), a partir del cual se generan el radical hidróxido y el ion hidroxilo. El paso 1b, se salta la producción de superóxido y la reducción del  $\text{O}_2$  se da no por  $1e^-$  sino por  $2e^-$  generando directamente  $\text{H}_2\text{O}_2$ , paso que pareciera ser termodinámicamente más favorable que su producción mediante el intermediario superóxido.



**FIGURA 1.** Posibles mecanismos de producción de ERO por los complejos  $\beta$ A-Cu. La flecha punteada corresponde a una reacción termodinámicamente desfavorable. Los electrones son donados por agentes reductores. (Modificado de [35]).

Existen también otros tipos de modelos, como el propuesto por Opazo *et al.* [37] que sugieren que la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por los complejos  $\beta\text{A-Cu}^{2+}$  se produce gracias a que el  $\beta\text{A}$  funciona como donador de  $e^-$  mediante el grupo sulfuro de la metionina que se encuentra en la posición 35 y que un agente reductor posteriormente reconstituye al péptido radical. Sin embargo, no se ha llegado a una conclusión hasta el momento, ya que existen estudios contradictorios en los que se observa que el  $\beta\text{A}$  tiene la capacidad de atrapar radicales, incluso en presencia de cobre y agentes reductores [38].

## Enfermedad de Alzheimer

### *Clasificación y descripción general*

Las demencias son una serie de patologías causadas por diversos desórdenes progresivos que afectan la memoria, el comportamiento y el pensamiento. Las personas que las padecen ven significativamente disminuida su capacidad de interacción y la realización de sus actividades diarias. Generalmente su padecimiento está asociado con el envejecimiento. Se debe poner especial énfasis en los adultos mayores de 65 años, ya que el riesgo de padecerlas, a partir de esta edad, se duplica cada cinco años [39].

La EA pertenece a las llamadas amiloidosis cerebrales [40]. Las amiloidosis son el término que designa las enfermedades en las cuales hay depósitos de fibrillas proteicas de 5-10 nm (amiloides) que se acumulan progresivamente en los espacios extracelulares de los tejidos y en su vasculatura. Estos filamentos están compuestos generalmente de fragmentos proteolíticos [41].

La EA es el tipo de demencia asociada con la edad, más común de la actualidad. Es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza, en etapas tempranas, por una pérdida de la memoria a corto plazo. Los síntomas tardíos incluyen un declive global progresivo de las capacidades cognitivas y de memoria, confusión, cambios en la personalidad y de la conducta, perturbaciones del lenguaje, retracción y alucinaciones. Su duración aproximada es de entre 8-10 años con un intervalo de 1-25 y la muerte generalmente se da por malnutrición, inanición o neumonía [42].

Este padecimiento es, hasta la fecha, irreversible y afecta a más de 35.6 millones de personas a nivel mundial. Se espera que esta cifra casi se duplique para 2030 según estudios de la *Alzheimer's Disease International* (2010), por lo tanto, esta enfermedad



representa uno de los problemas en el ámbito de la salud, a nivel social y familiar, más importantes de estos tiempos.

### **Antecedentes**

La EA fue descrita por primera vez en 1906 por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer en su trabajo titulado «*Acerca de una peculiar enfermedad de la corteza cerebral*» publicado en la revista *Neurologisches Centralblatt*. Posteriormente fue nombrada «Enfermedad de Alzheimer» por Emil Kraepelin. Alzheimer reporta el caso de una enfermedad psiquiátrica inusual, con cambios histomorfológicos específicos en el cerebro de una mujer de 51 años de edad, llamada Auguste Deter



**FIGURA 2. Fotografía: Auguste Deter.** Noviembre de 1902. (Tomado de [43]).

[43] (FIGURA 2). Esta paciente acude al hospital psiquiátrico presentando signos de celos hacia su esposo y rápidamente presenta un deterioro de la memoria y del comportamiento, siendo incapaz de orientarse en el tiempo y en el espacio, comprender situaciones y recordar los objetos que le son mostrados [44].

Con la descripción de este caso se inició la caracterización de esta enfermedad, que más de cien años después no ha sido completamente comprendida. Es de gran importancia actual debido al creciente envejecimiento poblacional al que nos estamos enfrentando, gracias al rápido incremento en la esperanza de vida, tanto en países

desarrollados como en vías de desarrollo. Es un enorme reto para las sociedades actuales asegurar el adecuado cuidado de estos pacientes y buscar tratamientos efectivos.

### ***Factores de riesgo***

El primer factor de riesgo para padecer esta enfermedad es el envejecimiento, el segundo es la historia familiar del padecimiento. Para su estudio, se ha clasificado en EA familiar (EAF) y EA esporádica (EAE), dependiendo del origen del padecimiento y en EA de inicio precoz (EAIP) y EA de inicio tardío (EAIT), dependiendo de la edad de los pacientes en la que se empezaron a notar los síntomas. Estas clasificaciones no son excluyentes, por lo que, tanto la familiar como la esporádica pueden tener ambos inicios.

La EAF corresponde al 25% de los casos totales de EA [42]. De éstos, la mayoría corresponden a la EAIT, que se presenta después de los 60-65 años de edad y se ha asociado con la presencia del alelo e4 de la Apolipoproteína E (APOE). Este alelo se presenta en el 19% de la población con EAF [42] y aumenta la predisposición a la acumulación del  $\beta$ A también en los casos esporádicos de la enfermedad [45].

La EAIP se presenta entre los 30 y 60-65 años de edad y corresponde al 1-6% de los casos totales. La EAIP familiar se hereda de manera autosómica dominante y se ha atribuido a más de 60 mutaciones en tres genes: en la proteína precursora del amiloide (APP), en la Presenilina 1 y en la Presenilina 2 (PSEN1 y 2). Estas últimas dos proteínas forman parte del complejo  $\gamma$ -secretasa, que interviene en la generación del  $\beta$ A. El 75% de los casos totales de EA son esporádicos y se deben a causas desconocidas. Se conocen algunos factores ambientales de susceptibilidad a la EA (revisados en [46]), como una edad parental avanzada al nacer, disminución de los perfiles hormonales en mujeres a

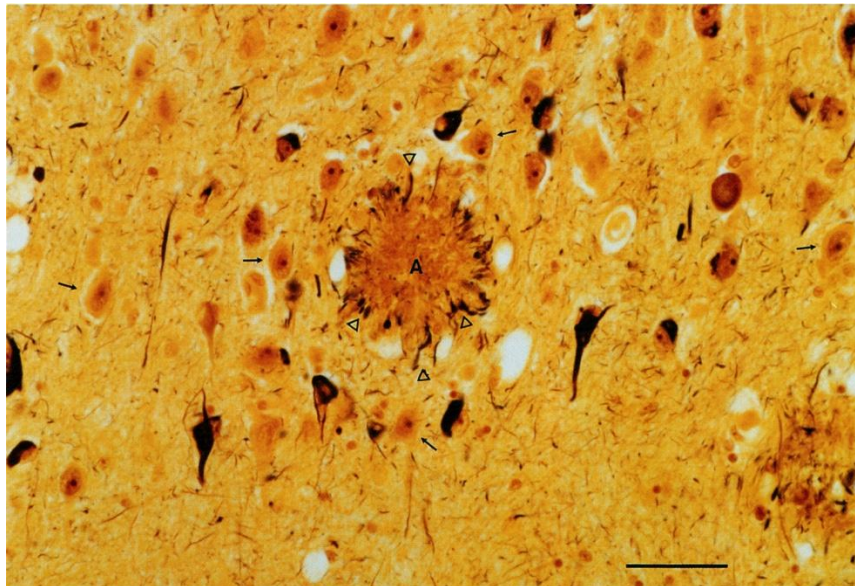
partir de los 60 años, fumar, tener sobrepeso y obesidad, padecer diabetes tipo 2, un alto consumo de grasas animales, traumatismos cerebrales. Así mismo, la influencia de cantidades elevadas de aluminio en el agua para beber, de altas concentraciones de hierro, zinc y selenio en el cerebro, la exposición ocupacional a pesticidas, defoliantes y fumigantes, y la exposición a campos electromagnéticos y a solventes, aún se encuentran en controversia (ver [47]). En la actualidad se proponen múltiples factores que contribuyen a la demencia, pero poco se sabe de la relación de éstos con los factores genéticos y su verdadera contribución en el desarrollo de la EA.

Las mutaciones que se han caracterizado en la APP se localizan en el dominio transmembranal o cercanas a la ubicación del  $\beta$ A [48,49]. Se cree que estas mutaciones pueden afectar el procesamiento del  $\beta$ A y promover la deposición del péptido. Así mismo, mutaciones en las PSEN 1 y 2 también están relacionadas con la sobreproducción de  $\beta$ A [50], lo que demuestra que este péptido es fundamental en la patogénesis de la enfermedad.

### ***Histopatología de la enfermedad***

Los tres cambios estructurales más importantes de esta enfermedad son: 1) la presencia en el cerebro de agregados extracelulares insolubles del péptido  $\beta$ -amiloide, formando las llamadas *placas amiloides* o *placas seniles*. 2) A nivel intracelular, los *ovillos neurofibrilares* formados por la proteína asociada a los microtúbulos *Tau*, hiperfosforilada y 3) una disminución significativa del tamaño de la corteza cerebral, causada por la pérdida neuronal en esta zona.

Las *placas seniles* son lesiones complejas en el neuropilo cortical, compuestas de varios elementos anormales: un depósito central extracelular de fibrillas amiloides, neuritas distróficas alrededor de los anteriores, microglía activa y astrocitos fibrilares [41] (FIGURA 3). Según reportes de Armstrong *et al.* [51,52], la composición tanto de los ovillos neurofibrilares como de las placas seniles es compleja, ya que está dada por múltiples proteínas, de las cuáles, al menos se conocen seis en común en ambos tipos de agregados:  $\beta$ A, Tau, Apolipoproteína E (ApoE), el complejo de ataque membranal (MAC), P-amiloide, factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF). Se sugiere que la relación



**FIGURA 3. Lesiones neuronales clásicas de la Enfermedad de Alzheimer mostradas mediante la tinción de plata modificada por Bielschowsky. (Tomado de [41]).**

La imagen representa una sección de 6  $\mu$ M de la amígdala de un hombre de 69 años con 6 años de historia de demencia progresiva. Los ovillos neurofibrilares ocupan gran parte del citoplasma de las neuronas piramidales seleccionadas (tinción oscura), en contraste con el citoplasma de neuronas adyacentes, citológicamente normales (café áureo) [flechas]. En el centro, una placa senil conformada por grandes depósitos extracelulares compactos de  $\beta$ A [A] rodeada por un halo de neuritas distróficas [cabezas de flecha]. Axones y dendritas alterados se encuentran presentes en estas placas neuríticas. Microglía reactiva y astrocitos fibrilares asociados con estas placas no se ven. El borde de una segunda placa neurítica se ve en la esquina inferior derecha. Barra = 50  $\mu$ m.

entre la generación anormal del  $\beta$ A y la patogénesis de la EA es mucho más compleja de lo que se cree, ya que existen diversos factores asociados a la generación de las lesiones antes mencionadas, como factores genéticos y la degeneración neuronal, o que ocurren como consecuencia de un evento primario desconocido.

Morfológicamente existen tres tipos distintos de placas seniles (PS) con características y composición molecular diferente. Las que han sido caracterizadas hasta el momento son las placas difusas o pre-amiloides, que contienen la APP sin el carboxilo terminal, y oligómeros  $\beta$ A1-42/43, entre otras proteínas. Las placas primitivas o neuríticas, que contienen a la APP completa y  $\beta$ A1-42/43, y las clásicas o densas, que contienen un núcleo de  $\beta$ A1-42/43 y  $\beta$ A40, así como una cantidad considerablemente mayor de proteínas [52]. Se conoce que la densidad de los depósitos primitivos y clásicos correlacionan con la severidad del estado intelectual [53]. Pareciera existir una evolución temporal de la formación de las placas seniles que conlleva a un daño neuronal mayor. La generación anormal del  $\beta$ A1-42/43 es el principal factor que contribuye a la progresión de la enfermedad. Sin embargo, esta hipótesis es controversial, ya que en realidad no se conoce la lesión primaria de la EA.

En la generación de las PS intervienen diversos componentes que tienen que ver con la degeneración neuronal como, por ejemplo, la desconexión sináptica, la degeneración neurítica, la astrogliosis y la microglía activa, etc. [52]. Esto explica la presencia de una gran variedad de proteínas implicadas en diversos procesos celulares, neurotransmisores y metales en las PS. El péptido  $\beta$ A1-42/43 es el mayor constituyente de las placas [52] y su presencia se asocia con el efecto de una mutación que conlleva a la acumulación de este péptido. Fisiológicamente, el que más se produce es el  $\beta$ A1-40 (90%) [54] y se encuentra soluble, predominantemente en fluidos biológicos [55], por lo

tanto, se ha sugerido que un aumento en la actividad de la  $\gamma$ -secretasa es un factor de riesgo para el padecimiento de EA debido al aumento en la producción de  $\beta$ A1-42/43 [56].

Otro tipo de componentes de las PS son una serie de proteínas de fase aguda y asociadas con el sistema inmunológico [52], como MAC, proteínas del sistema de complemento (C3d, C1q C5, C4p), interleucina 6, entre otras. También se encuentra la proteína priónica (PrP), los neurotransmisores ácido gama-aminobutírico (GABA) y el neuropéptido Y, la enzima acetilcolinesterasa, la hormona somatostatina y la proteína P-amiloide, que es una glicoproteína producida en el hígado, lo que sugiere que la presencia de ésta en el 90% de las placas seniles está asociada a una disfunción de la barrera hematoencefálica [57,58].

Al existir una gran variedad de elementos que contribuyen a la generación temporal de las PS y al desconocerse aún el factor principal que da inicio a esta cascada de eventos que culminan en la muerte neuronal, es difícil asegurar que la acumulación del  $\beta$ A sea la causa primordial de la patología de la EA. Cabe la posibilidad de que éste péptido esté enmascarando el o los eventos iniciales que dan lugar a la enfermedad, debido a sus efectos tóxicos secundarios.

### ***Hipótesis actuales***

Basándose en los marcadores neuropatológicos antes mencionados, se han generado diversas hipótesis sobre el inicio de la enfermedad. Una de las más aceptadas y estudiadas es la *Hipótesis de la Cascada Amiloide*, propuesta por Hardy en 1992 [59] (FIGURA 4), en la que la degeneración neuronal es iniciada por el procesamiento anormal de

la proteína precursora del amiloide (APP), lo que promueve la sobreproducción, acumulación y agregación del péptido  $\beta$ A1-42, que es el constituyente principal de las PS, causando una serie de disfunciones, entre ellas, el daño oxidante y posteriormente la muerte neuronal. En esta hipótesis, el daño vascular, la pérdida neuronal, la aparición de ovillos neurofibrilares, la inflamación y la serie de procesos que se alteran en esta patología pasan a formar parte de los procesos secundarios generados por la acumulación de  $\beta$ A.



**FIGURA 4.** Cronología de eventos que conllevan al daño neuronal, según la *hipótesis de la cascada amiloide*.

Se sugiere también que la acumulación del péptido puede estar dada por otras causas desconocidas diferentes a las mutaciones, pero finalmente este péptido es el responsable del inicio de una cascada de eventos que desencadenan la patología de la EA e incluso se encuentra en la EAE.

Hay estudios que aseguran que la deposición de las placas seniles es posterior a la presencia de los ovillos neurofibrilares intracelulares [60]. Braak y Braak propusieron en 1991 la *hipótesis de la degeneración del citoesqueleto neuronal* [61], en la cual los cambios en el citoesqueleto, como la hiperfosforilación y la agregación de Tau son los eventos principales de la degeneración neuronal y el desarrollo de la EA.

Otro tipo de evidencia sugiere que la enfermedad de Alzheimer inicia a partir de una falla sináptica que posteriormente converge en la muerte neuronal [62]. Se ha caracterizado un amplio déficit de diversos neurotransmisores en la EA, por ejemplo del GABA, la acetilcolina, la serotonina, somatostatina y el factor liberador de la corticotropina. Sin embargo, los síntomas iniciales parecen correlacionar con la pérdida de las sinapsis glutamatérgicas y colinérgicas. Así mismo, en estudios realizados en biopsias de la corteza frontal y temporal de pacientes con EA, de una duración entre 2 y 4 años, se observa una disminución del 25 al 35% en la densidad sináptica y del 15 al 35% en el número de sinapsis por neurona cortical [63]. Esta disminución es mayor a la que se podría explicar solamente por la pérdida neuronal, lo que lleva a pensar que la pérdida de las sinapsis es uno de los principales problemas en los inicios de la enfermedad. De la misma manera, se ha demostrado que existe una correlación entre la disminución de las terminales presinápticas corticales y el aumento de los niveles de  $\beta$ A solubles en un modelo de ratón transgénico de la APP de 2 a 4 meses de edad. A estos tiempos la



deposición de las placas amiloides no ha aumentado [64]. Por lo tanto, se cree que los oligómeros de  $\beta$ A y no las fibras, son los causantes de la toxicidad sináptica, pues se ha observado una correlación entre el declive cognitivo y la pérdida sináptica [65].

Sin embargo con en las hipótesis anteriores no es posible explicar la serie de cambios fisiológicos generados por la acumulación de los péptidos en algunas regiones específicas del cerebro, tomando en cuenta solamente sus propiedades de autoagregación. Por esto, Bush y Tanzi [66] han propuesto la *hipótesis metálica de la enfermedad de Alzheimer*, en la que se sugiere que la interacción del  $\beta$ A con algunos metales provoca la patogenicidad de estos péptidos derivando en la EA.

## **Papel del cobre en el cerebro y su relación con la EA**

Los iones metálicos tienen un papel importante en diversas actividades catalíticas y estructurales de los sistemas biológicos. Son esenciales para las funciones metabólicas celulares y, en especial, el cerebro es capaz de concentrar una gran cantidad de metales, por lo que debe tener mecanismos especializados en mantener la homeostasis metálica (transporte y almacenamiento) y sistemas de proteínas que no permitan que estos iones se encuentren libres, ya que son capaces de dañar distintos componentes celulares.

En los eucariotes, los metales más abundantes son el cobre, el hierro y el zinc. Al mismo tiempo, en el cerebro, estos metales son esenciales para diversas actividades neuronales, como la neurotransmisión, la sinaptogénesis, la neurogénesis, el crecimiento neurítico, la biosíntesis de neurotransmisores, la fosforilación oxidante y el transporte de oxígeno [67]. Así mismo, el cobre y el hierro en estado libre, son los principales generadores de ERO al reaccionar con dioxígeno molecular [20]. Estos metales son capaces de desencadenar diversas patologías cuando su presencia en este órgano se encuentra alterada.

La pérdida de la homeostasis de los iones metálicos se ha asociado con la progresión de diversas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y la EA (revisado en [68])[67,69]. Sin embargo, el papel de los diversos metales en la progresión de estas enfermedades es aún controvertido, ya que los resultados en la literatura científica son contradictorios.

Un importante punto de control respecto a la modulación de la concentración de metales en el cerebro es la barrera hematoencefálica (BHE). Ésta es poco permeable a los

metales cuando sus niveles fluctúan en sangre, y los mecanismos de transporte son principalmente dependientes de ATP [70]. Perturbaciones que ya se han reportado en enfermedades neurodegenerativas como la EA a nivel de la permeabilidad de la BHE [71,72], o del metabolismo energético [73,74], afectan de manera importante algunos procesos neuronales relacionados con la captación de metales y son la causa de ciertas enfermedades con manifestaciones neurológicas, como la enfermedad de Wilson<sup>4</sup> y la enfermedad de Menkes<sup>5</sup>.

El cobre es esencial para algunas enzimas y tiene un papel importante en las actividades metabólicas del cerebro, incluyendo la respiración celular. Sirve como cofactor para diversas enzimas (como la CuZnSOD) y es importante para el desarrollo neuronal y en la homeostasis de otros metales. Por otra parte, el cobre en exceso o en forma libre en el organismo es tóxico, ya que es capaz de formar HO<sup>·</sup> que debido a su alta reactividad, cicla entre dos estados de oxidación. También se une a diversas proteínas e interfiere con el equilibrio de otros metales.

El cobre se obtiene de la dieta y es absorbido por el intestino delgado, posteriormente pasa al hígado donde es incorporado a la ceruloplasmina y es secretado hacia la sangre. Para su transporte al cerebro, la BHE juega un papel importante. Se cree que el transportador asociado es la ATPasa de tipo P transportadora de cobre (ATP7A) [70]. La proteína transportadora de cobre 1 (Ctr1) es la que se encarga de transportar el cobre dentro de las neuronas y los astrocitos [70,75,76].

---

<sup>4</sup> Se debe a la mutación del transportador de cobre ATP7B, provocando la acumulación de este metal en los tejidos llevando al daño celular.

<sup>5</sup> Se debe a la mutación del transportador ATP7A, lo que provoca una pobre distribución del cobre a algunos tejidos (como el cerebro) disminuyendo la actividad de las enzimas esenciales para la estructura y la función celular.

La ingesta diaria recomendada de cobre en el hombre y la mujer adultos es de 0.9 mg y el límite tolerable es de 10 mg/día [77]. El cuerpo humano de un adulto sano de aproximadamente 70 kg contiene menos de 110 mg de cobre distribuido en distintas zonas: 10 mg en hígado, 8.8 mg en el cerebro, 46 mg en el esqueleto, 26 mg en músculo esquelético y 6 mg en sangre [70].

Los dos tipos de reacciones relacionadas con la presencia excesiva de Cu(II) en el cerebro, que conllevan a enfermedades neurodegenerativas, corresponden a la agregación proteica por la presencia del metal y la desnaturalización o daño proteico a causa de la oxidación por el metal [70]. Los péptidos  $\beta$ A tienen una alta afinidad por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  y pueden reducirlos [78]. Estos metales se han visto implicados en la patología de la EA, principalmente los iones de Cu y Zn que se sabe que co-purifican con extractos de las placas seniles [37]. Tanto el  $\beta$ A como la APP tienen sitios de unión a Cu(II), uniéndolo con alta afinidad ( $K_d \text{ APP} \approx 10 \text{ nM}$ ) [79], y tienen la capacidad de reducirlo a Cu(I) *in vitro*. El dominio de unión a cobre (CuBD) de la APP se encuentra en su extremo amino terminal, en una región rica en cisteínas. Esta proteína forma parte de una familia multigénica cuyo CuBD es similar entre todos los miembros, lo que sugiere la conservación evolutiva de su función [79].

En especial, los iones de Cu(II) están implicados en la patogénesis de la EA ya que son los que aumentan más en la patología, encontrándose elevados más de 4 veces en el neuropilo de pacientes con EA en comparación con personas sanas y a diferencia del Fe y Zn que sólo se encuentran elevados al doble [80]. Además, en estado dimérico, el  $\beta$ A1-40 une cobre con mayor afinidad que el Zn o el Fe [81]. Así mismo, el cobre tiene la capacidad de modificar la agregación de los péptidos  $\beta$ A [35,82-85] y su presencia es un factor significativo para la patología, que incluso, se ha llegado a proponer la *Hipótesis*

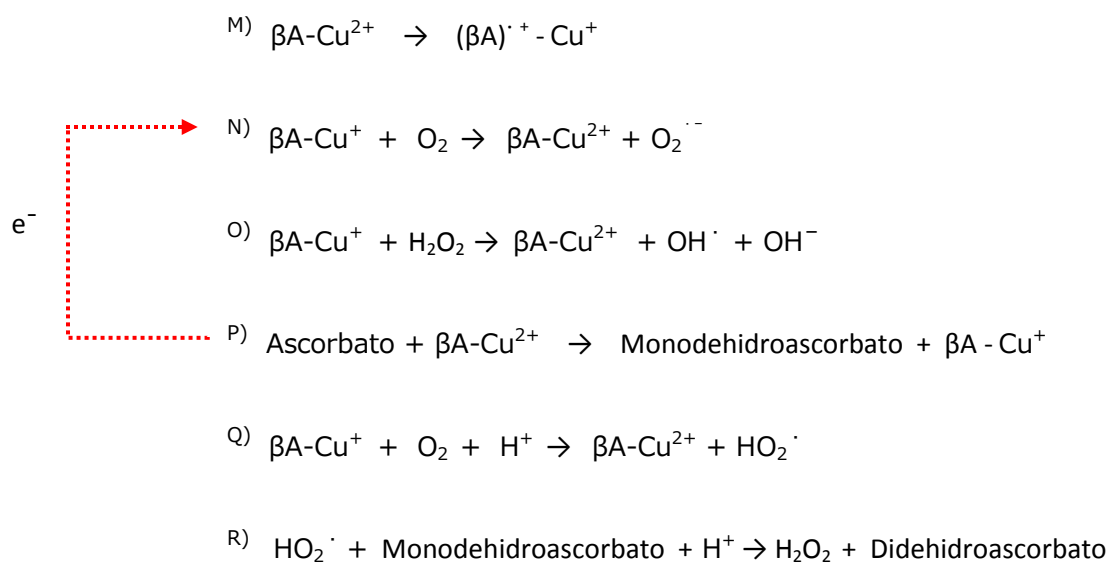
*Metálica de la Enfermedad de Alzheimer* [66] en la que se sugiere que deben existir interacciones, especialmente con metales de transición como el Cu y el Zn, que modifican las propiedades de los péptidos lo cual inicia la patología. Para esto, Bush y Tanzi se basaron en el conocimiento de que uno de los cambios más importantes que se da en el cerebro con el envejecimiento es el daño oxidante neuronal previo a la deposición de  $\beta$ A. De esta manera el evento primario que desencadena la patología puede ser un daño neuronal distinto de la acumulación del  $\beta$ A.

A pesar de que se han encontrado altas concentraciones de cobre en las placas amiloides ( $\sim 350 \mu\text{M}$ ) [80] a comparación de la concentración extracelular normal en el cerebro ( $0.2\text{-}1.7\mu\text{M}$ ) (revisado en [36]). Se han caracterizado zonas cerebrales con mayor concentración de cobre en individuos normales, como el hipocampo, la amígdala y la corteza, a diferencia de otras regiones cuya concentración no se encuentra en el intervalo de una concentración micromolar [86]. A su vez, se ha encontrado una correlación entre el declive cognitivo de los pacientes con EA y una disminución de la concentración de cobre en el plasma, sin diferencias significativas en su concentración en el líquido cefalorraquídeo [87,88]. Sin embargo, otros estudios han reportado una disminución significativa generalizada del cobre en el cerebro y en zonas especialmente afectadas en la EA, como la amígdala y el hipocampo [89]. La disminución de cobre en estas zonas, cuyo requerimiento del metal pareciera ser mayor, correlaciona con las zonas en las que se encuentra mayor atrofia cerebral en los pacientes con EA, como se verá más adelante.

El cobre tiene dos estados de oxidación que permiten la transferencia de electrones y por lo tanto este metal es esencial en la química de los ciclos redox de los complejos  $\beta$ A-Cu y en la activación del dioxígeno molecular. Al parecer, estos ciclos son la base de la generación de las ERO y es probable que estos péptidos sean capaces por sí mismos de llevarlos a cabo, pero también se sabe que la presencia de agentes reductores

externos, como el ácido ascórbico es fundamental para este proceso. Así mismo, éstos agentes se pueden unir a las proteínas y facilitar la generación de las ERO mediante la reacción de Fenton (reacción O) [36] y también promover la formación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A su vez, el radical amiloide formado puede formar productos de oxidación [30].

La presencia del ascorbato [90] junto con los complejos βA-Cu<sup>2+</sup>, tanto oligoméricos como fibrilares, facilita la reducción del oxígeno molecular generando como principal producto peróxido de hidrógeno (reacción P-R). Así mismo, el ascorbato es capaz de reducir los complejos βA-Cu<sup>2+</sup> promoviendo la presencia del cobre en estado de oxidación I capaz de reaccionar con el dióxígeno molecular y generar ERO (reacción P).



De estos mismos estudios, se sabe que el cobre (II) unido a los agregados oligoméricos y fibrilares es menos efectivo que el libre o el unido a los monómeros para generar ERO, lo que correlaciona con el papel de los ciclos redox del cobre en el aumento del estrés oxidante generado por complejos βA-Cu, dependiendo de la accesibilidad del cobre a moléculas reductoras.

La presencia de agentes reductores no es el único factor que influye la toxicidad de los complejos  $\beta\text{A-Cu}^{2+}$ . Uno de los más estudiados es la estequiometría  $\beta\text{A-cobre}$ . Se sabe por ejemplo, que la generación de peróxido aumenta en presencia del  $\beta\text{A1-40}$  cuando su estequiometría es 1:1 [91]. La viabilidad de los cultivos corticales primarios de ratón disminuye ante esta estequiometría del complejo  $\beta\text{A1-42}$ , siendo ésta la más tóxica para las células [92]. Por esta razón, se usó esta estequiometría en este proyecto para estudiar el efecto del cobre en la producción de las ERO por distintos péptidos  $\beta\text{A}$ . Sin embargo, se conoce que en las placas amiloides existe una estequiometría  $\beta\text{A}<\text{Cu(II)}$  (revisado en [82]) ya que la concentración de  $\beta\text{A1-42}$  insoluble en cerebros de pacientes con EA no supera una concentración de 40  $\mu\text{M}$  [93]. Esta estequiometría favorece la toxicidad de los complejos  $\beta\text{A-Cu(II)}$  [82]. Por otra parte, de acuerdo a Jiang *et al.* [90], en condiciones  $\beta\text{A}>\text{Cu(II)}$ , los radicales hidroxilo no se producen, lo que apoya la hipótesis del estrés oxidante como un evento temprano en la EA, previo a la acumulación de  $\beta\text{A}$ .

Otro argumento a favor de la hipótesis de la producción de las ERO por los complejos  $\beta\text{A-Cu}^{2+}$ , es la disminución de la producción de peróxido inducida por los  $\beta\text{A}$  al ser coincubados con el quelante de Cu/Zn clioquinol (CQ) en cultivos primarios corticales de ratón [94]. Así mismo, se sabe que el cobre favorece que las placas mantengan su estructura, ya que al agregar quelantes de metales [95] a placas seniles aisladas de pacientes con EA, se desestabiliza la estructura  $\beta$  de las mismas. Este quelante también disminuye en un 50% la acumulación de  $\beta\text{A}$  en el cerebro de ratones transgénicos que presentan una mutación en la proteína precursora del amiloide (APP2576) [96]. A este respecto también existe mucha controversia, pues los estudios de Bayer [97] mostraron que el CQ reduce la esperanza de vida de los ratones transgénicos que presentan otra

mutación en la proteína precursora del amiloide (APP751<sup>SL</sup>) y la suplementación con cobre recupera este efecto.

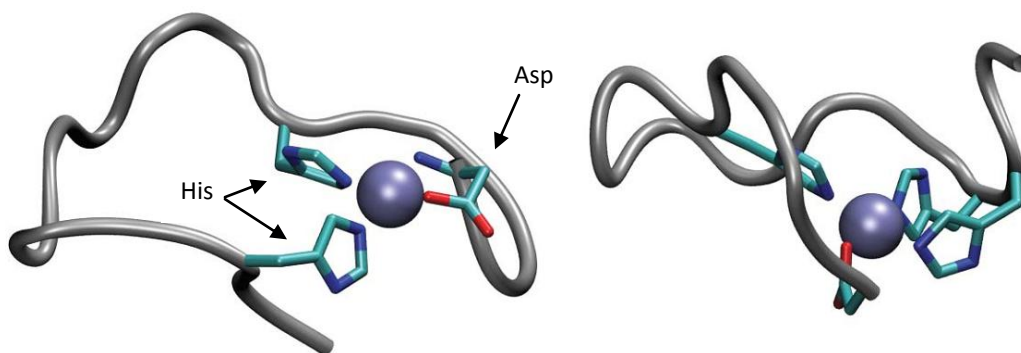
Actualmente se han hecho estudios clínicos en fase II usando CQ y se observa una disminución en los niveles plasmáticos del  $\beta$ A1-42 y un aumento en el Zn [98]. Usando 250 mg de PBT2, un análogo mejorado del CQ, se observó una disminución de los niveles del péptido  $\beta$ A en el líquido cefalorraquídeo pero no en el plasma. Este fármaco también fue capaz de mejorar dos parámetros cognitivos de la batería de pruebas neuropsicológicas [99,100]. Estos resultados parecen similares a los que se han encontrado con los ensayos clínicos de fase II que utilizan un suplemento de cobre [101] que produce una disminución en los niveles del  $\beta$ A1-42 en el líquido cefalorraquídeo, pero sin diferencias significativas en las pruebas cognitivas. El funcionamiento de estos quelantes parece promover la movilización del cobre y, de esta manera, se vuelve accesible a zonas deficientes en este metal, contrarrestando en cierto grado el deficiente transporte de Cu por la APP en la EA [102].

Otra propiedad de los péptidos  $\beta$ A que puede influir en la afinidad con metales es su longitud. Parece que ésta no interfiere con la afinidad al cobre o que su efecto es mínimo y la afinidad por cobre no se ve modificada por el estado de agregación en el que se encuentra el péptido [86], por lo tanto se sugiere que el sitio de unión al metal no es el mismo que el requerido para su fibrilación, por lo que no existe interferencia entre ambos. Sin embargo, estudiando la cinética de agregación de diversos fragmentos como el  $\beta$ A1-16,  $\beta$ A1-28 y  $\beta$ A1-40 [82] se ha encontrado que estos dos últimos disminuyen su tasa de agregación en presencia del cobre, debido a la estabilización del complejo  $\beta$ A-metal. El  $\beta$ A1-16 no se modifica en este aspecto ya que no contiene la secuencia hidrofóbica (LVFFA) que es crítica para la formación de fibrillas [103]. Así mismo, se



observó un efecto en la agregación de los péptidos  $\beta$ A1-40 y  $\beta$ A1-42 dependiente de la concentración del Cu(II) y de la estequiometría  $\beta$ A-Cu, en la cual, la disminución de las estructuras fibrilares correlacionó con un aumento en la concentración de Cu(II).

En la actualidad, existe suficiente evidencia de que los iones metálicos están relacionados con el mecanismo de estrés oxidante de los péptidos  $\beta$ A [36] y se ha considerado el  $\beta$ A como una metaloproteína, con su sitio de unión para el cobre en los primeros 16 residuos. Hasta la fecha, se han generado dos modelos de coordinación del péptido con Cu(II) [86] (FIGURA 5), uno que involucra a tres histidinas, en las posiciones 6, 13 y 14, y el grupo  $\text{COO}^-$  de un ácido aspártico en la posición 1. El otro involucra la coordinación del Asp1 mediante su amino-terminal y el grupo carboxilato y dos de las tres histidinas antes mencionadas, la 6 y la 13/14. Recientemente, un estudio espectroscópico de El Kohury *et al.* [104] apoya el modelo de coordinación de las tres histidinas en el fragmento  $\beta$ A1-16, pero debido a que la coordinación es dinámica dependiente de la temperatura y el pH, no se ha logrado establecer con exactitud el modelo.



**FIGURA 5. Modelos de las esferas de coordinación más probables del péptido  $\beta$ A con el Cu(II).** Panel izquierdo: N-term, His6, His13 o His14, Asp1-COO<sup>-</sup>. Panel derecho: His6, His13, His14, Asp1-COO<sup>-</sup>. (Tomado de [86]).

Así mismo, se considera que tanto la APP como la  $\beta$ A pierden su función de regulación de la homeostasis metálica y de prevención de la oxidación en la patología de Alzheimer [105], mecanismos que se sugieren son la función biológica de estas proteínas.

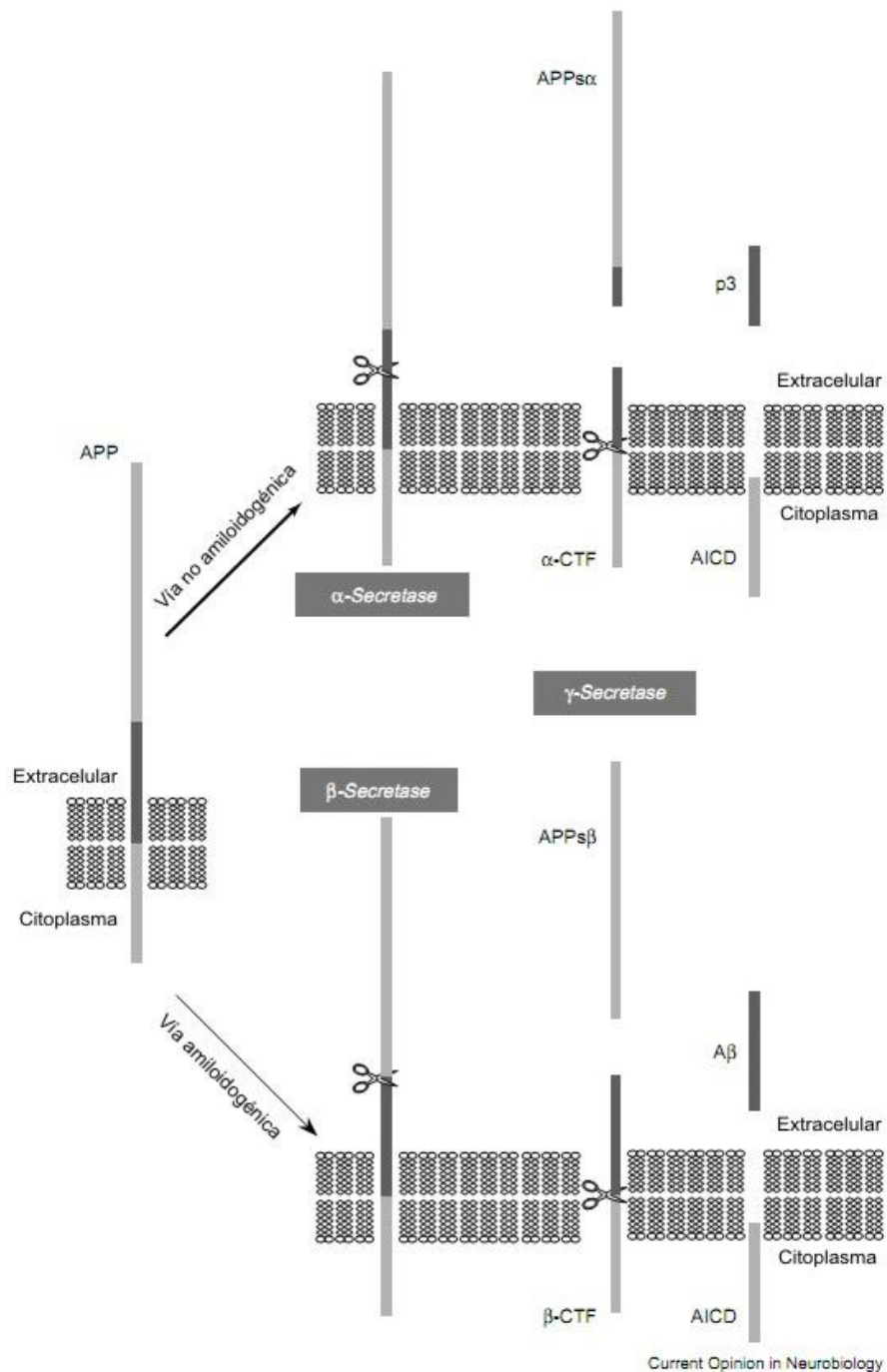
Finalmente, existe una gran controversia sobre el verdadero papel de la agregación de los péptidos  $\beta$ A. En diversos estudios (revisados en [82]) se ha demostrado que el Cu(II) es capaz de promover la oligomerización o la agregación del  $\beta$ A por la vía no amiloidogénica e incluso llega a inhibir la agregación del  $\beta$ A. Es por esto, que resulta interesante estudiar la función que tienen estos complejos y conocer las propiedades que pueden contribuir a la degeneración neuronal.

## Péptidos $\beta$ -amiloides

Los péptidos beta amiloides son polipéptidos de 4 kDa que han sido asociados con la patología de la EA ya que son uno de los principales componentes de las lesiones encontradas en el cerebro de los individuos que padecieron esta enfermedad [106], sin embargo también se encuentran en líquido cefalorraquídeo y sangre periférica de pacientes e individuos sanos (revisado en [107]).

Se generan a partir de la proteína precursora del amiloide (APP) a través de dos cortes enzimáticos secuenciales. La APP es una glicoproteína transmembranal que se expresa abundantemente en el cerebro y que se encuentra en todas las células de mamíferos. Su gen se encuentra en el cromosoma 21 en los humanos, tiene un dominio amino terminal extracelular muy largo y uno carboxilo terminal intracelular corto. La secuencia del  $\beta$ A se encuentra entre el dominio transmembranal conformada por 15 aminoácidos y el dominio extracelular conformado por otros 28 amino ácidos. La APP tiene dos vías de procesamiento catabólico [108] (FIGURA 6), uno es el no amiloidogénico, en el que la proteína es procesada secuencialmente por dos secretasas en la membrana celular, la  $\alpha$ -secretasa que libera al espacio extracelular el fragmento APP $\alpha$  y la  $\gamma$ -secretasa que corta en el dominio transmembranal liberando otro fragmento llamado p3. En la vía amiloidogénica, las moléculas de APP son internalizadas y cortadas en compartimentos endocíticos por la  $\beta$  y la  $\gamma$  secretasa, generando el péptido  $\beta$ A, que posteriormente es secretado al espacio extracelular [109].

Se ha demostrado que la APP es una proteína reguladora de la homeostasis del cobre neuronal usando ratones *knockout* para esta proteína. Los ratones presentan niveles elevados de cobre en la corteza cerebral, característica que desaparece



**FIGURA 6. Procesamiento proteolítico de la APP por las secretasas.**

La APP es una glicoproteína transmembranal del tipo I. La mayoría de ella es procesada por la vía no amiloidogénica (flecha gruesa). La APP es cortada primero por la  $\alpha$ -secretasa dentro del dominio del  $\beta$ A (región oscura) dando lugar a la secreción de APPs $\alpha$  sin generar  $\beta$ A. El fragmento carboxilo terminal (CTF) anclado a la membrana es cortado por la  $\gamma$  secretasa dentro de la membrana, liberando el péptido p3 y el dominio intracelular de la APP (AICD). De manera alternativa, la vía amiloidogénica (flecha delgada) se genera cuando la APP es cortada primero por la  $\beta$ -secretasa, produciendo la APPs $\beta$ .  $\beta$ A y AICD se generan con el corte por la  $\gamma$ -secretasa del fragmento  $\beta$ -CTF retenido en la membrana. Las tijeras indican los sitios de corte de las secretasa  $\alpha$   $\beta$  y  $\gamma$ . (Modificado de [108]).

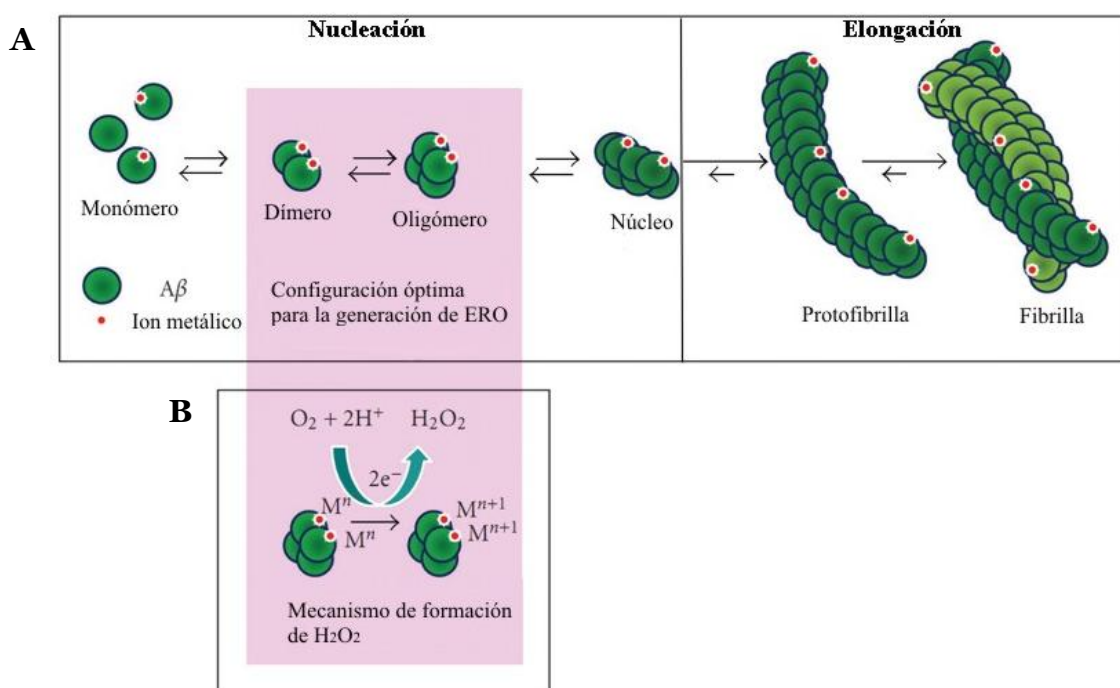
sobrexpresando la APP [110,111]. También se sabe que el cobre modula el corte proteolítico de la APP, ya que al aumentar las concentraciones de cobre se reduce la producción de  $\beta$ A en células ováricas de hámster chino [112,113].

Las dos formas fisiológicas más comunes de los péptidos beta-amiloides son el  $\beta$ A1-40 (90%) y el  $\beta$ A1-42 (10%) [70]. Estos últimos son llamadas  *$\beta$ A largos* y se agregan más fácilmente que los cortos. Se cree que son los principales causantes de la patología, ya que se encuentran en mayor cantidad en el cerebro de los pacientes que tuvieron EA familiar [114]. A pesar de la pequeña diferencia estructural, estos péptidos presentan diferencias en cuanto a su función biológica. Así mismo, se sabe que la tasa de  $\beta$ A1-42/ $\beta$ A1-40 aumenta con la edad. El  $\beta$ A1-42 es el principal componente de las placas amiloides y es más propenso a la agregación por la presencia de los dos residuos terminales hidrofóbicos [86]. Se sugiere que la agregación del  $\beta$ A1-42 es la causante de la progresión de la enfermedad y que la acumulación de estos agregados es dañina para el cerebro [115].

La formación de las fibras amiloides sigue el *modelo de polimerización dependiente de nucleación* (FIGURA 7) en un proceso de dos fases. La primera fase es de nucleación, en la que los monómeros presentan cambios conformacionales que les permiten asociarse y formar un núcleo oligomérico. La segunda fase es de elongación, en la que los núcleos crecen rápidamente por la adición de monómeros y forman fibrillas. La fase de nucleación es termodinámicamente no favorable y ocurre de manera gradual, mientras que la fase de elongación es un proceso mucho más favorable y ocurre rápidamente [116].

La toxicidad de los  $\beta$ A ha sido difícil de elucidar debido a que su agregación *in vivo* genera diversas especies: monómeros, oligómeros solubles, oligómeros insolubles, fibrillas amiloides, etc. Algunos estudios han demostrado que el  $\beta$ A soluble no es tóxico y

que al formar las fibrillas adquiere las propiedades dañinas [117] y que los agregados amorfos no son neurotóxicos (revisado en [118]). La evidencia actual apunta a que las especies más perjudiciales son los intermediarios oligoméricos [119,120] y no las protofibrillas o las fibras agregadas. La teoría es que los péptidos  $\beta$ A se generan en respuesta a la degeneración celular [52] y debido a que el estrés oxidante es una característica temprana de la EA, se cree que el factor involucrado en el daño son los  $\beta$ A en su etapa inicial de agregación, en la que la especie predominante son los oligómeros solubles [121].



**FIGURA 7. Modelo de polimerización dependiente de la nucleación de los péptidos  $\beta$ -amiloide.**

Los oligómeros solubles junto con sus iones metálicos con actividad redox son potenciales responsables de la generación del  $H_2O_2$ . **A)** Etapas de agregación del  $\beta$ A suponiendo que los oligómeros solubles tienen una sola vía para la formación de fibrillas. La configuración óptima para la generación de las ERO podría ser en la etapa de oligómero. **B)** Mecanismo propuesto para la generación del  $H_2O_2$ . En este caso  $M^n$  y  $M^{n+1}$  representan  $Cu(I)$  y  $Cu(II)$ . La generación del  $H_2O_2$  requiere la transferencia sincronizada de dos electrones de los iones metálicos unidos. (Modificado de [30]).

Se tiene conocimiento de que los  $\beta$ A tienen la capacidad de generar ERO. Los estudios de Behl *et al.* [24] sugieren que estos péptidos pueden generar un aumento en los niveles del  $H_2O_2$  y, en especial, cuando también existe la interacción de esta especie con metales como el Fe y el Cu genera además, ERO altamente tóxicas [122]. Así mismo, se ha demostrado que la adición de catalasa a los cultivos celulares previene la acumulación del  $H_2O_2$  por  $\beta$ A, lo que indica que estos péptidos juegan un papel importante en la regulación de esta especie (revisado en [36]).

Las propiedades redox del  $\beta$ A lo pueden hacer funcionar tanto como antioxidante como prooxidante dependiendo de las condiciones en las que se encuentre. En ausencia de una fuente donadora de electrones, los  $\beta$ A son capaces de donar  $e^-$ , resultando en la formación de un catión radical del péptido que es capaz de promover el ciclo redox de los metales que se encuentren unidos a él. Éste último también puede funcionar como un agente generador del daño oxidante. Estos resultados también son controvertidos ya que se ha visto que los complejos  $\beta$ A-Cu generan menos peróxido de hidrógeno y  $OH^\cdot$  que el cobre libre (revisado en [35]). Así mismo, se ha demostrado en trabajos de varios grupos, que existe una relación entre la producción de los péptidos y el estrés oxidante y viceversa (revisado en [8]). Se cree que esta interrelación de dichos procesos es el principal promotor del daño neuronal en el envejecimiento. Se ha llegado a encontrar el péptido  $\beta$ A oxidado en las placas amiloides [95], lo cual involucra claramente al estrés oxidante con la progresión de la EA.

Existe cierta controversia alrededor del papel de la agregación de estos péptidos en la EA y hay estudios que apoyan la hipótesis de que las fibrillas amiloides son las causantes de las anomalías en las neuronas próximas a las placas seniles [123]. También hay trabajos realizados en un modelo de ratón, que describen que los cuerpos

neuronales de las células que se encuentran alrededor de las placas son morfológicamente normales, a pesar de existir una severa distrofia de sus axones [124].

Actualmente no está claro si el daño cognitivo global que presentan los pacientes con EA se debe a los procesos bioquímicos y metabólicos que son afectados por los  $\beta$ A [125]. De manera sorprendente y contrario a los estudios mencionados anteriormente, también se ha encontrado que el aumento en la deposición de los  $\beta$ A correlaciona con una disminución en el daño oxidante en los cerebros de los pacientes con EA [11]. Es posible que la producción acelerada de los  $\beta$ A sea un mecanismo compensatorio para reducir la toxicidad de las ERO generadas por otro tipo de daño neuronal.

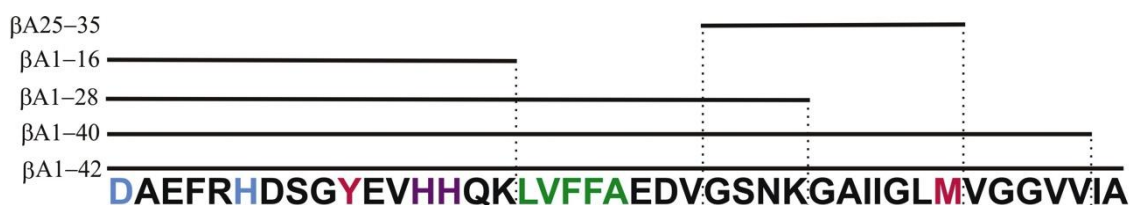
Se sabe que los distintos péptidos y fragmentos amiloides tienen un diferente efecto tóxico y que el grado de toxicidad puede estar relacionado con el estado de agregación de los mismos [123]. Así mismo, la metodología de síntesis, purificación, agregación de los péptidos, vehículo usado, concentración y modelos usados difieren mucho de un estudio a otro, por lo que resulta difícil obtener conclusiones contundentes sobre la toxicidad de los  $\beta$ A. La caracterización de las propiedades de los fragmentos amiloides ha sido una tarea muy complicada y actualmente existen en la literatura científica una gran cantidad de resultados divergentes respecto a las propiedades de los  $\beta$ A, en gran parte debido a las diferentes metodologías usadas para su estudio.

Así mismo, se han propuesto una gran cantidad de mecanismos por los cuales estos péptidos son neurotóxicos, por ejemplo: la formación de fibrillas, la presencia de oligómeros solubles, interacción con canales iónicos, despolarización membranal, estrés oxidante, formación de poros, daño endotelial, interacción con Tau, unión con enzimas antioxidantes y actividades mediadas por receptores específicos. Muchos de estos procesos son dependientes del estado de agregación del los péptidos [94,126].



### **Características de los fragmentos usados**

Para este proyecto, se usaron cuatro fragmentos del péptido  $\beta$ A con propiedades diferentes. Dos de ellos son fragmentos capaces de formar fibrillas (1-28 [127] y 1-40), ya que, como se muestra en la FIGURA 8, contienen la secuencia hidrofóbica crítica para la fibrilación. El fragmento truncado 1-16 no tiene tendencia a la agregación o a la formación de fibrillas [86], por lo tanto se vuelve un modelo del péptido  $\beta$ A soluble y coordinado con metales [128]. El 1-28 contiene los sitios de unión a metales y se puede agregar, así como formar fibrillas pero más lentamente que las formadas con el  $\beta$ A1-40 y 1-42. Por lo tanto el  $\beta$ A1-28 sirve como modelo del comportamiento de la agregación y la coordinación con metales [86] al igual que el 1-40, siendo en el primero, la formación de agregados menos favorable [82].



**FIGURA 8.** Comparación de secuencias de los fragmentos usados ( $\beta$ A25-35/1-16/1-28/1-40) con el péptido  $\beta$ A1-42. Aminoácidos involucrados en la coordinación con cobre (azul), en la generación de especies reactivas de oxígeno (rojo) y en ambos procesos (morado). Secuencia hidrofóbica crítica para la fibrilación (verde). (Modificado de [86,81,103]).

Los fragmentos 1-16, 1-28 y 1-40 contienen el sitio de coordinación para el cobre, pero únicamente el 1-40 es capaz de reducirlo ya que es el único que contiene un ambiente de histidinas para coordinarlo y una metionina en la posición 35 cuyo grupo sulfuro es capaz de donar electrones al cobre promoviendo su ciclo redox. Solamente los fragmentos 1-40 y 25-35 contienen este aminoácido, pero el 25-35 al no contener el

amino-terminal esencial para la coordinación con el cobre, no presenta actividad redox por sí solo. Las variantes cortas de coordinación con el cobre 1-16 y 1-28 unen al metal con una afinidad similar al péptido  $\beta$ A1-42 (revisado en [82]).

En la TABLA 1 se presenta un resumen de las propiedades relevantes para este trabajo, de cada uno de los fragmentos usados.

<b>Fragmento <math>\beta</math>A</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Sitio de coordinación con <math>\text{Cu}^{2+}</math> <sup>c</sup></b>	<b>Sitio de fibrilación<sup>d</sup></b>	<b>Capaz de reducir <math>\text{Cu}^{2+}</math></b>	<b>Contiene metionina</b>
<b>25-35</b>	GSNKGAIIGLM <sup>a</sup>	X	X	X <sup>e</sup>	✓
<b>1-16</b>	DAEFRHDSGYEVHHQK <sup>bd</sup>	✓	X	X <sup>e</sup>	X
<b>1-28</b>	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA EDVGSN <sup>bd</sup>	✓	✓	X <sup>e</sup>	X
<b>1-40</b>	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA EDVGSNKGAIIGLMVGGVV <sup>bd</sup>	✓	✓	✓ <sup>f</sup>	✓

**TABLA 1. Características de los distintos fragmentos  $\beta$ A usados en este proyecto.**

<sup>a</sup>SIGMA ALDRICH®. <sup>b</sup>[171]. <sup>c</sup>[86]. <sup>d</sup>[82]. <sup>e</sup>[38]. <sup>f</sup>[78].

## Muerte neuronal inducida por el $\beta$ A

Existe cierta correlación entre las regiones del cerebro en las que se acumula el péptido  $\beta$ A y las que contienen células en degeneración, especialmente la corteza entorrinal y el hipocampo de pacientes que padecieron EA [129]. Esta correlación se puede observar también a nivel subcelular, ya que la inmunoreactividad al  $\beta$ A es mayor en las células morfológicamente alteradas. El estudio de LaFerla *et al.* [130] encontró la presencia de neuronas degeneradas en los cerebros de ratones transgénicos que expresaban  $\beta$ A intracelular y se observaron en estas células características morfológicas distintivas de la apoptosis, como una cromatina condensada colindante con la membrana nuclear. Mediante un método para determinar apoptosis llamado TUNEL, se observó una gran cantidad de células positivas en la corteza cerebral, en el hipocampo, especialmente en las regiones CA1, CA2, CA3, en el giro dentado y también en la amígdala. Estas tres regiones son las más atrofiadas en los pacientes con EA y se han sugerido como marcadores clínicos estructurales para diferenciar un envejecimiento normal de una patología degenerativa (revisado en [131]) [132-136] incluso en pacientes presintomáticos [137].

Por lo tanto, se sugiere que la apoptosis es uno de los mecanismos más importantes que conlleva a la muerte neuronal en la EA (revisado en [138])[129,139] y también se tiene suficiente evidencia *in vitro* que apunta a que la apoptosis es la vía principal de la muerte generada por el  $\beta$ A [140].

La apoptosis está caracterizada por una serie de procesos celulares. Estos son: la fragmentación del DNA, la condensación de la cromatina, el encogimiento celular y el desensamblaje en cuerpos apoptóticos que posteriormente son engullidos por otras células [141]. La maquinaria encargada de la apoptosis es un sistema proteolítico de

proteasas de cisteína (caspasas) que participan en una cascada irreversible, desencadenada por señales proapoptóticas que resulta en la muerte celular organizada. La mayoría de estas caspasas son sintetizadas como precursores (pro-caspasas) que al ser proteolizadas son convertidas, por otras proteasas o mediante autoproteólisis, a la forma activa de la enzima. Las proenzimas contienen tres dominios: uno amino-terminal, una subunidad grande (20 kDa) y una subunidad pequeña (10 kDa). Para que se dé la activación de las caspasas, es necesario el procesamiento proteolítico entre los dominios y la asociación de las subunidades grande con la pequeña formando un heterodímero [141].

Existen dos vías apoptóticas, la extrínseca, a través de receptores de superficie celular y la intrínseca, que se inicia a nivel mitocondrial [142]. En la extrínseca un efector (Fas-L/TNF- $\alpha$ /TRAIL) se une a su receptor (Fas/TNF1/TRAIL) e inicia una serie de interacciones entre proteínas que forman un complejo llamado DISC, conformado por FADD/pro-caspasa-8 o 10. Este complejo promueve la activación de estas caspasas iniciadoras que a su vez activan a las caspasas efectoras como la 3, 6 y 7, que causan la muerte neuronal mediante la proteólisis de los componentes celulares. La vía intrínseca se activa por estímulos intracelulares. La mitocondria recibe una señal apoptótica, lo que origina que las proteínas proapoptóticas como Bax se oligomericen e inserten en la matriz mitocondrial externa permeabilizándola y permitiendo que el Citocromo c (CitC) y el Factor inductor de la apoptosis (AIF) se liberen al citoplasma. Ahí, el CitC une el Factor activador de proteasas 1 (Apaf-1) causando su oligomerización y promoviendo el reclutamiento de la pro-caspasa iniciadora 9. Este complejo es llamado apoptosoma. La caspasa-9 es activada y, a su vez, activa las caspasas efectoras como la 3 y la 7, causando la muerte neuronal. AIF migra al núcleo y promueve la condensación de la

cromatina y la fragmentación del DNA [143] de manera independiente de la activación de caspasas.

Existen diversos reportes que indican que el  $\beta$ A induce algunos cambios celulares que son característicos de la apoptosis (revisado en [50,144])[140]. Así, se ha sugerido que las caspasas juegan un papel importante en la muerte neuronal inducida por  $\beta$ A. Se sabe que estos péptidos son capaces de promover la apoptosis tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca [50]. El punto de convergencia de ambas es la caspasa-3, cuya expresión se ha encontrado aumentada en los cerebros de pacientes que tuvieron EA, lo cual no se observa en el envejecimiento normal [145]. Así mismo, la caspasa-3 es capaz de cortar a la APP promoviendo la deposición de placas en la EA [146]. Por esto se ha sugerido que la activación del mecanismo de muerte es fundamental para la progresión de la enfermedad. Esto se ha demostrado también con diversos inhibidores de caspasas que son capaces de bloquear la muerte de las neuronas del hipocampo cultivadas e inducida con el  $\beta$ A25-35 [147]. En un estudio de Harada *et al.* [144] se demostró que tanto el  $\beta$ A25-35 como el  $\beta$ A1-40 y el  $\beta$ A1-42 son capaces de aumentar la actividad de la caspasa-3 en cultivos corticales primarios mixtos de rata, siendo el 25-35 el que más la activa, luego el 1-42 y después el 1-40. La activación por estos dos últimos es dependiente de su concentración.

Así mismo, se ha encontrado aumentada la expresión de los factores anti y proapoptóticos como Bcl-2, Bcl-x, Bak y Bad en la corteza temporal de los pacientes con EA [148], siendo Bad y Bak los que contribuyen a la muerte neuronal asociada con la enfermedad y, probablemente, Bcl-x y Bcl-2 funcionando como un mecanismo compensatorio.

El aumento en la susceptibilidad a la muerte neuronal y al estrés oxidante son características presentes en la EAE y en la EAF [50]. Es posible que las neuronas sometidas a estímulos oxidantes mueran por un proceso apoptótico desencadenado en parte por las ERO [23]. Se sabe que la muerte apoptótica se puede deber al daño oxidante [149] y a que las ERO son capaces de promover la redistribución del CitC en diversos tipos celulares (revisado en [142]). Se ha sugerido que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es uno de los principales ejecutantes de la muerte neuronal [24] (y revisado en [138]) y que puede contribuir a la señalización apoptótica en la EA [78], probablemente por la vía mitocondrial, ya que este orgánulo es particularmente susceptible al daño oxidante y se ha encontrado alterado en el cerebro *postmortem* de pacientes con EA [22].

Más argumentos a favor de la muerte apoptótica dependiente de las ERO producidas por el βA es el estudio de Liu *et al.* [150], quien encontró un compuesto capaz de proteger a las células PC12 de la muerte neuronal mediante la prevención de la disfunción mitocondrial y el estrés del retículo endoplásmico inducidos con el βA25-35. Otros estudios sugieren que el βA1-40 es crítico para la EA y la forma agregada induce la muerte neuronal *in vitro* a diferencia de la no agregada en cultivos corticales primarios de rata [138].

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

El cerebro es el órgano con el mayor metabolismo aeróbico de todo el cuerpo. Con el envejecimiento el metabolismo oxidante se altera, lo que activa vías de daño y muerte celular que pueden contribuir al desencadenamiento de diversas patologías como la EA. Esta enfermedad es un desorden neurodegenerativo progresivo, que se caracteriza por un deterioro cognitivo global y se estima que es la forma más común de demencia asociada con la edad. Una de sus características histopatológicas más importantes es la presencia de placas amiloides, formadas por agregados extracelulares insolubles del  $\beta$ A en el cerebro de los pacientes.

Los péptidos  $\beta$ A más comunes están compuestos por 39-42 residuos y se originan del corte proteolítico de la APP. Contienen dominios de unión a algunos metales de transición, como zinc, hierro y cobre, que al unirse, modifican las propiedades de agregación de los péptidos [35]. También se altera la homeostasis metálica con el envejecimiento celular, por lo tanto, se ha sugerido que la producción de ERO por los péptidos  $\beta$ A y su interacción con los metales es uno de los principales ejecutantes del estrés oxidante observado en esta enfermedad [36,151] y por consiguiente del daño y muerte neuronal. Sin embargo, el mecanismo a través del cual los  $\beta$ A favorecen la producción de ERO no se conoce por completo. Todo esto ha llevado a concluir que es importante identificar dentro del péptido  $\beta$ A1-42, las secuencias de aminoácidos o los residuos capaces de interaccionar con los metales y conocer si dicha interacción favorece la producción de las ERO y la muerte celular. Para esto, se usarán cuatro fragmentos del péptido  $\beta$ A: 25-35, 1-16, 1-28 y 1-40 cuyas capacidades de formación de fibrillas y coordinación con cobre difieren.

## HIPÓTESIS

---

Los diversos fragmentos del  $\beta A$  inducirán distinto grado de daño neuronal dependiendo de si contienen el sitio de coordinación con  $Cu^{2+}$  y de sus propiedades de fibrilación.

Los péptidos que contienen los sitios de unión para los metales, la región hidrofóbica del  $\beta A$  y sean agregados con  $Cu^{2+}$  generarán mayor citotoxicidad ( $\beta A1-28+Cu^{2+}$  y  $\beta A1-40+Cu^{2+}$ ).

## OBJETIVOS

---

### Generales

Investigar la producción de las ERO y la apoptosis, inducida con diferentes fragmentos  $\beta A$  agregados con y sin  $Cu^{2+}$ , que presenten o no el sitio de coordinación para los metales en cultivos primarios de neuronas corticales y en terminales sinápticas aisladas (sinaptosomas).

### Específicos

Analizar la producción del superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en cultivos corticales primarios y en sinaptosomas estimulados por cuatro fragmentos del péptido  $\beta A$ : 1-16, 1-28, 25-35 y 1-40 agregados en presencia o ausencia de cobre (II).

Analizar la inducción de la apoptosis producida con los diferentes fragmentos, en cultivos corticales primarios, evaluada por la presencia de núcleos condensados y fragmentados y la actividad de la caspasa-3.



### **Cultivo celular**

Se realizaron cultivos primarios de corteza cerebral de embriones de 17-18 días de gestación de ratas Wistar. Se hace la disección de la corteza cerebral de los embriones y el tejido se corta e incuba en una solución de tripsina 0.25% con EDTA 1 mM por 3 min a 37°C. Posteriormente se incuba en una solución que contiene DNAsa (0.08%) e inhibidor de tripsina (0.52%). El tejido se homogeniza en una solución que además contiene magnesio al 3.8% y se pasa por una malla de disociación. Las células se resuspenden en medio Neurobasal Mixto (Gibco®) suplementado con 1% de B27 con antioxidantes (Gibco®) y 1% de B27 sin antioxidantes (Gibco®), 1% de Gentamicina (Gibco®) y 7.3% de L-glutamina (Sigma®). Para los distintos experimentos, las células se sembraron en placas Costar de 24 y 48 pozos pre-tratadas con poli-L-lisina (5 µg/ml) durante 3 h y en placas de 96 pozos de fondo transparente y lados opacos pretratadas con el polímero. En todos los casos se sembraron a una densidad de  $10 \times 10^6$  células/placa.

Se cultivaron las células por 8 días *in vitro* a 37°C en atmósfera humidificada (CO<sub>2</sub> 5% / Aire atmosférico 95%). Se adicionó glucosa (5 mM) y citosina-D-arabinosa (10 µM) al cultivo a los 4 días *in vitro*.

### **Purificación de los sinaptosomas**

Se obtienen mediante el método de Löscher [152]. Usando ratas Wistar macho (250-300 g) se disecciona 1 g de tejido cortical de ambos hemisferios en hielo y se homogeniza en 2 ml de sacarosa 0.32 M con 10% v/v de HEPES 5 mM y se centrifuga a 4,500 rpm por 10

min a 4°C. El sobrenadante se coloca en 1 ml de sacarosa 1.2 M con 10% v/v de HEPES 5 mM. La segunda centrifugación se da a 50,000 rpm a 4°C y  $w^2t$   $1.6 \times 10^{10}$  con aceleración lenta. La interfase se colecta y se lleva a 2 ml con la solución de sacarosa 0.32 M. Posteriormente, lo obtenido se coloca en sacarosa 0.8 M con 10% v/v de HEPES 5 mM. Se centrifuga igual que la segunda centrifugación y la pastilla se resuspende en 3 ml de buffer de Locke pH 7.2 (NaCl 154 mM, KCl 5.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 3.6 mM, HEPES 5 mM, glucosa 0.5 mM). Se incubaron alícuotas de 200 µl de los sinaptosomas a 37°C durante 3 h en agitación en presencia de los fragmentos βA mencionados.

### **Agregación de los péptidos**

Para su agregación, todos los péptidos fueron incubados por 24-30 horas en agitación circular a 37°C, en agua MiliQ o en una solución con CuCl<sub>2</sub> 1:1 a una concentración de 1 mM. En todos los experimentos, fueron usados a una concentración final de 20 µM.

Los fragmentos 1-16, 1-28 y 1-40 fueron sintetizados en fase sólida, utilizando grupos protectores Fmoc y fueron purificados por HPLC en fase reversa por el Dr. Luis Blancas Mejía (1-28 y 1-40) y la Lic. Guadalupe Trujano Ortiz (1-16) en el laboratorio de la Dra. Liliana Quintanar Vera, del Departamento de Química del Cinvestav. El fragmento 25-35 fue adquirido de Sigma®.

El fragmento 1-40 para ser solubilizado se disolvió primero en agua a pH 10 (con NaOH) y posteriormente se bajó el pH a 8-8.5 (con HCl). El péptido fue agregado a este pH de la manera antes mencionada.

## **Determinación de ERO**

### ***Superóxido***

Para la determinación de superóxido se usó el fluoróforo Dihidroetidio (DHE) (Molecular Probes®) a una concentración final de 1.5  $\mu\text{M}$ . Este fluoróforo es sensible a la oxidación, principalmente por superóxido liberando los productos fluorescentes etidio (Et) y 2-hidroetidio que permanecen en el núcleo debido a su interacción con el DNA, produciendo una marca roja. Después de exponer las células a los diferentes péptidos por diferentes períodos de tiempo, se agregó la solución con DHE y se incubó durante 15 min. Pasado este tiempo, se lavó el excedente extracelular del fluoróforo con PBS y se midió la fluorescencia en un lector de placas Biotek Synergy HT (Excitación 510 nm/Emisión 590 nm).

Para la adquisición de las imágenes, se sembraron las células en cajas de 24 pozos con cubreobjetos circulares. Después de los tratamientos y de la incubación con DHE las células se lavaron 3 veces por 3 min con D-PBS y se fijaron con formaldehído al 3.7% en hielo por 5 min. Se colocaron sobre portaobjetos con Fluoromont-g y posteriormente se observaron en un microscopio invertido de fluorescencia Nikon a un aumento de 40 X para adquirir imágenes. Las presentadas en este trabajo son las representativas de 4 experimentos independientes.

Para la determinación del  $\text{O}_2^{\cdot -}$  en los sinaptosomas se siguió el mismo método, incubando las muestras por 3 h a 37°C en agitación. Pasado el tiempo de incubación con el fluoróforo (20 min.), se centrifugaron a 18,000 rpm durante 4 min. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en PBS y se midió la fluorescencia emitida por el etidio colocando 100  $\mu\text{l}$  de las muestras por pozo en placas de 96 y siguiendo el protocolo como se menciona para las células.

### **Peróxido de hidrógeno**

Para la determinación de  $H_2O_2$  se usó el fluoróforo Amplex UltraRed (Molecular Probes®). Éste es un sustrato fluorogénico para la peroxidasa del rábano *Amoracia rusticana* (HRP) que reacciona con el peróxido de hidrógeno produciendo un producto fluorescente, siendo este ensayo sensible a esta especie. El Amplex se usó a una concentración final de 3  $\mu$ M agregando al ensayo peroxidasa de rábano (HRP) 0.5U/ml final. Después del tratamiento con los fragmentos, se separó el medio de las células, y éstas se rompieron con Buffer de lisis 1 X (10 mM TrisHCl, 10 mM  $NaH_2PO_4$ , pH 7.5, 130 mM NaCl, Tritón x100 1%) por 15 min en hielo y posteriormente se agregó el buffer de ensayo 2 X (40mM HEPES) con la peroxidasa y el sustrato. Para poder hacer la medición del  $H_2O_2$  en el medio, se sembraron las células en medio Neurobasal sin Rojo Fenol en las mismas condiciones anteriormente descritas. En este caso, se tomó el medio y a éste directamente se agregó el Amplex+HRP a las concentraciones mencionadas. Para medir la fluorescencia se utilizó un lector de placas BioTek Synergy HT a Ex530-560 nm/Em 590 nm.

Para la determinación en sinaptosomas, se siguió el mismo método, antes del tratamiento con los distintos fragmentos, se agregó ascorbato (Sigma®) 50  $\mu$ M a los sinaptosomas. Posteriormente, ya con los fragmentos, fueron incubados a 37°C en agitación por 3 horas. Para hacer la cuantificación del peróxido dentro de las terminales, y el que difundió al medio se centrifugaron las muestras a 18,000 rpm por 4 min., separando el medio del pellet, que fue resuspendido con el Buffer de Lisis. Posteriormente se siguió el protocolo de lectura como se menciona anteriormente usando las mismas concentraciones de Amplex y HRP.

### **Análisis de la actividad de la Caspasa-3**

Se usó el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AMC (Peptide Institute®) 20  $\mu$ M como marcador. Éste es cortado por la caspasa-3 liberando aminometilcumarina (AMC), que emite fluorescencia, pudiendo ser monitoreada en un espectrofluorómetro (Ex 380 nm/Em 430-460 nm).

Después del tratamiento por 24 horas con los distintos fragmentos, se lavaron las células con PBS y se rimpieron con un buffer 1X (10 mM TrisHCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 130 mM NaCl, Tritón x100 1%) por 15-20 min en agitación y en hielo. Posteriormente se agregó el buffer de ensayo 2X (40 mM HEPES, 2 mM DTT, 40  $\mu$ M Ac-DEVD-AMC) por 5 min. a temperatura ambiente en la oscuridad para leer una cinética de 45 min. en un lector de placas Biotek Synergy HT Ex 380/Em 430-460 nm. Los datos de la cinética fueron ajustados a la proteína total, medida mediante el método de Lowry [153]. Como control positivo, se usó el compuesto estaurosporina (STP), que es un inhibidor de las proteínas cinasas (PK) y que promueve la apoptosis por la vía mitocondrial, a una concentración de 200 nM.

### **Medición de proteína mediante el método de micro-Lowry**

Se usó el kit the Bio-Rad® DC Protein Assay que es un ensayo colorimétrico para la determinación de la concentración de proteína. El ensayo se basa en la reacción de las proteínas con la solución de tartrato de cobre en un medio alcalino, y posteriormente la reducción del reactivo de Folin. El color se obtiene especialmente por la presencia de aminoácidos aromáticos.

Las muestras fueron sonicadas y se colocaron 10  $\mu$ l por pozo por triplicado de cada condición. A cada pozo se agregaron 25  $\mu$ l del reactivo A+S, 200  $\mu$ l del reactivo B y se

dejaron en agitación por 20 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 750 nm con un espectrofluorómetro.

### **Conteo de núcleos condensados con tinción de Hoechst**

El Hoechst es un fluoróforo que se une al DNA, por lo tanto, es posible analizar de manera general la morfología nuclear y contar el número de los núcleos condensados y fragmentados, característicos de la apoptosis. Para esto, las células son sembradas en placas de 24 pozos sobre cubreobjetos circulares. El tratamiento con los diferentes péptidos en las células se hace por 24 horas y al término de éstas, se lavan con D-PBS (KCl 2.67 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.47 mM, NaCl 138 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.29 mM) 2 veces por 5 min. y se agregan 300  $\mu\text{l}$  de la solución de Hoechst 33258 (Sigma®) al 0.001% en D-PBS, por pozo. Se incuba por 15 min. a temperatura ambiente y posteriormente se hacen 2 lavados de 5 min. cada uno con D-PBS. Las células se fijan con formaldehído al 3.7% durante 8 min en hielo. Los cubreobjetos se retiran y son montados en portaobjetos con Fluoromont-g (Electron Microscopy Sciences®). Se dejan secar por 5-10 min. y se sellan las orillas con barniz transparente. Las fotografías fueron adquiridas con un microscopio invertido de epifluorescencia marca Nikon usando una magnificación 40x con un filtro UV. Para la cuantificación, se expresa el porcentaje de núcleos condensados o fragmentados sobre el total de núcleos contados en al menos 9 campos por pozo. Las fotografías mostradas en este trabajo son las imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes.

## **Estadística**

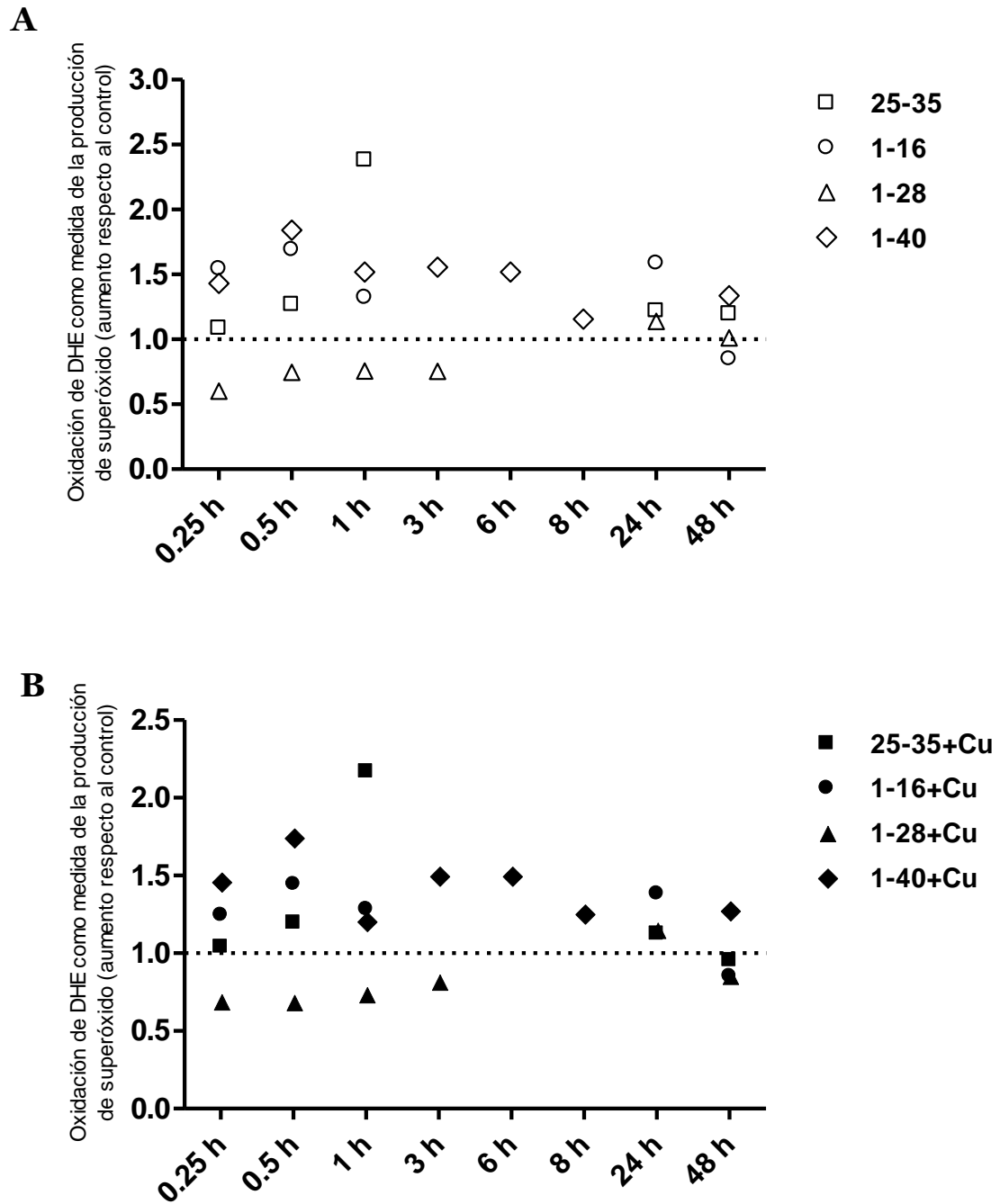
Todos los análisis estadísticos fueron realizados por la prueba de ANOVA de una sola vía seguida de una prueba post hoc de Fisher de comparación múltiple. Se escogió un nivel de significancia del 5%. Se utilizó el error estándar de la media (ESM).

### Determinación de las ERO en cultivos corticales primarios

Se ha sugerido que la neurotoxicidad de los péptidos  $\beta\text{A-Cu}^{2+}$  está directamente relacionada con su capacidad para generar ERO, especialmente el superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno [105,151] y que ésta se ve potenciada en presencia de metales [78]. Con el fin de evaluar la producción de las ERO con los fragmentos  $\beta\text{A}$  fibrilares (1-40, 1-28) y no fibrilares (1-16, 25-35) y compararla con la condición de estos fragmentos agregados con  $\text{Cu}^{2+}$ , se llevaron a cabo ensayos fluorométricos para la detección principalmente de dos especies reactivas del oxígeno: el superóxido y el peróxido de hidrógeno.

Inicialmente se evaluó la temporalidad de la producción del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por los diversos fragmentos agregados en presencia y ausencia de cobre, para la determinación de los puntos máximos de generación de esta especie en el modelo. Como se muestra en la FIGURA 9, los puntos de mayor producción del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  que se encontraron para cada fragmento son los mismos en su condición con y sin cobre (B y A respectivamente), y se observa una diferencia en la temporalidad de producción de las ERO de algunos fragmentos. Es importante resaltar que la mayoría de los fragmentos presentan inducción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a tiempos tempranos, siendo para el  $\beta\text{A}25-35$  después de una hora de exposición, para el  $\beta\text{A}1-16$  y el  $\beta\text{A}1-40$  después de media hora, y de manera interesante, el  $\beta\text{A}1-28$  a tiempos cortos (durante los cuales los otros fragmentos presentan sus picos máximos de producción de superóxido) disminuye la producción basal de superóxido, sugiriendo un efecto antioxidante.



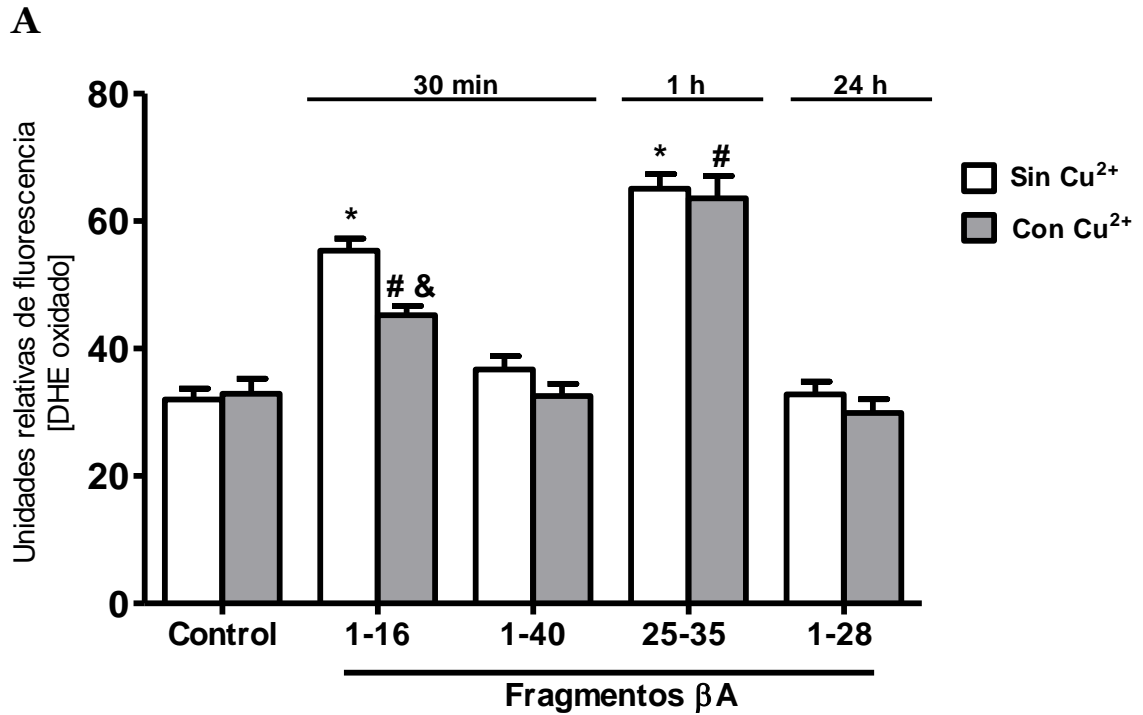


**FIGURA 9. Análisis temporal de la producción de superóxido con diferentes fragmentos  $\beta$ A.**

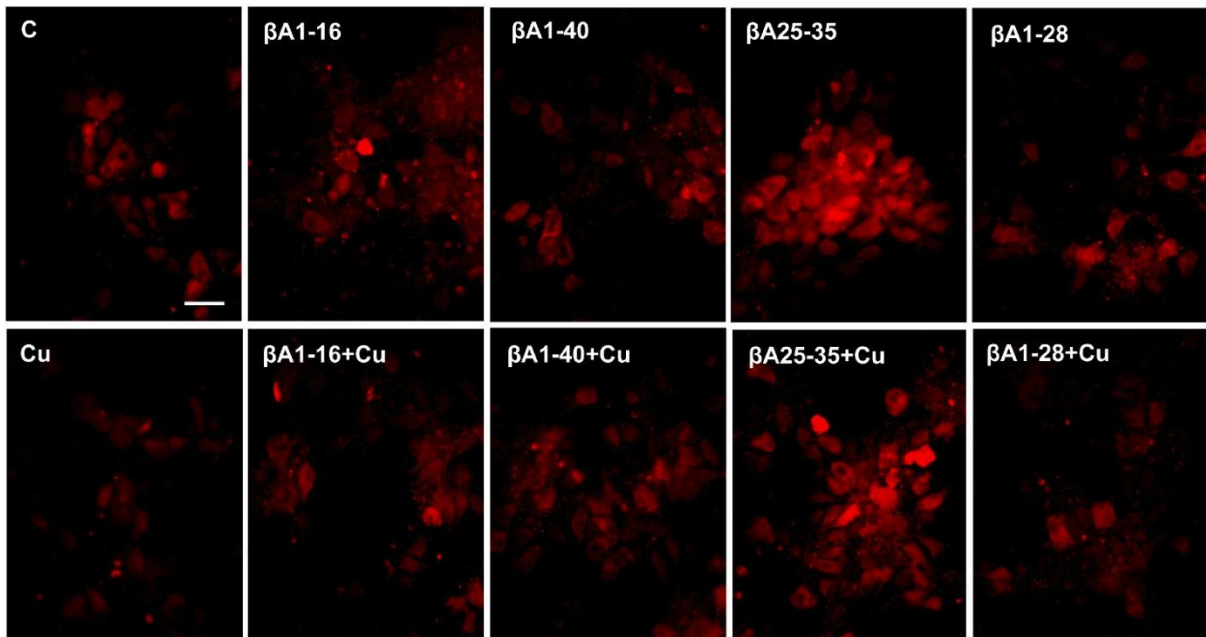
Las gráficas muestra la temporalidad de la producción de las ERO de cada uno de los fragmentos, **A)** en ausencia y **B)** en presencia de cobre a concentraciones equimolares. La línea punteada representa el control (células intactas sin y con cobre respectivamente) normalizado a 1.

Se escogieron los puntos máximos de producción de superóxido para estimular las células con los diferentes fragmentos agregados con y sin cobre y se llevó a cabo el ensayo fluorométrico de detección del radical superóxido con el fluoróforo dihidroetidio, en cultivos corticales primarios de rata.

Podemos observar en la FIGURA 10 que el fragmento 25-35 es el que induce mayor producción de superóxido, siendo este aumento del 104%. Este fragmento no contiene el sitio de unión a metales, por lo tanto, la presencia de cobre no modifica la capacidad de este péptido para inducir un aumento en el  $O_2^{\cdot -}$ . El fragmento 1-16 también promueve la producción de  $O_2^{\cdot -}$ , aumentando ésta en un 73% y, contrario a lo esperado, la condición tratada con cobre es capaz de prevenir en un 35% este incremento. El 1-28 parece no jugar un papel importante en la producción del superóxido y no se observa una diferencia significativa entre esta condición y la agregada con el metal. El fragmento 1-40 se comporta de manera similar al 1-28. En el caso del fragmento 1-16, los agregados no fibrilares sí se ven afectados por la presencia del cobre, siendo este metal capaz de disminuir de manera significativa la toxicidad de éstos. Así mismo, se confirma la incapacidad del fragmento 25-35 de interactuar de manera redox con el cobre, como se ha reportado anteriormente en fragmentos sin histidinas [154].



**B**



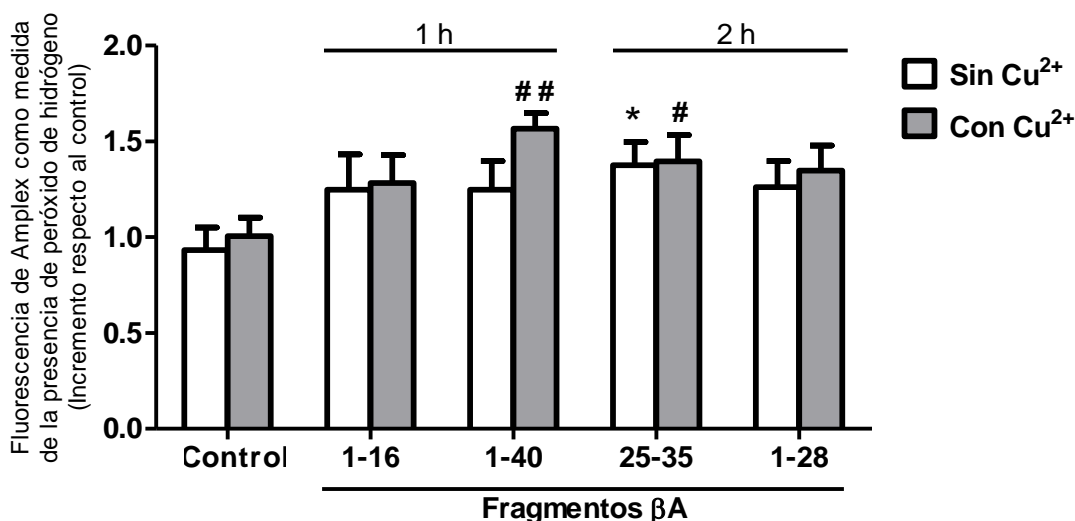
**FIGURA 10. Producción del superóxido con diferentes fragmentos  $\beta$ A.**

**A)** El histograma muestra los picos máximos de producción del superóxido con cada uno de los fragmentos, obtenidos a los tiempos indicados, en presencia y ausencia de cobre a concentraciones equimolares.  $n=4-6$ . \* $p<0.03$  significativo con respecto al control sin  $\text{Cu}^{2+}$ . & $p<0.01$ . Significativo con respecto al fragmento sin  $\text{Cu}^{2+}$ . # $p<0.05$  significativo respecto al control con  $\text{Cu}^{2+}$ . Los valores representan la media  $\pm$  ESM. **B)** Imágenes representativas de cada condición. Fotografías adquiridas con un microscopio de epifluorescencia Nikon, aumento 40X. Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ .

Posteriormente, se llevaron a cabo los experimentos de detección de peróxido de hidrógeno en el medio de cultivo en el que las células fueron sembradas y expuestas a los diferentes fragmentos, usando el sustrato fluorescente Amplex UltraRed en un ensayo que contiene peroxidasa de rábano picante para la detección de esta especie.

Se sabe que el  $H_2O_2$  juega un papel importante en la EA al encontrarse aumentados los niveles de catalasa en los pacientes [10,155] y también el  $H_2O_2$  se encuentra elevado en modelos animales [156] y celulares de la EA [24]. También se ha reportado la producción de esta especie *in vitro* en presencia de complejos  $\beta A-Cu$  [157]. Se cree que es una de las principales especies ejecutantes del daño neuronal [122] y cuya señalización podría dar lugar a la apoptosis [143].

En la FIGURA 11 se muestran los tiempos a los que se cuantificó mayor producción de  $H_2O_2$ . Podemos observar que los únicos fragmentos capaces de aumentar la producción de  $H_2O_2$  de manera extracelular son el 25-35 en su condición



**FIGURA 11. Producción del peróxido de hidrógeno por diferentes fragmentos  $\beta A$ .**

El histograma muestra los picos máximos de producción de  $H_2O_2$  de cada uno de los fragmentos, obtenidos en el medio a los tiempos indicados, en presencia y ausencia de  $Cu^{2+}$  a concentraciones equimolares. n=3-4. \*p<0.03 significativo respecto al control sin cobre. #p<0.05, ##p<0.003 respecto al control con cobre. Los valores representan la media  $\pm$  ESM.

con y sin cobre, y el 1-40+Cu<sup>2+</sup>. Debido a que la presencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se pudo observar únicamente en el medio y en el espacio intracelular no fue posible observar diferencias en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en relación con el control, en ninguna de las condiciones (datos no mostrados), es posible que esta especie se esté produciendo principalmente extracelularmente. Estos resultados sugieren que no parece tener lugar la dismutación enzimática o espontánea del superóxido producido por los péptidos 1-16 y 25-35 (FIGURA 10).

### **Determinación de la muerte neuronal apoptótica en cultivos corticales primarios**

Existe suficiente evidencia de la muerte neuronal apoptótica en los cerebros de pacientes con EA [138] principalmente en las zonas en las que existe mayor acumulación de  $\beta$ A, lo que correlaciona con la progresión de la patología [129]. Se ha visto la presencia de procesos característicos de la muerte apoptótica en pacientes que padecen la enfermedad.

Así mismo, diferentes estudios han demostrado que los niveles de caspasa-3 en cerebros de pacientes con EA son más altos que en controles de la misma edad, y también se ha demostrado que en el cerebro de ratas adultas la caspasa-3 no se encuentra elevada, por lo tanto, esto parecería indicar que los eventos neurodegenerativos que subyacen a la EA son distintos a los del envejecimiento [145].

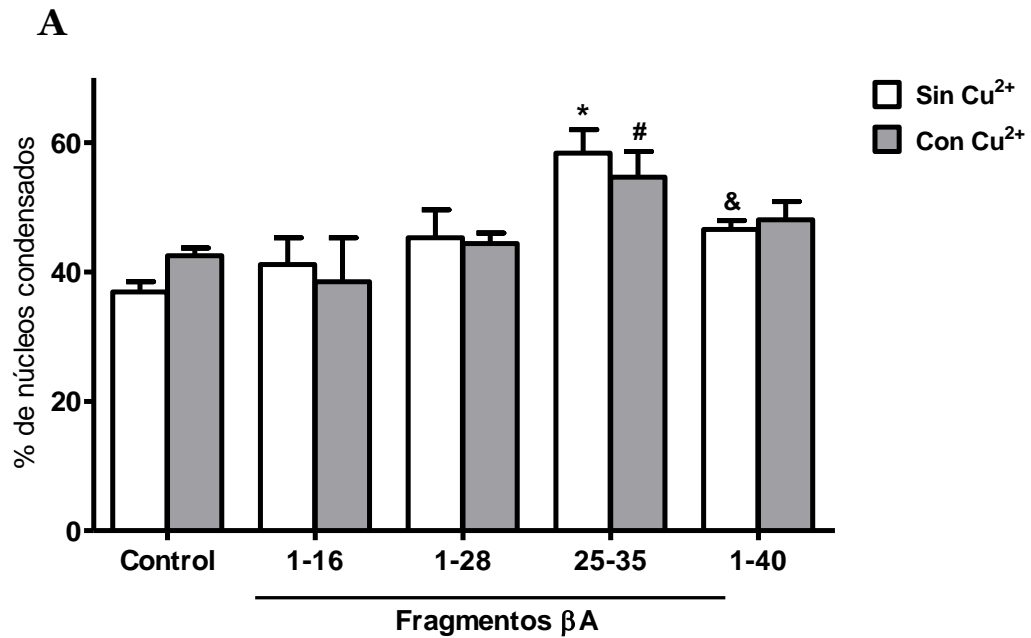
En cuanto a los modelos *in vitro*, estudios previos de la activación de la caspasa-3 en cultivos corticales primarios mixtos de embriones de rata, estimulados con el  $\beta$ A25-35 han demostrado que la actividad máxima de esta caspasa se da a las 24 horas de incubación con el fragmento a una concentración de 25  $\mu$ M. Del mismo modo, los  $\beta$ A1-40

y 1-42 son capaces de activar esta caspasa pero en menor medida. Además, la actividad de otras caspasas, como la caspasa-1 no aumenta con el mismo tratamiento [144]. Se ha reportado también en cultivos corticales neuronales de ratón que el  $\beta$ A1-42-Cu<sup>2+</sup> induce muerte neuronal iniciando a las 12 horas y estando su pico máximo a las 24 horas después de la exposición al péptido [37]. Por esta razón, se escogió este tiempo para observar los núcleos apoptóticos en neuronas estimuladas con los diversos fragmentos con y sin cobre, así como la actividad de la caspasa-3 en estas mismas condiciones.

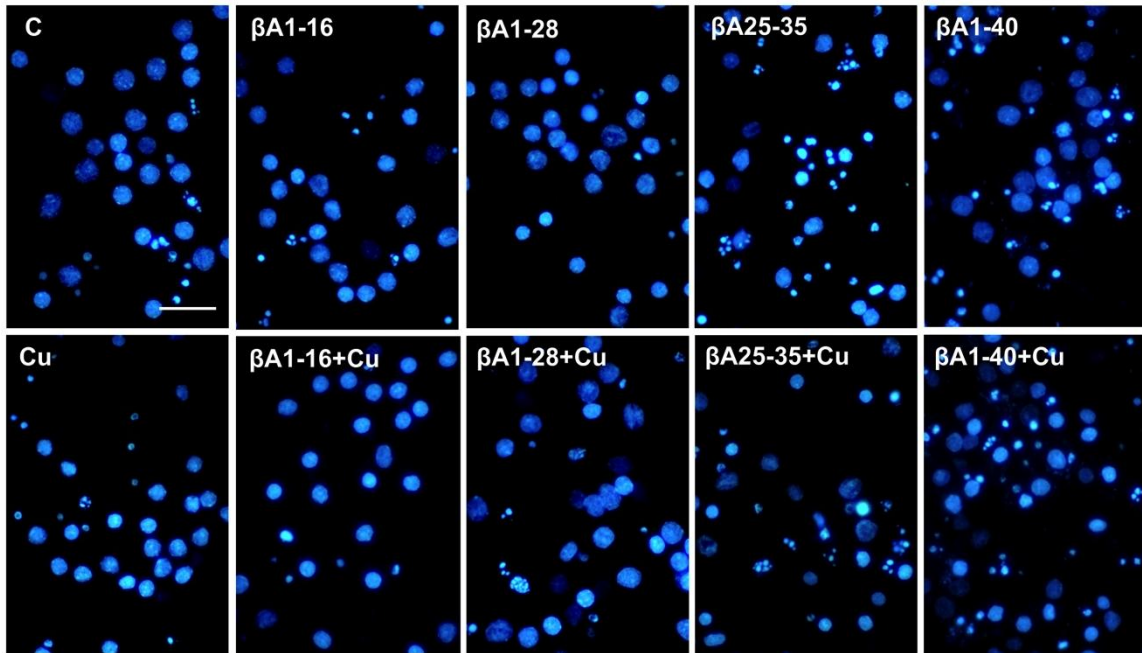
Primeramente, se realizó un conteo de núcleos condensados y fragmentados de las células estimuladas con los diferentes fragmentos. Este ensayo se llevó a cabo utilizando el fluoróforo Hoechst 33258, que al unirse al DNA, tiñe los núcleos.

En la FIGURA 12, podemos observar un aumento significativo del porcentaje de núcleos condensados en las condiciones tratadas con el fragmento 25-35 (21.5%) comparadas con su propio control, y con el fragmento 1-40 y 1-40+Cu<sup>2+</sup> en comparación con el control sin cobre (9.7% y 11.1% respectivamente). El péptido 25-35 es el único que en presencia del metal produce un aumento significativo de los núcleos apoptóticos, aproximadamente de un 12%. Sin embargo, este efecto no es mayor que el del fragmento solo, por lo que no se le puede atribuir mayor toxicidad en presencia de cobre. Como control positivo en estos ensayos se usó el compuesto estaurosporina que indujo aproximadamente un 84% de aumento en el conteo de núcleos condensados y fragmentados.

Ninguno de los fragmentos resulta ser distinto de su condición con cobre y el 1-40+Cu<sup>2+</sup> pareciera inducir mayor muerte neuronal al compararlo con el control sin cobre, pero este efecto se puede atribuir al ligero aumento que presenta el cobre por sí mismo en este proceso.



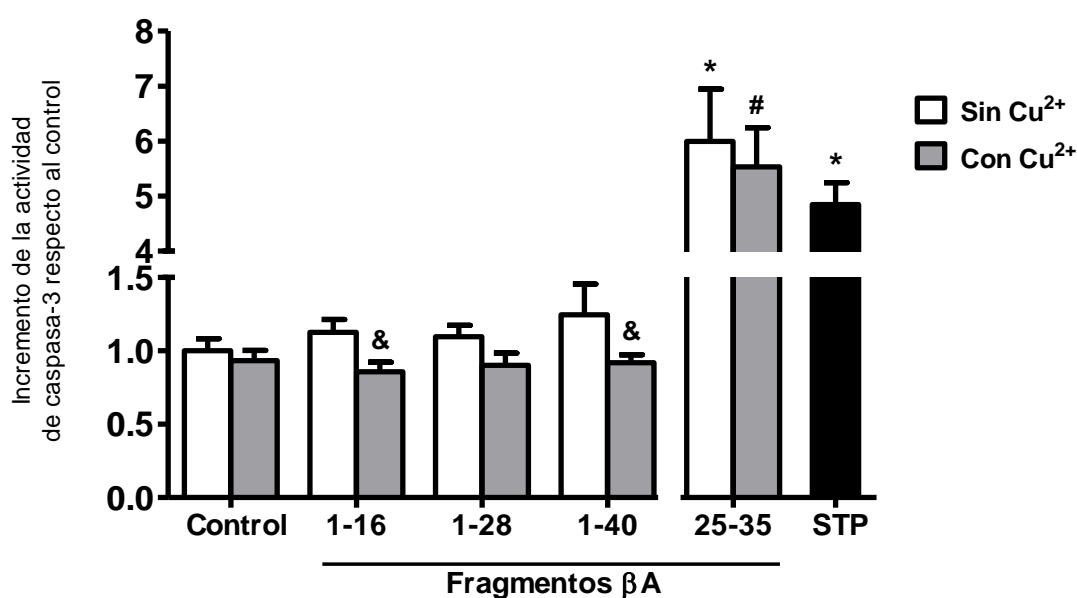
**B**



**FIGURA 12. Cuantificación de núcleos condensados (n.c.) por tinción de Hoechst.**

**A)** El histograma muestra el [conteo de n.c./total de núcleos por campo] de cada una de las condiciones estimuladas con los fragmentos por 24 h.  $n=3-5$ . \* $p<0.001$  significativo con respecto al control sin  $\text{Cu}^{2+}$ , # $p<0.02$  significativo respecto al control con  $\text{Cu}^{2+}$ , & $p<0.04$  significativo con respecto al control sin  $\text{Cu}^{2+}$ . Los valores representan la media  $\pm$  ESM. **B)** Microscopía de fluorescencia en la que se pueden observar los n.c. (apoptóticos) de cada condición. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de epifluorescencia, Nikon, magnificación 40x. Barra de escala 30  $\mu\text{m}$ .

En cuanto a la medición de la actividad de la caspasa-3, que con los fragmentos 1-16 y 25-35 fue medida a las 9, 24 y 48 horas, se observó que el pico de actividad de esta caspasa se encuentra a las 24 horas en este modelo (datos no mostrados), así mismo, con el fragmento 1-28 tanto en su condición agregada con cobre como sin cobre no se observó diferencia significativa entre las 5, 24 y 48 horas, razón por la cual se tomó el tiempo de 24 horas para la medición de la actividad de la caspasa-3.



**FIGURA 13. Actividad de caspasa-3.**

Medición de la actividad de la caspasa-3 mediante el corte del sustrato fluorescente AC-DEVD-MCA. Estimulación con los distintos fragmentos, en presencia y ausencia de cobre durante 24 horas.  $n=4-5$ . \* $p<0.0001$  significativo con respecto al control sin  $Cu^{2+}$ . # $p<0.0001$  significativo con respecto al control con  $Cu^{2+}$ . & $p<0.05$  significativo con respecto al tratamiento con el fragmento sin cobre. Los valores representan la media  $\pm$  ESM.

Podemos observar en la FIGURA 13 que al igual que el conteo de núcleos condensados, el fragmento 25-35 tanto con cobre, como sin cobre, fue el único capaz de aumentar de manera significativa (en un 500% para ambas condiciones) la actividad de



esta caspasa. Ninguno de los fragmentos con y sin cobre aumentaron esta actividad y los fragmentos 1-16+Cu<sup>2+</sup> y 1-40+Cu<sup>2+</sup> presentaron una disminución ligera pero significativa respecto al pequeño aumento que se vio en los fragmentos sin el metal. La actividad de caspasa-3 inducida por el 25-35 es atenuada completamente en presencia del inhibidor de caspasa-3 Ac-DEVD-CHO a una concentración de 40 µM (datos no mostrados).

### **Determinación de ERO en sinaptosomas**

Se ha reportado que en pacientes con EA, existe una importante disminución de las terminales sinápticas y que esta disminución es mucho mayor a la que se podría atribuir a la muerte neuronal, por lo tanto, existe la hipótesis de que un evento temprano en esta enfermedad es la pérdida selectiva de las sinapsis [62,63,65,125]. Así mismo, se ha encontrado una correlación entre el grado de degeneración cognitiva, con una disminución de la proteína presináptica vesicular sinaptofisina en la corteza frontal [158] y en el giro dentado del hipocampo [159] de pacientes con EA de inicio temprano.

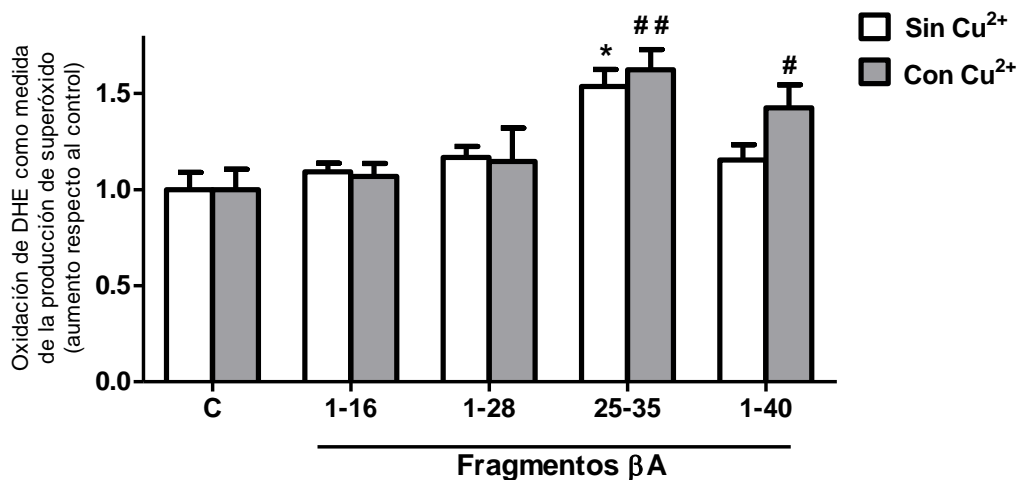
Por otra parte, las sinapsis son estructuras con una alta demanda energética, por lo que presentan una importante actividad mitocondrial lo que genera a su vez una constante producción de ERO, siendo estructuras en riesgo, ante condiciones de estrés, como ocurre con el envejecimiento y los desórdenes neurodegenerativos. La depleción energética o el aumento en el daño oxidante a distintas proteínas sinápticas puede resultar en la alteración de la homeostasis de calcio local y propiciar la degeneración sináptica [160].

Por lo mencionado anteriormente, es importante analizar en las terminales sinápticas aisladas, el daño oxidante que inducen los distintos fragmentos del  $\beta$ A, y su potenciación o abatimiento cuando se encuentran coordinados con cobre.

Para realizar los experimentos en sinaptosomas, fue necesario usar ascorbato a una concentración de 50  $\mu$ M como agente reductor, ya que el buffer de Locke, en el que se incuban las terminales, no contiene ningún agente reductor. Se sabe que cuando se encuentran agentes biológicos reductores, como el ascorbato o la dopamina, éstos aumentan considerablemente los niveles de peróxido de hidrógeno [30,37]. En presencia de estos agentes, el péptido  $\beta$ A pierde la función de reductor y se potencia la generación de ERO a largo plazo.

En estos experimentos (FIGURA 14), se puede observar que de los fragmentos sin cobre, sólo el 25-35 es capaz de inducir un aumento en un 53% del superóxido, dentro de las terminales sinápticas expuestas a un agente reductor. Sin embargo, los fragmentos 1-40+Cu<sup>2+</sup> y 25-35+Cu<sup>2+</sup> son los únicos capaces de aumentar el O<sub>2</sub><sup>·-</sup> a comparación del control con cobre en un 42 y 62% respectivamente.

El aumento de este radical en estos últimos fragmentos coordinados con cobre, resulta ser mayor al aumento que se da por los péptidos solos (25-35: 53% vs 25-35+Cu<sup>2+</sup>: 62% y 1-40: 15% vs 1-40+ Cu<sup>2+</sup>: 42%), y aunque en el caso del fragmento 25-35 no es significativo, en el 1-40 se observa una tendencia clara que no se puede atribuir al efecto del cobre por sí solo, y que podría estar relacionado con la toxicidad que ha sido reportada por los fragmentos largos del  $\beta$ A en las terminales sinápticas.



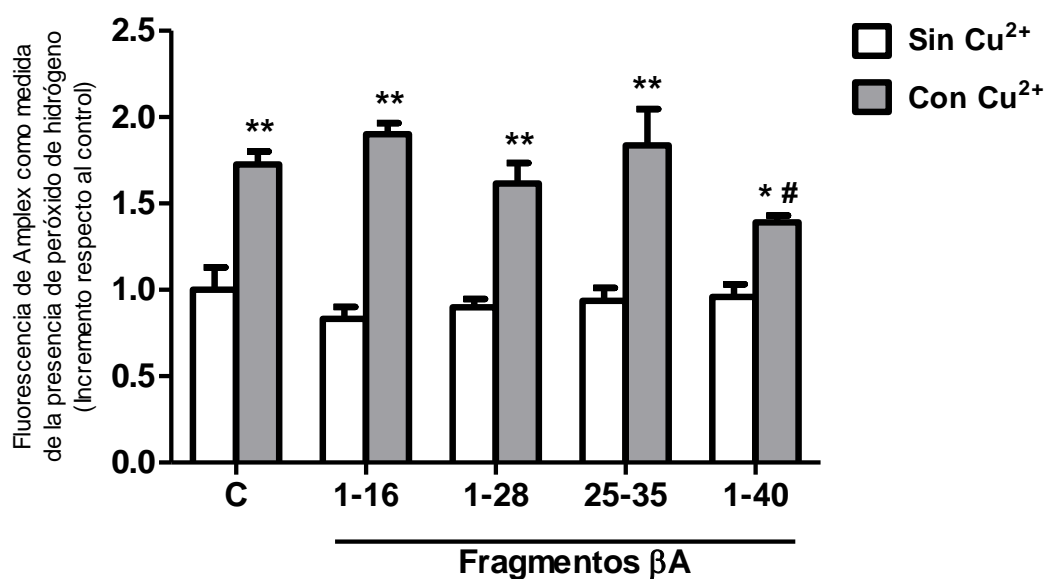
**FIGURA 14. Producción de  $O_2^{\cdot -}$  en sinaptosomas, por diferentes fragmentos  $\beta A$ .**

El histograma muestra el aumento en la producción de superóxido de cada uno de los fragmentos, después de exponer los sinaptosomas a los distintos péptidos durante 3 h en presencia de ascorbato 50  $\mu M$  como agente reductor, coordinados con o sin  $Cu^{2+}$  a concentraciones equimolares.  $n=4$ . \* $p<0.0006$  significativo con respecto al control sin  $Cu^{2+}$ . ## $p<0.005$  significativo con respecto al control con  $Cu^{2+}$ . Los valores representan la media  $\pm$  ESM. En estos datos, todas las condiciones control fueron normalizadas a 1 y los efectos de los distintos péptidos expresados con respecto al control con o sin cobre respectivamente, tomando en cuenta que no existe diferencia significativa entre éstos ( $p\leq 0.092$ ).

Por lo tanto, en el caso de los sinaptosomas, las fibras del 1-40+  $Cu^{2+}$  son capaces de aumentar de manera importante la producción de superóxido, resultando probablemente en un aumento en el daño oxidante a estas estructuras por los fragmentos largos y fibrilares asociados con cobre.

Así mismo, en los experimentos de detección de peróxido de hidrógeno, el cual fue medido tanto en el medio, como dentro de los sinaptosomas (la gráfica muestra la suma de estos dos valores), observamos que ninguno de los péptidos en ausencia de cobre induce un aumento significativo del peróxido, y todas las condiciones que tienen el metal, incluido el control, aumentan entre 50 y 100% el peróxido producido (FIGURA 15). La única condición que se observa diferente al control con cobre es el fragmento 1-40+ $Cu^{2+}$ . Este último complejo disminuye la generación de  $H_2O_2$  comparado con el control con cobre.

Esto probablemente se deba a que su longitud y la manera en que se encuentra plegado, impide la interacción del cobre con el ascorbato, disminuyendo la actividad redox del metal y previniendo en un 20% la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este resultado concuerda con el trabajo de Jiang *et al.* [90] quien demostró que la actividad catalítica de reducción de oxígeno molecular, disminuye cuando el cobre (II) se coordina con βA fibrilares. Sin embargo, también es posible que la acción antioxidante del 1-40+Cu se deba a la capacidad que tiene este complejo en forma monomérica de remover peróxido, como es reportado por Nadal *et al.* en sistemas libres de células [38]. En cuanto a los demás fragmentos, el aumento que se observa en las condiciones agregadas con cobre se puede atribuir únicamente a las reacciones redox del metal con el agente reductor y no a una acción entre los péptidos y el cobre a nivel sináptico.



**FIGURA 15. Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en sinaptosomas, por diferentes fragmentos βA.** El histograma muestra el aumento en la producción de peróxido de cada uno de los fragmentos, dentro de los sinaptosomas y en el medio, obtenidos a las 3 horas de incubación, usando ascorbato 50 μM como agente reductor, en presencia y ausencia de Cu<sup>2+</sup> a concentraciones equimolares. n=4. \*p<0.006, \*\*p<0.0001 significativo con respecto al control sin Cu<sup>2+</sup>. #p< 0.02 significativo con respecto al control con Cu<sup>2+</sup>. Los valores representan la media ± ESM.

En estas condiciones, si se compara el peróxido de hidrógeno producido dentro de las terminales sinápticas y fuera de ellas, se observa aproximadamente un 50% más de peróxido en el medio en el que fueron incubados los sinaptosomas que dentro de ellos (datos no mostrados), y en ambas partes se observa la misma tendencia que se muestra en la FIGURA 14. Esto sugiere que la generación de  $H_2O_2$  se está dando a nivel extracelular y debido a que esta especie es extremadamente permeable, es capaz de difundir al interior de las estructuras neuronales y causar daño oxidante. Esta conclusión se apoya en el hecho de que en un estudio de Huang [157], se demostró la capacidad de producción de peróxido de hidrógeno por el péptido  $\beta A1-42$  coordinado con  $Cu(II)$  y  $Fe(III)$  en un sistema libre de células.

Previamente a estos experimentos, se probaron los fragmentos en este modelo sin el uso de un agente reductor. En estas condiciones, solamente el control con cobre fue capaz de inducir un aumento significativo del peróxido en el medio y no se observó ninguna diferencia con ninguno de los fragmentos (datos no mostrados). Esto sugiere y resalta la importancia de la presencia de agentes reductores en las reacciones oxidantes que puedan dañar a las terminales sinápticas, situación que podría presentarse al existir un desbalance en el transporte de metales, como es el caso del envejecimiento.

En el presente trabajo, se usaron tres fragmentos truncados con características de coordinación con cobre y fibrilación distintas, así como el péptido  $\beta$ A1-40, con el objetivo de analizar las propiedades oxidantes de distintos complejos  $\beta$ A-Cu<sup>2+</sup> y su relación con la muerte neuronal. Se conoce que además de los fragmentos  $\beta$ A largos como el 1-40 y el 1-42 que se producen fisiológicamente, existen diversos fragmentos trancos, tanto C-terminales como N-terminales en el líquido cefalorraquídeo de pacientes que padecen EA, aunque en mucho menor cantidad que los largos. Entre ellos, para los fines de este trabajo, se ha descrito la presencia del 1-16 [107] y el 25-35 [161]. Así mismo, ha sido demostrado que los péptidos 25-35 y 1-40 son capaces de inducir la producción de especies reactivas, sin embargo los mecanismos a través de los cuales ejercen esta acción, están lejos de conocerse. Por otra parte, se conoce que el cobre aumenta la producción de ERO inducida por el 1-40.

Los resultados obtenidos en los cultivos celulares indican que la producción de superóxido, ocurre poco tiempo después de la incubación (entre los treinta y sesenta minutos) para la mayoría de los fragmentos, y cuando éstos son agregados con cobre presentan el mismo curso temporal de producción de superóxido. En contraste, el fragmento 1-28 mostró un efecto antioxidante a tiempos tempranos después de la incubación. Las propiedades antioxidantes ya han sido reportadas con anterioridad en un modelo libre de células y usando el fragmento soluble [162].

Contrario a lo que se había sugerido anteriormente, se encontró que la capacidad de inducir la producción de superóxido de los diversos fragmentos, no está en función de su capacidad de formación de fibras o de unir cobre, y más bien favorecen la hipótesis de la toxicidad de los oligómeros. Los resultados indican que los fragmentos incapaces de

fibrilar son los que aumentan significativamente la cantidad de superóxido (1-16 y 25-35) y en el caso del 25-35, la presencia de cobre no aumenta la producción de este radical, ya que este fragmento no presenta el sitio de coordinación con metales, y por tanto, la generación de superóxido por el 25-35 es independiente de la presencia del metal. Esto a su vez, sugiere que la capacidad de este fragmento para generar de manera autocatalítica especies reactivas de oxígeno reduciendo metales activos (FIGURA 1), no ocurre en las presentes condiciones experimentales. Alternativamente, este péptido podría estar favoreciendo la generación de otra especie reactiva diferente del superóxido, que no fue detectada por el dihidroetidio. De la misma manera, contrario a lo que se pensaba, el cobre unido al fragmento 1-16 disminuye en un 35% el superóxido generado por el fragmento solo. Esto sugiere que la interacción del fragmento con el metal resulta en una actividad antioxidante, que probablemente esté asociada con la posible disociación de los oligómeros  $\beta$ A1-16 en presencia del metal. Observaciones preliminares de microscopía electrónica sugieren que esto podría ocurrir (datos no mostrados). Así mismo, algunos estudios sugieren que el cobre está involucrado en la oligomerización de los  $\beta$ A, sin embargo, otros sugieren que promueve la agregación por la vía no amiloidogénica o que incluso inhibe la agregación de los  $\beta$ A (revisado en [82]). Por lo tanto, el cobre podría estar actuando como un neuroprotector, previniendo la formación de especies tóxicas de  $\beta$ A, o induciendo estructuras  $\beta$ A neurotóxicas, como es revisado en [163]. Por otra parte, existen estudios donde se demuestra que el cobre es capaz de reducir las especies oligoméricas solubles del  $\beta$ A1-42 en un modelo de *C. elegans* usando el metal a altas concentraciones [164], y en un modelo libre de células usando cobre a bajas concentraciones [165].

En cuanto a la producción de peróxido de hidrógeno, resulta claro que los fragmentos que contienen a la metionina 35 (25-35 y 1-40) son los que tienen la

capacidad de generar esta especie. Sin embargo, el 1-40 en coordinación con cobre pareciera favorecer las reacciones de reducción del metal, pudiendo ser el péptido en sí mismo un donador de electrones, en contraste con el fragmento 25-35 cuya condición con y sin cobre no es diferente. Esto confirma la importancia del ambiente de histidinas para la coordinación con cobre en las reacciones redox de los complejos  $\beta\text{A-Cu}^{2+}$ . En este caso, únicamente el péptido 1-40 contiene las 3 histidinas implicadas en la coordinación del metal y la metionina 35. Así mismo, se descarta la generación de peróxido de hidrógeno a partir de superóxido, ya que no hay una correlación clara entre la producción de éstas dos especies por los distintos péptidos.

Diversos estudios señalan que los péptidos 25-35 y 1-40 son capaces de inducir muerte apoptótica en neuronas cultivadas por un mecanismo dependiente de caspasas. En el presente estudio investigamos la potencialidad de los distintos péptidos para inducir apoptosis y su relación con la producción de especies reactivas de oxígeno. Únicamente el fragmento 25-35, tanto independiente como en presencia de cobre, fue capaz de aumentar el número de núcleos fragmentados y condensados así como la actividad de caspasa-3. Así mismo, se encontró un ligero aumento del número de núcleos apoptóticos en presencia del fragmento 1-40, que es significativo, pero no correlaciona con un aumento significativo en la actividad de caspasa-3. Esto podría deberse a que la caspasa-3 se cuantificó únicamente después de 24 h de la incubación con este péptido y no a tiempos anteriores o posteriores donde podría haberse activado. Alternativamente, la presencia de núcleos fragmentados después de incubar a las células con este fragmento podría deberse a la activación de una vía apoptótica independiente de caspasas, como lo es la iniciada por AIF. AIF es una proteína del espacio intermembranal mitocondrial, cuya translocación al núcleo media el proceso apoptótico de manera independiente de caspasas promoviendo la fragmentación y condensación de la cromatina [166]. Su presencia en el



citoplasma ha sido reportada en cultivos corticales primarios de rata expuestos a los fragmentos  $\beta$ A25-35 soluble [167] y  $\beta$ A1-42 dimérico, trimérico y en estructuras de alto peso molecular [168]. Por otra parte en células PC12 transfectadas con la APP con la mutación sueca<sup>6</sup>, se observó un aumento en los niveles de AIF en la fracción mitocondrial [169].

Resulta interesante que de acuerdo a nuestros resultados, el único fragmento capaz de aumentar las ERO y la muerte neuronal es el 25-35. La acción tóxica de este péptido se ha atribuido a diversos procesos celulares (revisados en [161]). Los resultados sugieren claramente que la toxicidad del 25-35 no está ligada a la reducción de metales de transición, confirmando lo que ha sido reportado anteriormente para este fragmento [170], ya que el péptido 25-35 no presenta el sitio de unión a metales. Sin embargo, es posible que la inducción de apoptosis por este péptido, se deba por lo menos en parte, a la inducción de estrés oxidante, ya que claramente aumentó la producción de superóxido y de peróxido, aunque no es posible descartar otros factores.

De acuerdo a nuestras observaciones sobre la producción de diferentes ERO en sinaptosomas, es posible sugerir que en este modelo, de manera similar a lo observado en el modelo celular, no parece ocurrir la formación de peróxido de hidrógeno, subsecuente a la producción de superóxido, ya que no se encontró una relación entre las dos especies en presencia de los complejos péptido-metal. Esto coincide con lo que fue demostrado con el péptido 1-42 en el estudio de Opazo *et al.* [37]. Así mismo, los resultados apuntan a que la presencia de agentes reductores, como el ascorbato, es fundamental para las reacciones de oxidación y reducción de los metales coordinados a los fragmentos  $\beta$ A. Es por esto, que podemos descartar que los péptidos que no

---

<sup>6</sup> Doble mutación de los residuos 670 y 671 (Lys-Met  $\rightarrow$  Asn-Lys) de la APP, cercanos al sitio de corte de la  $\beta$ -secretasa y que provoca un aumento en la producción de  $\beta$ A.

contienen los sitios de coordinación y reducción de metales (histidinas y metionina 35) puedan ejecutar los ciclos redox propuestos como un posible mecanismo de daño oxidante en las neuronas [157]. Esto sugiere la importancia de la pérdida de la homeostasis metálica en procesos patológicos como la enfermedad de Alzheimer.

En el caso de los fragmentos largos del  $\beta A$ , como el 1-40, resulta interesante observar una disminución significativa en los niveles de peróxido de hidrógeno producido en las terminales sinápticas en presencia de un metal y un agente reductor. Esto podría sugerir una acción quelante de cobre, por parte del péptido 1-40 atenuando la toxicidad oxidante en las terminales. En los estudios de Nadal *et al.* [38] en un sistema libre de células, se demostró que el  $\beta A_{1-40} + Cu^{2+}$  en estado fibrilar y en presencia de ascorbato genera aproximadamente la misma cantidad de peróxido que la condición de  $Cu + Ascorbato$ , sin embargo, en estado monomérico, es capaz de disminuir el peróxido de hidrógeno que se produce. Esto sugiere que en nuestra preparación podrían existir monómeros.

Por otra parte se observó la producción de superóxido por este péptido coordinado con cobre en las terminales, sugiriendo que la toxicidad de éste péptido en las terminales se debe en mayor medida a la producción de superóxido y que ésta es dependiente de la presencia de cobre. La toxicidad del 25-35 también está asociada a la producción de superóxido en las terminales, tanto en su condición coordinada con cobre como de manera individual, confirmando los resultados observados en los cultivos.

## CONCLUSIONES

---

En este estudio demostramos que los fragmentos  $\beta$ A utilizados producen ERO a tiempos cortos, entre la media hora y las tres horas, tanto en el modelo celular como en el de terminales sinápticas. Así mismo, La producción de ERO puede ocurrir tanto intracelularmente como en el medio extracelular, posiblemente por mecanismos diferentes. El péptido 25-35, en particular, aumenta las ERO en ambos compartimentos. Como era de esperarse, este fragmento fue el que indujo mayor daño a nivel sináptico y neuronal en los diversos parámetros estudiados y su toxicidad no es dependiente de la presencia de cobre.

Los fragmentos capaces de inducir la producción de superóxido en las células no necesariamente inducen la formación de esta especie en terminales. En éstas últimas, los complejos  $\beta$ A-Cu fibrilares resultan más tóxicos mientras que en las células, los agregados más tóxicos son los posibles oligómeros.

Sorprendentemente, los fragmentos con potencial de fibrilación (1-28 y 1-40) no presentan un efecto sobre la producción de especies en ausencia de cobre. El ligero aumento en la actividad apoptótica inducida por el fragmento 1-40 podría no estar relacionado con un daño oxidante inicial. Así mismo, es este fragmento el único cuya producción de  $H_2O_2$  es potenciada por la presencia de cobre tanto en el sistema celular como en las terminales sinápticas, como era de esperarse.

Este trabajo nos lleva a concluir que la presencia de agentes reductores y una alta concentración de metales de transición como el cobre en las terminales sinápticas, son factores esenciales para la producción de ERO, especialmente del peróxido de hidrógeno. Sin embargo, gracias a lo observado en sinaptosomas respecto a la producción de peróxido de hidrógeno, es posible afirmar que en estas estructuras, donde la concentración del metal es mayor ya que se libera en la transmisión sináptica, el péptido

1-40+Cu<sup>2+</sup> a pesar de inducir la presencia de esta especie reactiva, es capaz de disminuirla a comparación de la que induciría el cobre en estado libre en presencia de agentes reductores.

Aparentemente, el cobre tiene un efecto potenciador de la producción de especies, únicamente cuando el fragmento es fibrilar y contiene la metionina 35, como es el caso del 1-40, mientras que en ausencia de esta metionina, aún en estado fibrilar (como el fragmento 1-28), el cobre no ejerce un efecto; o de manera contraria, al presentar la metionina pero no la capacidad fibrilar (como en el caso del fragmento 25-35), el cobre tampoco es capaz de potenciar la toxicidad del péptido.

Finalmente, el presente estudio sugiere que la capacidad de fibrilación y la interacción con cobre, no están necesariamente relacionadas como factores independientes, con el efecto tóxico de los fragmentos  $\beta$ A, sugiriendo que la acción oxidante de los péptidos es muy compleja y posiblemente multifactorial.

## REFERENCIAS

---

1. Sandra A (1992) *Discovering the Brain*: National Academy Press.
2. Llinás R (1988) *The biology of the brain. Readings from Scientific American*. New York: W H Freeman and Company.
3. Hubbard BM, Anderson JM (1981) A quantitative study of cerebral atrophy in old age and senile dementia. *J Neurol Sci* 50: 135-145.
4. Shankar SK (2010) *Biology of aging brain*. *Indian J Pathol Microbiol* 53: 595-604.
5. Gemma C, Vila J, Bachstetter A, Bickford PC (2007) *Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention* In: DR Riddle, editor. *Brain Aging: Models, Methods and Mechanisms*. Boca Raton (FL): CRC Press.
6. de Grey AD, Ames BN, Andersen JK, Bartke A, Campisi J, et al. (2002) Time to talk SENS: critiquing the immutability of human aging. *Ann N Y Acad Sci* 959: 452-462; discussion 463-455.
7. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.
8. Quiroz-Baez R MT, Hernández-Ortega K, Ferrera P, Massieu L, Arias C (2007) Amyloid-beta protein metabolism and toxicity: Role of oxidative stress. In: Santamaría A Jn-CM, editor. *New Perspectives on Brain Cell Damage, Neurodegeneration, and Neuroprotective Strategies*. First Edition ed. Kerala, India Research Signpost.
9. Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B (1997) An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68: 2061-2069.
10. Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR (1995) Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45: 1594-1601.
11. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, et al. (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 759-767.
12. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, et al. (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2070-2075.
13. Kanta J (2011) The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 54: 97-101.
14. Butterfield DA, Lauderback CM (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 Radic Biol Med* 32: 1050-1060.
15. Gabbita SP, Lovell MA, Markesbery WR (1998) Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 71: 2034-2040.
16. Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF (1994) Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 36: 747-751.
17. Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
18. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD (2011) Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells* 32: 491-509.
19. Halliwell B (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 52: 253-265.

20. Halliwell B, Gutteridge J (1999) Free radicals in biology and medicine: Oxford Science Publications.
21. Beal MF (1998) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1366: 211-223.
22. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, et al. (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21: 3017-3023.
23. Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA (2000) Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol* 130: 184-208.
24. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77: 817-827.
25. Shen C, Chen Y, Liu H, Zhang K, Zhang T, et al. (2008) Hydrogen peroxide promotes A $\beta$  production through JNK-dependent activation of gamma-secretase. *J Biol Chem* 283: 17721-17730.
26. Benzi G, Moretti A (1995) Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* 16: 661-674.
27. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD (2010) Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem* 47: 53-67.
28. De Leo ME, Borrello S, Passantino M, Palazzotti B, Mordente A, et al. (1998) Oxidative stress and overexpression of manganese superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 250: 173-176.
29. Stone JR, Yang S (2006) Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 8: 243-270.
30. Tabner BJ, Mayes J, Allsop D (2010) Hypothesis: soluble a $\beta$  oligomers in association with redox-active metal ions are the optimal generators of reactive oxygen species in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2011: 546380.
31. Barbusiński K (2009) Fenton Reaction - Controversy Concerning the Chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering*.
32. Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
33. Perrin R, Briancón S, Jeandel C, Artur Y, Minn A, et al. (1990) Blood activity of Cu/Zn superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in Alzheimer's disease: a case-control study. *Gerontology* 36: 306-313.
34. Turnbull S, Tabner BJ, El-Agnaf OM, Twyman LJ, Allsop D (2001) New evidence that the Alzheimer beta-amyloid peptide does not spontaneously form free radicals: an ESR study using a series of spin-traps. *Free Radic Biol Med* 30: 1154-1162.
35. Hureau C, Faller P (2009) A $\beta$ -mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochimie* 91: 1212-1217.
36. Smith DG, Cappai R, Barnham KJ (2007) The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta* 1768: 1976-1990.
37. Opazo C, Huang X, Cherny RA, Moir RD, Roher AE, et al. (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.

38. Nadal RC, Rigby SE, Viles JH (2008) Amyloid beta-Cu<sup>2+</sup> complexes in both monomeric and fibrillar forms do not generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalytically but quench hydroxyl radicals. *Biochemistry* 47: 11653-11664.
39. Anders W PM (2010) World Alzheimer Report 2010. The Global Economic Impact of Dementia. <http://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport2010.pdf> Alzheimer's Disease International
40. Glenner GG, Murphy MA (1989) Amyloidosis of the nervous system. *J Neurol Sci* 94: 1-28.
41. Selkoe DJ (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6: 487-498.
42. Bird T (2010) Alzheimer Disease Overview. In: GeneReviews, Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. University of Washington, Seattle.
43. Maurer K, Volk S, Gerbaldo H (1997) Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349: 1546-1549.
44. Strassnig M, Ganguli M (2005) About a peculiar disease of the cerebral cortex: Alzheimer's original case revisited. *Psychiatry (Edgmont)* 2: 30-33.
45. Siegel G, Brady T, et al. (2006) *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects. Seventh Edition* ed: Academic Press.
46. Chen JH, Lin KP, Chen YC (2009) Risk factors for dementia. *J Formos Med Assoc* 108: 754-764.
47. Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR (2005) Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect* 113: 1250-1256.
48. Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 254: 97-99.
49. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349: 704-706.
50. Eckert A, Marques CA, Keil U, Schussel K, Muller WE (2003) Increased apoptotic cell death in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 604-609.
51. Armstrong RA, Lantos PL, Cairns NJ (2008) What determines the molecular composition of abnormal protein aggregates in neurodegenerative disease? *Neuropathology* 28: 351-365.
52. Armstrong RA (2009) The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 47: 289-299.
53. Delaère P, Duyckaerts C, He Y, Piette F, Hauw JJ (1991) Subtypes and differential laminar distributions of beta A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol* 81: 328-335.
54. Zou K, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M (2002) A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J Neurosci* 22: 4833-4841.
55. Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, Schenk DB (1993) Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 61: 1965-1968.
56. Li T, Li YM, Ahn K, Price DL, Sisodia SS, et al. (2011) Increased expression of PS1 is sufficient to elevate the level and activity of  $\gamma$ -secretase in vivo. *PLoS One* 6: e28179.
57. Duong T, Pommier EC, Scheibel AB (1989) Immunodetection of the amyloid P component in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 78: 429-437.
58. Kimura M, Arai H, Takahashi T, Iwamoto N (1994) Amyloid-P-component-like immunoreactivity in beta/A4-immunoreactive deposits in Alzheimer-type dementia brains. *J Neurol* 241: 170-174.

59. Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256: 184-185.
60. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42: 631-639.
61. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239-259.
62. Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298: 789-791.
63. Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO (1987) A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 78: 151-164.
64. Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, et al. (2000) High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20: 4050-4058.
65. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, et al. (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30: 572-580.
66. Bush AI, Tanzi RE (2008) Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. *Neurotherapeutics* 5: 421-432.
67. Hung YH, Bush AI, Cherny RA (2010) Copper in the brain and Alzheimer's disease. *J Biol Inorg Chem* 15: 61-76.
68. da Silva GF, Tay WM, Ming LJ (2005) Catechol oxidase-like oxidation chemistry of the 1-20 and 1-16 fragments of Alzheimer's disease-related beta-amyloid peptide: their structure-activity correlation and the fate of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 280: 16601-16609.
69. Bonda DJ, Lee HG, Blair JA, Zhu X, Perry G, et al. (2011) Role of metal dyshomeostasis in Alzheimer's disease. *Metallomics* 3: 267-270.
70. Gaggelli E, Kozlowski H, Valensin D, Valensin G (2006) Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem Rev* 106: 1995-2044.
71. Biron KE, Dickstein DL, Gopaul R, Jefferies WA (2011) Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease. *PLoS One* 6: e23789.
72. Ujiie M, Dickstein DL, Carlow DA, Jefferies WA (2003) Blood-brain barrier permeability precedes senile plaque formation in an Alzheimer disease model. *Microcirculation* 10: 463-470.
73. Cunnane S, Nugent S, Roy M, Courchesne-Loyer A, Croteau E, et al. (2011) Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition* 27: 3-20.
74. Kapogiannis D, Mattson MP (2011) Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 10: 187-198.
75. Zhou B, Gitschier J (1997) hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7481-7486.
76. Lee J, Prohaska JR, Dagenais SL, Glover TW, Thiele DJ (2000) Isolation of a murine copper transporter gene, tissue specific expression and functional complementation of a yeast copper transport mutant. *Gene* 254: 87-96.



77. (2001) Dietary reference intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington DC: National Academy Press.
78. Huang X, Cuajungco MP, Atwood CS, Hartshorn MA, Tyndall JD, et al. (1999) Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J Biol Chem* 274: 37111-37116.
79. Barnham KJ, McKinstry WJ, Multhaup G, Galatis D, Morton CJ, et al. (2003) Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis. *J Biol Chem* 278: 17401-17407.
80. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* 158: 47-52.
81. Garzon-Rodriguez W, Yatsimirsky AK, Glabe CG (1999) Binding of Zn(II), Cu(II), and Fe(II) ions to Alzheimer's A beta peptide studied by fluorescence. *Bioorg Med Chem Lett* 9: 2243-2248.
82. Pedersen JT, Ostergaard J, Rozlosnik N, Gammelgaard B, Heegaard NH (2011) Cu(II) mediates kinetically distinct, non-amyloidogenic aggregation of amyloid-beta peptides. *J Biol Chem* 286: 26952-26963.
83. Chen YR, Huang HB, Chyan CL, Shiao MS, Lin TH, et al. (2006) The effect of Abeta conformation on the metal affinity and aggregation mechanism studied by circular dichroism spectroscopy. *J Biochem* 139: 733-740.
84. Atwood CS, Moir RD, Huang X, Scarpa RC, Bacarra NM, et al. (1998) Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem* 273: 12817-12826.
85. Atwood CS, Scarpa RC, Huang X, Moir RD, Jones WD, et al. (2000) Characterization of copper interactions with alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta1-42. *J Neurochem* 75: 1219-1233.
86. Faller P, Hureau C (2009) Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid-beta peptide. *Dalton Trans*: 1080-1094.
87. Kessler H, Pajonk FG, Meisser P, Schneider-Axmann T, Hoffmann KH, et al. (2006) Cerebrospinal fluid diagnostic markers correlate with lower plasma copper and ceruloplasmin in patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 113: 1763-1769.
88. Pajonk FG, Kessler H, Supprian T, Hamzei P, Bach D, et al. (2005) Cognitive decline correlates with low plasma concentrations of copper in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 8: 23-27.
89. Deibel MA, Ehmann WD, Markesbery WR (1996) Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. *J Neurol Sci* 143: 137-142.
90. Jiang D, Li X, Liu L, Yagnik GB, Zhou F (2010) Reaction rates and mechanism of the ascorbic acid oxidation by molecular oxygen facilitated by Cu(II)-containing amyloid-beta complexes and aggregates. *J Phys Chem B* 114: 4896-4903.
91. Dai X, Sun Y, Gao Z, Jiang Z (2010) Copper enhances amyloid-beta peptide neurotoxicity and non beta-aggregation: a series of experiments conducted upon copper-bound and copper-free amyloid-beta peptide. *J Mol Neurosci* 41: 66-73.
92. Smith DP, Smith DG, Curtain CC, Boas JF, Pilbrow JR, et al. (2006) Copper-mediated amyloid-beta toxicity is associated with an intermolecular histidine bridge. *J Biol Chem* 281: 15145-15154.

93. Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, et al. (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155: 853-862.
94. Barnham KJ, Ciccotosto GD, Tickler AK, Ali FE, Smith DG, et al. (2003) Neurotoxic, redox-competent Alzheimer's beta-amyloid is released from lipid membrane by methionine oxidation. *J Biol Chem* 278: 42959-42965.
95. Dong J, Atwood CS, Anderson VE, Siedlak SL, Smith MA, et al. (2003) Metal binding and oxidation of amyloid-beta within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. *Biochemistry* 42: 2768-2773.
96. Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, et al. (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 30: 665-676.
97. Schäfer S, Pajonk FG, Multhaup G, Bayer TA (2007) Copper and clioquinol treatment in young APP transgenic and wild-type mice: effects on life expectancy, body weight, and metal-ion levels. *J Mol Med (Berl)* 85: 405-413.
98. Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, Macfarlane S, Mastwyk M, et al. (2003) Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol* 60: 1685-1691.
99. Lannfelt L, Blennow K, Zetterberg H, Batsman S, Ames D, et al. (2008) Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting Abeta as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 7: 779-786.
100. Faux NG, Ritchie CW, Gunn A, Rembach A, Tsatsanis A, et al. (2010) PBT2 rapidly improves cognition in Alzheimer's Disease: additional phase II analyses. *J Alzheimers Dis* 20: 509-516.
101. Kessler H, Pajonk FG, Bach D, Schneider-Axmann T, Falkai P, et al. (2008) Effect of copper intake on CSF parameters in patients with mild Alzheimer's disease: a pilot phase 2 clinical trial. *J Neural Transm* 115: 1651-1659.
102. Treiber C, Simons A, Strauss M, Hafner M, Cappai R, et al. (2004) Clioquinol mediates copper uptake and counteracts copper efflux activities of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279: 51958-51964.
103. Balbach JJ, Ishii Y, Antzutkin ON, Leapman RD, Rizzo NW, et al. (2000) Amyloid fibril formation by A beta 16-22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR. *Biochemistry* 39: 13748-13759.
104. El Khoury Y, Dorlet P, Faller P, Hellwig P (2011) New insights into the coordination of Cu(II) by the amyloid-B 16 peptide from Fourier transform IR spectroscopy and isotopic labeling. *J Phys Chem B* 115: 14812-14821.
105. Bush AI (2003) The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 26: 207-214.
106. Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, et al. (1993) beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10836-10840.
107. Portelius E, Zetterberg H, Andreasson U, Brinkmalm G, Andreasen N, et al. (2006) An Alzheimer's disease-specific beta-amyloid fragment signature in cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 409: 215-219.
108. Wilquet V, De Strooper B (2004) Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 14: 582-588.

109. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, et al. (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron* 37: 925-937.
110. Maynard CJ, Cappai R, Volitakis I, Cherny RA, White AR, et al. (2002) Overexpression of Alzheimer's disease amyloid-beta opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *J Biol Chem* 277: 44670-44676.
111. White AR, Reyes R, Mercer JF, Camakaris J, Zheng H, et al. (1999) Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice. *Brain Res* 842: 439-444.
112. Borchardt T, Camakaris J, Cappai R, Masters CL, Beyreuther K, et al. (1999) Copper inhibits beta-amyloid production and stimulates the non-amyloidogenic pathway of amyloid-precursor-protein secretion. *Biochem J* 344 Pt 2: 461-467.
113. Borchardt T, Schmidt C, Camarkis J, Cappai R, Masters CL, et al. (2000) Differential effects of zinc on amyloid precursor protein (APP) processing in copper-resistant variants of cultured Chinese hamster ovary cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46: 785-795.
114. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, et al. (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2: 864-870.
115. Small DH, McLean CA (1999) Alzheimer's disease and the amyloid beta protein: What is the role of amyloid? *J Neurochem* 73: 443-449.
116. Kumar S, Walter J (2011) Phosphorylation of amyloid beta (A $\beta$ ) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)* 3: 803-812.
117. Octave JN (1995) The amyloid peptide precursor in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Belg* 95: 197-209.
118. Yankner BA (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16: 921-932.
119. Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356.
120. Kim JR, Muresan A, Lee KY, Murphy RM (2004) Urea modulation of beta-amyloid fibril growth: experimental studies and kinetic models. *Protein Sci* 13: 2888-2898.
121. Fukumoto H, Tokuda T, Kasai T, Ishigami N, Hidaka H, et al. (2010) High-molecular-weight beta-amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *FASEB J* 24: 2716-2726.
122. Milton NG (2004) Role of hydrogen peroxide in the aetiology of Alzheimer's disease: implications for treatment. *Drugs Aging* 21: 81-100.
123. Price DL, Borchelt DR, Walker LC, Sisodia SS (1992) Toxicity of synthetic A beta peptides and modeling of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 13: 623-625.
124. Adalbert R, Nogradi A, Babetto E, Janeckova L, Walker SA, et al. (2009) Severely dystrophic axons at amyloid plaques remain continuous and connected to viable cell bodies. *Brain* 132: 402-416.
125. Small DH, Mok SS, Bornstein JC (2001) Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nat Rev Neurosci* 2: 595-598.
126. Rauk A (2008) Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? *Dalton Trans*: 1273-1282.
127. Kirschner DA, Inouye H, Duffy LK, Sinclair A, Lind M, et al. (1987) Synthetic peptide homologous to beta protein from Alzheimer disease forms amyloid-like fibrils in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6953-6957.

128. Dorlet P, Gambarelli S, Faller P, Hureau C (2009) Pulse EPR spectroscopy reveals the coordination sphere of copper(II) ions in the 1-16 amyloid-beta peptide: a key role of the first two N-terminus residues. *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 9273-9276.
129. Su JH, Anderson AJ, Cummings BJ, Cotman CW (1994) Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5: 2529-2533.
130. LaFerla FM, Tinkle BT, Bieberich CJ, Haudenschield CC, Jay G (1995) The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet* 9: 21-30.
131. Johnson KA, Fox NC, Sperling RA, Klunk WE (2012) Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006213.
132. Chan D, Fox NC, Scahill RI, Crum WR, Whitwell JL, et al. (2001) Patterns of temporal lobe atrophy in semantic dementia and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 49: 433-442.
133. Pantel J, Schönknecht P, Essig M, Schröder J (2004) Distribution of cerebral atrophy assessed by magnetic resonance imaging reflects patterns of neuropsychological deficits in Alzheimer's dementia. *Neurosci Lett* 361: 17-20.
134. Poulin P, Zakzanis KK (2002) In vivo neuroanatomy of Alzheimer's disease: evidence from structural and functional brain imaging. *Brain Cogn* 49: 220-225.
135. Prestia A, Boccardi M, Galluzzi S, Cavedo E, Adorni A, et al. (2011) Hippocampal and amygdalar volume changes in elderly patients with Alzheimer's disease and schizophrenia. *Psychiatry Res* 192: 77-83.
136. Dickerson BC, Bakkour A, Salat DH, Feczko E, Pacheco J, et al. (2009) The cortical signature of Alzheimer's disease: regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals. *Cereb Cortex* 19: 497-510.
137. Chételat G, Villemagne VL, Villain N, Jones G, Ellis KA, et al. (2012) Accelerated cortical atrophy in cognitively normal elderly with high  $\beta$ -amyloid deposition. *Neurology* 78: 477-484.
138. Estus S, Tucker HM, van Rooyen C, Wright S, Brigham EF, et al. (1997) Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J Neurosci* 17: 7736-7745.
139. Barinaga M (1998) Is apoptosis key in Alzheimer's disease? *Science* 281: 1303-1304.
140. Iversen LL, Mortishire-Smith RJ, Pollack SJ, Shearman MS (1995) The toxicity in vitro of beta-amyloid protein. *Biochem J* 311 ( Pt 1): 1-16.
141. Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
142. Franklin JL (2011) Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 14: 1437-1448.
143. Circu ML, Aw TY (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48: 749-762.
144. Harada J, Sugimoto M (1999) Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. *Brain Res* 842: 311-323.
145. Shimohama S, Tanino H, Fujimoto S (1999) Changes in caspase expression in Alzheimer's disease: comparison with development and aging. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 381-384.
146. Ayala-Grosso C, Ng G, Roy S, Robertson GS (2002) Caspase-cleaved amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 12: 430-441.

147. Jordán J, Galindo MF, Miller RJ (1997) Role of calpain- and interleukin-1 beta converting enzyme-like proteases in the beta-amyloid-induced death of rat hippocampal neurons in culture. *J Neurochem* 68: 1612-1621.
148. Kitamura Y, Shimohama S, Kamoshima W, Ota T, Matsuoka Y, et al. (1998) Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease. *Brain Res* 780: 260-269.
149. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251.
150. Liu X, Xu K, Yan M, Wang Y, Zheng X (2010) Protective effects of galantamine against Abeta-induced PC12 cell apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Neurochem Int* 57: 588-599.
151. Butterfield DA (2002) Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res* 36: 1307-1313.
152. Löscher W, Vetter M (1985) In vivo effects of aminooxyacetic acid and valproic acid on nerve terminal (synaptosomal) GABA levels in discrete brain areas of the rat. Correlation to pharmacological activities. *Biochem Pharmacol* 34: 1747-1756.
153. Lowry OH, Rosenbrough, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
154. Schöneich C (2002) Redox processes of methionine relevant to beta-amyloid oxidation and Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 397: 370-376.
155. Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Bastianetto S, Theroux L, et al. (1999) Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Radic Biol Med* 27: 544-553.
156. Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, et al. (2009) Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 14670-14675.
157. Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, et al. (1999) The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 38: 7609-7616.
158. Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, et al. (2001) Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56: 127-129.
159. Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R, Alford M, et al. (1994) Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 174: 67-72.
160. Mattson MP, Liu D (2002) Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 2: 215-231.
161. Millucci L, Ghezzi L, Bernardini G, Santucci A (2010) Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35. *Curr Protein Pept Sci* 11: 54-67.
162. Baruch-Suchodolsky R, Fischer B (2008) Soluble amyloid beta<sub>1-28</sub>-copper(I)/copper(II)/Iron(II) complexes are potent antioxidants in cell-free systems. *Biochemistry* 47: 7796-7806.
163. Karr JW, Szalai VA (2008) Cu(II) binding to monomeric, oligomeric, and fibrillar forms of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide. *Biochemistry* 47: 5006-5016.
164. Rebolledo DL, Aldunate R, Kohn R, Neira I, Minniti AN, et al. (2011) Copper reduces A $\beta$  oligomeric species and ameliorates neuromuscular synaptic defects in a *C. elegans* model of inclusion body myositis. *J Neurosci* 31: 10149-10158.

165. Garai K, Sengupta P, Sahoo B, Maiti S (2006) Selective destabilization of soluble amyloid beta oligomers by divalent metal ions. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 210-215.
166. Candé C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 115: 4727-4734.
167. Movsesyan VA, Stoica BA, Faden AI (2004) MGLuR5 activation reduces beta-amyloid-induced cell death in primary neuronal cultures and attenuates translocation of cytochrome c and apoptosis-inducing factor. *J Neurochem* 89: 1528-1536.
168. Yu W, Mechawar N, Krantic S, Quirion R (2011)  $\alpha 7$  Nicotinic receptor activation reduces  $\beta$ -amyloid-induced apoptosis by inhibiting caspase-independent death through phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Neurochem* 119: 848-858.
169. Strosznajder JB, Cieslik M, Cakala M, Jesko H, Eckert A, et al. (2011) Lipoxygenases and poly(ADP-ribose) polymerase in amyloid beta cytotoxicity. *Neurochem Res* 36: 839-848.
170. Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA (2001) Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1--42) and A beta(25--35). *J Am Chem Soc* 123: 5625-5631.
171. Rozga M, Bal W (2010) The Cu(II)/A $\beta$ /human serum albumin model of control mechanism for copper-related amyloid neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 23: 298-308.

## AGRADECIMIENTOS

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** por ser mi segundo hogar y brindarme todas las posibilidades para una excelente formación como una orgullosa estudiante de esta magnífica entidad.

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS Y FACULTAD DE MEDICINA** por permitirme acceder a diversos grupos de investigación de excelente calidad, así como tener un lugar en el Consejo Técnico de la Facultad.

**DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO** por la oportunidad de ser parte de su cálido equipo de trabajo y ser un gran ejemplo a seguir, no sólo en el aspecto académico sino también en el trato personal y por entender y apoyar siempre mis objetivos. Gracias también por la precisa dirección y corrección de este proyecto y la confianza brindada a lo largo de estos años de trabajo.

**BIÓL. TERESA MONTIEL MONTES** por todo el apoyo técnico y los consejos, incluso en días festivos o en horarios extremos, que aportaron mucho a este trabajo. También por las comilonas de cochinita deliciosa.

**DRA. LILIANA QUINTANAR VERA** por su estrecha colaboración en este proyecto, empezando por proporcionarnos los fragmentos  $\beta A$  usados en el trabajo. Por todo el apoyo brindado a la discusión y corrección del mismo y por la gran accesibilidad que hubo siempre en el trato personal.

**DR. LUIS BLANCAS MEJÍA Y LIC. GUADALUPE TRUJANO ORTIZ** por la síntesis de los fragmentos  $\beta A$  que nos fueron proporcionados para la realización de este proyecto y la facilitación de algunos protocolos.

**M EN C. MARIPAZ MÁRQUEZ QUIROZ** por las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de algunos de los fragmentos usados que ayudaron a la discusión de los resultados.

**DRA. CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ** por amablemente facilitarme un espacio en su laboratorio para el aprendizaje de la obtención de sinaptosomas y por las correcciones y sugerencias hechas al proyecto.

**DR. HORACIO DAVID HERAS SANDOVAL** por su apoyo en la enseñanza del método de obtención y manejo de sinaptosomas.

**DR. IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ Y DR. WILHELM HANSBERG TORRES** por las sugerencias y correcciones hechas a este trabajo a pesar de la premura con la que se tuvieron que hacer.

**MIS PADRES** por todo su amor, dedicación y esmero en mi correcta educación y su inigualable apoyo en cada paso que he dado. También por ayudarme a crecer y superarme siempre y por brindarme todo lo necesario para ello.

**MAMI** por siempre estar pendiente de mi trabajo, mi alimentación, mi abrigo, por siempre cuidarme y mandarme ayuda celestial.

**AQUILES** por ser el mejor compañero y complemento en mi vida, por todo su amor, paciencia y apoyo absoluto en mis metas y por consentirme y ayudarme en los momentos difíciles. También por todas las aventuras que hemos vivido y las que nos esperan juntos.

**MAFER, MARIANO, ERICK, DIEGO C., IAN, COCHITA Y DIEGO O.** porque a pesar de ser todos tan distintos, hemos alcanzado más de 10 años de amistad, momentos inolvidables y a hacer una increíble hermandad que ha superado tiempo y distancia. Por siempre estar al pendiente de los demás y apoyarnos en todos nuestros logros.

**MON, DIEGO, ITZ, FERS, JAVIER, LUISPA, ENRIQUE, RODRIGO, MARIANA, MIGUEL Y DONOVAN** por ser amigos y compañeros de generación increíbles, por su excelente sentido del humor que propició una muy bonita convivencia y momentos inolvidables y por su extrema ñoñez.

**CYNTHIA** por ser una amiga inesperada y un apoyo incondicional.

**LAURITA** por ser una gran amiga y una madre académica excepcional.

**ESTELA** por las extraordinarias pláticas sobre la vida y por siempre estar ahí cuando más lo necesitaba.

**HUGO Y AMR** porque nuestra gran amistad inició al mismo tiempo que la escritura de esta tesis, por todo su apoyo en el proceso, pero más por los momentos que nos esperan.

**PALOMA, BLANCA, CRISTIAN, JULIO, SELENE, LETY, MARLEN, GABY Y CECI** por el excelente ambiente de laboratorio y por enseñarme tantas cosas.

**DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA, DR. ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO Y DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA** porque su entusiasmo y motivación por mejorar las cosas se contagia y por las excelentes clases que nos dieron.

**DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ Y DRA. CLARA ESPITIA PINZÓN** por haberme permitido formar parte de sus grupos de trabajo y por todo lo que me enseñaron.

Así mismo, agradezco los apoyos que me fueron brindados a lo largo de la licenciatura por diferentes instituciones:

- **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.** SNI Apoyo a Estudiantes de Licenciatura No. 102775.
- **Universidad Nacional Autónoma de México.** Beca PAPIIT IN211710.
- **Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal.** Beca PIFUTP08-161.
- **SEP.** Sistema Integral de Becas para la Educación Superior. Beca de Servicio Social.
- **SEP.** Sistema Integral de Becas para la Educación Superior. Beca de Titulación.