



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL NEURONAL Y SUS
IMPLICACIONES EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Aydé Mendoza Oliva

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Facultad de Química

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. noviembre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL NEURONAL Y SUS
IMPLICACIONES EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

M. en C. Aydée Mendoza Oliva

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres, Marino Mendoza López y Lili Oliva Serrano por ser mi motivo, inspiración y apoyo. Especialmente a ti papá, porque me enseñaste a ser valiente, luchar y a superar adversidades. Gracias por ese amor inmenso que sin duda sigue siendo correspondido.

A mis hermanos, por ser mi orgullo y bendición.

A la Dra. Clorinda Arias, por su dedicación y persistencia, estoy en deuda.

A mis familiares, amigos y a todos aquellos que han estado cerca de mi compartiendo grandes momentos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Clorinda Arias Álvarez en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y recibió fondos de CONACYT 166482 y PAPITT IN204212, UNAM.

Agradezco al comité tutor y a los sinodales sus comentarios y sugerencias en la revisión de esta tesis, a la Q.F.B. Patricia Ferrera Boza su asesoría y ayuda técnica en el laboratorio, al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para asistir a congresos y a CONACYT por la beca otorgada durante mi formación doctoral.

Formato: dg_1
VoBo Tutor,
Revisión de tesis de doctorado

29/08/2016

Subcomité Académico

Yo Dr.(a): **Ana Brigida Clorinda Arias Álvarez**

Tutor (asesor de tesis) del estudiante: **Aydé Mendoza Oliva**

Manifiesto haber leído, revisado y corregido el manuscrito de tesis que lleva como título:

Estudio del metabolismo del colesterol neuronal y sus implicaciones en la enfermedad de Alzheimer

Por lo que autorizo a que sea entregado para su revisión a los sinodales que el Subcomité Académico asigne para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas por la Universidad Nacional Autónoma de México.

Atentamente



Dra. Ana Brigida Clorinda Arias Álvarez

Tutor

PMDCB/1409/2016

Mendoza Oliva Aydé
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 12 de septiembre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Estudio del metabolismo del colesterol neuronal y sus implicaciones en la enfermedad de Alzheimer**", dirigida por el/la Dr(a) **Arias Álvarez Ana Brígida Clorinda**

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Vaca Domínguez Luis Alfonso
VOCAL	Pedraza Chaverri José
VOCAL	Tovar Palacio Armando Roberto
VOCAL	Gevorkian Markosian Gohar
SECRETARIO	Tovar y Romo Luis Bernardo

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de septiembre de 2016
COORDINADOR



Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA

contacto:mdcbq@posgrado.unam.mx tel. 56237006

PMDCB/1410/2016

SINODALES DESIGNADOS
Presente

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 12 de septiembre del presente año, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS** del/la estudiante **Mendoza Oliva Aydé**, con la tesis "**Estudio del metabolismo del colesterol neuronal y sus implicaciones en la enfermedad de Alzheimer**", dirigida por el/la Dr(a) **Arias Álvarez Ana Brígida Clorinda**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

		Acepto	
PRESIDENTE	Vaca Domínguez Luis Alfonso	<input checked="" type="checkbox"/> No	<u>23/9/16</u> fecha <u>Luis Vaca</u> firma
VOCAL	Pedraza Chaverri José	<input checked="" type="checkbox"/> No	<u>23/9/16</u> fecha <u>Pedraza</u> firma
VOCAL	Tovar Palacio Armando Roberto	<input checked="" type="checkbox"/> No	<u>27/9/16</u> fecha <u>Armando</u> firma
VOCAL	Gevorkian Markosian Gohar	<input checked="" type="checkbox"/> No	<u>23/9/16</u> fecha <u>Gohar</u> firma
SECRETARIO	Tovar y Romo Luis Bernardo	<input checked="" type="checkbox"/> No	<u>23/9/16</u> fecha <u>Luis</u> firma

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de septiembre de 2016
COORDINADOR


Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA

contacto:mdcbq@posgrado.unam.mx tel. 56237006

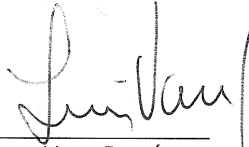
13 / 10 / 16
dd-mm-aaaa

C.P. Agustín Mercado
Director de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar
UNAM
Presente

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado "Estudio del metabolismo del colesterol neuronal y sus implicaciones para la Enfermedad de Alzheimer", que para obtener el grado de Doctor presenta la alumna Aydé Mendoza Oliva con número de cuenta 404034207 inscrita en el **Doctorado en Ciencias Bioquímicas**, considero que la tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez

v3 / 10 / 2016

dd-mm-aaaa

C.P. Agustín Mercado
Director de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar
UNAM
P r e s e n t e

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado "Estudio del metabolismo del colesterol neuronal y sus implicaciones para la Enfermedad de Alzheimer", que para obtener el grado de Doctor presenta la alumna Aydé Mendoza Oliva con número de cuenta 404034207 inscrita en el **Doctorado en Ciencias Bioquímicas**, considero que la tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dr. José Pedraza Chaverri

19/10/16

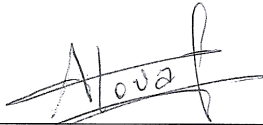
dd-mm-aaaa

C.P. Agustín Mercado
Director de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar
UNAM
Presente

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado "Estudio del metabolismo del colesterol neuronal y sus implicaciones para la Enfermedad de Alzheimer", que para obtener el grado de Doctor presenta la alumna Aydé Mendoza Oliva con número de cuenta 404034207 inscrita en el **Doctorado en Ciencias Bioquímicas**, considero que la tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dr. Armando Roberto Tovar Palacio

19 / 10 / 16

dd-mm-aaaa

C.P. Agustín Mercado
Director de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar
UNAM
Presente

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado "Estudio del metabolismo del colesterol neuronal y sus implicaciones para la Enfermedad de Alzheimer", que para obtener el grado de Doctor presenta la alumna Aydé Mendoza Oliva con número de cuenta 404034207 inscrita en el **Doctorado en Ciencias Bioquímicas**, considero que la tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dra. Gohar Gevorkjian Markosian

18, 11, 2016

dd-mm-aaaa

C.P. Agustín Mercado
Director de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar
UNAM
Presente

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado "Estudio del metabolismo del colesterol neuronal y sus implicaciones para la Enfermedad de Alzheimer", que para obtener el grado de Doctor presenta la alumna Aydé Mendoza Oliva con número de cuenta 404034207 inscrita en el **Doctorado en Ciencias Bioquímicas**, considero que la tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	8
ÍNDICE DE FIGURAS	16
ABREVIATURAS	18
ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	21
ABSTRACT	22
RESUMEN	24
INTRODUCCIÓN	26
El colesterol y su relevancia clínica	27
Funciones del colesterol	28
Obtención, transporte y eliminación de colesterol	28
Biosíntesis del colesterol y su inhibición por estatinas.....	31
Regulación de la síntesis de colesterol	32
Metabolismo del colesterol cerebral	35
La enfermedad de Alzheimer	37
Producción del péptido A β	40
Desregulación de colesterol en la enfermedad de Alzheimer	42
PARTE I	45
EFFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA EN EL METABOLISMO DEL COLESTEROL NEURONAL	45
La homocisteína y su relación con la enfermedad de Alzheimer	45
Relación entre la homocisteína y el metabolismo de colesterol	48
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	50
OBJETIVO GENERAL	50
OBJETIVOS PARTICULARES	50
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	51
Cultivo de neuroblastoma humano.....	51
Evaluación de la viabilidad celular.....	52
Cuantificación de colesterol	53
Captura de BODIPY-FL-LDL.....	54
Electroforesis.....	55
Western blot	55
Inmunofluorescencia	56

qRT-PCR.....	56
Cuantificación de A β por ELISA	57
RESULTADOS PARTE I	58
Estrategia para dilucidar el mecanismo de aumento de colesterol por Hcy	58
Efecto de la Hcy sobre la viabilidad neuronal	58
Efecto de la Hcy sobre los niveles de colesterol en SMS-MSN	60
Efecto de la Hcy en el contenido de la HMG-CoA reductasa	61
Cuantificación de colesterol del medio.....	63
Efecto de la Hcy en la captura de BODIPY-FL LDL.....	63
Efecto de la Hcy en producción A β	64
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIONES	70
PARTE II	71
PAPEL DEL COLESTEROL EN EL METABOLISMO DE A β Y EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA DE SÍNTESIS DE COLESTEROL POR LOVASTATINA EN SNC.....	71
OBJETIVO	74
OBJETIVOS PARTICULARES	74
METODOLOGÍA	75
Tratamiento de las neuronas con Lov y colesterol.....	75
Captura de BODIPY-FL-LDL.....	75
Modelo <i>in vivo</i> de administración sistémica de Lov y colesterol	75
Cuantificación de A β por ELISA en cerebro de rata	76
Análisis estadístico	77
RESULTADOS PARTE II	78
Efecto de la Lov sobre los niveles de colesterol y la sobrevivencia neuronal.....	78
La Lov induce sobrerregulación de la HMG-CoA reductasa en SMS-MSN.....	80
La administración sistémica de Lov no reduce los niveles de colesterol en el cerebro	82
La administración sistémica de Lov aumenta los niveles de HMG-CoA reductasa y SREBP-2 en el cerebro de rata	83
Efectos diferenciales de la dieta HFD y Lov sobre los niveles de APP y la producción de A β	85
DISCUSIÓN	87

CONCLUSIONES	91
CONCLUSIONES FINALES	92
REFERENCIAS	95
ANEXO	114
Artículo 1: Lovastatin Differentially Affects Neuronal Cholesterol and Amyloid- β Production <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	114
Artículo 2: The complex actions of statins in brain and their relevance for Alzheimer's disease treatment: an analytical review.....	125
Artículo 3: Interplay between cholesterol and homocysteine in the exacerbation of amyloid-beta toxicity in human neuroblastoma cells.....	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1 Estructura química de la molécula de colesterol.....	27
Fig 2 Composición y clasificación de las lipoproteínas	29
Fig 3 Circuito del colesterol endógeno y exógeno	30
Fig 4 La biosíntesis de colesterol y su inhibición por estatinas.....	32
Fig 5 Regulación de la biosíntesis de colesterol.....	34
Fig 6 Atrofia cerebral en la EA	38
Fig 7 Características histopatológicas de la EA.....	38
Fig 8 Procesamiento de APP y producción de A β	42
Fig 9 El colesterol en el cerebro y su participación en la sobreproducción de A β ..	44
Fig 10 Metabolismo de la Hcy.....	46
Fig 11 Mecanismos de muerte neuronal por Hcy.....	47
Fig 12 Cambios en el contenido de colesterol por Hcy en las células de neuroblastoma humano	49
Fig 13 Células de neuroblastoma humano SMS-MSN	52
Fig 14 Efecto del colesterol y Hcy sobre la actividad reductora de la mitocondria en células SMS-MSN cultivadas sin suero.....	59
Fig 15 Efecto del colesterol y Hcy en la viabilidad/citotoxicidad	59
Fig 16 Determinación de la acumulación de colesterol en SMS-MSN incubadas en medio sin suero	60
Fig 17 Análisis por Western blot de HMG-CoA reductasa en células SMS-MSN mantenidas en medio sin suero.....	62
Fig 18 Determinación de colesterol total y libre en medio de cultivo con 10 % de suero.....	63

Fig 19 Efecto de la Hcy en la Incorporación de BODIPY-FL-LDL en las células SMS-MSN	64
Fig 20 Determinación de A β del medio de cultivo 10 % suero	65
Fig 21 Análisis por Western blot de la expresión de APP y BACE-1 en lisados completos de células SMS-MSN mantenidas en medio con 10 % de suero.....	66
Fig 22 Efecto de la Lov sobre los niveles de colesterol y viabilidad neuronal	79
Fig 23 La Lov induce sobrerregulación de la HMG-CoA reductasa y activación de SREBP-2 en SMS-MSN	81
Fig 24 Determinación de la concentración de colesterol en hígado y cerebro de rata.....	83
Fig 25 Niveles de HMG-CoA reductasa y SREBP-2 en hígado y cerebro de rata.....	84
Fig 26 Efectos diferenciales de la Lov sobre los niveles de APP y A β <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	86
Fig 27 Participación de la Hcy y Lov en el metabolismo de colesterol neuronal.....	94

ABREVIATURAS

24-OHC	24-hidroxicolesterol
27-OHC	27-hidroxicolesterol
ABCA1	Transportador de membrana dependiente de ATP subfamilia A1
ABCA7	Transportador de membrana dependiente de ATP subfamilia A7
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ADI	Federación Internacional de Asociaciones de Alzheimer
Ado	Adenosina
AMPK	Cinasa activada por monofostato de adenina
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora del β -amiloide
ATP	Adenosín trifosfato
A β	β -amiloide
BACE-1	Enzima-1 de corte de APP en el sitio β
BHE	Barrera hematoencefálica
BODIPY	Boron-dipirrometano
BODIPY- FL-LDL	LDL marcadas con BODIPY
CBS	Cistationina β sintasa
cDNA	DNA codificante
CLU	Clusterina
CYP46	Colesterol 24S-hidroxilasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA	Enfermedad de Alzheimer
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ERAD	Vía de degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ES	Error estándar
EthD-1	Homodímero de etidio
FPP	Farnesil pirofosfato
GGPP	Geranil-geranil pirofostato
GSH	Glutación
Hcy	Homocisteína

HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HFD	Dieta alta en grasa
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HPR	Peroxidasa de horseradish
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
INSIG-1	Proteína del gen-1 inducido por insulina
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
Lov	Lovastatina
M-MLV RT	Enzima reverso-transcriptasa del virus de la leucemia murina Moloney
mRNA	RNA mensajero
MS	Metionina sintasa
SMS-MSN	Neuroblastoma humano
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2-5-bromuro de difenil-tetrazolio
M β CD	Metil- β -ciclodextrina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NMDA	N-metil-D-aspartato
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa cuantitativa
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico
S1P	Proteasa de sitio-1
S2P	Proteasa de sitio-2
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SCAP	Proteína que activa la escisión de SREBP
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
SREBP-2	Proteína- 2 de unión al elemento regulador de esteroides
SREBPs	Proteínas de unión al elemento regulador de esteroides

SSD

Dominio de detección de esteroles

VLDL

Lipoproteínas de muy baja densidad

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

El siguiente trabajo de tesis de doctorado se dividió en dos partes para cubrir el objetivo global que fue analizar cambios en el metabolismo del colesterol cerebral y su relación con la aparición de marcadores de la enfermedad de Alzheimer.

En la primera parte se estudió bajo qué condiciones patológicas se podría incrementar el contenido de colesterol cerebral. Esta primera parte se titula:

“Efecto de la homocisteína en el metabolismo del colesterol neuronal”

En la segunda parte se analizó el papel de la ingesta de dietas altas en colesterol y el efecto de la lovastatina, un fármaco que se usa para disminuir la síntesis de colesterol sistémico, en el contenido de colesterol cerebral y en la producción de la proteína β -amiloide. Esta segunda parte se titula:

“Papel del colesterol en el metabolismo de la proteína β -amiloide y efecto de la inhibición de la vía de síntesis de colesterol por lovastatina en el sistema nervioso central”.

Al final de cada sección se presenta una discusión global abarcando hallazgos de ambos estudios.

ABSTRACT

Current research indicates that alterations in the regulation of cholesterol increase susceptibility to neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD). In this thesis, we have used different models for studying various aspects of neuronal cholesterol metabolism and its possible implications for this disease. We analyzed the role of the cholesterol as a risk factor for AD and statins as neuroprotective agents.

In the first part of this work, we analyzed a metabolic condition related to the increase of neuronal cholesterol content. In this sense, the increase of homocysteine (Hcy) is a metabolic risk factor associated with high-cholesterol, atherosclerosis and vascular thrombosis. However, it was unknown the effect of Hcy in the levels of cholesterol in neurons and its potential as a neurotoxin able to increase the toxicity of the amyloid- β (A β) protein.

In this analysis, using a neuronal cell line, we assessed the effect of elevated Hcy levels on the metabolism of neuronal cholesterol. The results of these experiments indicate that Hcy may contribute to the pathogenesis through the increase of the concentration of cholesterol in neurons by a mechanism involving the accumulation and/or capture of cholesterol, thus creating a cellular environment of increased vulnerability.

On the other hand, using *in vivo* and *in vitro* models, we also evaluated the effect of the lovastatin (Lov) on cholesterol levels, as well as the impact of the inhibition of cholesterol synthesis in the metabolism of amyloid- β precursor protein (APP), whose amyloidogenic processing takes place in the brain of patients with AD.

We found that relevant doses of Lov affect differentially the expression and the production of A β and APP *in vivo* and *in vitro*. We also showed that several effects of HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA) reductase inhibition by Lov have negative implications on neuronal survival *in vitro*. These effects are independent of a Lov-induced reduction in cholesterol. *In vivo*, Lov does not decrease cholesterol content, but acts through the mevalonate pathway as indicated the increase in the mature form of the sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP-2) and overexpression of HMG-CoA reductase observed.

These findings may help to elucidate the complex mechanisms that influence the origin and development of AD. With regard to the prevention and treatment with statins, we do not find solid evidence to support its use in this disease. Further research is needed to clarify their beneficial and/or toxic effects on the brain.

RESUMEN

Investigaciones actuales indican que alteraciones en la regulación del colesterol aumentan la susceptibilidad a padecer trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (EA). En el presente trabajo hemos utilizado diferentes modelos para estudiar dos aspectos relacionados con la homeostasis de colesterol y sus posibles implicaciones para esta enfermedad. Analizamos el papel del colesterol y homocisteína (Hcy) como factores de riesgo para la EA y el de las estatinas como posibles agentes neuroprotectores.

La regulación del metabolismo de colesterol cerebral es poco conocida. En la primera parte de esta tesis analizamos una condición metabólica relacionada al aumento en el contenido de colesterol neuronal. En este sentido, el incremento de Hcy es un factor de riesgo asociado con hipercolesterolemia, aterosclerosis y trombosis vascular. Sin embargo, no se conocía el efecto de la Hcy en los niveles de colesterol neuronal ni su papel potencial como neurotoxina capaz de incrementar la toxicidad del péptido β -amiloide ($A\beta$). En este estudio se realizó un análisis *in vitro* de dicha condición asociada con la patología de Alzheimer en una línea neuronal con el fin de evaluar su efecto en el metabolismo del colesterol. Los resultados de estos experimentos indican que la Hcy puede contribuir a la etiopatogenia a través del aumento en la concentración de colesterol neuronal por un mecanismo que involucra la acumulación y/o captura de colesterol, creando así un ambiente celular de mayor vulnerabilidad.

En la segunda parte de la tesis, evaluamos el efecto de la lovastatina (Lov) en modelos *in vivo* e *in vitro* sobre los niveles de colesterol, así como la repercusión de la inhibición de la vía de síntesis de colesterol en el metabolismo de la proteína precursora del β -amiloide (APP), cuyo procesamiento amiloidogénico ocurre en el cerebro de pacientes con EA. Encontramos que dosis relevantes de Lov afectan diferencialmente la expresión de APP y la producción del $A\beta$ *in vivo* e *in vitro*. Demostramos que el efecto de la inhibición de la HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA) reductasa por Lov tiene implicaciones negativas sobre la supervivencia neuronal *in vitro*. Esto es independiente de la disminución de colesterol inducida por Lov. *In vivo*, la Lov no disminuye el contenido de colesterol, pero sí actúa a través de la vía del mevalonato como se indica por el aumento

de la forma madura de la proteína-2 de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-2) y la sobreexpresión de HMG-CoA reductasa observada.

Los resultados de esta tesis ayudarán a dilucidar los mecanismos complejos que influyen en la causa y desarrollo de la EA. En cuanto a la prevención y tratamiento con estatinas, no encontramos evidencia sólida para apoyar su uso en la EA. Se requiere más investigación para aclarar sus efectos benéficos y/o tóxicos en el cerebro.

INTRODUCCIÓN

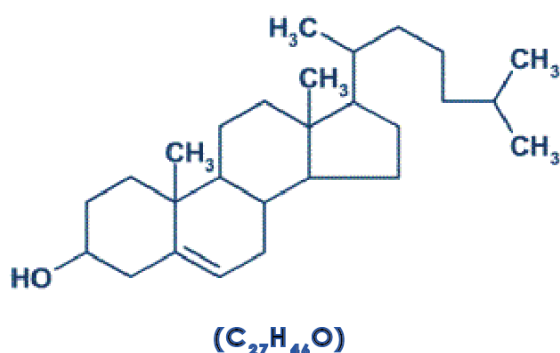
Aunque la molécula de colesterol es fundamental para el buen funcionamiento de muchos procesos celulares (1-4), el colesterol se ha concebido popularmente como una sustancia "perjudicial" que obstruye las arterias y que se ha vinculado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) (5). Actualmente, estudios epidemiológicos y experimentales indican que algunos defectos en el metabolismo del colesterol están asociados a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA) (6-9).

El cerebro es el órgano con el mayor contenido de colesterol, sin embargo el metabolismo y la compleja regulación de su homeostasis en el sistema nervioso central (SNC) son poco conocidos (10). Hasta ahora, la relación entre la EA y el metabolismo del colesterol cerebral no se ha aclarado. En la búsqueda de tratamientos para la EA, en los últimos años se ha tratado de dilucidar los mecanismos moleculares que relacionan directa o indirectamente al colesterol y su metabolismo con la EA debido al papel terapéutico que pudieran tener los fármacos utilizados para disminuir el colesterol sistémico (11, 12). En esta tesis, analizamos el mecanismo molecular por el cual la homocisteína (Hcy), una molécula relacionada con altos niveles de colesterol (13-15) y EA (16-18) incrementa el colesterol en neuronas así como su potencial en la formación de la proteína β -amiloide ($A\beta$), característica de esta enfermedad (19, 20). Además, examinamos el efecto de una estatina comercial, la lovastatina (Lov) sobre la homeostasis de colesterol en SNC debido a que estos medicamentos se han planteado como tratamiento y/o prevención de EA (21-24). Sin embargo, sus implicaciones en el funcionamiento de este sistema han sido poco exploradas y los resultados con respecto a su eficacia en EA son encontrados (25-28).

En los siguientes párrafos, se presenta una visión general del metabolismo del colesterol y su regulación. Se describe la química del colesterol, sus implicaciones clínicas más conocidas que se han vinculado con la EA, las funciones que cumple en el cuerpo, la regulación de su metabolismo en tejidos extracerebrales, así como parte de la información que hasta ahora se conoce de su regulación en SNC. Finalmente, describimos cómo es que alteraciones en estos procesos se han asociado con la patología de Alzheimer.

El colesterol y su relevancia clínica

La palabra colesterol proviene del griego $\chiολή$ (xolí) que significa "bilis", y de $\sigmaτερεος$ (stereos) que es "sólido". En 1758 fue identificado por François Poulletier de la Salle en los cálculos de la vesícula biliar (29). Fue hasta 1815 que Michel Eugène Chevreul le otorgó el nombre de "colesterina" aludiendo a su origen biliar (29). En 1859, Marcellin Berthelot inició el estudio de la estructura del colesterol (30). Para 1888, Friedrich Reinitzer determinó la fórmula empírica del colesterol ($C_{27}H_{46}O$) y fue hasta 1932 que Heinrich Wieland y Adolf Windaus presentaron la estructura correcta del colesterol (29, 31) que se muestra en la Fig 1.



nombre sistemático (IUPAC):
(3β)-cholest-5-en-3-ol

cuatro carbociclos condensados que presentan varias sustituciones:

- Dos radicales metilo en las posiciones C-10 y C-13
- Una cadena alifática ramificada de 8 carbonos en la posición C-17
- Un grupo hidroxilo en la posición C-3
- Una insaturación entre los carbonos C-5 y C-6

Fig 1 Estructura química de la molécula de colesterol

En la molécula de colesterol se puede distinguir una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo y una cola o porción apolar formada por el carbociclo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos. Así, el colesterol es una molécula tan hidrófoba que la solubilidad de colesterol libre en agua es de 10^{-8} M. Modificado de Claros, 2010 (32).

El colesterol tiene implicaciones tanto en la salud como en la enfermedad, siendo que hasta ahora se han otorgado 13 premios Nobel a investigadores que han estudiado su estructura y fisiología (33, 34). Los investigadores en el campo se refieren al colesterol como una molécula dual ya que por un lado se relaciona con ECV y al mismo tiempo es una molécula esencial para la función corporal (31) (ver pág 28). Gran parte del conocimiento que se tiene acerca de la fisiología del colesterol proviene de estudios de asociación con las ECV (revisado Aydé Mendoza Oliva

en Valenzuela y Morgado, 2006). Por ejemplo, se sabe que la hipercolesterolemia o niveles elevados de colesterol en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL) forman parte las placas ateromatosas en las paredes de las arterias (35). La hipercolesterolemia se trata generalmente con dietas bajas en lípidos, fármacos inhibidores de la síntesis de colesterol y de su absorción (36). Ahora se reconoce que el riesgo de ECV se debe a múltiples factores no sólo a hipercolesterolemia, sino también a la presión arterial alta, a otras enfermedades como diabetes, obesidad, tabaquismo, inactividad física, factores genéticos, edad, estrés y alcoholismo (revisado en van Rooy y Pretorius, 2014) (37).

Si bien, la EA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por muerte neuronal (38), desde hace tiempo se ha mostrado que existen vínculos entre esta enfermedad y las ECV principalmente relacionadas con desregulación en la homeostasis de colesterol (39-42). Hasta el momento, no existe evidencia que compruebe que estas alteraciones ocasionan la EA. Sin embargo, cada vez hay más resultados que indican que pueden tener un rol importante en esta enfermedad (ver pág 42).

Funciones del colesterol

El colesterol es un lípido presente en las membranas celulares y en el plasma sanguíneo de los animales. Es una molécula estructural que modula las propiedades fisicoquímicas de la membrana plasmática (1). Es un componente clave de las balsas lipídicas, éstas son regiones de la membrana plasmática que participan activamente en la transducción de señales (2). El colesterol es precursor de moléculas, como la vitamina D, (43) y las hormonas esteroideas (3). En el sistema nervioso es necesario para la diferenciación neuronal y la correcta transmisión eléctrica y sináptica (4, 44). Otra de sus implicaciones en la fisiología celular es su papel en la proliferación celular (45).

Obtención, transporte y eliminación de colesterol

El colesterol del cuerpo humano se obtiene por vía exógena y endógena. En la vía exógena el colesterol proviene de los alimentos de origen animal. Puede presentarse en forma libre o unido a un ácido graso (éster de colesterol). La vía

endógena se refiere a la biosíntesis de colesterol en las células. Esta vía aporta aproximadamente las dos terceras partes del colesterol del cuerpo (46).

El colesterol de la vía exógena o endógena se almacena en el hígado, se secreta y distribuye a los demás tejidos del organismo en las lipoproteínas (46). Todas las células del cuerpo sintetizan colesterol, sin embargo la mayor parte de este es obtenido por endocitosis de lipoproteínas mediada por receptor (47).

Las lipoproteínas son complejos hidrosolubles, conformados de un núcleo de lípidos apolares (colesterol esterificado y triglicéridos) cubiertos con una capa externa polar que consta de apolipoproteínas, fosfolípidos y colesterol libre (48) (Fig 2A). Cada tipo de lipoproteína tiene una composición y una proporción característica de apolipoproteínas que es reconocida por su receptor (49). Se clasifican según su densidad y composición, a mayor densidad mayor contenido en proteínas, a mayor diámetro mayor contenido de lípidos (49) (Fig 2B) y son: a) Quilomicrones, b) Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, very low density lipoprotein), c) Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, intermediate density lipoprotein), d) Lipoproteínas de baja densidad (LDL, low density lipoprotein), e) Lipoproteínas de alta densidad (HDL, high density lipoprotein) (48).

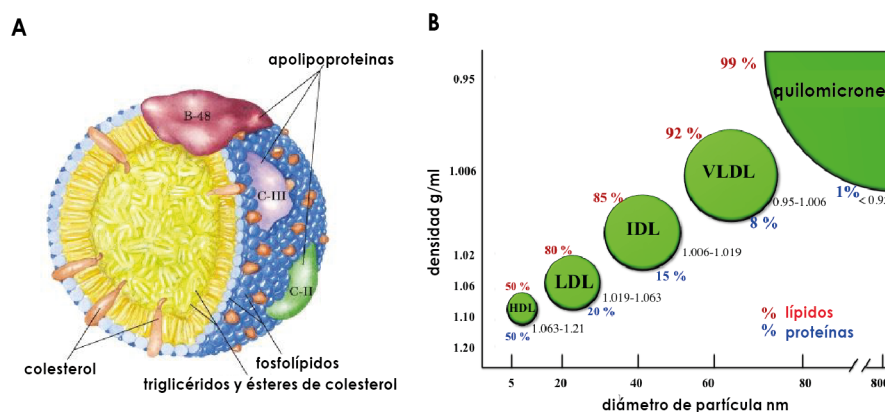


Fig 2 Composición y clasificación de las lipoproteínas

A) Las lipoproteínas están formadas por proteínas y lípidos. Constan de un núcleo de lípidos apolares (colesterol esterificado y triglicéridos) cubiertas con una capa externa polar de apolipoproteínas, fosfolípidos y colesterol libre. **B)** Las lipoproteínas se clasifican según su densidad y composición. Modificado de Nelson y Cox, 2005 (48) y Vikram, 2012 (49).

La regulación del metabolismo de las lipoproteínas es vital y es resultado de un equilibrio entre la circulación del colesterol en el hígado y los demás órganos del

cuerpo, en lo que se conoce como circuito exógeno y endógeno de colesterol (Fig 3). Los dos circuitos están conectados: el colesterol de la dieta es transportado por los quilomicrones al hígado, en su paso por el torrente sanguíneo los quilomicrones van dejando parte de su contenido. En el hígado, los remanentes de quilomicrones se pueden reciclar y ensamblar en VLDL junto con el colesterol que el hígado sintetiza (del circuito endógeno). Al igual que los quilomicrones, las VLDL descargan triglicéridos hacia el tejido muscular y adiposo. A medida que van descargando lípidos las VLDL se transforman sucesivamente en IDL, LDL o HDL. Las LDL transportan la mayor parte del colesterol a los tejidos y pueden permanecer en circulación durante varios días. Las HDL contienen colesterol libre que es excretado por las células y lo transportan hacia el hígado para su eliminación, en lo que se conoce como el transporte reverso del colesterol (revisado en Tudela, 1996) (46).

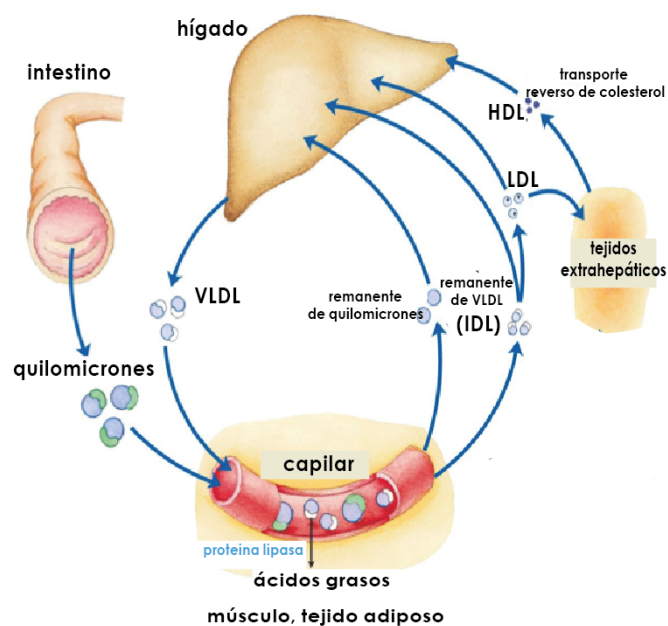


Fig 3 Circuito del colesterol endógeno y exógeno

El colesterol exógeno es de origen alimentario y sigue un circuito entre el hígado y el intestino, el colesterol endógeno es sintetizado principalmente por el hígado y es transportado hacia los demás tejidos. En el transporte reverso, el colesterol de las células regresa al hígado para su eliminación. Modificado de Nelson y Cox, 2005 (48).

Con respecto a la obtención de colesterol, a diferencia de los demás tejidos, el SNC no obtiene el colesterol de la dieta ni de las lipoproteínas plasmáticas, sino de la síntesis *de novo* (ver pág 35).

El colesterol no se metaboliza hasta dióxido de carbono (CO₂) y agua, por lo tanto no aporta energía ni tiene valor calórico. El catabolismo de todo el colesterol del cuerpo, se realiza en el hígado mediante el sistema citocromo P₄₅₀, introduciendo grupos hidroxilo (OH) en la molécula, convirtiéndolo en ácidos biliares que son secretados en la bilis (50). Esta forma de eliminación es insuficiente cuando hay un exceso de ingesta dietética de colesterol. La síntesis de los ácidos biliares es altamente regulada (revisado por Dikkers y Tietge, 2010) (51) debido a la formación de metabolitos citotóxicos como el 27-hidroxicolesterol (27-OHC), un oxiesterol vinculado con la EA (52, 53) (ver pág 35). Una forma de eliminación directa de colesterol es a través de la descamación natural de la piel (54).

Biosíntesis del colesterol y su inhibición por estatinas

La vía de síntesis de colesterol también conocida como la vía del mevalonato se realiza principalmente en el retículo endoplásmico (RE) y en el citoplasma. Es una vía metabólica altamente costosa presente en prácticamente todos los tejidos animales (55). Las principales moléculas necesarias para la síntesis de colesterol son: acetil coenzima A (acetil-CoA), que proporciona todos los átomos de carbono del colesterol, adenosín trifosfato (ATP) como fuente de energía y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como donante de equivalentes reductores (56).

La vía comienza con la condensación de moléculas de acetil-CoA para formar mevalonato, con su posterior conversión a unidades de isopreno, estos se condensan en pasos sucesivos para formar escualeno como intermediario, donde finalmente éste último se cicla para dar el producto final: el colesterol (56). El paso limitante en la biosíntesis del colesterol es catalizado por la enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA) reductasa que transforma el HMG-CoA a mevalonato (57) y es el blanco inhibido por estatinas (Fig 4).

Además del colesterol, en esta vía también se obtienen compuestos intermedios bio-activos, tal como el geranil-geranil pirofosfato (GGPP) y farnesil pirofosfato (FPP) que son etiquetas de lípidos utilizados para la modificación post-traducciona de una amplia variedad de proteínas, incluyendo la subunidad γ de las proteínas G heterotriméricas (58). La prenilación de estas proteínas se

requiere para su unión a la membrana celular, permitiendo a la célula llevar a cabo funciones biológicas importantes tales como migración, diferenciación, proliferación y señalización (59). La inhibición de la vía de colesterol por las estatinas reduce la prenilación de las proteínas G como Rho, Rac, Ras y Rab (60) lo que puede tener consecuencias perjudiciales para la función celular (61). Los isoprenos también están involucrados en la transcripción (isopentil tRNAs), N-glicosilación (dolicol), y el transporte de electrones en la mitocondria (ubiquinona y hemo A) (56). La inhibición de la vía por estatinas puede tener una amplia y compleja gama de efectos hipolipemiantes y pleiotrópicos (Fig 4).

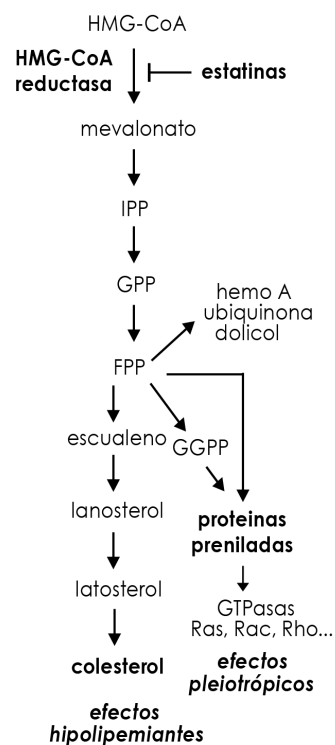


Fig 4 La biosíntesis de colesterol y su inhibición por estatinas

La inhibición de la HMG-CoA reductasa por las estatinas disminuye los niveles de colesterol e interfiere con la formación de isoprenos derivados del mevalonato. La reducción de isoprenos como FPP y GGPP disminuye la prenilación de proteínas. A través de la inhibición de la vía en este punto, las estatinas pueden tener una amplia y compleja gama de efectos hipolipemiantes y pleiotrópicos. Modificado de Mendoza-Oliva et al., 2014 (66).

Regulación de la síntesis de colesterol

La homeostasis del colesterol sistémico es controlada por la síntesis, la absorción, eflujo, degradación y excreción (62). La biosíntesis de colesterol se rige principalmente por su concentración en el RE (63) y es modulada negativamente por los niveles plasmáticos de colesterol en las LDL (64). Gran parte de la

regulación de la síntesis de colesterol se lleva a cabo en este paso (55) donde la enzima HMG-CoA reductasa es sujeta a regulación a corto y largo plazo (Fig 5A,B). Los trabajos en la literatura indican que la proteína glicosilada anclada a la membrana del RE tiene un peso molecular de 80-97 kDa correspondiente a su forma monomérica. La HMG-CoA reductasa humana cristaliza principalmente como un homotetrámero y el sitio activo se forma por la contribución de dos monómeros (65).

La regulación a corto plazo de la enzima se produce a través de su fosforilación/desfosforilación mediada por señalización hormonal. La fosforilación de la HMG-CoA reductasa producida por el glucagón a través de la cinasa activada por monofostato de adenina (AMPK) (67) disminuye su actividad enzimática, mientras que su desfosforilación inducida por la insulina a través de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) aumenta su actividad (68). La regulación a largo plazo de la HMG-CoA reductasa es modulada alostéricamente por retroalimentación negativa mediada por el contenido de esteroides. Un mecanismo de detección de colesterol en el RE regula la expresión de genes implicados en la biosíntesis de colesterol (HMG-CoA reductasa), así como en su absorción (a través del receptor de LDL) (63, 69) y degradación (70) (Fig 5A).

Las proteínas de unión al elemento regulador de esteroides (SREBPs) son los factores de transcripción clásicos que regulan la homeostasis del colesterol celular y controlan la expresión de genes relacionados con la síntesis de colesterol y la absorción de LDL (63). Los factores SREBPs son proteínas integrales de membrana que residen en el RE.

En presencia de altos niveles de esteroides, los SREBPs se encuentran unidos a otra proteína de membrana, la proteína que activa la escisión de SREBP (SCAP, SREBP cleavage-activating protein) (71). El complejo SREBP-SCAP es retenido en el RE a través de su unión con la proteína del gen-1 inducido por insulina (INSIG-1, insulin-induced gene-1) (72, 73). Cuando los niveles de esteroides disminuyen, el complejo SREBP-SCAP sale del RE y se transporta al Golgi a través de la vía secretora (74). En el Golgi, el SREBP se procesa secuencialmente por la proteasa de sitio-1 (S1P) y por la proteasa del sitio-2 (S2P) (75, 76) que producen el dominio N-terminal

soluble y activo de SREBP, que entonces entra en el núcleo e induce la expresión de sus genes blanco (77). Esta fina regulación del metabolismo del colesterol es consecuencia de un dominio de detección de esterol (SSD) presente tanto en la proteína SCAP como en la HMG-CoA reductasa (78). A nivel post-traduccional, los esteroides también regulan la degradación de la HMG-CoA reductasa (79-81). Cuando el nivel de colesterol es bajo, la HMG-CoA reductasa es estable, pero cuando el colesterol aumenta, la HMG-CoA reductasa interactúa a través de su dominio SSD con INSIG-1 (82) permitiendo su ubiquitinación y posterior degradación por la vía de degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (ERAD, del inglés endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) (82) (Fig 5B).

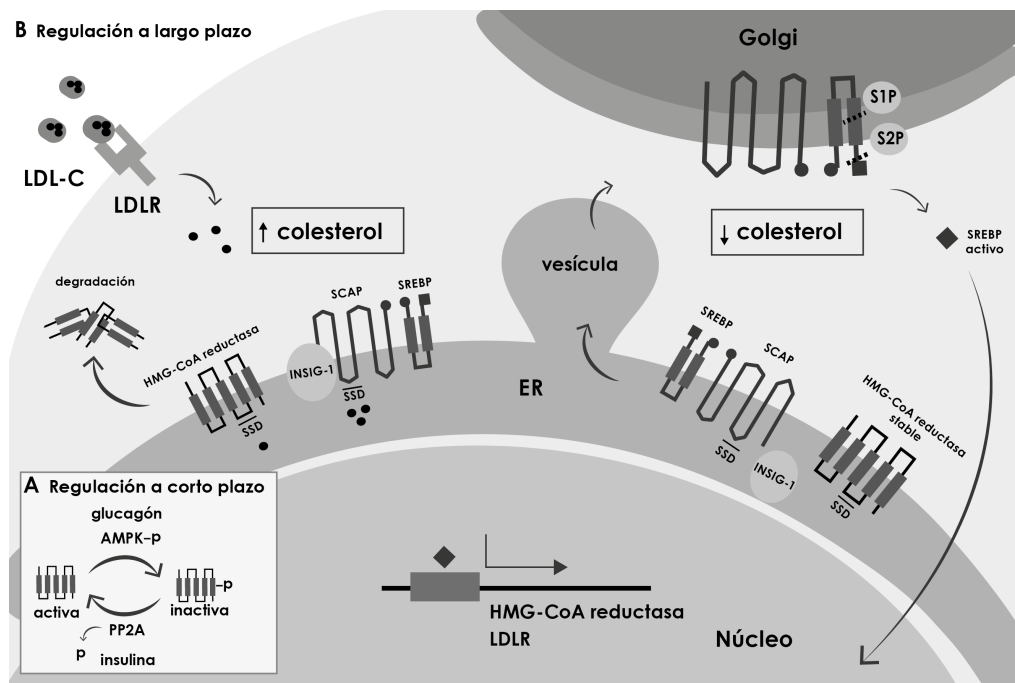


Fig 5 Regulación de la biosíntesis de colesterol

La síntesis del colesterol a través de la HMG-CoA reductasa es objeto de regulación a corto y largo plazo. **A)** En el cuadro blanco de la esquina inferior izquierda se muestra la regulación a corto plazo de la síntesis de colesterol. La fosforilación de la HMG-CoA reductasa, se activa por el glucagón a través de AMPK lo que disminuye la actividad de la enzima, mientras que la insulina a través de PP2A produce su desfosforilación y aumenta su actividad. **B)** La regulación a largo plazo de la HMG-CoA reductasa es alostéricamente modulada por retroalimentación negativa mediada por el colesterol. Los SREBPs, son los factores de transcripción que regulan la homeostasis del colesterol celular y controlan la expresión de la HMG-CoA reductasa y LDLR (receptor de LDL). En presencia niveles altos de colesterol (↑ colesterol), SREBP se une a SCAP. El complejo SREBP-SCAP es retenido en el RE a través de su unión a INSIG-1. Cuando los niveles de colesterol disminuyen (↓ colesterol) el complejo SREBP-SCAP sale del RE y se transporta al Golgi a través de

la vía secretora. En el aparato de Golgi, el SREBP es secuencialmente procesado por S1P y S2P lo que da como resultado un SREBP soluble y activo, que luego entra en el núcleo e induce la expresión de sus genes blanco. El colesterol también regula la degradación de la HMG-CoA reductasa, cuando los niveles de colesterol son bajos, la HMG-CoA reductasa es estable, pero cuando el colesterol aumenta, ésta interactúa a través de su dominio SSD con INSIG-1 lo que permite su degradación. Modificado de Mendoza-Oliva *et al.*, 2014 (66).

Metabolismo del colesterol cerebral

El cerebro es el órgano con el mayor contenido de colesterol. Alrededor del 25 % del colesterol del cuerpo reside en el cerebro, principalmente en forma no esterificada (83). Es el principal componente estructural de las membranas celulares y de las vainas de mielina (10). En el SNC, el colesterol también participa en procesos celulares clave como la diferenciación celular, la formación de sinápsis, dendritas y axones, neurotransmisión, endocitosis, plasticidad sináptica, señalización intracelular, y es un precursor de neuroesteroides activos (4, 44). Se han descrito diferencias significativas entre el metabolismo del colesterol en el SNC y los sistemas periféricos. Por ejemplo, la vida media de colesterol circulante es de sólo pocos días, en contraste con el colesterol del cerebro que puede permanecer estable durante 6 meses en roedores y hasta 5 años en humanos (10). La regulación del metabolismo del colesterol en el SNC es poco conocida en comparación con la regulación del colesterol periférico. En el humano, el colesterol materno es la principal fuente de colesterol del cerebro durante las primeras etapas de desarrollo (84). La formación y maduración de la barrera hematoencefálica (BHE, del inglés blood-brain barrier) entre las 12-18 semanas de gestación (85) impide la absorción de las lipoproteínas de la circulación (86) por lo tanto, después de esta etapa de desarrollo, los niveles de colesterol del cerebro son independientes de la dieta o de la síntesis hepática y su producción esencialmente (> 99 %) depende de la síntesis *de novo* (83).

Durante la mielinización axonal, los oligodendrocitos tienen la mayor capacidad para la síntesis de colesterol. Más tarde, en la edad adulta, la tasa de síntesis de estas células disminuye y el colesterol es sintetizado principalmente por los astrocitos (87, 88). Las neuronas son capaces de sintetizar la mayor parte del colesterol necesario para su crecimiento y sinaptogénesis en las primeras etapas de desarrollo (4). Pero en el cerebro maduro, las neuronas reducen su capacidad

de biosíntesis probablemente debido al alto gasto energético de la vía y se vuelven dependientes de colesterol producida por los astrocitos (89, 90).

La homeostasis del colesterol en el cerebro se mantiene mediante el equilibrio entre el transporte de colesterol a través de un proceso dependiente de lipoproteínas específicas del cerebro y el colesterol sintetizado endógenamente. Las lipoproteínas en el cerebro, se sintetizan, ensamblan y secretan principalmente por los astrocitos y son transportadas a las neuronas (91, 92). Los transportadores del tipo ABC (del inglés, ATP binding cassette) son moléculas importantes para mediar el transporte de lípidos en el SNC, y especialmente en la formación de la apolipoproteína E (APOE) (93). Una vez que se sintetiza el colesterol, el transportador de membrana dependiente de ATP subfamilia A1 (ABCA1), tanto en células gliales como en neuronas, lo secreta (83, 94, 95).

Existe evidencia que muestra que la biosíntesis del colesterol en el cerebro también está regulada por SREBP y por la HMG-CoA reductasa de manera similar que en los tejidos periféricos, esto es a través de la inhibición por retroalimentación de la expresión génica y degradación (96). En las neuronas, la HMG-CoA reductasa está presente y activa en el RE pero también se encuentra en los axones donde la síntesis de colesterol no tiene lugar (97) lo que sugiere que esta enzima podría tener otra función en las neuronas. El equilibrio de los niveles de colesterol en el cerebro es finamente modulado. El colesterol se excreta del cerebro en la forma de 24-hidroxicolesterol (24-OHC) por la acción de la colesterol 24S-hidroxilasa (CYP46) (10, 83, 98) una enzima neuronal específica (99), y aunque el colesterol circulante no atraviesa la BHE, su producto oxidado, el 27-OHC si puede llegar al cerebro (100, 101). Se ha planteado la hipótesis de que el influjo de 27-OHC al cerebro representa el vínculo entre la hipercolesterolemia y el riesgo de desarrollar EA (52, 53). La investigación del metabolismo del colesterol en el cerebro tiene una larga historia, pero este campo ha cobrado un gran impulso en la última década, probablemente por la relación del colesterol en las enfermedades neurodegenerativas como la EA.

La enfermedad de Alzheimer

La EA es la demencia neurodegenerativa más frecuente en adultos mayores y fue nombrada por Emil Kraepelin en honor al neuropatólogo alemán Alois Alzheimer (1864-1915). En 1907, Alzheimer describió tanto la conducta, como las características neuropatológicas de la demencia en una mujer de 51 años; ambas manifestaciones continúan en la actualidad vigentes para el diagnóstico de la EA (102).

El inicio de la EA es muy difícil de identificar por el paciente y su familia. Las deficiencias conductuales en los pacientes con EA evolucionan gradualmente (103). Los primeros síntomas se manifiestan a menudo como déficits muy sutiles e intermitentes en la memoria episódica (104). Algunas señales de alerta temprana son a menudo identificadas como un aspecto normal del envejecimiento. Por lo general, los nuevos pacientes acuden al médico en excelentes condiciones neurológicas, sin déficits graves. Los déficits continúan con alteraciones en el lenguaje, el pensamiento abstracto y las funciones ejecutivas, hasta llegar a la incapacidad de reconocer personas y a la propia imagen (105). Después de un periodo de algunos años la demencia, que ya se encuentra avanzada, además de afectar las funciones cognitivas y conductuales afecta los sistemas motores como el extrapiramidal, lo que provoca disminución en la marcha e incontinencia. La muerte en estos pacientes se puede presentar por medio de complicaciones respiratorias menores como neumonía por aspiración (106).

En cuanto a las características neuropatológicas, el cerebro de pacientes con Alzheimer en etapa final se caracteriza por atrofia del hipocampo y de la corteza cerebral así como dilatación ventricular, todo en magnitudes mayores de lo esperado para la edad (107) (Fig 6).

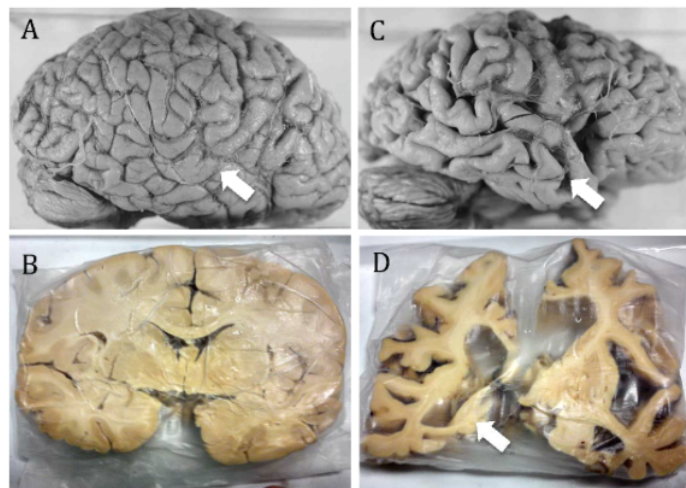


Fig 6 Atrofia cerebral en la EA

Comparación neuroanatómica de **A, B)** un cerebro normal **C, D)** y un cerebro con EA. **C)** En el cerebro con EA se observa atrofia prominente en las áreas frontal y temporal que participan en las funciones de asociación (flechas). **D)** sección coronal del cerebro con EA donde se observa una ampliación de los ventrículos y atrofia del hipocampo. Modificado de Soto-Rojas, 2015 (108).

Los cambios microscópicos más obvios y de diagnóstico en el cerebro con EA son: la presencia de placas amiloideas y las marañas neurofibrilares (109). Las primeras se forman a partir de depósitos extracelulares de $A\beta_{[1-40]}$ y $A\beta_{[1-42]}$ (Fig 7A), mientras que las segundas se generan a partir de filamentos helicoidales apareados de la proteína tau hiperfosforilada (Fig 7B). Ambos eventos ocurren particularmente en la corteza frontal y en el hipocampo, e interfieren con la comunicación sináptica en estas regiones (110).

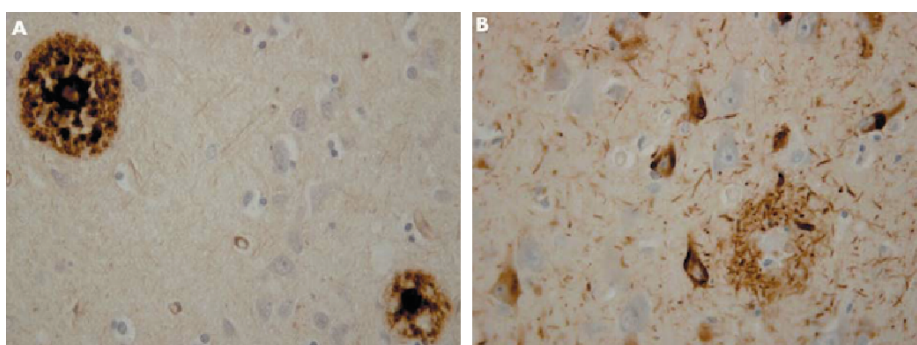


Fig 7 Características histopatológicas de la EA

A) Placas neuríticas, teñidas con anticuerpos anti- $A\beta_{[1-42]}$. **B)** Placas neuríticas y ovillos neurofibrilares, teñidas con anticuerpos de filamentos helicoidales apareados de la proteína tau. Modificada de Vandenberghe y Tournoy, 2005 (111).

La etiología de la EA puede ser de tipo genética (familiar) y esporádica. La primera representa menos del 2 % de los casos y se asocia a mutaciones en tres genes: el de proteína precursora del β -amiloide (APP) en el cromosoma 21, el de la presenilina 1 en el cromosoma 14, y el de la presenilina 2 en el cromosoma 1 en humanos (revisado en Dorszewska *et al.*, 2016) (112). Este tipo de EA se conoce también como “de inicio temprano”, ya que los individuos que portan alguna de las mutaciones mencionadas presentan los primeros síntomas en edades tempranas, incluso en la tercera década de vida (113).

En el caso de la EA esporádica, aún se desconocen los factores que la inducen; tiene una prevalencia del 98 % y por lo general se presenta a partir de los 65 años de edad. Así, la incidencia de personas menores de 65 años con la EA es inferior al 1 %, aumenta de 5 a 10 % a partir de los 65 años y de 30 a 40 % a partir de los 80 años de edad (112). Por ello, se considera que el principal factor de riesgo para desarrollar la EA es la edad. De hecho, algunos desórdenes relacionados con la edad como la hipercolesterolemia, la disfunción en la respuesta antioxidante, y la homeostasis mitocondrial se han asociado fuertemente al desarrollo de la enfermedad (revisado por Maes *et al.*, 2009) (114). En el reporte del 2015 de la Federación Internacional de Asociaciones de Alzheimer (ADI, del inglés Alzheimer's disease Internacional) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS, del inglés World Health Organization) se estimó que a nivel mundial, existen 46.8 millones de personas con demencia. Debido a que esta enfermedad se asocia de manera importante con la edad, se prevé que el número de personas con EA crezca conforme aumenta la expectativa de vida a nivel mundial. Se ha previsto que la población con EA se duplique cada 20 años, es decir que existan 74.7 millones de personas con EA en 2030 y 131.5 millones en 2050, esto es un nuevo caso de demencia cada cuatro segundos. Estos nuevos estimados son 12-13 % mayores que los del reporte de 2009 (115). En Estados Unidos se estimó que en 2010 existían de 5.4 millones de personas afectadas con la EA según el censo del año 2000 (116). En nuestro país, se estimó que en 2014 existían 860,000 personas afectadas. La proyección del número de mexicanos afectados por la demencia para el año 2050 llegará a más de 3.5 millones (117).

La causa de la EA no se conoce por completo, pero se cree que involucra tanto factores genéticos como ambientales, por lo que es difícil establecer su prevención. En la actualidad, tampoco se dispone de algún tratamiento para curar o por lo menos alterar el avance de la demencia. Por lo cual queda mucho por hacer para apoyar y mejorar la vida de las personas con demencia.

Actualmente en México hay más de 13 millones de adultos mayores de 60 años, en este sentido la demencia representa una amenaza significativa para la calidad de vida de éstas personas. Algunos de los factores de riesgo socio-demográficos para la aparición de la demencia son: la desventaja social y el analfabetismo, los cuales propician la exposición temprana a factores de riesgo que alteran el proceso biológico del envejecimiento y pueden llegar a producir multimorbilidad, en particular alteraciones cardiovasculares y metabólicas (117).

Además de la edad existen otros factores de riesgo para padecer la enfermedad los cuales incluyen: antecedentes familiares con EA, presión arterial alta por mucho tiempo, las dietas altas en grasas, antecedentes de traumatismo craneal, niveles altos de Hcy y colesterol, una vida sedentaria y una estimulación cognoscitiva pobre (6, 118-122).

Producción del péptido A β

En 1984, Glenner y Woong descubrieron una molécula que se deposita en el cerebro durante el desarrollo de la EA: el péptido A β (19). Desde entonces, se sabe que esta proteína se encuentra directamente asociada a la EA, sin embargo, no se conoce bien que genera su producción y acumulación en el cerebro.

El péptido A β es el principal componente de las placas neuríticas en la EA (Fig 7A) (20). Es derivado de la glicoproteína transmembranal tipo I, la proteína APP (123). La APP presenta un dominio extracelular grande en la región N-terminal (124) una región transmembranal, que contiene parte de la secuencia del A β y un dominio citoplasmático de menor tamaño en la región C-terminal (Fig 8). Esta proteína es ubicua en el organismo y está conservada evolutivamente (125, 126). El gen de la APP se localiza en el cromosoma 21 y existen varias isoformas con un tamaño que puede variar de 563 hasta 770 aminoácidos. Las neuronas expresan

principalmente la isoforma APP₆₉₅ (127). Se han relacionado varias funciones a la proteína APP: interviene como receptor ligado a proteínas G (128), participa en el crecimiento y guía axonal durante el desarrollo (129) y contribuye a la homeostasis de iones de cobre (130).

La proteína APP se procesa mediante la acción de diversas proteasas. En la vía no amiloidogénica, una proteasa conocida como α -secretasa corta la APP y previene la formación de A β con lo que se impide la formación de los depósitos (131). Sin embargo, una parte de la APP es procesada de manera diferente. Otra secretasa, la β -secretasa, corta la APP liberando un fragmento carboxilo, que tras ser procesado por la γ -secretasa, libera el A β (Fig 8). Este péptido tiene una solubilidad limitada y forma autoagregados que constituyen las fibras insolubles de las placas. La acción de la β -secretasa y γ -secretasa (complejo) produce diversos tipos de péptidos. La forma más común, relativamente soluble, tiene 40 aminoácidos A β _[1-40], mientras que otras formas tienen una longitud de 42 o 43 residuos: A β _[1-42] y A β _[1-43]. Estas últimas son mucho más insolubles y forman fibras con características cinéticas mucho más rápidas (131).

La principal β -secretasa de las neuronas en el procesamiento amiloidogénico de APP es la enzima-1 de corte de APP en el sitio β (BACE-1, del inglés beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme-1). BACE-1 es una aspartil proteasa transmembranal cuyo corte genera el N-terminal del A β , es la enzima limitante en la producción de este péptido (Fig 8). Con el aumento en la expresión neuronal de BACE-1 predomina la vía del procesamiento amiloidogénico (132). La proteína BACE-1 tiene 501 aminoácidos (~70 kDa) y dos sitios activos. La mayoría de los tejidos exhiben actividad β -secretasa pero los niveles más altos de actividad se observan en las neuronas (133).

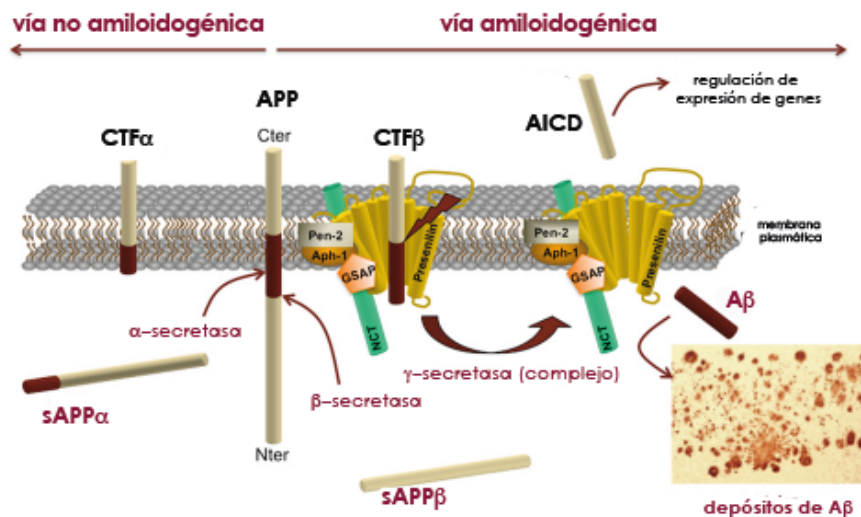


Fig 8 Procesamiento de APP y producción de A β

El procesamiento de APP se puede realizar por la vía amiloidogénica (derecha) o no amiloidogénica (izquierda). Las enzimas α - y β -secretasa cortan a la APP en su dominio extracelular para liberar respectivamente un fragmento soluble sAPP α o sAPP β en el espacio extracelular y generar fragmentos carboxi-terminales CTF o CTF β . Estos fragmentos posteriormente pueden ser procesados por el complejo γ -secretasa para generar el fragmento AICD (del inglés, amyloid precursor protein intracellular cytoplasmic/C-terminal domain) el cual participa en la regulación de la expresión génica. El complejo γ -secretasa se compone de las proteínas presenilina, nicastrina (NCT), proteína activadora de γ -secretasa (GSAP), Pen-2, y Aph-1. Modificado de Vingtdeux *et al.*, 2012 (134).

Desregulación de colesterol en la enfermedad de Alzheimer

Estudios epidemiológicos y experimentales han sugerido que la hipercolesterolemia aumenta la susceptibilidad para desarrollar EA (6, 135). De hecho, la presencia del alelo ϵ 4 de la APOE, que se asocia positivamente con alto contenido de colesterol en el cerebro, es uno de los factores de riesgo mejor establecidos para el desarrollo de EA (7, 8, 21, 136). Un estudio preliminar indica que la variación genética en el locus APOE en la población mexicana es un factor genético que influye en los niveles de lípidos en plasma particularmente en la población femenina (137).

Se ha indicado también que niveles altos de colesterol aumentan el riesgo de EA en un 66 % (138), y que este aumento de colesterol en la mediana edad se correlaciona mejor con la aparición de la EA. A mayor edad, la correlación entre EA y el colesterol no es consistente. Recientemente estudios de asociación de genoma completo han identificado polimorfismos en genes asociados con la

homeostasis del colesterol, incluyendo al transportador ABCA1, al transportador de membrana dependiente de ATP subfamilia A7 (ABCA7) y clusterina (CLU) (9, 139, 140). También los niveles plasmáticos altos de 24-OHC han sido asociados con la EA (141, 142) y con la demencia vascular (143). Sin embargo, todavía no está claro si los niveles plasmáticos altos de 24-OHC están relacionados directamente con el desarrollo de la EA o si es un reflejo de la disrupción de la BHE o ambos (144). La mayoría de los resultados al respecto han demostrado que la regulación del colesterol en EA está alterada en diferentes niveles: biosíntesis, transporte, ensamblaje de las lipoproteínas, los receptores de lipoproteínas y señalización (145) (Fig 9A).

Evidencia creciente sugiere que el colesterol puede influir en la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de la APP y la producción de A β . Estudios en animales han demostrado que el exceso de colesterol de la dieta acelera la acumulación de A β en el cerebro y en contraste, la reducción en colesterol favorece la vía no amiloidogénica del metabolismo de APP disminuyendo la producción de A β y la formación de placa amiloide (146-149). Aunque los mecanismos por los que el colesterol afecta la producción de A β no se conocen, se ha sugerido que los cambios en los niveles de colesterol en la membrana o su distribución en las balsas de lípidos influye en la actividad y la expresión de las β - y γ -secretasas involucradas en el procesamiento amiloidogénico de APP (23, 146, 148, 150-152) (Fig 9B). Por otro lado, el colesterol alto aumenta la toxicidad neuronal de A β mediante el aumento de la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (153, 154). De esta manera, el colesterol puede aumentar la vulnerabilidad del cerebro para eventos tóxicos durante el envejecimiento a dos niveles: el aumento de la deposición de A β y su toxicidad. Sin embargo, el factor crítico en el análisis de estos datos debe tener en cuenta que el paso del colesterol desde la periferia al cerebro es normalmente prevenido por la BHE, con lo cual, la relación entre la concentración alta de colesterol sistémico y la acumulación de A β no está del todo clara (Fig 9A). Por lo cual resulta importante valorar qué factores del ambiente cerebral puedan estar involucrados en el aumento de colesterol cerebral, lo que nos permitirá tener un mejor entendimiento de su papel patogénico en la EA.

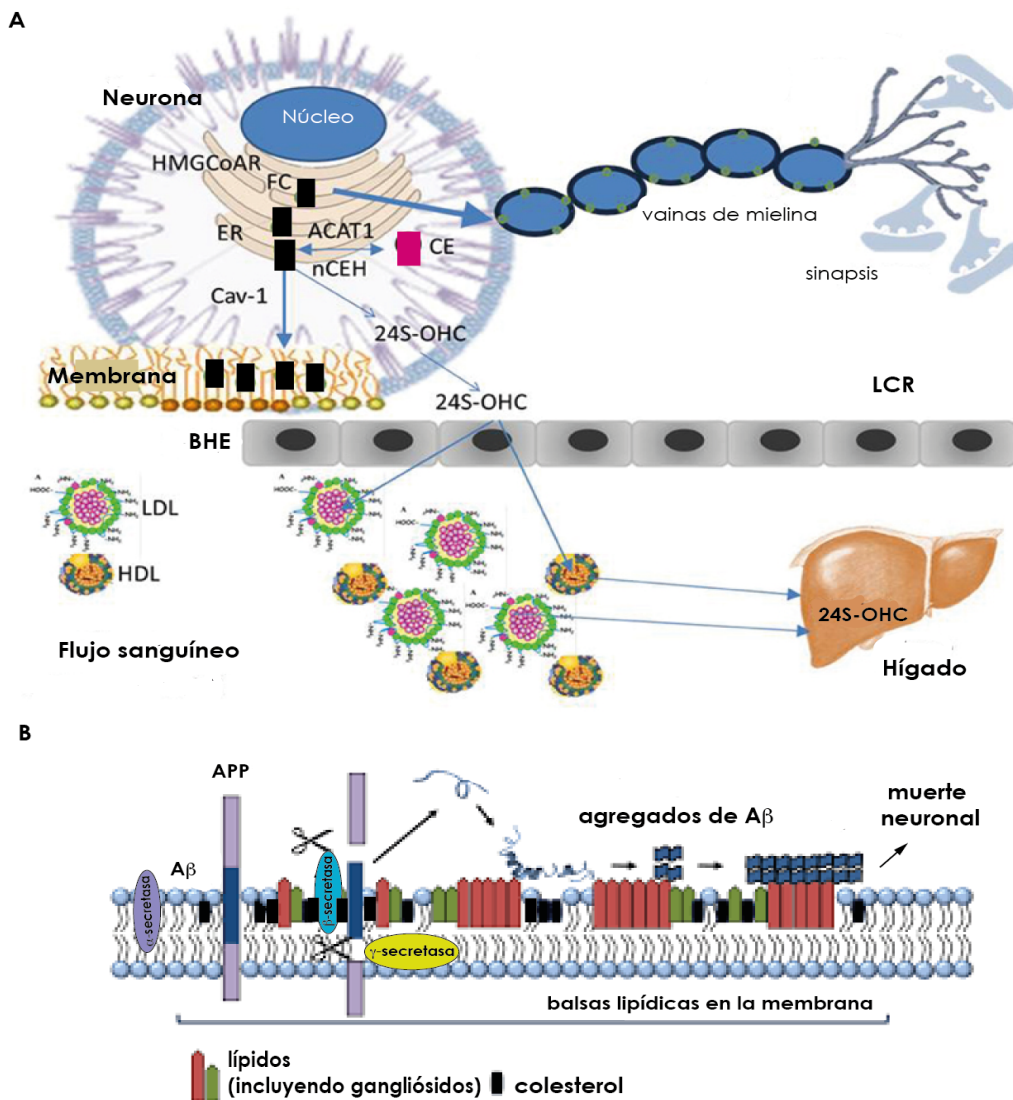


Fig 9 El colesterol en el cerebro y su participación en la sobreproducción de A β

A) La BHE impide que las lipoproteínas plasmáticas lleguen al cerebro, por lo cual el colesterol en este tejido es sintetizado *de novo*. Las neuronas mantienen constantes sus concentraciones de colesterol a través de los mismos mecanismos homeostáticos que regulan el metabolismo del colesterol intracelular en los tejidos periféricos. El colesterol sintetizado en la RE, puede localizarse hacia la membrana plasmática interactuando con caveolina-1 (Cav-1), una parte del colesterol se esterifica por la acil-CoA-colesterol aciltransferasa (ACAT). Para su eliminación, el colesterol se convierte en 24S-OHC, cruza la BHE, entra en el plasma, y se lleva al hígado para la excreción en la bilis. Modificado de Anchisi *et al.*, 2013 (155). **B)** Las enzimas β y γ -secretasas se encuentran unidas a la membrana en las balsas lipídicas. El alto contenido puede influir en la actividad de estas enzimas involucradas en el metabolismo de la proteína APP durante la producción de A β , promoviendo de esta manera la formación de agregados de A β y la muerte neuronal. Modificado de Morgado y Garvey, 2016 (156).

PARTE I

EFFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA EN EL METABOLISMO DEL COLESTEROL NEURONAL

La homocisteína y su relación con la enfermedad de Alzheimer

Al igual que el colesterol, los niveles plasmáticos elevados de Hcy pueden aumentar el riesgo de padecer ECV y también se han asociado con EA (16, 17). La Hcy es un aminoácido no proteico, su metabolismo requiere de vitaminas del grupo B, especialmente el ácido fólico, de la vitamina B6 y vitamina B12. Cuando hay deficiencia de alguna de estas vitaminas, los niveles de Hcy en sangre aumentan, esta alteración en el metabolismo se conoce como hiperhomocisteinemia (157). Los niveles de Hcy en plasma pueden incrementar con la edad (158) como resultado de la pérdida de la función renal o disminución en la actividad de enzimas y vitaminas que participan en su metabolismo (159, 160).

La Hcy es un aminoácido sulfurado que se forma del metabolismo de la metionina. La Hcy se transforma a cisteína por la vía de transulfuración con la intervención de dos enzimas dependientes de la vitamina B6 como la cistationina β sintasa (CBS) o puede ser remetilada a metionina, proceso en el que interviene la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) dependiente del ácido fólico y de vitamina B12. Esta enzima cataliza la conversión de 5,10 metilentetrahidrofolato, en una reacción dependiente de NADPH, a 5-metiltetrahidrofolato; este metabolito que se produce en una reacción fisiológica irreversible es uno de los tres dadores del grupo metilo en la conversión de Hcy a metionina por la enzima metionina sintasa (MS) (157) (Fig 10).

Hasta el momento no se conoce con exactitud cómo la hiperhomocisteinemia contribuye al desarrollo de ECV. Además los altos niveles de Hcy en plasma están asociados comúnmente a desórdenes genéticos (atrofia de la corteza cerebral) como son mutaciones de las enzimas que participan en su metabolismo y las deficiencias en las vitaminas B6 y B12 (162).

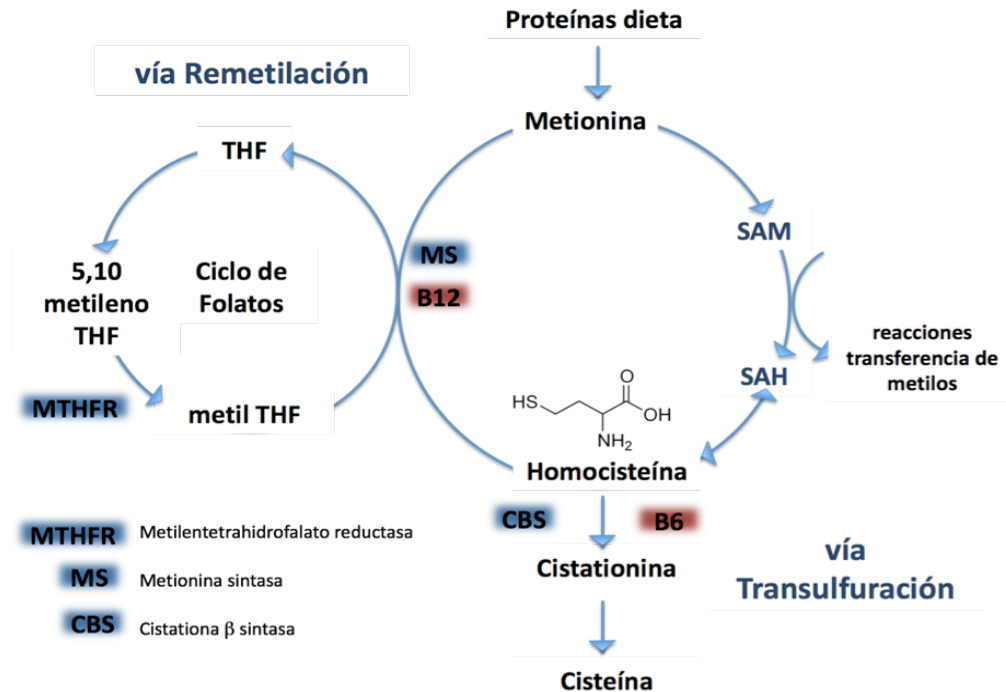


Fig 10 Metabolismo de la Hcy

La Hcy es un aminoácido producto intermedio del metabolismo de la metionina y la cisteína. La Hcy es metabolizada por dos vías: transulfuración y remetilación. La transulfuración de la Hcy a cisteína es catalizada por la CBS, un proceso que requiere fosfato de piridoxal (B6) como cofactor. Por otro lado, la remetilación de la Hcy produce metionina. Esta reacción es catalizada por la MS. La cobalamina (B12) es cofactor de la MS. THF, tetrahidrofolato. Modificado de Mendoza-Oliva, 2011 (163).

Con base en estudios epidemiológicos enfocados en la asociación de Hcy y la EA, se ha sugerido que el daño vascular puede contribuir al comienzo y progreso de la enfermedad (17). En reportes en los que los niveles de Hcy están elevados y los de folatos disminuidos, se ha observado una reducción en el número de microvasos sanguíneos, daño en los capilares cerebrales y disfunción de la BHE en pacientes con EA (161).

Algunos trabajos se han encaminado a esclarecer la relación entre la acumulación de Hcy y el daño neuronal presente en la EA. Estudios previos han mostrado que la Hcy es tomada por las neuronas vía un transportador de membrana específico (164), lo cual resulta en la acumulación relativa de altas concentraciones de Hcy en las células. También se ha documentado que la acumulación de Hcy produce daño a las neuronas a través de diversos

mecanismos de toxicidad tales como: la generación de ERO, incremento de la toxicidad de A β , la activación de apoptosis, hiperactivación de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y la fosforilación de proteínas del citoesqueleto, entre otros (153, 165-170) (Fig 11).

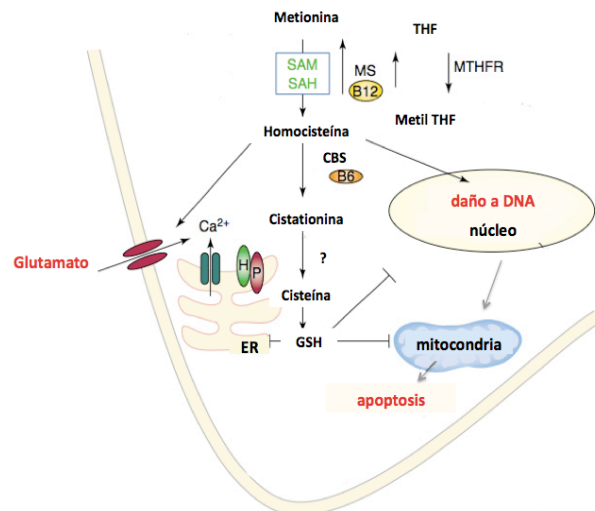


Fig 11 Mecanismos de muerte neuronal por Hcy

La Hcy puede producir la muerte neuronal a través de mecanismos que involucran el daño a DNA, la activación de señales que inducen apoptosis, alteraciones en la función mitocondrial como la liberación de citocromo c y la activación de caspasas, así como disminución de la respuesta antioxidante de la célula. Puede también ejercer acciones directas sobre los receptores de glutamato con aumento en el influjo de calcio. Investigaciones recientes han señalado que la Hcy induce estrés del RE, el cual puede contribuir a sus mecanismos patogénicos. Modificado de Mattson y Shea, 2003 (171).

La homeostasis de los niveles de Hcy parece ser importante en el proceso de metilación del ácido desoxirribonucleico (DNA) que es un mecanismo de regulación de la expresión génica (172). En este aspecto se ha estudiado la regulación de los genes que participan en el procesamiento de la proteína APP. Trabajos en este ámbito han revelado que los niveles de S-adenosilmetionina (SAM), el principal donador de metilo, están disminuidos en pacientes con EA (173). Estos datos hipotetizan que las alteraciones en el ciclo SAM/Hcy (produciendo la acumulación de Hcy) son responsables del bajo nivel de SAM y por lo tanto de la reducción de metilación del DNA (174). La Hcy provoca la acumulación de S-adenosilhomocisteína (SAH) debido a que la reacción que convierte SAH a Hcy y adenosina (Ado) es reversible, de esta forma se favorece la

síntesis de SAH. La reacción procede hacia la formación de SAM, solo si la Hcy y la Ado son removidas (175) (Fig 10).

El SAH es un inhibidor de las metiltransferasas de DNA, lo cual tiene como consecuencia la hipometilación del DNA y la activación o sobreexpresión de genes involucrados en la patología de Alzheimer. De acuerdo con lo anterior se ha propuesto que alteraciones del ciclo SAM/Hcy incrementan la producción de las γ y β -secretasas, involucradas en la generación de A β (18).

Relación entre la homocisteína y el metabolismo de colesterol

Se ha reportado una correlación positiva entre los niveles de Hcy y los de colesterol en el plasma de pacientes y en modelos animales con homocisteinemia (176-178). Basados en estudios epidemiológicos, la elevación de Hcy correlaciona con niveles altos de colesterol y triglicéridos en estos pacientes (13). Actualmente, la investigación en este campo se ha encaminado a esclarecer los eventos bioquímicos que llevan a la acumulación de colesterol mediada por Hcy. En líneas celulares de hepatocitos (HepG2), la Hcy incrementa la actividad de la HMG-CoA reductasa con un aumento en la producción y secreción de colesterol (14), la Hcy aumenta la incorporación de partículas LDL del medio, induce estrés del RE y provoca la activación de factores de transcripción involucrados en la síntesis de colesterol y triglicéridos (15, 179, 180), en células del endotelio vascular aumenta el colesterol total, induce la expresión del mensajero y de la enzima HMG-CoA reductasa (181).

A pesar de que se conoce mucho acerca del metabolismo del colesterol y de la Hcy hasta el momento queda por aclarar su participación en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Debido a que existe evidencia de la participación de la Hcy en el metabolismo del colesterol, en una investigación anterior (153) examinamos si la Hcy podía inducir la acumulación de colesterol en neuronas. En este caso, observamos que después de varios días de incubar a las células en presencia de Hcy se acumula colesterol en las neuronas (Fig 12) (153). Nuestro hallazgo es interesante debido a que representa una condición que está presente en la EA y que además puede modificar varios aspectos relacionados con el metabolismo de colesterol (15, 179, 180). En base a lo descrito

en la literatura pensamos que los posibles mecanismos involucrados en el aumento de colesterol por Hcy podrían ser la inducción de la vía de síntesis de colesterol y/o la captura de colesterol desde el suero (14, 15, 179, 180). En el presente trabajo decidimos continuar estudiando el efecto de la Hcy sobre el metabolismo del colesterol neuronal y examinar si este tiene una repercusión en la producción del péptido A β .

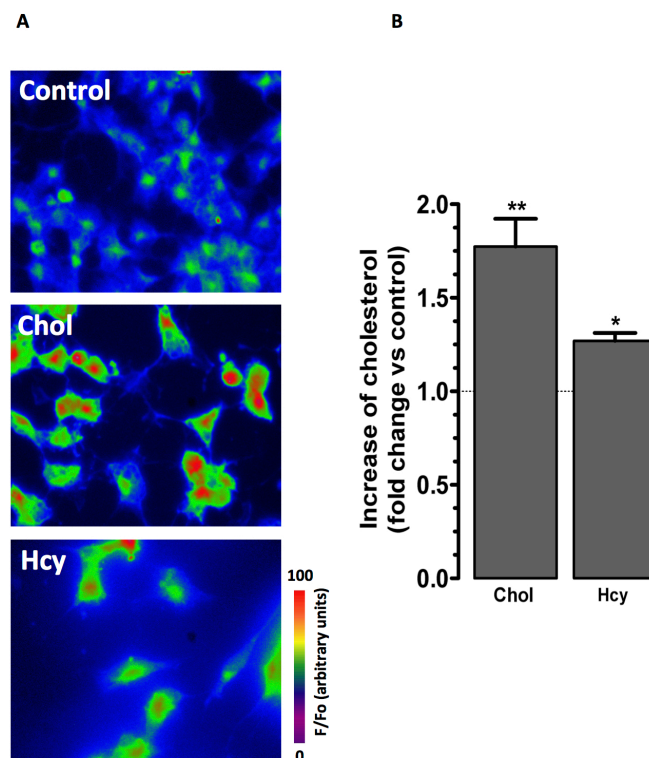


Fig 12 Cambios en el contenido de colesterol por Hcy en las células de neuroblastoma humano

Las células se trataron con colesterol (50 μ M) o Hcy (50 μ M) durante 5 días. Los paneles muestran en **A)** las imágenes fluorescentes correspondientes al control, las células expuestas a colesterol o Hcy y la intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias) de la tinción con filipina. El panel **B)** se muestra el aumento de los niveles de colesterol cuantificados usando el sistema Amplex Red (Molecular Probes) de lisados celulares completos. Los cambios en los niveles de colesterol se expresan como aumento en comparación con las células control. Cada barra representa la media \pm error estándar (ES) de las determinaciones por triplicado de cinco experimentos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control; prueba de Dunnett. Chol, colesterol; Hcy, homocisteína. Modificado de Mendoza-Oliva *et al.*, 2013 (153).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que un factor de riesgo reconocido en la EA es la acumulación de Hcy y este metabolito se relaciona con incrementos en el colesterol intracelular, resulta importante valorar el mecanismo por el cual la Hcy aumenta los niveles de colesterol en neuronas y determinar si estas condiciones pueden favorecer la sobreproducción de A β .

OBJETIVO GENERAL

Evaluar en células de neuroblastoma humano diferenciado los mecanismos por los cuales la Hcy induce la acumulación de colesterol y determinar su efecto sobre la sobreproducción de A β .

OBJETIVOS PARTICULARES

Estudiar el efecto de la Hcy en el metabolismo del colesterol neuronal

- Examinar el mecanismo por el cual la Hcy aumenta el colesterol en neuronas (síntesis y/o acumulación, captura).
- Determinar si existe algún cambio en la expresión de la enzima HMG-CoA reductasa después del tratamiento con Hcy.

Estudiar el efecto de la Hcy en el metabolismo del péptido A β

- Examinar la sobreproducción de A β en presencia de Hcy.
- Examinar la expresión de las enzimas involucradas en el procesamiento de la proteína APP en presencia de Hcy.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se usó una línea de neuroblastoma humano diferenciado a fenotipo neuronal. Las células se incubaron en presencia de colesterol y Hcy. Los experimentos se realizaron en presencia o ausencia de suero que contiene colesterol con el fin de valorar el efecto de la Hcy sobre la vía de síntesis de colesterol.

Cultivo de neuroblastoma humano

El estudio de los mecanismos que conducen a la disfunción neuronal y la pérdida celular en la EA ha sido la principal ventaja del uso de los sistemas *in vitro*. Además de los cultivos primarios (182, 183), se han usado líneas celulares de neuroblastoma humano tales como SH-SY5Y (184-187) para estudiar dichos mecanismos asociados con la EA.

El cultivo de neuroblastoma humano y su diferenciación a un fenotipo neuronal mediante la manipulación del medio de cultivo ofrece algunas ventajas a la experimentación. Dentro de estas se incluyen: la capacidad de expansión a gran escala antes de la diferenciación con relativa facilidad y el bajo costo del cultivo en comparación con las neuronas primarias de mamíferos, cuyo uso está más limitado (revisado en Kovalevich y Langford, 2013) (188). Además, las células de neuroblastoma humano expresan proteínas e isoformas específicas que no están inherentemente presentes en células primarias de roedores (188). La diferenciación neuronal de estas células implica una serie de eventos específicos, incluyendo la formación y extensión de procesos neuríticos, aumento de la excitabilidad de la membrana plasmática, la formación de sinapsis positivas a sinaptofisina y la inducción de proteínas específicas de neuronas, neurotransmisores y receptores (188, 189). La diferenciación sincroniza el ciclo celular para producir una población de células neuronales homogéneas (190) y evita la presencia de otras células derivadas de la cresta neuronal (191).

Para los experimentos *in vitro* de este trabajo se utilizó una línea celular no comercial de neuroblastoma humano (SMS-MSN) (192) (Fig 13A). Las SMS-MSN indiferenciadas, se mantuvieron creciendo en medio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen, CA, EUA) con aminoácidos no esenciales más suero fetal de cabra 10 % (Gibco Invitrogen, CA, EUA). Las células se cultivaron en cajas Petri o placas multipozos en

una atmósfera de 5 % de CO₂ a 37 °C y a una densidad de 1x10⁶ células/pozo. Los experimentos se hicieron usando SMS-MSN diferenciadas a fenotipo neuronal, para la cual 24 h después de sembradas las células fueron diferenciadas agregando al cultivo ácido retinoico (10 µM) y factor de crecimiento neuronal (NGF) (50 ng/mL) en condiciones normales de suero (10 %) y se dejaron incubando durante 5 días más hasta obtener una densidad celular apropiada. Al final de este periodo el medio de incubación fue reemplazado por medio fresco con 10 % de suero y las neuronas fueron expuestas a las diferentes condiciones experimentales planteadas. En otros experimentos, las células se incubaron con los tratamientos durante el proceso de diferenciación (5 días) y en medio libre de suero. Por Western blot corroboramos que las SMS-MSN diferenciadas en medio libre de suero expresan fuertemente el marcador nuclear específico de neuronas maduras NeuN (Neuronal Nuclei) (193) (Fig 13B). Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de Hcy (50-100 µM Sigma-Aldrich, MO, EUA) o colesterol (50 µM; Sigma-Aldrich, MO, EUA) disuelto en etanol (0.16 %).

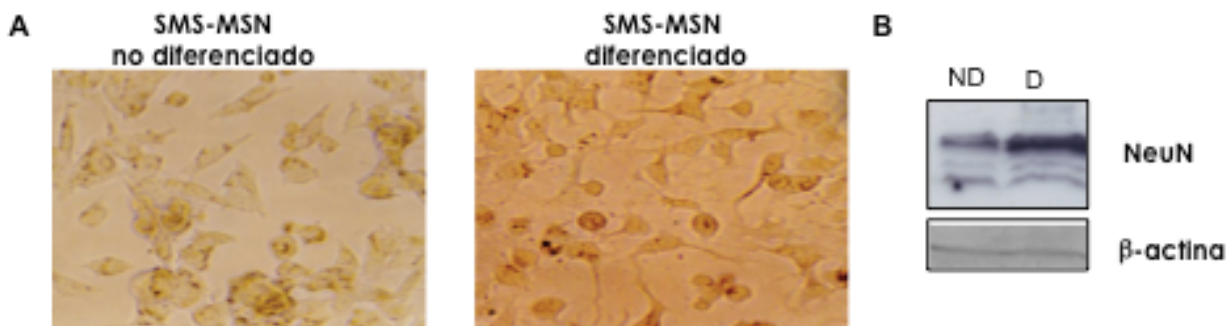


Fig 13 Células de neuroblastoma humano SMS-MSN

A) La línea celular de SMS-MSN se diferencia a neurona por la adición de ácido retinoico (10 µM) y factor de crecimiento neural (50 ng/mL). Imágenes obtenidas por microscopía de luz (contraste de fases) (10X). Donada por Q.F.B. Patricia Ferrera. **B)** Las SMS-MSN diferenciadas en medio sin suero presentan niveles mayores de NeuN (anticuerpo anti-NeuN; Chemicon International, Temecula, CA, EUA) ND, no diferenciadas; D, diferenciadas.

Evaluación de la viabilidad celular

Ensayo de reducción del MTT

Para analizar la toxicidad de los agentes empleados, se utilizó un procedimiento en el cual se cuantifica la viabilidad de las células (194). Este método mide la

actividad redox de la mitocondria a través de la conversión del compuesto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difenil-tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) a cristales de formazán durante las reacciones de la cadena respiratoria. De manera breve, el MTT se disolvió en PBS 1X a una concentración de 5 mg/mL y se agregó al cultivo de SMS-MSN en una razón de 1/10 (v/v). Las células se incubaron con el MTT durante 1 h a 37 °C. Al término de este tiempo, el medio fue retirado y los cristales de formazán se solubilizaron con alcohol isopropílico (0.8 mL). La absorbancia de cada muestra se cuantificó usando un espectrofotómetro a 570 nm (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA).

Ensayo muerte/vida

Este ensayo puede determinar la viabilidad de las células de una población basándose en la integridad de membrana plasmática y la actividad esterasa. La calceína (Calceína-AM), que no es fluorescente, penetra en las células vivas y es convertida por la actividad esterasa intracelular, en un compuesto polianiónico que fluoresce intensamente en verde. El homodímero de etidio (EthD-1) es un colorante rojo fluorescente que sólo puede penetrar las membranas celulares dañadas y aumenta su fluorescencia cuando se une a ácidos nucleicos. Las células capaces de excluir el EthD-1 se consideran como viables. Brevemente, las células se sembraron sobre cubreobjetos, se incubaron con los tratamientos, se lavaron con PBS 1X y sin fijar se tiñeron siguiendo las indicaciones del kit LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Las células se observaron inmediatamente al microscopio (20X) (Zeiss Axioskop 40; Oberkochen, Alemania).

Cuantificación de colesterol

La determinación de la concentración de colesterol se realizó mediante un ensayo colorimétrico-enzimático (Amplex Red Cholesterol Assay kit; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Esta tecnología puede detectar una concentración de colesterol de 200 nM (80 ng/mL) o menos y se puede utilizar para detectar colesterol libre y esterificado. Los ésteres de colesterol son hidrolizados por la colesterol esterasa liberando colesterol el cual es sustrato de la colesterol oxidasa; dicha reacción produce H₂O₂ y su cetona correspondiente. El H₂O₂ es detectado

con el reactivo 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (Amplex Red Reagent). El H_2O_2 en presencia de Amplex Red Reagent y la peroxidasa de horseradish (HPR) en una estequiometría 1:1 reacciona para dar el compuesto fluorescente resorufina la cual tiene poca interferencia con la autofluorescencia de la mayoría de las muestras biológicas.

De manera breve, al término del tratamiento las células se recolectaron en un amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Nonidet P40 1 %, desoxicolato 0.5 %, cocktail de inhibidores de proteasas (Complete™, Roche, Basel SUI) y se sometieron a 3 ciclos de sonicado. Cada ciclo consistió de 10 s de descargas a 40 kHz y 2 min de reposo, esto se realizó en hielo (4 °C). Una vez sonicadas las muestras, se determinó la concentración de proteína por el método de modificado de Lowry (195). Por cada condición se utilizaron 25 µg de proteína total para la cuantificación de colesterol.

El experimento se realizó en oscuridad, las muestras se diluyeron en el amortiguador de reacción después de que un volumen equivalente que contenía al reactivo Amplex Red Reagent y el cocktail de enzimas se agregó (300 µM Amplex Red, 2 U/mL de colesterol oxidasa, 2 U/mL de colesterol esterasa y 2 U/mL de HPR). Posteriormente, las muestras se colocaron en placas de ELISA y se incubaron durante 30 min a 37 °C en oscuridad. La absorbancia de la resorufina que es el producto final de la reacción se midió a 535 nm en un espectrofotómetro (microplate reader, model 550; Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Los valores de colesterol se calcularon usando las concentraciones de colesterol conocidas y se normalizaron los valores por el contenido de proteína.

Captura de BODIPY-FL-LDL

Para analizar la incorporación de LDL a las células, se usaron LDL marcadas con BODIPY (boron-dipirrometano) (BODIPY- FL-LDL). Las células fueron sembradas y posteriormente crecidas sobre cubreobjetos en medio sin suero por 12 h. A continuación, las células se incubaron en medio fresco que contenía 10 µg/mL de BODIPY-FL-LDL (Molecular Probes, OR, EUA) en presencia o ausencia de Hcy. Las células se incubaron en oscuridad a 37 °C por diferentes tiempos (5, 12, 18, 24, y 72 h). Después de la incubación, la fluorescencia de las LDL que se incorporaron a

las células se midió utilizando un espectrofotómetro (Ab 485 nm, Em 530 nm) con lámpara de xenón (Synergy H4 microplate reader, BioTek; VT, EUA). En otro experimento, después del tratamiento de 24 h con Hcy las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 1 %. La captura de BODIPY-FL-LDL (Ab 515 nm, Em 520 nm) se detectó usando un microscopio confocal DSU a 100X. Cinco Z-pilas consecutivas de las imágenes de fluorescencia y 5 Z-pilas del campo claro se acoplaron en una sola imagen utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA.)

Electroforesis

Transcurrido el periodo de tratamiento, las células se cosecharon usando un buffer de lisis y se cuantificó proteína como se explicó anteriormente. Posteriormente, se cargó proteína disuelta en un buffer de muestra en condiciones reductoras con 2- β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.05 % y dodecil sulfato de sodio (SDS) (10 % p/v). La concentración de proteína se especifica en cada experimento. Las muestras se hirvieron durante 10 min a 95 °C. Se utilizó gel al 10 % de acrilamida-SDS, el cual se corrió a voltaje constante, 50 V por 30 min y 100 V por 2 h en un buffer de corrida (tris-base, glicina y SDS pH 8.3).

El gel se equilibró en el buffer de transferencia (25 mM tris-base, 192 mM glicina, metanol 20 %) durante 5 min al igual que la membrana de transferencia (Hybond ECL Nitrocellulose, Amersham Pharmacia Biotech, IL). Cuando se cargaron 25-30 μ g de proteína la transferencia se llevó a cabo en un sistema de cámara semiseca durante 1 h a 25 V, para cargas de proteína mayores se transfirió en cámara húmeda por 8-10 h a 30 V a 4 °C.

Western blot

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó a temperatura ambiente por 2 h con PBS 1X-leche descremada al 5 %. Posteriormente la membrana se incubó a 4 °C toda la noche con los anticuerpos primarios: anti-HMG-CoA reductasa (sc-27578, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), anticuerpo monoclonal anti-Alzheimer Precursor Protein A4 (22C11) (Chemicon International, Temecula, CA, EUA), monoclonal anti-BACE-1 (Chemicon International) y monoclonal anti- β -actina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Las concentraciones de anticuerpo se

detallan en cada experimento. Después de 3 lavados de 5 min con PBS 1X/Tween-20 0.1 %, la membrana se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (cabra anti-ratón IgG (1:10,000–50,000; Santa Cruz Biotechnology). La membrana se lavó (3 veces/5 min) con PBS 1X/0.1 % Tween-20 para ser revelada por quimioluminiscencia (ECL kit; EMD Millipore, Temecula, CA, EUA). La detección se realizó por medio de un film Kodak. El análisis densitométrico se llevó a cabo por medio del software Image J (NIH). Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de densidad óptica (ODU).

Inmunofluorescencia

Las células SMS-MSN fueron cultivadas sobre cubreobjetos. Al concluir los distintos tratamientos, se hicieron 2 lavados con PBS 1X durante 5 min. Después se fijaron durante 20 minutos con paraformaldehído al 4 % y nuevamente se lavaron (2 veces/5 min en PBS 1X). Las células se permeabilizaron con una solución de PBS 1X/Tritón X-100 0.1 % durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron toda la noche en solución de bloqueo (PBS 1X/BSA 5 %). Después, las células se incubaron por 24 h con anti-HMG-CoA reductasa 1:100 (sc-27578, Santa Cruz Biotechnology). Se hicieron 3 lavados de 5 min en PBS 1X e inmediatamente después las células se incubaron en oscuridad durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario Alexa Fluor-546 (1:300, 1:300; Molecular Probes). Se incubaron por 20 min con faloidina para detectar actina y finalmente las células se lavaron con PBS 1X. Las células se analizaron con un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioscop 40, Oberkochen, Germany). El control negativo se obtuvo por la omisión del anticuerpo primario.

qRT-PCR

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa cuantitativa (qRT-PCR) para medir los niveles del mensajero del ácido ribonucleico (RNA) (mRNA) de HMG-CoA reductasa (humana), usando los valores del mRNA de β -actina (humana) para normalizar los datos. A partir de 1 μ g de RNA se sintetizó el DNA codificante (cDNA) usando la enzima reverso-transcriptasa del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV RT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) según las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones: se usó

una concentración final de oligonucleótidos al azar de 150 ng/μL, 7.5 ng/μL de oligonucleótido dT20, 10 mM de dNTPs, 0.1 M de DTT y 100 unidades de la enzima M-MLV RT en un volumen final de 20 μL por reacción. La reacción de PCR en tiempo real fue llevada a cabo en un equipo Rotor-gene Q (Qiagen, Valencia, CA, EUA) usando el kit SYBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen) y se usó una concentración de 200 nM de cada oligonucleótido en un volumen final de 20 μL por reacción.

La amplificación por qRT-PCR se llevó a cabo bajo los siguientes parámetros: incubación de 50 °C por 2 min, activación a 95 °C por 10 min, con 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s y alineación con los oligos para HMG-CoA reductasa y β-actina a 60 °C por 60 s, con elongación final a 72 °C por 2 min. La especificidad de los productos amplificados se comprobó por el análisis de las curvas de fusión. El rango de temperatura para el análisis de las curvas de fusión fue de 50 °C - 99 °C durante 5 s (imagen no mostrada). Los oligonucleótidos que se usaron para HMG-CoA reductasa humana: F 5' -TACCATGTCAGGGGTACGTC-3' y R 5' -CAAGCCTAGAGACATAATCATC-3' (247 pb) y para β-actina humana: F 5' -TGAAGGTGACAGCAGTCGGTTG-3' y R 5' -GGCTTTAGGATGGCAAGGGAC-3' (146 pb) fueron sintetizados por Sigma-Aldrich. Los resultados fueron analizados con el método propuesto por Pfaffl, 2001 (196).

Cuantificación de Aβ por ELISA

Los niveles de Aβ_[1-42] la forma más tóxica del péptido y de Aβ_[1-40] la forma más abundante se determinaron usando un ensayo ELISA de tipo sándwich específico para cada forma de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Después de tratar las células el medio de cultivo se recolectó y las muestras se analizaron usando dicho kit. La concentración de Aβ se detectó mediante la lectura de las densidades ópticas a 450 nm en un espectrofotómetro (microplate reader 550, BioRad). Los resultados expresan los niveles de cambio en comparación de los valores control.

RESULTADOS PARTE I

Estrategia para dilucidar el mecanismo de aumento de colesterol por Hcy

En un reporte anterior mostramos que incubando a las células SMS-MSN por un lapso de cinco días con Hcy (50 μ M) durante el proceso de diferenciación se observa un aumento en la concentración celular de colesterol con respecto al control (Fig 12) (153). El medio de cultivo adicionado con 10 % de suero en el cual se incubaron las células en estos experimentos contenía colesterol (51.16 mg/L) (Fig 18). Con el fin de examinar si el incremento celular de colesterol observado en presencia de Hcy se deba a un aumento en la captura de colesterol del medio o a la posibilidad de que la Hcy induzca la vía de síntesis de colesterol consideramos importante realizar estos experimentos en un medio sin colesterol. Para esto, decidimos utilizar el mismo medio de cultivo pero sin la adición de suero.

Efecto de la Hcy sobre la viabilidad neuronal

Después del tratamiento con colesterol (50 μ M) y Hcy (50 y 100 μ M) por 5 días en medio de cultivo sin suero analizamos la viabilidad celular por dos ensayos: reducción de MTT y viabilidad/citotoxicidad. En el ensayo de MTT, observamos, que al igual que en trabajos reportados anteriormente el colesterol disminuye la viabilidad celular (en un 30 % con respecto al control) (Fig 14). Con este mismo tratamiento en el ensayo viabilidad/citotoxicidad observamos mayor número de células muertas con respecto al control que son positivas al EthD-1 (Fig 15). En estas condiciones de cultivo, observamos que la Hcy en el ensayo de MTT no disminuye la capacidad reductora de la célula (Fig 14) y en el de viabilidad/citotoxicidad no se observa mayor número de células muertas con respecto al control (Fig 15).

Con respecto al resultado de la viabilidad celular después del tratamiento por Hcy, observamos que este efecto, entre otros posibles factores, depende de la concentración de suero del medio, ya que en las células incubadas con 10 % de suero, la Hcy sí disminuye la viabilidad celular (153). Apoyando este resultado, en una publicación anterior (153) hemos mostrado que existen efectos diferenciales de la toxicidad mediada por Hcy, los cuales son dependientes de la

concentración y de la diferenciación neuronal, siendo que las células diferenciadas expresan mayores niveles del receptor de NMDA (197) y son más susceptibles al daño por Hcy (153, 197).

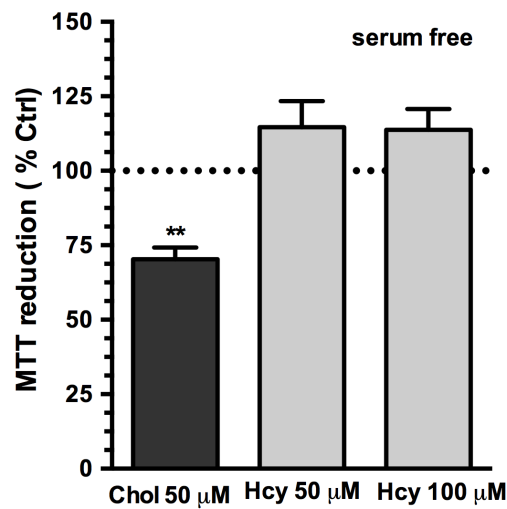


Fig 14 Efecto del colesterol y Hcy sobre la actividad reductora de la mitocondria en células SMS-MSN cultivadas sin suero

Las células se trataron con colesterol (50 μ M) o Hcy (50 μ M y 100 μ M) durante 5 días en medio sin suero. Los datos expresan los porcentajes con respecto al control (línea superior punteada) en la reducción de MTT. Se grafica el promedio obtenido de cada condición \pm ES de 5-6 experimentos independientes realizados por triplicado. ** $P < 0.01$ vs control; prueba de Dunnet. Chol, colesterol; Hcy, homocisteína.

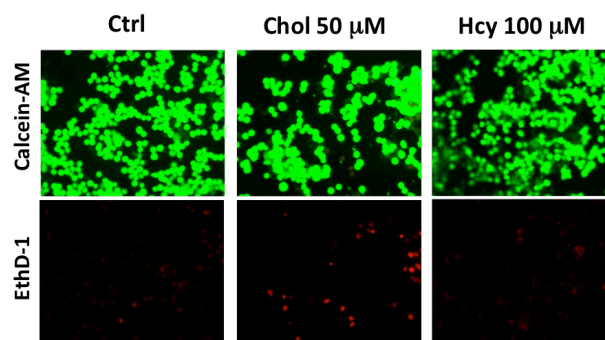


Fig 15 Efecto del colesterol y Hcy en la viabilidad/citotoxicidad

Las células vivas son positivas a Calceína-AM (verde) y las muertas a EthD-1 (rojo). Las células se incubaron con los tratamientos indicados durante 5 días en medio sin suero, se lavaron con PBS 1X, se fijaron y se tiñeron siguiendo las indicaciones del kit viability/cytotoxicity de Molecular Probes. Las células se observaron inmediatamente al microscopio (20X). Ctrl, control; Chol, colesterol; Hcy, homocisteína.

Efecto de la Hcy sobre los niveles de colesterol en SMS-MSN

En un artículo anterior mostramos que la Hcy puede inducir la acumulación de colesterol en células de neuroblastoma humano SMS-MSN cultivadas en medio con 10 % de suero (153) (Fig 12). En este trabajo examinamos el contenido de colesterol de las células incubadas en ausencia de suero y en presencia de Hcy.

Detectamos el colesterol intracelular mediante un ensayo colorimétrico-enzimático, después de someter a las células a los tratamientos durante 5 días. El incremento en el contenido de colesterol se calculó en porcentaje con respecto al control (100 %). Con el colesterol (50 μ M) directamente añadido a las células se registraron los valores más altos (Fig 16). En ausencia de suero no observamos un cambio significativo en el contenido de colesterol con el tratamiento de Hcy (50 μ M y 100 μ M) (Fig 16).

Este resultado fue uno de los primeros indicios de que la Hcy no aumentaba el colesterol neuronal por la vía de la síntesis. Sin embargo, continuamos analizando su efecto en la vía para corroborar estos resultados.

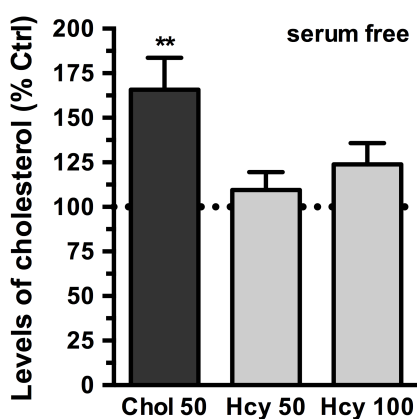


Fig 16 Determinación de la acumulación de colesterol en SMS-MSN incubadas en medio sin suero

Las células se trataron con colesterol (50 μ M) o Hcy (50 μ M y 100 μ M) durante 5 días. Los niveles de colesterol se determinaron usando el sistema Amplex Red (Molecular Probes). Los datos expresan los cambios en el porcentaje de colesterol con respecto a la condición control (línea punteada). Se grafica el promedio obtenido \pm ES de 5-6 experimentos realizados por triplicado. ** $P < 0.01$ vs control; prueba de Dunnet. Chol, colesterol; Hcy, homocisteína.

Efecto de la Hcy en el contenido de la HMG-CoA reductasa

Para evaluar si la Hcy tenía algún efecto en el contenido de la HMG-CoA reductasa, analizamos primero la expresión basal de la enzima en las neuronas SMS-MSN y posteriormente el efecto de la Hcy en su expresión. Observamos que la expresión basal de la enzima es baja, pero comprobamos que está presente en las células SMS-MSN diferenciadas (Fig 17A).

El anticuerpo (sc-27578, Santa Cruz Biotechnology) que utilizamos reconoce la porción carboxilo terminal (589-888 aa) de la HMG-CoA reductasa humana. En el Western blot observamos la banda que corresponde al monómero de la enzima de un peso molecular esperado de 80-97 kDa dependiendo de la glicosilación de la proteína y otra que corresponde a uno de los productos de degradación con un peso molecular de 40-55 kDa (Fig 17A). Sin embargo, observamos que la expresión de HMG-CoA reductasa en la condición control y con los tratamientos de colesterol y Hcy es similar (Fig 17A) descartando algún efecto de la Hcy sobre el contenido de la enzima. En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de los diferentes experimentos. También corroboramos la expresión de la HMG-CoA reductasa en SMS-MSN mediante inmunofluorescencia (Fig 17B). Brevemente, las células se fijaron, se incubaron con el anticuerpo primario anti-HMG-CoA reductasa (1:100) y posteriormente con el anticuerpo secundario Alexa Fluor-546 (rojo) que se usó 1:300, la actina se detectó con faloidina (verde). No se observaron cambios en la expresión de la proteína con colesterol (50 μ M) y Hcy (100 μ M) (Fig 17B).

Además del análisis de la expresión de la proteína HMG-CoA reductasa mediante Western blot e inmunofluorescencia también examinamos si había algún cambio en la expresión del mRNA de HMG-CoA reductasa por Hcy. El tiempo de incubación con los tratamientos control, colesterol (50 μ M) y Hcy (100 μ M) fue de 18 h y tampoco se observaron cambios en la expresión de mRNA (Fig 17 C).

Los resultados de estos experimentos indican que las células SMS-MSN diferenciadas sí expresan la enzima HMG-CoA reductasa pero la Hcy no induce la expresión del gen, ni aumenta la concentración de la proteína. Además de que no observamos un aumento de colesterol en las células incubadas en ausencia

de suero en presencia de Hcy, estos resultados en conjunto mostraron que el mecanismo de síntesis probablemente no es el principal involucrado en el aumento de colesterol por Hcy y que este efecto puede deberse al aumento de la captura de colesterol del medio. Lo siguiente que se realizó fue estudiar si la Hcy aumentaba el contenido de colesterol debida a la incorporación de colesterol-LDL del medio de cultivo. Lo primero que se realizó en esta siguiente fase fue determinar la concentración de colesterol del medio de cultivo.

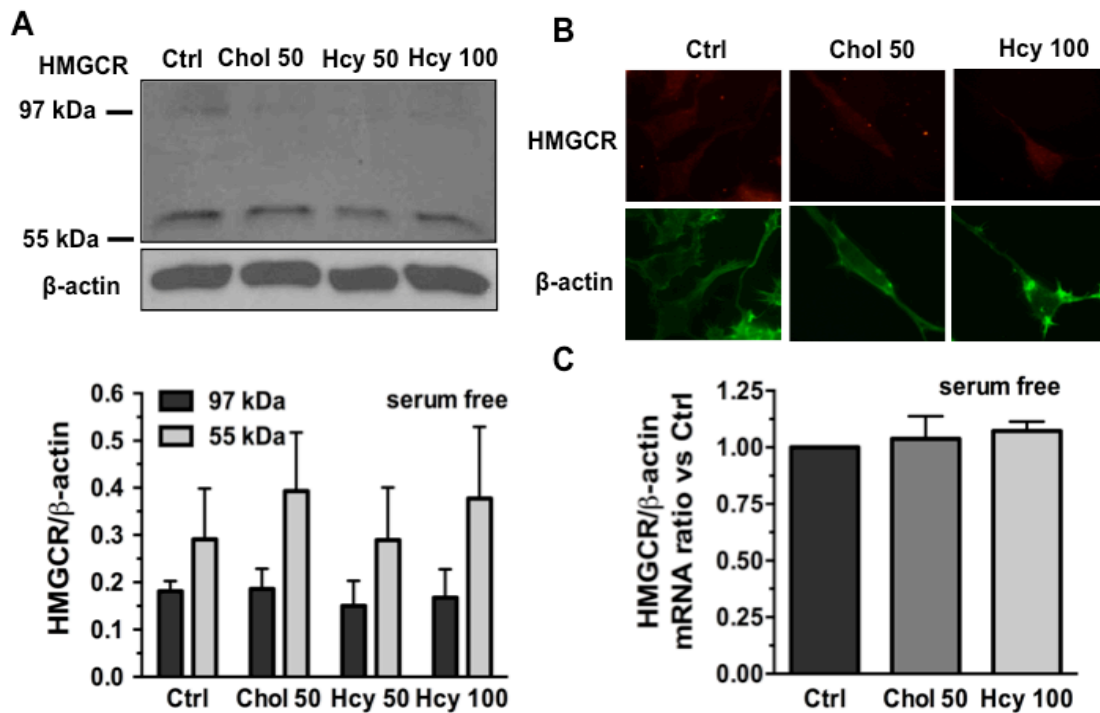


Fig 17 Análisis por Western blot de HMG-CoA reductasa en células SMS-MSN mantenidas en medio sin suero

A) Western blot para HMG-CoA reductasa (HMGCR) en células SMS-MSN después del tratamiento con Hcy (50 y 100 μ M) en medio libre de suero por 5 días. Panel superior: SDS-PAGE 10 %. Anticuerpo anti-HMGCR humana (1:100), el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa: cabra anti-ratón IgG se usó 1:6000. Se cargaron 100 μ g de proteína en cada carril. Panel inferior: Representación del análisis densitométrico de la expresión de HMGCR. Se grafica el promedio \pm ES de 4-6 experimentos, Las gráficas muestran el análisis densitométrico de los niveles de HMGCR (dos bandas: ~97 y 55 kDa). Los resultados se normalizaron con el control de carga (β -actina) **B)** Inmunofluorescencia de HMGCR después del tratamiento con colesterol (50 μ M) y Hcy (100 μ M). Panel superior: HMGCR, anti- HMGCR (1:100) y Alexa Fluor-546 (1:300, rojo). Panel inferior: actina detectada con faloidina (verde). **C)** Expresión del mRNA HMGCR. Las células de SMS-MSN se incubaron en medio sin suero con colesterol (50 μ M) o Hcy (100 μ M) por 18 h. Se extrajo el RNA total y se transcribió a cDNA que se usó para el análisis de qRT-PCR. La expresión de HMGCR fue normalizada con la expresión del gen control β -actina. Los cambios en los niveles del mRNA de

HMG-CoA reductasa se expresan como aumento en comparación con las células control. Cada barra representa la media \pm ES de las determinaciones por triplicado de tres experimentos. Ctrl, control; Chol, colesterol; Hcy, homocisteína; HMGCR, HMG-CoA reductasa.

Cuantificación de colesterol del medio

Usando un ensayo colorimétrico-enzimático determinamos que la concentración de colesterol total del medio con 10 % de suero es de alrededor de 51.16 mg/L. La mayor parte del colesterol se encuentra en forma esterificada (43.13 mg/L) y una pequeña parte en forma libre (2.04 mg/L) (153) (Fig 18).

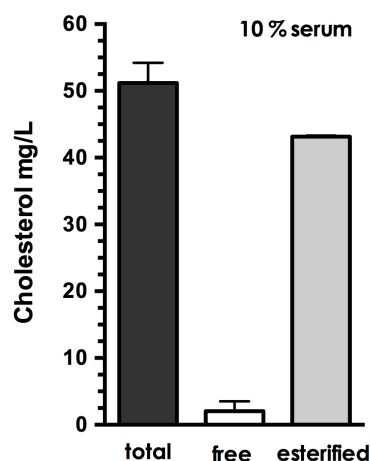


Fig 18 Determinación de colesterol total y libre en medio de cultivo con 10 % de suero

La cantidad de colesterol en el medio de cultivo se determinó usando el sistema Amplex Red (Molecular Probes). El método puede detectar colesterol esterificado y libre. Se grafica el contenido de colesterol total, esterificado y libre (mg/L) de 2-6 experimentos realizados por triplicado.

Efecto de la Hcy en la captura de BODIPY-FL LDL

En el siguiente experimento analizamos si la Hcy podía aumentar la captura de colesterol de medio de cultivo. La estrategia que siguió consistió en incubar a las células en medio sin suero pero con la adición de LDL fluorescentes (BODIPY-FL-LDL, Molecular Probes). Las células fueron sembradas en condiciones normales de suero (10 %) y se dejaron adherir a la placa por 24 h. Posteriormente, este medio de cultivo fue reemplazado por medio sin suero y las células se dejaron incubando por 12 h más. Finalizado este tiempo, este medio de cultivo fue retirado. El experimento consistió en un curso-temporal (5, 12, 18, 24 y 72 h) de incubación con medio sin suero adicionado con 10 μ g/mL de BODIPY-FL-LDL en ausencia (control) o presencia de Hcy (Fig 19A). Las incubaciones se realizaron en

oscuridad a 37 °C. Después de la incubación se cuantificó la intensidad de fluorescencia de las partículas BODIPY-FL-LDL. Como podemos observar en la Fig 19A la intensidad de fluorescencia cuantificada incrementó en función del tiempo y a las 24 h de incubación se detectó una mayor fluorescencia con el tratamiento de Hcy. En la Fig 19B, se muestra una imagen de las partículas BODIPY-FL-LDL que se incorporaron a las células control y tratadas con Hcy por 24 h.

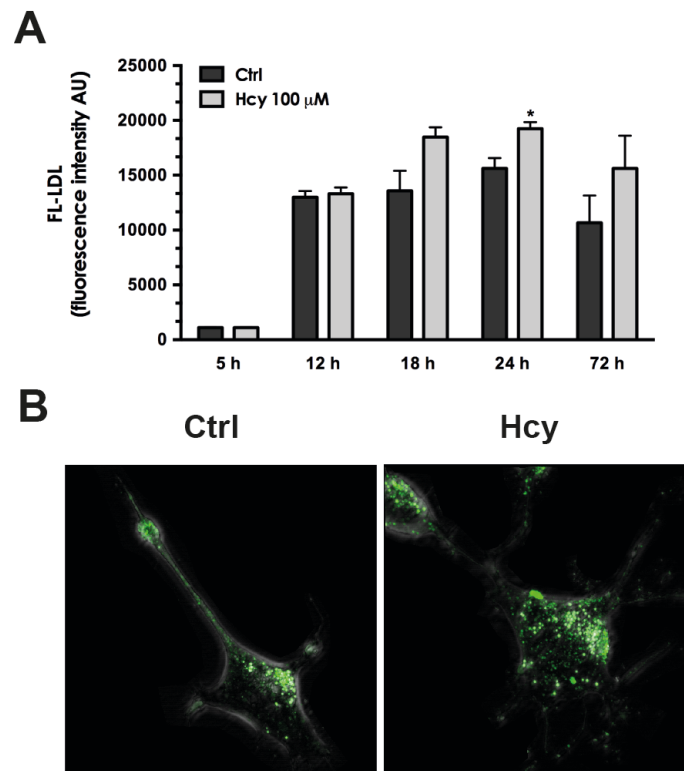


Fig 19 Efecto de la Hcy en la Incorporación de BODIPY-FL-LDL en las células SMS-MSN. Las células SMS-MSN fueron tratadas en ausencia (Ctrl) o presencia de Hcy (100 μM) por 5, 12, 18, 24 y 72 h en medio sin suero adicionado con 10 μg/mL de BODIPY-FL-LDL en oscuridad a 37 °C. **A)** Las células fueron lavadas con PBS 1X, la incorporación de LDL intracelular se detectó usando un espectrofotómetro de fluorescencia a 485/530 nm. Se graficó la media ± ES de 3 experimentos * $p < 0.1$ vs. Ctrl 24. **B)** La captura de LDL fue detectada por fluorescencia usando un microscopio confocal con un aumento de 100X. 5 Z-pilas fueron acopladas en una sola imagen con 5 Z-pilas de campo claro utilizando el software Image J. Ctrl, control; Hcy, homocisteína.

Efecto de la Hcy en producción A β

Para contribuir al estudio de la relación del metabolismo del colesterol y la Hcy con su posible participación en la sobreproducción de A β , en este trabajo se cuantificó la producción de A β (Fig 20) y analizó la expresión de la proteína APP y BACE-1 (Fig 21) en la condición donde la Hcy aumenta el contenido de colesterol

intracelular. En estos experimentos las células se incubaron durante 24 h y 5 días en medio con 10 % suero. Se recuperó el medio de cultivo y se cuantificó el A β secretado al medio de cultivo.

Los niveles de A β _[1-42], la forma más tóxica del péptido y de A β _[1-40], la forma más abundante se determinaron del medio de cultivo por un ensayo de ELISA. Los resultados expresan los niveles de cambio en comparación de los valores control. No observamos un cambio significativo en el aumento de la concentración de A β en las condiciones analizadas (Fig 20).

El análisis por Western blot no mostró un cambio significativo en el contenido de APP después del tratamiento con colesterol (50 μ M) o Hcy (50 μ M) a las 24 h de tratamiento (Fig 21) ni a los 5 días (datos no mostrados). Para el caso de la expresión de BACE-1 se observó una tendencia hacia el aumento en los niveles de esta proteína (Fig 21), sin embargo, tampoco se observó aumento en la actividad de la enzima (datos no mostrados).

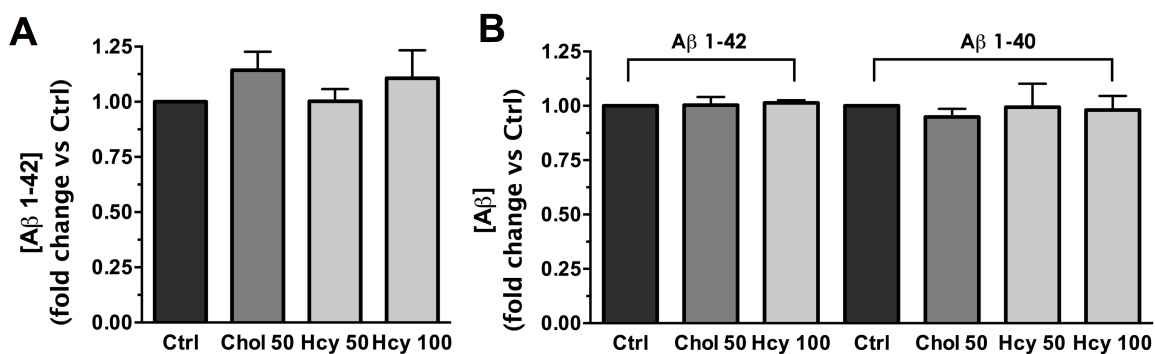


Fig 20 Determinación de A β del medio de cultivo 10 % suero

Las células se incubaron por **A**) 24 h y **B**) 5 días con los tratamientos control, colesterol (50 μ M) o Hcy (50 y 100 μ M), posteriormente el medio de cultivo se recolectó y se analizó el contenido de A β _[1-40] y A β _[1-42] por ELISA tipo sándwich, según especificaciones del fabricante (Invitrogen). Se muestra el cambio de concentración de A β con respecto a la condición control, se grafica el promedio \pm ES de las determinaciones por duplicado de 3 experimentos. Ctrl, control; Chol, colesterol; Hcy, homocisteína.

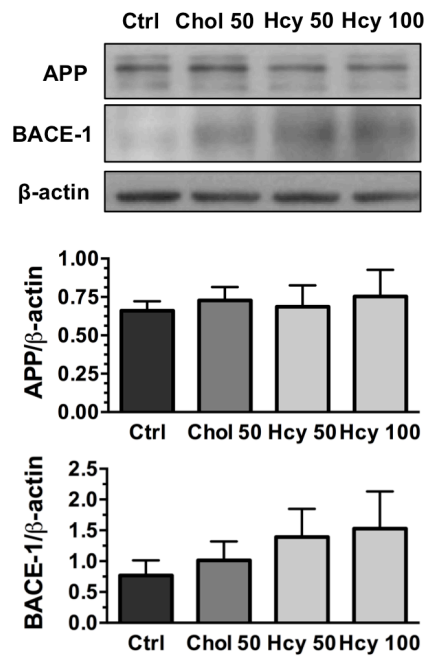


Fig 21 Análisis por Western blot de la expresión de APP y BACE-1 en lisados completos de células SMS-MSN mantenidas en medio con 10 % de suero.

Western blot de APP (~110 -130 kDa dependiendo de su glicosilación) y BACE-1 (~70 kDa). Las células se incubaron por 24 h con los tratamientos control, colesterol (50 μ M) y Hcy (50 y 100 μ M). Se cargaron 25 μ g de proteína en cada carril. Ctrl, control; Chol, colesterol; Hcy; homocisteína.

DISCUSIÓN

Un aspecto importante para entender la etiología de la EA se refiere a analizar los factores de riesgo que pueden incidir durante el proceso del envejecimiento y promover la aparición de marcadores histopatológicos. Existe evidencia de que el colesterol puede jugar un papel importante en aumentar el procesamiento amiloidogénico y favorecer la sobreproducción de A β (146-149) o bien, participar como sustrato oxidante que promueva aún más la neurotoxicidad de este péptido (153).

Aunque la regulación y desregulación del colesterol sistémico se conocen con cierto detalle, poco se sabe acerca de la regulación del colesterol cerebral (10). Las evidencias que sugieren una relación entre el metabolismo del colesterol y la EA son extensas (7, 8, 136, 139), sin embargo, el análisis de estos hallazgos debe tener en cuenta que el paso del colesterol desde la periferia al cerebro está limitado por la BHE (10). Es por eso que estudiar los mecanismos neuronales involucrados en el aumento de colesterol permitirán un mejor entendimiento de su papel patogénico.

Un metabolito cuyos niveles elevados generalmente se asocian con el aumento en el contenido de colesterol celular es la Hcy (14, 15, 179-181). La concentración fisiológica de Hcy en el cerebro es de 10 μ M (198). En condiciones patológicas, como en isquemia cerebral puede alcanzar concentraciones de 50 μ M (199) mientras que en condiciones de hiperhomocisteinemia leve y moderada las concentraciones en el plasma van de 10 a 30 ó de 30 a 100 μ M, respectivamente (200, 201). Las concentraciones de Hcy pueden aumentar entre otras causas, si las concentraciones de ácido fólico, vitaminas B6 y B12 se encuentran por debajo de los límites normales (159, 160, 162). A diferencia del colesterol, la Hcy puede cruzar la BHE (164, 202, 203) y también puede formarse en el SNC (204).

Existe evidencia de que el aumento la concentración de Hcy acompaña la progresión de varias enfermedades neurodegenerativas como la EA (171, 205, 206). Sin embargo, el mecanismo molecular de su papel en la etiopatogenia de esta enfermedad aun no se ha aclarado. Una dosis de Hcy (50 μ M) relacionada con las concentraciones patológicas que se pueden alcanzar en un sujeto, es

suficiente para incrementar el colesterol neuronal (153). En esta tesis distinguimos entre los posibles mecanismos implicados en el aumento de colesterol por Hcy: síntesis de colesterol, acumulación y/o captura de LDL.

En un principio nos enfocamos en examinar si la Hcy inducía la vía de síntesis de colesterol en SMS-MSN, ya que existía evidencia en la literatura de que la Hcy incrementaba la expresión y actividad de la HMG-CoA reductasa así como de factores transcripcionales de esta vía en modelos no neuronales (14, 15, 179, 180). Suponíamos que la Hcy producía un cambio en la expresión génica de estas enzimas ya que el aumento de colesterol se observó después de un tratamiento crónico con Hcy (153). Sin embargo, en estos experimentos demostramos que la Hcy no incrementa la expresión de la HMG-CoA reductasa, ni su contenido proteico (Fig 17) a diferencia de lo reportado en otros trabajos en tejido hepático (14, 181). Fue interesante encontrar que, si bien la Hcy no modifica la expresión de la HMG-CoA reductasa, si participó en incrementar la captura y/o acumulación de LDL del medio de cultivo al interior de las neuronas (Fig 19), sugiriendo que este puede ser un mecanismo patológico de aumento de colesterol en el SNC. Este mecanismo de acumulación de LDL por Hcy ha sido descrito en macrófagos y células endoteliales en asociación con la inducción de placas ateroscleróticas (207, 208). Con base en estos resultados proponemos que el aumento de colesterol por Hcy es resultado de la captura y/o acumulación inapropiadamente incrementada de LDL, sin embargo aún queda por dilucidar cómo se produce esta alteración.

En esta condición *in vitro*, las SMS-MSN incorporan el colesterol de las lipoproteínas del medio de cultivo, sin mostrar algún efecto detectable sobre la vía de síntesis de colesterol (Fig 17). Este mecanismo concuerda con evidencias anteriores donde en las neuronas maduras la síntesis está disminuida y el colesterol se obtienen de la glía (87-90). Resulta interesante ahondar en la participación de la glía, particularmente los astrocitos en la regulación del colesterol y su transporte hacia las neuronas.

Recientemente se ha encontrado una asociación entre los niveles totales de Hcy y la incidencia de demencia analizada por estudios de resonancia magnética

(MRI) (209) lo que cobra relevancia a la luz de nuestros hallazgos en cuanto a la asociación de Hcy con una mayor acumulación de colesterol neuronal. Sin embargo, al momento no tenemos datos concluyentes sobre la asociación de la Hcy en relación con incrementar la producción del péptido A β (Fig 20 y 21).

La Hcy actúa como una neurotoxina por ejercer varios efectos adversos sobre las neuronas (210). Existen los efectos diferenciales de la toxicidad por Hcy, en donde se ha observado que esta toxicidad es dependiente de la concentración y de la diferenciación neuronal, siendo las células diferenciadas que expresan mayores niveles de receptor NMDA más susceptibles al daño por Hcy (153, 197). También existe evidencia que en algunos tipos celulares hay un efecto contrario, esto es un aumento de la viabilidad celular en presencia de Hcy (211, 212). Con nuestros resultados mostramos que la toxicidad mediada por Hcy también depende de la presencia de algunos componentes del suero (como el colesterol) ya que en ausencia de suero, la Hcy no aumenta el colesterol (Fig 16), y no resulta neurotóxica (Fig 14 y 15) a diferencia de las células incubadas con suero 10 % (que presentan colesterol) donde las neuronas si son susceptibles (153). Como mostramos anteriormente este aumento de neurotoxicidad con colesterol involucra mayor formación de ERO (153).

En resumen, en esta tesis se analizó *in vitro* una situación asociada con la EA, el aumento en la concentración de la Hcy. El incremento en la captura y/o acumulación de colesterol por Hcy es un hallazgo interesante debido a que representa una condición patológica neuronal que puede ocurrir de forma endógena en el cerebro y es una conexión entre el metabolismo del colesterol plasmático y cerebral, una cuestión aún no resuelta de la desregulación del colesterol en la EA.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que la Hcy puede contribuir a la etiopatogenia de la EA a través del aumento en la concentración de colesterol neuronal mediante un mecanismo que involucra la acumulación y/o captura de colesterol de lipoproteínas creando así un ambiente celular de mayor vulnerabilidad. Al contrario de lo que se había mostrado en otros modelos celulares, en las SMS-MSN diferenciadas la Hcy no incrementa el colesterol por inducción de la vía de síntesis, ya que como observamos la Hcy no aumenta el mRNA ni la proteína HMG-CoA reductasa. Proponemos que el aumento de colesterol neuronal endógeno por Hcy puede contribuir a la muerte neuronal en EA y representar un vínculo en la desregulación del metabolismo de colesterol plasmático y cerebral presente en EA, aún queda por esclarecer su papel en la formación de marcadores histopatológicos como el A β .

PARTE II

PAPEL DEL COLESTEROL EN EL METABOLISMO DE A β Y EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA DE SÍNTESIS DE COLESTEROL POR LOVASTATINA EN SNC

Las estatinas como posibles fármacos para la prevención y/o tratamiento de la EA

Las estatinas son inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa, la enzima limitante en la biosíntesis de colesterol (213, 214). En vista de que varios estudios han demostrado una correlación positiva entre el colesterol alto y un aumento en el riesgo de desarrollar EA (21, 22) las estatinas se han propuesto como fármacos alternativos para su tratamiento y/o prevención .

Sin embargo, trabajos epidemiológicos y experimentales que han examinado los efectos benéficos de las estatinas en la prevención de EA han mostrado resultados controversiales (25, 26). Aunque tienen propiedades hipolipemiantes, las estatinas también presentan efectos pleiotrópicos que no están relacionados con la reducción de colesterol y tienen una amplia gama de implicaciones biológicas cuyas consecuencias en la función cerebral no se han caracterizado completamente (66). Diferentes trabajos han informado tanto de los efectos benéficos como tóxicos de las estatinas en el SNC. En Mendoza-Oliva *et al.*, 2014 (66) revisamos estos estudios y mostramos que los efectos de las estatinas en el cerebro son amplios y complejos y que su uso para el tratamiento de varias enfermedades, incluyendo la EA debe ser cuidadosamente considerado (ver pág 125).

Estudios en pacientes con EA (215) y en modelos animales han mostrado que la simvastatina o pravastatina reducen los niveles de A β tanto en líquido cefalorraquídeo (LCR) y en el cerebro (216) y disminuyen la síntesis de colesterol sin alterar el contenido de colesterol cerebral (217). En neuronas cultivadas la Lov también reduce los niveles de A β pero sin disminuir la concentración total de colesterol (218). La Lov y simvastatina pueden reducir los niveles de 24-OHC en plasma (219) y en LCR de pacientes con EA (215). En otros reportes, se ha mostrado que las estatinas pueden reducir los niveles de colesterol membranar en el cerebro y afectar su distribución en las membranas sinaptosomales (220, 221). La Lov y el metil- β -ciclodextrina (M β CD), un compuesto que extrae colesterol de

las membranas alteran la función de los complejos de proteínas asociadas a las balsas lipídicas en las neuronas (23). La Lov y la simvastatina reducen la secreción de APOE de las células gliales a través de la inhibición en la prenilación de proteínas (222). Varias estatinas (Lov, pravastatina y simvastatina) también afectan la expresión de genes implicados en el crecimiento celular, la señalización y el tráfico de colesterol en el cerebro de ratón. Por lo tanto, muchos de los efectos reportados de las estatinas en el cerebro o neuronas cultivadas dependen de su capacidad para inhibir la vía de colesterol. A pesar del uso generalizado de las estatinas, las consecuencias de la inhibición de la síntesis de colesterol y las moléculas intermediarias en el SNC no se han elucidado todavía.

Con el aumento de las ECV en los próximos años, se espera que la prescripción y el uso de las estatinas aumente. De aquí, la necesidad de regular el consumo de estatinas a fin de evitar su abuso y eliminar la automedicación. Actualmente, no hay evidencia sólida para apoyar el uso de las estatinas para el tratamiento o prevención de enfermedades neurodegenerativas tales como la EA. Varios mecanismos relacionados principalmente con la inhibición de la HMG-CoA reductasa, se han propuesto para dar cuenta de los efectos perjudiciales de las estatinas en el SNC. Los datos que apuntan a la eficacia de las estatinas para el tratamiento de la EA son algo contradictorios y se requiere más investigación para aclarar sus efectos benéficos y/o tóxicos, así como determinar si son seguras para prevenir o tratar la EA.

Como ha sido mencionado, la regulación del metabolismo del colesterol en el SNC es poco conocida en comparación con nuestro conocimiento sobre el colesterol periférico. A pesar del uso generalizado de las estatinas, las implicaciones de la inhibición de la síntesis de colesterol en el SNC no se han aclarado. Debido a la relación entre el colesterol y EA, es importante comprender cómo está regulado el colesterol en el SNC y cómo este proceso se ve afectado por las estatinas, esto para contribuir al entendimiento de su valor terapéutico en la EA.

En esta sección del estudio exploramos los efectos de la Lov, una estatina lipofílica, capaz de cruzar la BHE (223) sobre la homeostasis del colesterol, la supervivencia neuronal y su papel regulador de la expresión de APP y metabolismo del A β usando un modelo celular de SMS-MSN y un modelo *in vivo* de administración de Lov.

OBJETIVO

Analizar el efecto inhibitor de la Lov sobre la vía de síntesis de colesterol en SNC y su repercusión sobre la expresión de APP y la generación de A β en modelos *in vivo* e *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Estudiar el efecto de la Lov en la biosíntesis del colesterol neuronal

- Examinar la concentración de colesterol después de la administración de Lov.
- Analizar la expresión de proteínas que participan en la biosíntesis de colesterol (HMG-CoA reductasa y SREBP-2).

Estudiar el efecto de la Lov y colesterol en el metabolismo del péptido A β

- Determinar los niveles de A β después del tratamiento de Lov y colesterol.
- Examinar la expresión de APP.

METODOLOGÍA

En el modelo *in vitro* se usaron células SMS-MSN diferenciadas y en el modelo *in vivo* se administró Lov sistémica a ratas.

La metodología utilizada ya ha sido descrita en la primera parte de la tesis en cuanto a: cultivo celular de SMS-MSN, ensayos de viabilidad neuronal, cuantificación del colesterol, tinción de colesterol, ensayo de captura de LDL (BODIPY-FL-LDL), inmunohistoquímica, qRT-PCR; ensayo de ELISA para A β . A continuación se describe la metodología usada con respecto a los tratamientos de los cultivos celulares en esta segunda parte y para los experimentos *in vivo*.

Tratamiento de las neuronas con Lov y colesterol

Las células SMS-MSN fueron expuestas a diferentes concentraciones de Lov (2 o 10 μ M; Calbiochem, CA, EUA disuelta en 0.1 % de etanol) o colesterol (25 μ M; Sigma-Aldrich, MO, EUA disuelto en 0.16 % de etanol) y cultivadas en condiciones estándares de suero (10 %) o con medio libre de suero por 2 o 5 días adicionales.

Captura de BODIPY-FL-LDL

Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos en medio sin suero y tratadas en presencia o ausencia de Lov (2 μ M) por 12 h. A continuación, las células se incubaron en medio fresco que contenía 10 μ g/mL de BODIPY-FL-LDL (Molecular Probes, OR, EUA). Después de la incubación a 37 °C por 5 h, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 1 %. La captura de BODIPY-FL-LDL (Ab 515 nm, Em 520 nm) se detectó usando un microscopio confocal DSU a 60X. De 7-9 Z-pilas consecutivas se acoplaron en una sola imagen utilizando el software ImageJ (NIH, EUA).

Modelo *in vivo* de administración sistémica de Lov y colesterol

Se usaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (Harlan, Facultad de Química, UNAM, México), adultas jóvenes, con un peso promedio de 250 g. Las ratas se mantuvieron previo y durante el experimento en una habitación con un ciclo invertido de luz-oscuridad, una temperatura ambiente controlada (22 °C), con acceso *ad libitum* a agua y a una dieta estándar para roedores (Harlan Laboratories, IN, EUA.) antes de la experimentación. Todos los animales fueron

tratados de acuerdo con las normas del Comité para el Cuidado de Animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Los animales se dividieron en tres grupos: un grupo de control, en el que las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar y 2 grupos experimentales. En un grupo experimental, los animales fueron alimentados con una dieta alta en grasa (HFD, del inglés high fat diet) que contiene 1 % de colesterol (Bio-Serv, NJ, EUA). El segundo grupo experimental se alimentó con 0.04 % de Lov añadida a una dieta estándar de acuerdo con lo publicado (224). Las ratas se mantuvieron en una de estas tres dietas, con libre acceso a agua, durante 5 días. Después del tratamiento, todas las ratas se decapitaron durante la cuarta hora del ciclo de oscuridad. Las muestras de hígado y de cerebro (incluyendo la corteza, el hipocampo y el cerebelo) se diseccionaron rápidamente. Las muestras frescas se sumergieron en PBS 1X con inhibidores de proteasas (Complete™, Roche, Basel SUI) y después se almacenaron a -70 ° C hasta su análisis.

Cuantificación de A β por ELISA en cerebro de rata

La concentración de A β en muestras de cerebro se determinó usando el mismo método que con las células SMS-MSN, una vez que la proteína se extrajo a partir del tejido se siguieron las recomendaciones del fabricante (A β _[1-40] ELISA, Invitrogen, CA, EUA). Los tejidos se pesaron y se homogeneizaron con 8 volúmenes de amortiguador en frío de guanidina 5 M HCl/50 mM Tris HCl y después se mezclaron a temperatura ambiente durante 3 h. Las muestras homogeneizadas se diluyeron (1:10) con buffer BSAT-DPBS frío (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco con 5 % de BSA y 0.03 % de Tween-20 suplementado con inhibidores de la proteasas) y se centrifugaron a 16,000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se mantuvo en hielo y se utilizó para cuantificar los niveles de A β . Todos los resultados se normalizaron por la masa de tejido y se expresan como niveles relativos con respecto al control.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como promedios \pm error estándar (ES). La significancia estadística se determinó utilizando la prueba de Student's t test. Se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, EUA) para realizar las gráficas y llevar a cabo el análisis estadístico.

RESULTADOS PARTE II

Efecto de la Lov sobre los niveles de colesterol y la sobrevivencia neuronal

Las células SMS-MSN se expusieron a Lov por 5 días en presencia y en ausencia de suero para valorar sus efectos sobre los niveles de colesterol y la posible neurotoxicidad. En ausencia de suero, la Lov (2 μ M) redujo el colesterol celular en 40 % medido por el ensayo colorimétrico-enzimático (Fig 22A) y visualizado por la tinción con filipina (Fig 22B). Sin embargo, en presencia de 10 % de suero el efecto de la Lov en la reducción del colesterol no fue evidente (Fig 22A,B) debido a que las neuronas son capaces de tomar LDL del suero como se ve en la imagen con BODIPY-FL-LDL (Fig 22C) y de filipina. En ausencia de suero la Lov es neurotóxica de manera dosis-dependiente (Fig 22D). Sin embargo, como se observa en Fig 22E, el grado de la muerte neuronal dependiente de Lov a 10 μ M en medio con 10 % de suero fue similar a la muerte con Lov 2 μ M en la condición libre de suero. Para determinar si la toxicidad de la Lov era dependiente de su capacidad para disminuir el colesterol neuronal, las células SMS-MSN se incubaron con colesterol añadido (25 μ M) en ausencia y presencia de suero (Fig 22E). En ningún caso se previno la muerte neuronal, sugiriendo que la toxicidad podría estar asociada con alguno de los efectos pleitrópicos descritos para la Lov dependientes de la inhibición de metabolitos río abajo del colesterol como resultado de la inhibición de la HMG-CoA reductasa.

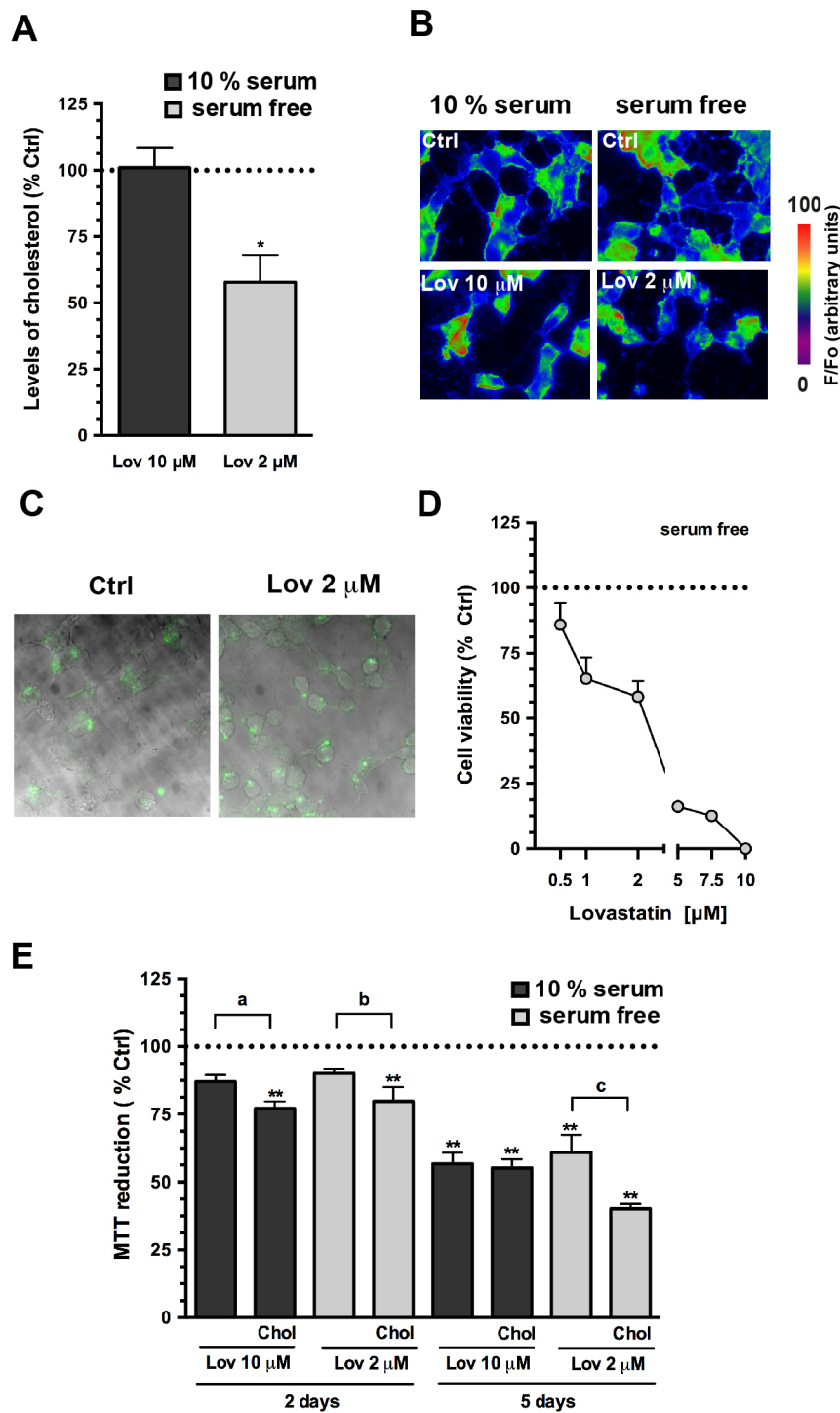


Fig 22 Efecto de la Lov sobre los niveles de colesterol y viabilidad neuronal

A) Contenido de colesterol en células SMS-MSN cuantificado mediante el ensayo colorimétrico-enzimático en lisados completos de neuronas tratadas con Lov 10 μ M en medio con 10 % de suero (columnas oscuras) o Lov 2 μ M en condiciones sin suero (columnas grises) por 5 días. Los niveles de colesterol se expresan como porcentaje de cambio en comparación con las células control incubadas con 10 % de suero o sin suero en ausencia de Lov (línea punteada). Cada barra representa la media \pm ES de las determinaciones por triplicado de cinco a seis experimentos. **B)** Imágenes fluorescentes e intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias) de la tinción con

filipina en células MSN diferenciadas expuestas a Lov (10 o 2 μ M) por 5 días en medio con 10 % de suero (panel izquierdo) y sin suero (panel derecho), que muestran la reducción en el contenido de colesterol cuando la Lov (2 μ M) fue añadida al medio sin suero. Las imágenes (60X) fueron analizadas usando el software Image J. **C)** Efecto de la Lov en la captura de LDL en medio libre de suero. Las células MSN fueron tratadas en ausencia (Ctrl) o presencia de Lov (2 μ M) por 12 h e incubadas por 5 h adicionales a 37 °C en ausencia (Ctrl) o presencia de Lov (2 μ M) en medio que contenía 10 μ g/mL de BODIPY-FL-LDL. La captura de LDL fue detectada por fluorescencia usando un microscopio confocal con un aumento de 60X. De 7-9 Z-pilas fueron acopladas en una sola imagen con campo claro utilizando el software ImageJ. **D)** Viabilidad celular a diferentes concentraciones de Lov. Las células fueron tratadas durante 5 días con diferentes concentraciones (0.5-10 μ M) de Lov (círculos grises) en medio sin suero. Cada punto representa la media \pm ES de tres experimentos realizados por triplicado y expresados como porcentaje de cambio con respecto al control (línea punteada). **E)** Efectos de la Lov (10 o 2 μ M) sobre la actividad reductora de la mitocondria en ausencia o presencia de colesterol (25 μ M) en medio con 10 % de suero (columnas oscuras) y libre de suero (columnas grises) por 2 o 5 días. Los datos están expresados como el porcentaje de los valores Ctrl de cada condición (línea punteada). Se muestra la media \pm ES de tres a cuatro diferentes experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ vs. Ctrl, ** $p < 0.01$ vs. Ctrl, ^{a, b, c} $p < 0.05$ vs. Lov (2 o 10 μ M). Ctrl, control; Chol, colesterol; Lov, lovastatina. Modificado de Mendoza-Oliva *et al.*, 2015 (225).

La Lov induce sobrerregulación de la HMG-CoA reductasa en SMS-MSN

Posteriormente analizamos los efectos de la Lov sobre la expresión neuronal de la HMG-CoA reductasa. En estas células observamos la expresión de la enzima con semejanza a lo descrito en el hígado (224), dos bandas de la enzima que corresponden a la proteína monomérica (~97 kDa) y una banda de degradación (~55 kDa) (Fig 23A). La degradación de la enzima es un mecanismo de regulación a largo plazo influenciado no solo por la concentración de esteroides sino también por el estado oligomérico de la enzima (226). Las neuronas derivadas de SMS-MSN expresan pobremente la HMG-CoA reductasa de manera basal pero, posterior a la incubación con Lov se observó un incremento de la proteína de casi 3 veces después de 2 y 5 días de exposición. Este incremento corresponde particularmente a la forma degradada (Fig 23A,B). También se observó un incremento de dos veces en la expresión de su mRNA (Fig 23C). Estos efectos también se acompañaron de un incremento de la forma madura (~50-68 kDa) de su factor de transcripción, SREBP-2 (Fig 23A). Estos resultados, similares a lo reportado en el hígado, sugieren que la HMG-CoA reductasa neuronal es un blanco de la Lov. También demuestran que su regulación puede depender de la

presencia de compuestos no-esteroles porque el incremento de la enzima se observó aún en presencia de colesterol en el medio de cultivo.

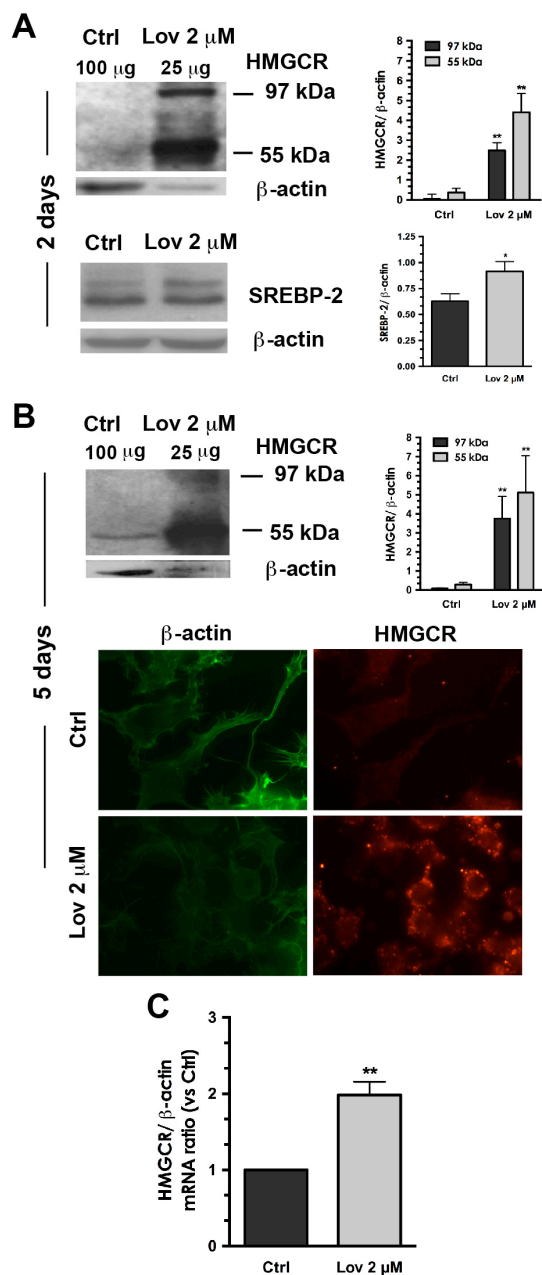


Fig 23 La Lov induce sobrerregulación de la HMG-CoA reductasa y activación de SREBP-2 en SMS-MSN

A) Western blot para HMG-CoA reductasa y la forma madura de SREBP-2 en células MSN después del tratamiento con Lov (2 μM) en medio libre de suero durante 2 días. Para determinar los niveles de HMGCR 100 μg de proteína de células control y 25 μg de proteína de células tratadas con Lov fueron cargados en el gel. Las gráficas muestran el análisis densitométrico del nivel de HMGCR (dos bandas: ~97 y 55 kDa) y las forma madura de SREBP-2 (~50-68 kDa) en células SMS-MSN. Los resultados se normalizaron con el control de carga (β-actina). Los valores son la media ± ES de 3 experimentos independientes. **B)** Panel superior: Western blot para HMGCR en células SMS-MSN

después del tratamiento con Lov ($2 \mu\text{M}$) en medio libre de suero por 5 días. La gráfica muestra el análisis densitométrico de HMGCR en las células SMS-MSN. Los resultados se normalizaron con el control de carga (β -actina). Los valores son la media \pm ES de 3-6 experimentos independientes. Panel inferior: inmunofluorescencia para HMGCR después del tratamiento con ($2 \mu\text{M}$) en medio libre de suero por 5 días. Panel izquierdo: tinción de actina con faloidina (verde). Panel derecho: HMGCR, anti-HMGCR (1:100) y Alexa Fluor (1:300, rojo). Las imágenes fueron adquiridas con el objetivo 100X. **C)** Expresión de HMGCR mRNA. Las células fueron incubadas en medio sin suero con Lov ($2 \mu\text{M}$) (columnas oscuras) por 18 h. Cada barra representa la media \pm ES de cuatro experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ vs. Ctrl, ** $p < 0.01$ vs. Ctrl. Ctrl, control; Chol, colesterol; Lov, lovastatina; HMGCR, HMG-CoA reductasa. Modificado de Mendoza-Oliva *et al.*, 2015 (225).

La administración sistémica de Lov no reduce los niveles de colesterol en el cerebro

Para comparar los resultados obtenidos en el modelo neuronal con lo que puede ocurrir *in vivo*, decidimos analizar un modelo de administración de dietas altas en colesterol (1 %) (HFD) y con una dieta de Lov (0.04 %) por 5 días y evaluar los niveles de colesterol en el hígado y en diferentes regiones cerebrales. La dieta rica en colesterol incrementó en un 42 % el colesterol hepático (Fig 24A) sin modificar su contenido en ninguna de las regiones cerebrales analizadas (Fig 24B). Como se ha reportado, el contenido basal de colesterol en el cerebro fue significativamente más grande que en el hígado. Para determinar si el consumo de Lov reduce el colesterol cerebral se analizó el efecto a los 5 días de consumo y se observó que si bien el colesterol hepático disminuye un 30 %, no tuvo ningún efecto en bajar el colesterol cerebral (Fig 24A, B).

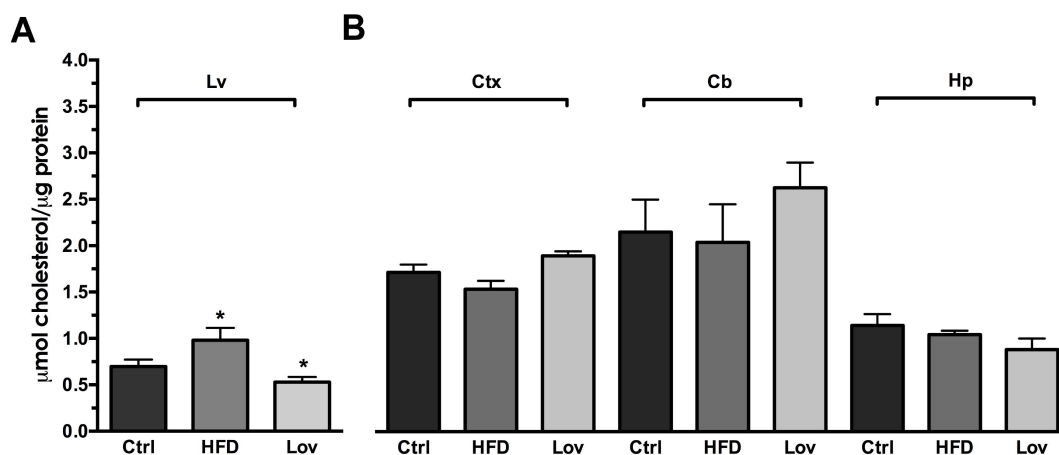


Fig 24 Determinación de la concentración de colesterol en hígado y cerebro de rata. Las ratas fueron alimentadas con una dieta regular (columnas oscuras), HFD (columnas grises) y con Lov 0.04 % (columnas claras) por 5 días. La concentración de colesterol en **A**) Hígado (Lv) y **B**) tejidos cerebrales (Ctx, corteza; Cb, cerebelo y Hp, hipocampo) fue determinada mediante el ensayo colorimétrico-enzimático. Los resultados están expresados en μmol de colesterol y normalizados con el contenido de proteína. Se graficó la media \pm ES de tres experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ vs. Ctrl. Ctrl, control; HFD, dieta alta en grasa; Lov, lovastatina. Modificado de Mendoza-Oliva *et al.*, 2015 (225).

La administración sistémica de Lov aumenta los niveles de HMG-CoA reductasa y SREBP-2 en el cerebro de rata

Como *in vitro* observamos que la HMG-CoA reductasa se expresa significativamente en presencia de Lov, quisimos analizar si esta enzima es blanco de la Lov en el cerebro *in vivo*. Para esto medimos los niveles de proteína de la HMG-CoA reductasa en diferentes regiones del cerebro así como de su factor de transcripción. Consistente con lo reportado por Ness *et al.*, 1994 (224), encontramos que las ratas alimentadas con 0.04 % de Lov por 5 días, mostraron un incremento notable de la enzima en el hígado comparado con ratas alimentadas con dietas altas en colesterol o con comida regular (Fig 25A). Aunque la Lov no modificó el contenido de colesterol en el cerebro si indujo significativamente el contenido de su enzima (Fig 25A) sugiriendo que la HMG-CoA reductasa cerebral, es blanco de la Lov, sin afectar el contenido de colesterol. Más aún, la Lov también incrementó en todos los tejidos analizados la expresión de la forma madura del factor de transcripción SREBP-2 (Fig 25B).

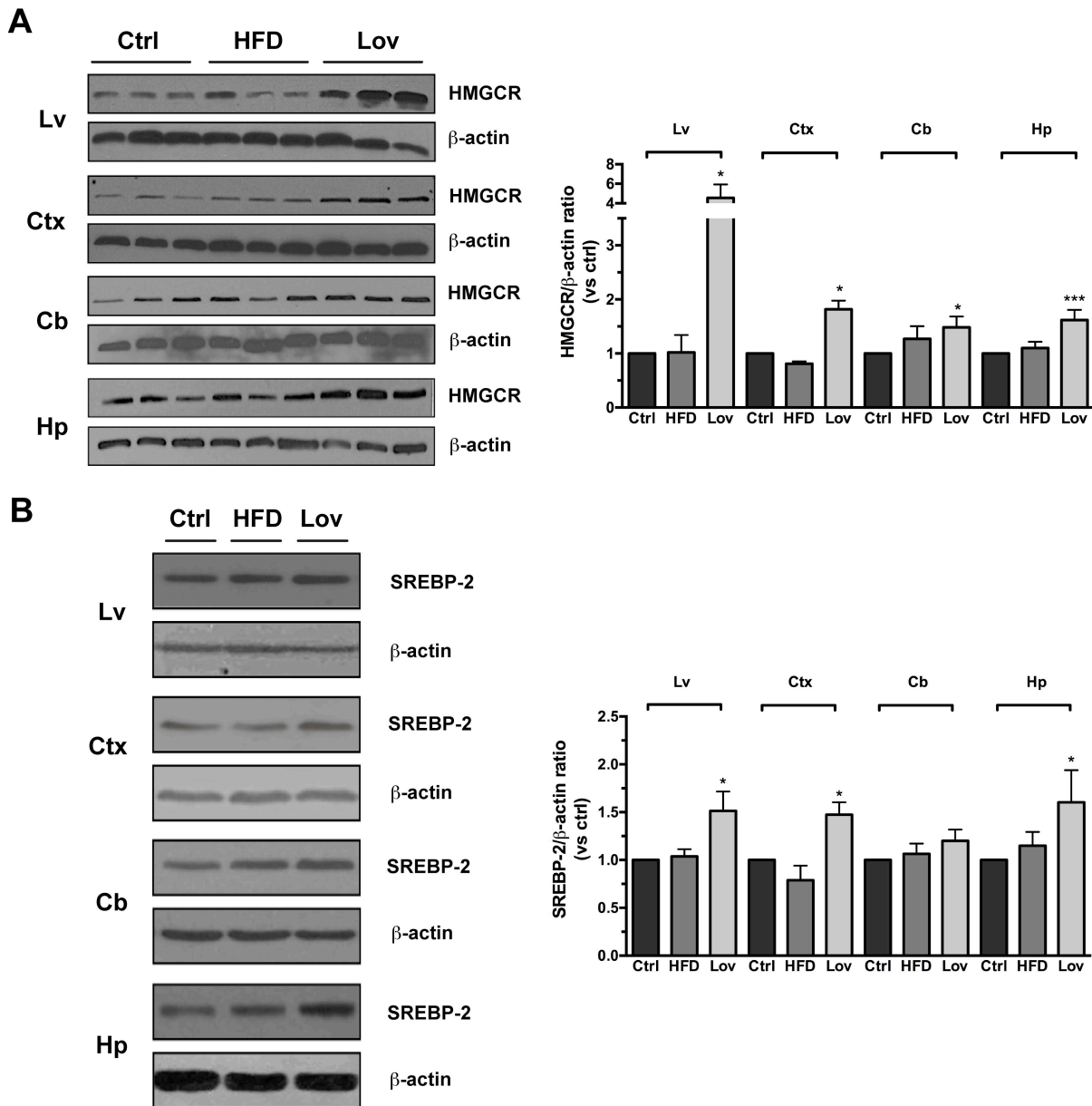


Fig 25 Niveles de HMG-CoA reductasa y SREBP-2 en hígado y cerebro de rata

A) Western blots de HMG-CoA reductasa (~ 97 kDa) y **B)** la forma madura (~ 68 kDa) de SREBP-2 en hígado (Lv) y tejidos cerebrales (Ctx, corteza; Cb, cerebelo y hipocampo, Hp). Las ratas recibieron una dieta regular (columnas oscuras), HFD (columnas grises) y con Lov 0.04 % (columnas claras) por 5 días. Las gráficas representan los cambios en los niveles de HMGCR y SREBP-2 que fueron normalizados con el control de carga (β -actina) y comparados contra los niveles de los controles. Se muestra la media \pm ES de tres experimentos. * $p < 0.05$ vs. Ctrl. *** $p < 0.001$ vs. Ctrl. Ctrl, control; HFD, high fat diet; Lov, lovastatina; HMGCR, HMG-CoA reductasa. Modificado de Mendoza-Oliva *et al.*, 2015 (225).

Efectos diferenciales de la dieta HFD y Lov sobre los niveles de APP y la producción de A β

En virtud de que las estatinas han sido propuestas como drogas alternativas para el tratamiento en la EA por la relación entre el alto colesterol y la producción de A β , decidimos investigar si la Lov regula el metabolismo de la APP *in vivo* e *in vitro*. Para los estudios *in vitro* las células SMS-MSN diferenciadas que expresan a la forma humana APP₆₉₅ se expusieron a Lov 10 μ M o Lov 2 μ M sin suero por 5 días. En ambas condiciones observamos un ligero incremento en los niveles de APP (Fig 26 A). De manera inesperada la Lov disminuyó de forma significativa las formas secretadas A β _[1-42] y A β _[1-40] (11 % y 27 %, respectivamente) (Fig 26B). Sin embargo, las ratas alimentadas con Lov por 5 días no presentaron niveles mayores de APP (Fig 26C) ni cambios en el contenido basal de A β _[1-40] en ninguna región cerebral (Fig 26D). Las ratas alimentadas con dietas altas en colesterol si presentaron un incremento en APP en corteza cerebral e hipocampo (21% y 23 % respectivamente) (Fig 26C) así como un incremento significativo (45 %) en el A β _[1-40] en la corteza cerebral (Fig 26D).

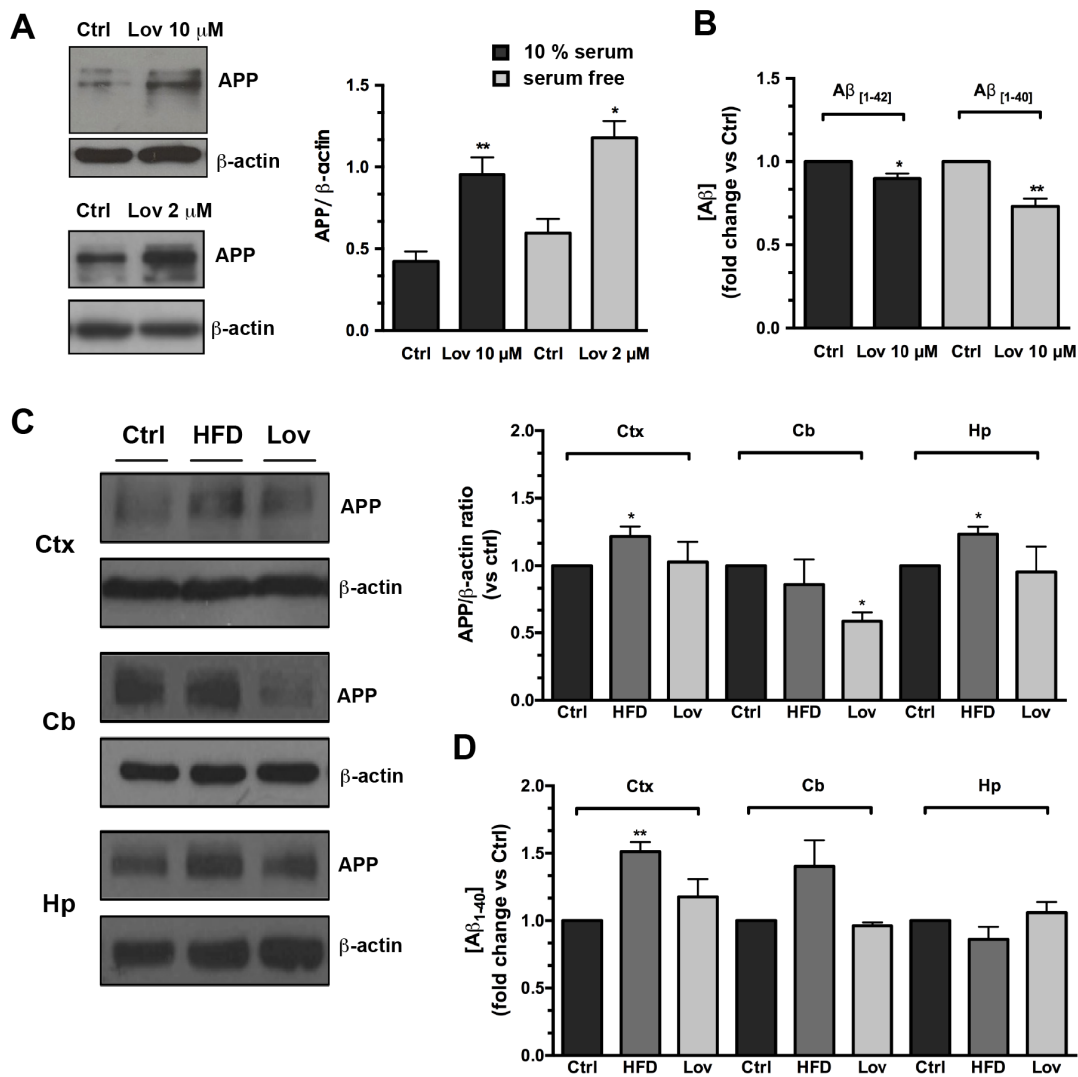


Fig 26 Efectos diferenciales de la Lov sobre los niveles de APP y Aβ *in vivo* e *in vitro*

Western blots de APP en células MSN cells y cerebro de rata después del tratamiento con Lov **A)** Las células SMS-MSN fueron tratadas con Lov (10 μM) durante 5 días en medio con 10 % de suero. Los resultados fueron normalizados con el control de carga (β-actina). Las gráficas representan el análisis densitométrico de los niveles de APP. Se graficó la media ± ES de tres experimentos. **B)** Los niveles de Aβ en medio de cultivo después del tratamiento con Lov. El contenido de Aβ_[1-42] y Aβ_[1-40] se representan como incrementos con respecto a las células control. Se graficó la media ± ES de tres experimentos realizados por triplicado. **C)** Western blot de los niveles de APP en tejidos cerebrales (Ctx, corteza; Cb, cerebelo y Hp, hipocampo). Las ratas fueron alimentadas con una dieta regular (columnas oscuras), HFD (columnas grises) y Lov 0.04 % (columnas claras) por 5 días. Las gráficas representan los cambios en el nivel de APP comparado con el control. Los resultados fueron normalizados con el control de carga (β-actina) y presentados como la media mean ± ES de tres experimentos. **D)** Niveles de Aβ en cerebro de rata (Ctx, Cb y Hp). Los resultados fueron normalizados por el contenido de proteína. **p* <0.05 vs. Ctrl, ***p* <0.01 vs. Ctrl. Ctrl, control; HFD, high fat diet; Lov, lovastatina. Modificado de Mendoza-Oliva *et al.*, 2015 (225).

DISCUSIÓN

Aunque varias evidencias apoyan que existe una relación entre los altos niveles de colesterol circulante y el riesgo de desarrollar EA, el papel del colesterol cerebral en la expresión de marcadores de EA y los posibles efectos protectores de las estatinas no han sido aclarados. En este trabajo mostramos que una dieta alta en colesterol aumenta la expresión de APP *in vivo* (Fig 26C). Por otra parte, una dieta alta en colesterol aumenta la expresión de A β *in vivo* sin afectar el contenido de colesterol en el cerebro (Fig 24).

En la clínica, las estatinas se usan ampliamente para reducir el colesterol plasmático. También se ha sugerido que las estatinas se podrían utilizar para la prevención y el tratamiento de EA debido a los efectos neuroprotectores, incluyendo la disminución de A β (23, 24, 227, 228), su capacidad antioxidante (228, 229), y sus efectos anti-inflamatorios, entre otros. Sin embargo, las implicaciones de la disminución de los niveles de colesterol en combinación con los efectos pleiotrópicos de las estatinas sobre el SNC no se conocen bien. Debido a que el colesterol y sus metabolitos intermedios son cruciales para la función normal del cerebro, la terapia con estatinas para la EA es cuestión de debate. De hecho, existen informes sobre las consecuencias negativas del tratamiento con estatinas, como efectos cognitivos adversos en animales (230), manifestaciones psiquiátricas en humanos (231), deficiencias en la neurotransmisión (27, 28, 232), alteraciones en la neuroplasticidad (233-235) e incluso neurotoxicidad (154, 236). Este estudio, ha mostrado que la exposición prolongada con Lov a diferentes dosis, induce muerte neuronal en células SMS-MSN (Fig 22D). La muerte celular inducida por Lov se produce incluso con la adición de colesterol libre o LDL-C (Fig 22C y E), lo que sugiere que la neurotoxicidad puede atribuirse a los efectos pleiotrópicos asociados con las estatinas (154, 237-240). De acuerdo con nuestras observaciones, otros informes han demostrado que la Lov sólo reduce los niveles de colesterol en medio libre de suero. Este proceso va acompañado de la disminución de productos intermedios, tales como FPP y GGPP, y la disminución de la isoprenilación de proteínas en neuronas cultivadas (241), lo cual puede contribuir a los efectos tóxicos observados con la Lov. Aunque la Lov inhibe la síntesis *de novo* del colesterol, hemos confirmado que los niveles de colesterol

celular se mantienen, por lo menos en las neuronas cultivadas (Fig 22A y B). Esto puede ser el resultado de la captura de lipoproteínas con colesterol presentes en el suero (Fig 22C). Un hallazgo interesante en este trabajo fue la presencia de la HMG-CoA reductasa en las neuronas y su notable sobreexpresión inducida por Lov (Fig 23). Se acepta generalmente que los astrocitos son la células implicadas principalmente en la síntesis de colesterol (87). Aquí, hemos demostrado que las neuronas también pueden participar en la regulación del colesterol en el cerebro y que las estatinas pueden modificar su metabolismo en estas células. *In vivo*, cinco días de tratamiento con Lov fue suficiente para producir una notable reducción en el colesterol hepático aunque el colesterol cerebral no se vio afectado (Fig 24), similar a los resultados obtenidos de células cultivadas. Hay varias razones por las que la Lov no presentó un efecto sobre el contenido de colesterol del cerebro: por ejemplo, la estabilidad metabólica del colesterol en el cerebro tiene una vida media más larga que en los órganos periféricos (10). También es posible que en este modelo, 5 días de tratamiento con Lov no es suficiente para producir los niveles que inhiben completamente a la HMG-CoA reductasa en el cerebro debido a que las concentraciones de Lov (0.9 a 1.4 ng/mL) en el LCR (223) son menores que el IC50 para inhibir a la HMG-CoA reductasa en hepatocitos (2.7 ng/mL) (242). Estas diferencias implican que en nuestro modelo, hay una inhibición parcial de la HMG-CoA reductasa en el cerebro. Sabemos que la Lov entró en las regiones del cerebro analizadas debido a un notable incremento en la expresión de la enzima limitante la HMG-CoA reductasa, así como de la forma madura del factor de transcripción SREBP-2. La sobreexpresión de HMG-CoA reductasa es similar a la reportada en el hígado de ratas alimentadas con la misma dieta (0.04 % de Lov) (224). Es interesante señalar que se observó que la exposición a Lov aumenta los niveles de HMG-CoA reductasa y paradójicamente, aumenta la degradación de la HMG-CoA reductasa, lo que puede implicar que hay una pérdida de la regulación de la enzima o que su degradación fue promovida por otro mecanismo no relacionado con las concentraciones de esteroides. Esta notable sobreexpresión de HMG-CoA reductasa puede afectar la producción de otros productos intermedios biológicamente activos en la vía del mevalonato, con posibles consecuencias negativas sobre la función neuronal.

Se ha propuesto que la concentración alta de colesterol circulante afecta a la producción y acumulación de A β en el cerebro (23, 146, 148, 149, 243). Por consiguiente, las estatinas se han propuesto como una terapia alternativa para el tratamiento y prevención de la EA. Sin embargo, el papel del colesterol en el cerebro y los efectos de las estatinas sobre el metabolismo de APP no se conocen del todo.

En este estudio, mostramos que las ratas alimentadas con HFD presentan un incremento de colesterol en el hígado, pero no en el cerebro (Fig 24). Además, se observó un aumento importante en la producción de APP en el hipocampo y la corteza cerebral (Fig 26C). Sin embargo, esto fue acompañado por un aumento en los niveles de A β solamente en la corteza cerebral (Fig 26D), lo que indica que la condición metabólica de la corteza es particularmente sensible a la acumulación de A β . Este es el primer trabajo que demuestra que sólo cinco días con HFD es suficiente para cambiar la expresión y el procesamiento de APP sin alterar la acumulación de colesterol en el cerebro de ratas normales. Hasta el momento no hay una explicación mecanicista de esta aparente paradoja. Los altos niveles de colesterol en el suero puede inducir cambios vasculares que alteran la permeabilidad de la BHE para favorecer el acceso de las moléculas reactivas, tales como citocinas o ERO al SNC (244). Consistente con nuestros resultados, Ghribi *et al.*, 2006 (151) informaron que la acumulación de A β y de hierro inducida por colesterol en la corteza cerebral de conejo fue mayor que en el hipocampo y está relacionada con disrupción de la BHE. Es interesante señalar, que la carga de A β en la corteza cerebral es un marcador temprano de los pacientes con EA (245).

Estudios previos han mostrado que las estatinas tienen propiedades anti-amiloidogénicas (23, 216, 246, 247). En este estudio, hemos demostrado que existen efectos diferenciales del tratamiento con Lov sobre la expresión de APP y A β *in vivo* e *in vitro*. En las neuronas cultivadas, la inhibición de HMG-CoA reductasa mediada por Lov disminuye la secreción de A β (Fig 26B), en concordancia con los estudios mencionados anteriormente. Este efecto fue independiente de la disminución de colesterol, lo que indica un mecanismo alternativo es responsable del efecto de las estatinas sobre el metabolismo de

APP. Por el contrario, el tratamiento *in vivo* con Lov produce un ligero aumento de APP sin afectar la producción de A β (Fig 26C y D). Es posible que cinco días de tratamiento con Lov no fueron suficientes para alcanzar una dosis fisiológicamente relevante para afectar el metabolismo de A β . Sin embargo, el tratamiento fue suficiente para producir un aumento robusto de moléculas relacionadas con el metabolismo del colesterol, tales como HMG-CoA reductasa y el factor de transcripción SREBP-2 (Fig 25A y B). Algunos estudios han indicado que los diferentes metabolitos de la vía del mevalonato (colesterol y los isoprenoides) tienen efectos diferenciales sobre la expresión de APP y la producción de A β . Esto explicaría algunas de las discrepancias aparentes entre los efectos *in vivo* e *in vitro* de Lov, dependiendo de las dosis alcanzadas en las células. Por ejemplo, Ostrowski *et al.*, 2007 (60) mostró que la inhibición de la isoprenilación de proteínas por simvastatina y Lov en células de neuroblastoma causa la acumulación de APP a través de la inhibición de las proteínas G (Rho, Rac, Ras y Rab) lo que disminuye la formación de fragmentos C-terminales de APP y la secreción de A β . Estos resultados, junto con los nuestros, sugieren que el efecto *in vivo* de las estatinas sobre APP es extremadamente complejo porque múltiples moléculas se ven alteradas por la inhibición de la HMG-CoA reductasa (24, 218, 248). Sin embargo, nuestros resultados *in vivo* son consistentes con los encontrados en pacientes con EA tratados por 12 semanas con simvastatina que no presentan cambios en los marcadores relacionados con la enfermedad (249).

CONCLUSIONES

Las estatinas se han sugerido como fármacos para el tratamiento y disminución de riesgo de EA debido a la conexión en la desregulación de colesterol presente en esta patología. En esta tesis, investigamos el papel de una estatina, la Lov sobre la homeostasis del colesterol neuronal y sus efectos en la producción de A β . Los efectos de la Lov se analizaron *in vitro* en una línea de neuroblastoma humano diferenciado e *in vivo*, examinando sus efectos en tejido hepático y cerebral de ratas alimentadas con dieta adicionada que contenía Lov. Observamos que dosis relevantes de Lov afectan diferencialmente la expresión y la producción de APP y A β *in vivo* e *in vitro*. Hemos demostrado que varios efectos de la inhibición de la HMG-CoA reductasa por Lov tienen implicaciones negativas sobre la supervivencia neuronal *in vitro*. Estos efectos se presentan de forma independiente de la disminución de colesterol inducida por Lov. *In vivo*, la administración de Lov no disminuye el contenido de colesterol en el cerebro, pero si actúa a través de la vía del mevalonato como se indica por el aumento de la forma madura de SREBP-2 y la sobreexpresión de HMG-CoA reductasa observada. Estos hallazgos podrían ayudar a dilucidar los efectos de la Lov en la homeostasis del colesterol cerebral y a determinar los mecanismos por los cuales las estatinas afectan la amiloidosis relacionada con la EA.

CONCLUSIONES FINALES

En el presente trabajo analizamos varios aspectos del metabolismo del colesterol neuronal y sus posibles implicaciones para la EA. Por un lado, estudiamos uno de los factores de riesgo asociados con el desarrollo y aparición de la enfermedad como los niveles elevados de Hcy y también el efecto *in vivo* e *in vitro* de la Lov, un fármaco que se ha propuesto para el tratamiento y prevención de la EA. Ambas moléculas están estrechamente relacionados al metabolismo del colesterol. Tanto la Hcy como la Lov pueden cruzar la BHE, pero sus efectos son poco conocidos en el SNC.

Al comienzo de esta investigación hipotetizamos que la Hcy aumentaba el colesterol incrementando la síntesis *de novo* en las neuronas y que este resultado sería contrarrestado por la Lov, pero la evidencia experimental demostró que la Hcy no altera la vía de síntesis de colesterol, es decir la Hcy y la Lov, no modifican la misma vía en las neuronas (Fig 27A). Sin embargo, debido a la importancia terapéutica de las estatinas en la EA continuamos examinando el efecto de la Lov sobre el sistema nervioso.

Tomando los resultados de la tesis en conjunto aportamos nuevos hallazgos al conocimiento de la regulación del colesterol en el sistema nervioso. Mostramos evidencia de que la HMG-CoA reductasa se encuentra presente en las neuronas. En las células SMS-MSN diferenciadas la expresión de esta enzima es relativamente baja. Las células cultivadas son más dependientes del colesterol del suero, tal como lo observamos en dos experimentos: por un lado, la Hcy no activa la vía de síntesis de colesterol sino que aumenta la concentración de LDL en las neuronas (Fig 27A); y por otro lado, aunque la Lov inhiba la síntesis de colesterol, la concentración de colesterol no disminuye si las células se incuban en presencia de LDL, debido a que las neuronas internalizan LDL provenientes del medio de cultivo, con lo cual compensan la concentración de colesterol intracelular (Fig 27A). En el caso del tratamiento con Lov mostramos que se presenta una notable sobreexpresión de la HMG-CoA reductasa y activación del factor de transcripción SREBP-2, probablemente como un mecanismo de compensación, pero en este caso más que del colesterol de los productos

intermedios biológicamente activos de la vía, lo cual se refleja en efectos negativos sobre la viabilidad neuronal.

Todas estas evidencias muestran que las neuronas tienen una baja capacidad para compensar el déficit de productos intermedios y de colesterol mediante la síntesis *de novo*, y que son más dependientes del colesterol exógeno. Nuestros resultados complementan otros reportes que indican que en un sistema *in vivo* las neuronas maduras pueden obtener el colesterol de lipoproteínas que importan vía receptor (LDLR o LRP1) desde la glía (Fig 27B) (87, 89) y se utiliza en procesos clave como neurotransmisión, formación de sinápsis, dendritas y axones, endocitosis y plasticidad sináptica (4, 44). Todavía quedan por esclarecer aspectos básicos de la regulación del metabolismo de colesterol en el SNC, como su transporte y distribución hacia las neuronas (Fig 27B). Consideramos que es importante analizar de forma conjunta estas interacciones neuro-gliales sobre la homeostasis de colesterol cerebral y su repercusión sobre los marcadores de daño neuronal en EA.

En ambos apartados mostramos que los efectos sobre el metabolismo de APP y la generación de A β son complejos. Determinamos que la Lov reduce la secreción A β pero resulta neurotóxica. En cuanto a los mecanismos involucrados, concluimos que estos son independientes de la propiedad hipolipemiante de la Lov y pueden estar asociados a su acción pleitrópica. Por otro lado, el aumento de colesterol neuronal con cinco días de tratamiento con Hcy no es suficiente para observar un cambio significativo en la secreción de A β , por lo cual se sugiere realizar estos experimentos con un tratamiento más prolongado y examinar otros aspectos clave en la formación de A β como la distribución de colesterol en las balsas lipídicas.

Muchos trabajos además del presente han explorado los factores que influyen en la causa y el desarrollo de la EA. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la aparición de la EA se desarrolla a partir de una compleja serie de sucesos asociados al envejecimiento patológico (acumulación de colesterol, Hcy, etc.) que tienen lugar en el cerebro actuando de manera crónica. Con respecto a la prevención y tratamiento, en esta tesis no encontramos evidencia sólida para

apoyar el uso de estatinas en la EA, por lo cual se requiere más investigación para aclarar sus efectos benéficos y/o tóxicos en el SNC.

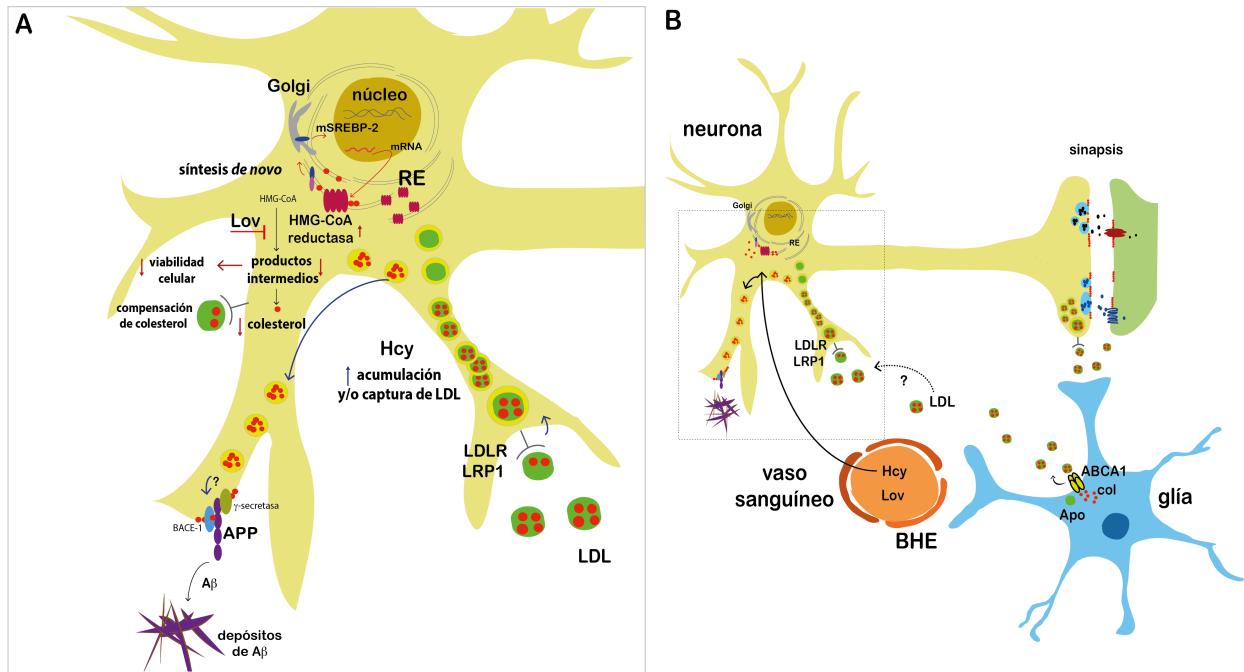


Fig 27 Participación de la Hcy y Lov en el metabolismo de colesterol neuronal

A) La Hcy y la Lov, modifican la regulación del colesterol neuronal participando en diferentes procesos. La Hcy aumenta los niveles de colesterol en las neuronas por la acumulación y/o captura de LDL. Por otro lado, la Lov, inhibe la vía de síntesis de colesterol, pero las neuronas compensan los niveles de colesterol internalizando LDL. La inhibición también provoca efectos pleiotrópicos debido a la pérdida de productos intermedios con implicaciones negativas en la viabilidad celular. Sin embargo estos efectos no son compensados a pesar de la notable sobreexpresión de HMGC_oA reductasa. Aún falta por determinar cómo esta desregulación por Hcy y Lov modifica la producción de A β . **B)** Las neuronas tienen una baja capacidad para compensar el déficit de colesterol y de productos intermedios mediante la síntesis *de novo*, y son más dependientes del colesterol exógeno. Este colesterol proviene de la glía y es transportado hacia las neuronas en lipoproteínas.

REFERENCIAS

1. Ohvo-Rekila H, Ramstedt B, Leppimaki P, Slotte JP. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res.* 2002 Jan;41(1):66-97.
2. Incardona JP, Eaton S. Cholesterol in signal transduction. *Current opinion in cell biology.* 2000 Apr;12(2):193-203.
3. Hanukoglu I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 1992 Dec;43(8):779-804.
4. Pfrieger FW. Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochimica et biophysica acta.* 2003 Mar 10;1610(2):271-80.
5. Ribeiro SM, Luz Sdos S, Aquino Rde C. The Role of Nutrition and Physical Activity in Cholesterol and Aging. *Clinics in geriatric medicine.* 2015 Aug;31(3):401-16.
6. Kalaria RN. Small vessel disease and Alzheimer's dementia: pathological considerations. *Cerebrovasc Dis.* 2002;13 Suppl 2:48-52.
7. Jarvik GP, Austin MA, Fabsitz RR, Auwerx J, Reed T, Christian JC. Genetic influences on age-related change in total cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol, and triglyceride levels: longitudinal apolipoprotein E genotype effects. *Genetic epidemiology.* 1994;11(4):375-84.
8. Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology.* 1998;17(1):14-20.
9. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009 Oct;41(10):1088-93.
10. Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. *Current opinion in lipidology.* 2001 Apr;12(2):105-12.
11. Shi C, Liu J, Wu F, Zhu X, Yew DT, Xu J. beta-sitosterol inhibits high cholesterol-induced platelet beta-amyloid release. *Journal of bioenergetics and biomembranes.* 2011 Dec;43(6):691-7.
12. Hoglund K, Blennow K. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on beta-amyloid peptide levels: implications for Alzheimer's disease. *CNS Drugs.* 2007;21(6):449-62.
13. Olszewski AJ, Szostak WB, Bialkowska M, Rudnicki S, McCully KS. Reduction of plasma lipid and homocysteine levels by pyridoxine, folate, cobalamin, choline, riboflavin, and troxerutin in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1989 Jan;75(1):1-6.
14. O K, Lynn EG, Chung YH, Siow YL, Man RY, Choy PC. Homocysteine stimulates the production and secretion of cholesterol in hepatic cells. *Biochimica et biophysica acta.* 1998 Aug 28;1393(2-3):317-24.

15. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest*. 2001 May;107(10):1263-73.
16. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Martelli M, Servadei L, Brunetti N. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2005 Sep;82(3):636-43.
17. Seshadri S. Elevated plasma homocysteine levels: risk factor or risk marker for the development of dementia and Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis*. 2006 Aug;9(4):393-8.
18. Fuso A, Seminara L, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Scarpa S. S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol Cell Neurosci*. 2005 Jan;28(1):195-204.
19. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 May 16;120(3):885-90.
20. Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Biemann K. Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Feb 15;301(1):41-52.
21. Wolozin B. A fluid connection: cholesterol and Abeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 8;98(10):5371-3.
22. Doraiswamy PM, Xiong GL. Pharmacological strategies for the prevention of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2006 Jan;7(1):1-10.
23. Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 26;95(11):6460-4.
24. Won JS, Im YB, Khan M, Contreras M, Singh AK, Singh I. Lovastatin inhibits amyloid precursor protein (APP) beta-cleavage through reduction of APP distribution in Lubrol WX extractable low density lipid rafts. *J Neurochem*. 2008 May;105(4):1536-49.
25. McGuinness B, O'Hare J, Craig D, Bullock R, Malouf R, Passmore P. Statins for the treatment of dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 (8):CD007514.
26. Scott HD, Laake K. Statins for the prevention of Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001 (4):CD003160.
27. Mailman T, Hariharan M, Karten B. Inhibition of neuronal cholesterol biosynthesis with lovastatin leads to impaired synaptic vesicle release even in the presence of lipoproteins or geranylgeraniol. *J Neurochem*. 2011 Dec;119(5):1002-15.

28. Linetti A, Fratangeli A, Taverna E, Valnegri P, Francolini M, Cappello V. Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *Journal of cell science*. 2010 Feb 15;123(Pt 4):595-605.
29. Cook. RP. Cholesterol Chemistry, Biochemistry, and Pathology. New York, NY, USA: Academic Press Inc.; 1958.
30. Rosenfeld L. Four Centuries of Clinical Chemistry. New York University School of Medicine, New York, NY, USA: Taylor & Francis; 1999.
31. Bloch K. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids*. 1992 Aug;57(8):378-83.
32. Claros MG. BioROM2011: ayudas al aprendizaje de bioquímica, biotecnología y biología molecular. Disponible en: <http://www.biorom.uma.es>.
33. Eastwood M. The great cholesterol myth: unfortunate consequences of Brown and Goldstein's mistake. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2012 Feb;105(2):214.
34. Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Disponible en: http://www.nobelprize.org/nobel_organizations/nobelmedia/nobelprize_org.
35. Plakkal Ayyappan J, Paul A, Goo YH. Lipid droplet-associated proteins in atherosclerosis (Review). *Molecular medicine reports*. 2016 Jun;13(6):4527-34.
36. Tiwari V, Khokhar M. Mechanism of action of anti-hypercholesterolemia drugs and their resistance. *Eur J Pharmacol*. 2014 Oct 15;741:156-70.
37. van Rooy MJ, Pretorius E. Obesity, hypertension and hypercholesterolemia as risk factors for atherosclerosis leading to ischemic events. *Current medicinal chemistry*. 2014;21(19):2121-9.
38. Krstic D, Knuesel I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nature reviews Neurology*. 2013 Jan;9(1):25-34.
39. Liu G, Yao L, Liu J, Jiang Y, Ma G, Genetic. Cardiovascular disease contributes to Alzheimer's disease: evidence from large-scale genome-wide association studies. *Neurobiol Aging*. 2014 Apr;35(4):786-92.
40. Rosenberg PB, Mielke MM, Tschanz J, Cook L, Corcoran C, Hayden KM. Effects of cardiovascular medications on rate of functional decline in Alzheimer disease. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*. 2008 Nov;16(11):883-92.
41. Elias-Sonnenschein LS, Viechtbauer W, Ramakers IH, Verhey FR, Visser PJ. Predictive value of APOE-epsilon4 allele for progression from MCI to AD-type dementia: a meta-analysis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2011 Oct;82(10):1149-56.
42. Razay G, Vreugdenhil A, Wilcock G. The metabolic syndrome and Alzheimer disease. *Archives of neurology*. 2007 Jan;64(1):93-6.

43. Ambrecht HJ, Okuda K, Wongsurawat N, Nemani RK, Chen ML, Boltz MA. Characterization and regulation of the vitamin D hydroxylases. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1992 Dec;43(8):1073-81.
44. Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*. New York, NY. 2001 Nov 9;294(5545):1354-7.
45. Chen HW, Heiniger HJ. Stimulation of sterol synthesis in peripheral leukocytes of leukemic mice. *Cancer research*. 1974 Jun;34(6):1304-7.
46. Tudela V. El colesterol: lo bueno y lo malo: Fondo de cultura económica; 1996.
47. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* New York, NY. 1986 Apr 4;232(4746):34-47.
48. Nelson DL, M.M. Lehninger. *Principios de Bioquímica*. 4a ed: Omega; 2005.
49. Vikram Jairam KUaVN. Pathophysiology of Lipoprotein Oxidation. In: Kostner SFaG, editor. *Lipoproteins - Role in Health and Diseases*: InTech; 2012.
50. Norlin M, Wikvall K. Enzymes in the conversion of cholesterol into bile acids. *Current molecular medicine*. 2007 Mar;7(2):199-218.
51. Dikkers A, Tietge UJ. Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC. *World journal of gastroenterology*. 2010 Dec 21;16(47):5936-45.
52. Heverin M, Bogdanovic N, Lutjohann D, Bayer T, Pikuleva I, Bretillon L. Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res*. 2004 Jan;45(1):186-93.
53. Shafaati M, Marutle A, Pettersson H, Lovgren-Sandblom A, Olin M, Pikuleva I. Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in the brains of Alzheimer's patients with the Swedish APP 670/671 mutation. *J Lipid Res*. 2011 May;52(5):1004-10.
54. Cofan Pujol M. [Basic mechanisms: absorption and excretion of cholesterol and other sterols]. *Clinica e investigacion en arteriosclerosis : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Arteriosclerosis*. 2014 Jan-Feb;26(1):41-7.
55. Sharpe LJ, Brown AJ. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). *J Biol Chem*. 2013 Jun 28;288(26):18707-15.
56. Edwards PA, Ericsson J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:157-85.
57. Friesen JA, Rodwell VW. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol*. 2004;5(11):248.

58. Fukada Y, Takao T, Ohguro H, Yoshizawa T, Akino T, Shimonishi Y. Farnesylated gamma-subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature*. 1990 Aug 16;346(6285):658-60.
59. Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:241-69.
60. Ostrowski SM, Wilkinson BL, Golde TE, Landreth G. Statins reduce amyloid-beta production through inhibition of protein isoprenylation. *J Biol Chem*. 2007 Sep 14;282(37):26832-44.
61. Maeda A, Yano T, Itoh Y, Kakumori M, Kubota T, Egashira N. Down-regulation of RhoA is involved in the cytotoxic action of lipophilic statins in HepG2 cells. *Atherosclerosis*. 2010 Jan;208(1):112-8.
62. Cohen DE. Balancing cholesterol synthesis and absorption in the gastrointestinal tract. *J Clin Lipidol*. 2008 Apr;2(2):S1-3.
63. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997 May 2;89(3):331-40.
64. Fernandez ML, McNamara DJ. Regulation of cholesterol and lipoprotein metabolism in guinea pigs mediated by dietary fat quality and quantity. *J Nutr*. 1991 Jul;121(7):934-43.
65. Luskey KL, Stevens B. Human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Conserved domains responsible for catalytic activity and sterol-regulated degradation. *J Biol Chem*. 1985 Aug 25;260(18):10271-7.
66. Mendoza-Oliva A, Zepeda A, Arias C. The complex actions of statins in brain and their relevance for Alzheimer's disease treatment: an analytical review. *Current Alzheimer research*. 2014;11(9):817-33.
67. Clarke PR, Hardie DG. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J*. 1990 Aug;9(8):2439-46.
68. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*. 2003 Dec;144(12):5179-83.
69. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14;100(21):12027-32.
70. Jo Y, Debose-Boyd RA. Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2010 Jun;45(3):185-98.
71. Radhakrishnan A, Sun LP, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell*. 2004 Jul 23;15(2):259-68.

72. Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*. 2002 Aug 23;110(4):489-500.
73. Adams CM, Reitz J, De Brabander JK, Feramisco JD, Li L, Brown MS. Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J Biol Chem*. 2004 Dec 10;279(50):52772-80.
74. Espenshade PJ, Li WP, Yabe D. Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep 3;99(18):11694-9.
75. Duncan EA, Brown MS, Goldstein JL, Sakai J. Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem*. 1997 May 9;272(19):12778-85.
76. Duncan EA, Dave UP, Sakai J, Goldstein JL, Brown MS. Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *J Biol Chem*. 1998 Jul 10;273(28):17801-9.
77. Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28;96(20):11041-8.
78. Sever N, Yang T, Brown MS, Goldstein JL, DeBose-Boyd RA. Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol Cell*. 2003 Jan;11(1):25-33.
79. Faust JR, Luskey KL, Chin DJ, Goldstein JL, Brown MS. Regulation of synthesis and degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase by low density lipoprotein and 25-hydroxycholesterol in UT-1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Sep;79(17):5205-9.
80. Edwards PA, Lan SF, Fogelman AM. Alterations in the rates of synthesis and degradation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase produced by cholestyramine and mevinoxin. *J Biol Chem*. 1983 Sep 10;258(17):10219-22.
81. Nakanishi M, Goldstein JL, Brown MS. Multivalent control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Mevalonate-derived product inhibits translation of mRNA and accelerates degradation of enzyme. *J Biol Chem*. 1988 Jun 25;263(18):8929-37.
82. Song BL, Sever N, DeBose-Boyd RA. Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Mol Cell*. 2005 Sep 16;19(6):829-40.
83. Bjorkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004 May;24(5):806-15.

84. McConihay JA, Horn PS, Woollett LA. Effect of maternal hypercholesterolemia on fetal sterol metabolism in the Golden Syrian hamster. *J Lipid Res.* 2001 Jul;42(7):1111-9.
85. Bertossi M, Virgintino D, Errede M, Roncali L. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of cortical plate microvasculature in the human fetus telencephalon. *Microvasc Res.* 1999 Jul;58(1):49-61.
86. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem.* 1987 Oct 15;262(29):14352-60.
87. Nieweg K, Schaller H, Pfrieger FW. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem.* 2009 Apr;109(1):125-34.
88. Dietschy JM, Turley SD. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res.* 2004 Aug;45(8):1375-97.
89. Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S. Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience.* 1993 Jul;55(1):81-90.
90. Pfrieger FW. Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays.* 2003 Jan;25(1):72-8.
91. Hayashi H. Lipid metabolism and glial lipoproteins in the central nervous system. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(4):453-61.
92. Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest.* 1985 Oct;76(4):1501-13.
93. Vance JE, Hayashi H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochimica et biophysica acta.* 2010 Aug;1801(8):806-18.
94. Fukumoto H, Deng A, Irizarry MC, Fitzgerald ML, Rebeck GW. Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in central nervous system cells by liver X receptor agonists increases secreted Abeta levels. *J Biol Chem.* 2002 Dec 13;277(50):48508-13.
95. Wellington CL, Walker EK, Suarez A, Kwok A, Bissada N, Singaraja R. ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab Invest.* 2002 Mar;82(3):273-83.
96. Ong WY, Hu CY, Soh YP, Lim TM, Pentchev PG, Patel SC. Neuronal localization of sterol regulatory element binding protein-1 in the rodent and primate brain: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *Neuroscience.* 2000;97(1):143-53.

97. Vance JE, Pan D, Campenot RB, Bussiere M, Vance DE. Evidence that the major membrane lipids, except cholesterol, are made in axons of cultured rat sympathetic neurons. *J Neurochem.* 1994 Jan;62(1):329-37.
98. Matsuda A, Nagao K, Matsuo M, Kioka N, Ueda K. 24(S)-hydroxycholesterol is actively eliminated from neuronal cells by ABCA1. *J Neurochem.* 2013 Jul;126(1):93-101.
99. Bretillon L, Diczfalusy U, Bjorkhem I, Maire MA, Martine L, Joffre C. Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is specifically expressed in neurons of the neural retina. *Curr Eye Res.* 2007 Apr;32(4):361-6.
100. Gosselet F, Saint-Pol J, Fenart L. Effects of oxysterols on the blood-brain barrier: Implications for Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 22.
101. Leoni V, Masterman T, Patel P, Meaney S, Diczfalusy U, Bjorkhem I. Side chain oxidized oxysterols in cerebrospinal fluid and the integrity of blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J Lipid Res.* 2003 Apr;44(4):793-9.
102. Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clinical anatomy.* 1995;8(6):429-31.
103. Tarawneh R, Holtzman DM. The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2012 May;2(5):a006148.
104. Gold CA, Budson AE. Memory loss in Alzheimer's disease: implications for development of therapeutics. *Expert review of neurotherapeutics.* 2008 Dec;8(12):1879-91.
105. Weintraub S, Wicklund AH, Salmon DP. The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2012 Apr;2(4):a006171.
106. Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron.* 2004 Sep 30;44(1):181-93.
107. Whitwell JL, Przybelski SA, Weigand SD, Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC. 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology.* 2007 Jul;130(Pt 7):1777-86.
108. Soto-Rojas LO. Neuroinflammation and Alteration of the Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *Intech.* 2015.
109. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2011 Sep;1(1):a006189.
110. Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Discoveries of tau, abnormally hyperphosphorylated tau and others of neurofibrillary degeneration: a personal historical perspective. *J Alzheimers Dis.* 2006;9(3 Suppl):219-42.

111. Vandenberghe R, Tournoy J. Cognitive aging and Alzheimer's disease. *Postgraduate medical journal*. 2005 Jun;81(956):343-52.
112. Dorszewska J, Predecki M, Oczkowska A, Dezor M, Kozubski W. Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*. 2016;13(9):952-63.
113. Vetrivel KS, Zhang YW, Xu H, Thinakaran G. Pathological and physiological functions of presenilins. *Molecular neurodegeneration*. 2006;1:4.
114. Maes OC, Chertkow HM, Wang E, Schipper HM. MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders. *Current genomics*. 2009 May;10(3):154-68.
115. internacional Asd. World Alzheimer Report 2015. 2015.
116. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*. 2013 May 7;80(19):1778-83.
117. Gutierrez-Robledo LM, Arrieta-Cruz I. [Dementia in Mexico: The need for a National Alzheimer s Plan]. *Gaceta medica de Mexico*. 2015 Sep-Oct;151(5):667-73.
118. Sadowski M, Pankiewicz J, Scholtzova H, Li YS, Quartermain D, Duff K. Links between the pathology of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurochem Res*. 2004 Jun;29(6):1257-66.
119. Breteler MM. Vascular involvement in cognitive decline and dementia. Epidemiologic evidence from the Rotterdam Study and the Rotterdam Scan Study. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Apr;903:457-65.
120. Meyer JS, Rauch G, Rauch RA, Haque A. Risk factors for cerebral hypoperfusion, mild cognitive impairment, and dementia. *Neurobiol Aging*. 2000 Mar-Apr;21(2):161-9.
121. Schonknecht P, Lutjohann D, Pantel J, Bardenheuer H, Hartmann T, von Bergmann K. Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls. *Neurosci Lett*. 2002 May 10;324(1):83-5.
122. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Archives of neurology*. 1998 Nov;55(11):1449-55.
123. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987 Feb 19-25;325(6106):733-6.
124. Rossjohn J, Cappai R, Feil SC, Henry A, McKinsty WJ, Galatis D. Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature structural biology*. 1999 Apr;6(4):327-31.

125. Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* New York, NY. 1987 Feb 20;235(4791):877-80.
126. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* New York, NY. 1987 Feb 20;235(4791):880-4.
127. Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K, Masters CL. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochemistry international*. 2000 Mar;36(3):175-84.
128. Murayama Y, Takeda S, Yonezawa K, Giambarella U, Nishimoto I, Ogata E. Cell surface receptor function of amyloid precursor protein that activates Ser/Thr kinases. *Gerontology*. 1996;42 Suppl 1:2-11.
129. Ninomiya H, Roch JM, Sundsmo MP, Otero DA, Saitoh T. Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid beta/A4 protein precursor that promotes fibroblast growth. *The Journal of cell biology*. 1993 May;121(4):879-86.
130. White AR, Multhaup G, Maher F, Bellingham S, Camakaris J, Zheng H. The Alzheimer's disease amyloid precursor protein modulates copper-induced toxicity and oxidative stress in primary neuronal cultures. *J Neurosci*. 1999 Nov 1;19(21):9170-9.
131. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* New York, NY. 1992 Apr 10;256(5054):184-5.
132. Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*. 2008 Oct 31;283(44):29615-9.
133. Cole SL, Vassar R. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Molecular neurodegeneration*. 2007;2:22.
134. Vingtdeux V, Sergeant N, Buee L. Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer's disease. *Frontiers in physiology*. 2012;3:229.
135. Ledesma MD, Dotti CG. Peripheral cholesterol, metabolic disorders and Alzheimer's disease. *Frontiers in bioscience*. 2012;4:181-94.
136. Gomez-Isla T, West HL, Rebeck GW, Harr SD, Growdon JH, Locascio JJ. Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease. *Annals of neurology*. 1996 Jan;39(1):62-70.
137. Gamboa R, Vargas-Alarcon G, Medina-Urrutia A, Cardoso-Saldana G, Hernandez-Pacheco G, Zamora-Gonzalez J. Influence of the apolipoprotein E polymorphism on plasma lipoproteins in a Mexican population. *Human biology*. 2001 Dec;73(6):835-43.

138. Solomon A, Kivipelto M, Wolozin B, Zhou J, Whitmer RA. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009;28(1):75-80.
139. Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*. 2010 May 12;303(18):1832-40.
140. Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN, Buross J. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2011 May;43(5):436-41.
141. Bretillon L, Siden A, Wahlund LO, Lutjohann D, Minthon L, Crisby M. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases. *Neurosci Lett*. 2000 Oct 27;293(2):87-90.
142. Papassotiropoulos A, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Rao ML, Maier W, Björkhem I, von Bergmann K, Heun R. Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2000.
143. Lutjohann D, Papassotiropoulos A, Björkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res*. 2000 Feb;41(2):195-8.
144. Hughes TM, Rosano C, Evans RW, Kuller LH. Brain cholesterol metabolism, oxysterols, and dementia. *J Alzheimers Dis*. 2013;33(4):891-911.
145. Shobab LA, Hsiung GY, Feldman HH. Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet neurology*. 2005 Dec;4(12):841-52.
146. Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC, 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol*. 1994 Mar;126(1):88-94.
147. Sparks DL, Kuo YM, Roher A, Martin T, Lukas RJ. Alterations of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation. Preliminary observations. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Apr;903:335-44.
148. Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis*. 2000 Aug;7(4):321-31.
149. Shie FS, Jin LW, Cook DG, Leverenz JB, LeBoeuf RC. Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport*. 2002 Mar 25;13(4):455-9.
150. Kalvodova. Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *J Biol Chem*. 2005.

151. Ghribi O, Golovko MY, Larsen B, Schrag M, Murphy EJ. Deposition of iron and beta-amyloid plaques is associated with cortical cellular damage in rabbits fed with long-term cholesterol-enriched diets. *J Neurochem*. 2006 Oct;99(2):438-49.
152. Kalvodova L, Kahya N, Schwille P, Eehalt R, Verkade P, Drechsel D. Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *J Biol Chem*. 2005 Nov 4;280(44):36815-23.
153. Mendoza-Oliva A, Ferrera P, Arias C. Interplay between cholesterol and homocysteine in the exacerbation of amyloid-beta toxicity in human neuroblastoma cells. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013 Sep;12(6):842-8.
154. Ferrera P, Mercado-Gomez O, Silva-Aguilar M, Valverde M, Arias C. Cholesterol potentiates beta-amyloid-induced toxicity in human neuroblastoma cells: involvement of oxidative stress. *Neurochem Res*. 2008 Aug;33(8):1509-17.
155. Anchisi L, Dessi S, Pani A, Mandas A. Cholesterol homeostasis: a key to prevent or slow down neurodegeneration. *Frontiers in physiology*. 2012;3:486.
156. Morgado I, Garvey M. Lipids in Amyloid-beta Processing, Aggregation, and Toxicity. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015;855:67-94.
157. Pietrzik K, Bronstrup A. Causes and consequences of hyperhomocyst(e)inemia. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 1997;67(5):389-95.
158. Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *European journal of clinical investigation*. 1992 Feb;22(2):79-87.
159. Brattstrom L, Lindgren A, Israelsson B, Andersson A, Hultberg B. Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. *Journal of internal medicine*. 1994 Dec;236(6):633-41.
160. Meleady RA, Graham IM. Homocysteine and vascular disease: nature or nurture? *Journal of cardiovascular risk*. 1998 Aug;5(4):233-7.
161. Zhu X, Smith MA, Honda K, Aliev G, Moreira PI, Nunomura A. Vascular oxidative stress in Alzheimer disease. *Journal of the neurological sciences*. 2007 Jun 15;257(1-2):240-6.
162. Snowdon DA, Tully CL, Smith CD, Riley KP, Markesbery WR. Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun study. *The American journal of clinical nutrition*. 2000 Apr;71(4):993-8.

163. Mendoza-Oliva A. Relaciones entre la toxicidad inducida por homocisteína, colesterol y Cu²⁺ en presencia del péptido β-amiloide: implicaciones para la Enfermedad de Alzheimer. UNAM; 2011.
164. Grieve A, Butcher SP, Griffiths R. Synaptosomal plasma membrane transport of excitatory sulphur amino acid transmitter candidates: kinetic characterisation and analysis of carrier specificity. *Journal of neuroscience research*. 1992 May;32(1):60-8.
165. White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL. Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J Neurochem*. 2001 Mar;76(5):1509-20.
166. Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TB. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *Journal of neuroscience research*. 2002 Dec 1;70(5):694-702.
167. Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem*. 2001 Jul;78(2):249-53.
168. Kruman, II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci*. 2000 Sep 15;20(18):6920-6.
169. Kruman, II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002 Mar 1;22(5):1752-62.
170. Zieminska E, Lazarewicz JW. Excitotoxic neuronal injury in chronic homocysteine neurotoxicity studied in vitro: the role of NMDA and group I metabotropic glutamate receptors. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2006;66(4):301-9.
171. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in neurosciences*. 2003 Mar;26(3):137-46.
172. Siegfried Z, Simon I. DNA methylation and gene expression. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*. 2010 May-Jun;2(3):362-71.
173. Beyer K, Lao JI, Latorre P, Riutort N, Matute B, Fernandez-Figueras MT. Methionine synthase polymorphism is a risk factor for Alzheimer disease. *Neuroreport*. 2003 Jul 18;14(10):1391-4.
174. Medina M, Urdiales JL, Amores-Sanchez MI. Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2001 Jul;268(14):3871-82.
175. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J*. 1996 Mar;10(4):471-80.

176. Daly C, Fitzgerald AP, O'Callaghan P, Collins P, Cooney MT, Graham IM. Homocysteine increases the risk associated with hyperlipidaemia. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*. 2009 Apr;16(2):150-5.
177. Kartal Ozer N, Negis Y, Aytan N. Molecular mechanisms of cholesterol or homocysteine effect in the development of atherosclerosis: Role of vitamin E. *BioFactors*. 2003;19(1-2):63-70.
178. Ozkan Y, Ozkan E, Simsek B. Plasma total homocysteine and cysteine levels as cardiovascular risk factors in coronary heart disease. *International journal of cardiology*. 2002 Mar;82(3):269-77.
179. Woo CW, Siow YL, Pierce GN, Choy PC, Minuk GY, Mymin D. Hyperhomocysteinemia induces hepatic cholesterol biosynthesis and lipid accumulation via activation of transcription factors. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2005 May;288(5):E1002-10.
180. Woo CW, Siow YL, O K. Homocysteine activates cAMP-response element binding protein in HepG2 through cAMP/PKA signaling pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006 May;26(5):1043-50.
181. Li H, Lewis A, Brodsky S, Rieger R, Iden C, Goligorsky MS. Homocysteine induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase in vascular endothelial cells: a mechanism for development of atherosclerosis? *Circulation*. 2002 Mar 5;105(9):1037-43.
182. Mufson EJ, Kordower JH. Cortical neurons express nerve growth factor receptors in advanced age and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jan 15;89(2):569-73.
183. Ray B, Bailey JA, Sarkar S, Lahiri DK. Molecular and immunocytochemical characterization of primary neuronal cultures from adult rat brain: Differential expression of neuronal and glial protein markers. *Journal of neuroscience methods*. 2009 Nov 15;184(2):294-302.
184. Tanii H, Ankarcrona M, Flood F, Nilsberth C, Mehta ND, Perez-Tur J. Alzheimer's disease presenilin-1 exon 9 deletion and L250S mutations sensitize SH-SY5Y neuroblastoma cells to hyperosmotic stress-induced apoptosis. *Neuroscience*. 2000;95(2):593-601.
185. Trimmer PA, Borland MK. Differentiated Alzheimer's disease transmitochondrial cybrid cell lines exhibit reduced organelle movement. *Antioxidants & redox signaling*. 2005 Sep-Oct;7(9-10):1101-9.
186. Lambert MP, Stevens G, Sabo S, Barber K, Wang G, Wade W. Beta/A4-evoked degeneration of differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Journal of neuroscience research*. 1994 Nov 1;39(4):377-85.
187. Li YP, Bushnell AF, Lee CM, Perlmutter LS, Wong SK. Beta-amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. *Brain research*. 1996 Nov 4;738(2):196-204.

188. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2013;1078:9-21.
189. Agholme L, Lindstrom T, Kagedal K, Marcusson J, Hallbeck M. An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis*. 2010;20(4):1069-82.
190. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 1983 Oct;71(4):741-7.
191. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Cena V. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*. 2000 Sep;75(3):991-1003.
192. Reynolds CP, Biedler JL, Spengler BA, Reynolds DA, Ross RA, Frenkel EP. Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1986 Mar;76(3):375-87.
193. Sarnat HB, Nochlin D, Born DE. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system. *Brain & development*. 1998 Mar;20(2):88-94.
194. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
195. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
196. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.
197. Zhao Z, Lu R, Zhang B, Shen J, Yang L, Xiao S. Differentiation of HT22 neurons induces expression of NMDA receptor that mediates homocysteine cytotoxicity. *Neurological research*. 2012 Jan;34(1):38-43.
198. Broch OJ, Ueland PM. Regional distribution of homocysteine in the mammalian brain. *J Neurochem*. 1984 Dec;43(6):1755-7.
199. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 May 27;94(11):5923-8.
200. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annual review of nutrition*. 1992;12:279-98.
201. Mansoor MA, Ueland PM, Aarsland A, Svardal AM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with homocystinuria. *Metabolism: clinical and experimental*. 1993 Nov;42(11):1481-5.

202. Griffiths R, Grieve A, Allen S, Olverman HJ. Neuronal and glial plasma membrane carrier-mediated uptake of L-homocysteate is not selectively blocked by beta-p-chlorophenylglutamate. *Neurosci Lett*. 1992 Dec 7;147(2):175-8.
203. Zeise ML, Knopfel T, Zieglgansberger W. (+/-)-beta-Parachlorophenylglutamate selectively enhances the depolarizing response to L-homocysteic acid in neocortical neurons of the rat: evidence for a specific uptake system. *Brain research*. 1988 Mar 8;443(1-2):373-6.
204. Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis*. 2003 Oct;14(1):32-42.
205. Sachdev PS. Homocysteine and brain atrophy. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2005 Sep;29(7):1152-61.
206. Herrmann W, Obeid R. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2011 Mar;49(3):435-41.
207. Morihara N, Ide N, Weiss N. Aged garlic extract inhibits homocysteine-induced scavenger receptor CD36 expression and oxidized low-density lipoprotein cholesterol uptake in human macrophages in vitro. *Journal of ethnopharmacology*. 2011 Apr 12;134(3):711-6.
208. Vignini A, Nanetti L, Bacchetti T, Ferretti G, Curatola G, Mazzanti L. Modification induced by homocysteine and low-density lipoprotein on human aortic endothelial cells: an in vitro study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004 Sep;89(9):4558-61.
209. Miwa K, Tanaka M, Okazaki S, Yagita Y, Sakaguchi M, Mochizuki H. Increased Total Homocysteine Levels Predict the Risk of Incident Dementia Independent of Cerebral Small-Vessel Diseases and Vascular Risk Factors. *J Alzheimers Dis*. 2015;49(2):503-13.
210. Mattson MP. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular medicine*. 2003;3(2):65-94.
211. Chen C, Halkos ME, Surowiec SM, Conklin BS, Lin PH, Lumsden AB. Effects of homocysteine on smooth muscle cell proliferation in both cell culture and artery perfusion culture models. *The Journal of surgical research*. 2000 Jan;88(1):26-33.
212. Chiang JK, Sung ML, Yu HR, Chang HI, Kuo HC, Tsai TC. Homocysteine induces smooth muscle cell proliferation through differential regulation of cyclins A and D1 expression. *Journal of cellular physiology*. 2011 Apr;226(4):1017-26.
213. Istvan ES. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J*. 2002 Dec;144(6 Suppl):S27-32.

214. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990 Feb 1;343(6257):425-30.
215. Simons M, Schwarzler F, Lutjohann D, von Bergmann K, Beyreuther K, Dichgans J. Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Annals of neurology*. 2002 Sep;52(3):346-50.
216. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 8;98(10):5856-61.
217. Lutjohann D, Stroick M, Bertsch T, Kuhl S, Lindenthal B, Thelen K. High doses of simvastatin, pravastatin, and cholesterol reduce brain cholesterol synthesis in guinea pigs. *Steroids*. 2004 Jun;69(6):431-8.
218. Cole SL, Grudzien A, Manhart IO, Kelly BL, Oakley H, Vassar R. Statins cause intracellular accumulation of amyloid precursor protein, beta-secretase-cleaved fragments, and amyloid beta-peptide via an isoprenoid-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2005 May 13;280(19):18755-70.
219. Vega GL, Weiner MF, Lipton AM, Von Bergmann K, Lutjohann D, Moore C. Reduction in levels of 24S-hydroxycholesterol by statin treatment in patients with Alzheimer disease. *Archives of neurology*. 2003 Apr;60(4):510-5.
220. Eckert GP, Kirsch C, Mueller WE. Differential effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and apoE-deficient mice. *Neuroreport*. 2001 Apr 17;12(5):883-7.
221. Kirsch C, Eckert GP, Mueller WE. Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochemical pharmacology*. 2003 Mar 1;65(5):843-56.
222. Naidu A, Xu Q, Catalano R, Cordell B. Secretion of apolipoprotein E by brain glia requires protein prenylation and is suppressed by statins. *Brain research*. 2002 Dec 20;958(1):100-11.
223. Botti RE, Triscari J, Pan HY, Zayat J. Concentrations of pravastatin and lovastatin in cerebrospinal fluid in healthy subjects. *Clin Neuropharmacol*. 1991 Jun;14(3):256-61.
224. Ness GC, Eales S, Lopez D, Zhao Z. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression by sterols and nonsterols in rat liver. *Arch Biochem Biophys*. 1994 Feb 1;308(2):420-5.
225. Mendoza-Oliva A, Ferrera P, Fragoso-Medina J, Arias C. Lovastatin Differentially Affects Neuronal Cholesterol and Amyloid-beta Production in vivo and in vitro. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2015 Aug;21(8):631-41.
226. Cheng HH, Xu L, Kumagai H, Simoni RD. Oligomerization state influences the degradation rate of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem*. 1999 Jun 11;274(24):17171-8.

227. Hosaka A, Araki W, Oda A, Tomidokoro Y, Tamaoka A. Statins reduce amyloid beta-peptide production by modulating amyloid precursor protein maturation and phosphorylation through a cholesterol-independent mechanism in cultured neurons. *Neurochem Res.* 2013 Mar;38(3):589-600.
228. Barone E, Cenini G, Di Domenico F, Martin S, Sultana R, Mancuso C. Long-term high-dose atorvastatin decreases brain oxidative and nitrosative stress in a preclinical model of Alzheimer disease: a novel mechanism of action. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society.* 2011 Mar;63(3):172-80.
229. Kurinami H, Sato N, Shinohara M, Takeuchi D, Takeda S, Shimamura M. Prevention of amyloid beta-induced memory impairment by fluvastatin, associated with the decrease in amyloid beta accumulation and oxidative stress in amyloid beta injection mouse model. *International journal of molecular medicine.* 2008 May;21(5):531-7.
230. Maggo S, Ashton JC. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on learning and memory in the guinea pig. *Eur J Pharmacol.* 2013 Dec 1.
231. Hyypä MT, Kronholm E, Virtanen A, Leino A, Jula A. Does simvastatin affect mood and steroid hormone levels in hypercholesterolemic men? A randomized double-blind trial. *Psychoneuroendocrinology.* 2003 Feb;28(2):181-94.
232. Matthies H, Jr., Schulz S, Holt V, Krug M. Inhibition by compactin demonstrates a requirement of isoprenoid metabolism for long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuroscience.* 1997 Jul;79(2):341-6.
233. Schulz JG, Bosel J, Stoeckel M, Megow D, Dirnagl U, Endres M. HMG-CoA reductase inhibition causes neurite loss by interfering with geranylgeranylpyrophosphate synthesis. *J Neurochem.* 2004 Apr;89(1):24-32.
234. Vural K, Tuglu MI. Neurotoxic effect of statins on mouse neuroblastoma NB2a cell line. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011 Sep;15(9):985-91.
235. Tanaka T, Tatsuno I, Uchida D, Moroo I, Morio H, Nakamura S. Geranylgeranyl-pyrophosphate, an isoprenoid of mevalonate cascade, is a critical compound for rat primary cultured cortical neurons to protect the cell death induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibition. *J Neurosci.* 2000 Apr 15;20(8):2852-9.
236. Michikawa M, Yanagisawa K. Inhibition of cholesterol production but not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. *J Neurochem.* 1999 Jun;72(6):2278-85.
237. Meske V, Albert F, Richter D, Schwarze J, Ohm TG. Blockade of HMG-CoA reductase activity causes changes in microtubule-stabilizing protein tau via suppression of geranylgeranylpyrophosphate formation: implications for Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci.* 2003 Jan;17(1):93-102.

238. Arnold DE, Gagne C, Niknejad N, McBurney MW, Dimitroulakos J. Lovastatin induces neuronal differentiation and apoptosis of embryonal carcinoma and neuroblastoma cells: enhanced differentiation and apoptosis in combination with dbcAMP. *Mol Cell Biochem.* 2010 Dec;345(1-2):1-11.
239. Marcuzzi A, Tricarico PM, Piscianz E, Kleiner G, Vecchi Brumatti L, Crovella S. Lovastatin induces apoptosis through the mitochondrial pathway in an undifferentiated SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Cell death & disease.* 2013;4:e585.
240. Garcia-Roman N, Alvarez AM, Toro MJ, Montes A, Lorenzo MJ. Lovastatin induces apoptosis of spontaneously immortalized rat brain neuroblasts: involvement of nonsterol isoprenoid biosynthesis inhibition. *Mol Cell Neurosci.* 2001 Feb;17(2):329-41.
241. Hooff GP, Peters I, Wood WG, Muller WE, Eckert GP. Modulation of cholesterol, farnesylpyrophosphate, and geranylgeranylpyrophosphate in neuroblastoma SH-SY5Y-APP695 cells: impact on amyloid beta-protein production. *Molecular neurobiology.* 2010 Jun;41(2-3):341-50.
242. Haley RW, Dietschy JM. Is there a connection between the concentration of cholesterol circulating in plasma and the rate of neuritic plaque formation in Alzheimer disease? *Archives of neurology.* 2000 Oct;57(10):1410-2.
243. Høglund K, Thelen KM, Syversen S, Sjogren M, von Bergmann K, Wallin A. The effect of simvastatin treatment on the amyloid precursor protein and brain cholesterol metabolism in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2005;19(5-6):256-65.
244. Puig KL, Floden AM, Adhikari R, Golovko MY, Combs CK. Amyloid precursor protein and proinflammatory changes are regulated in brain and adipose tissue in a murine model of high fat diet-induced obesity. *PLoS one.* 2012;7(1):e30378.
245. Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 2002 Jun 25;58(12):1791-800.
246. Murphy MP, Morales J, Beckett TL, Astarita G, Piomelli D, Weidner A. Changes in cognition and amyloid-beta processing with long term cholesterol reduction using atorvastatin in aged dogs. *J Alzheimers Dis.* 2010;22(1):135-50.
247. Kojro E, Fuger P, Prinzen C, Kanarek AM, Rat D, Endres K. Statins and the squalene synthase inhibitor zaragozic acid stimulate the non-amyloidogenic pathway of amyloid-beta protein precursor processing by suppression of cholesterol synthesis. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(4):1215-31.
248. Cole SL, Vassar R. Isoprenoids and Alzheimer's disease: a complex relationship. *Neurobiol Dis.* 2006 May;22(2):209-22.
249. Serrano-Pozo A, Vega GL, Lütjohann D, Locascio JJ, Tennis MK, Deng A. Effects of simvastatin on cholesterol metabolism and Alzheimer disease biomarkers. *Alzheimer disease and associated disorders.* 2010 Jul-Sep;24(3):220-6.

Artículo 1: Lovastatin Differentially Affects Neuronal Cholesterol and Amyloid- β Production *in vivo* and *in vitro*.

Mendoza-Oliva, A., Ferrera, P., Fragoso-Medina, J., Arias, C. (2015) CNS Neurol Disord Drug Targets 12(6): 842-848.

ORIGINAL ARTICLE

Lovastatin Differentially Affects Neuronal Cholesterol and Amyloid- β Production *in vivo* and *in vitro*

Aydé Mendoza-Oliva,¹ Patricia Ferrera,¹ Jorge Fragoso-Medina² & Clorinda Arias¹

¹ Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

² Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

Keywords

APP; Cholesterol; High fat diet; HMGCR; Lovastatin; SREBP-2.

Correspondence

Clorinda Arias, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-228, 04510 México D.F., México.
Tel.: +52-55 56229215;
Fax: +52 55 56229182;
E-mail: carias@unam.mx
Received 13 January 2015; revision 8 May 2015; accepted 22 May 2015

doi: 10.1111/cns.12420

SUMMARY

Background and Aims: Epidemiological and experimental studies indicate that high cholesterol may increase susceptibility to age-associated neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease (AD). Thus, it has been suggested that statins, which are inhibitors of the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), may be a useful therapeutic tool to diminish the risk of AD. However, several studies that analyzed the therapeutic benefits of statins have yielded conflicting results. Herein, we investigated the role of lovastatin on neuronal cholesterol homeostasis and its effects on amyloid β protein production *in vivo* and *in vitro*. **Methods and Results:** Lovastatin effects were analyzed *in vitro* using differentiated human neuroblastoma cells and *in vivo* in a lovastatin-fed rat model. We demonstrated that lovastatin can differentially affect the expression of APP and $A\beta$ production *in vivo* and *in vitro*. Lovastatin-induced HMGCR inhibition was detrimental to neuronal survival *in vitro* via a mechanism unrelated to the reduction of cholesterol. We found that *in vivo*, dietary cholesterol was associated with increased $A\beta$ production in the cerebral cortex, and lovastatin was not able to reduce cholesterol levels. However, lovastatin induced a remarkable increase in the mature form of the sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2) as well as its target gene HMGCR, in both neuronal cells and in the brain. **Conclusions:** Lovastatin modifies the mevalonate pathway without affecting cholesterol levels *in vivo* and is able to reduce $A\beta$ levels only *in vitro*.

Introduction

Epidemiological and experimental studies have linked changes in cholesterol metabolism to an increased susceptibility to AD [1–3]. In fact, the $\epsilon 4$ allele of ApoE, which is associated with high cholesterol, is a well-established risk factor for AD [4,5]. $A\beta$ deposition in the brain is considered an important factor in AD progression, as it initiates a cascade of events associated with synaptic damage and neuronal death [6]. The majority of APP is constitutively cleaved within the $A\beta$ sequence by α -secretase enzymes, preventing $A\beta$ production. In the amyloidogenic pathway, APP is proteolyzed by β -secretase, which is further cleaved by γ -secretase, leading to $A\beta$ formation [7–9]. High-cholesterol intake has been linked to the accumulation of $A\beta$ in the brain, suggesting that high cholesterol might increase the amyloidogenic processing of APP and that, in contrast, low cholesterol favors the nonamyloidogenic pathway, decreasing $A\beta$ production and amyloid plaque formation [10–12]. Changes in membrane cholesterol levels or in its distribution in lipid rafts have been suggested to influence the activity and expression of the enzymes involved in the amyloidogenic processing of APP [10,11,13,14]. We have previously shown

that neuronal exposure to high cholesterol worsens $A\beta$ toxicity by increasing the formation of ROS [15]. Thus, cholesterol may increase the brain's vulnerability to $A\beta$ at two levels: by promoting $A\beta$ deposition and by increasing its toxicity. Therefore, it has been suggested that statins, which are pharmacological inhibitors of HMGCR [16], may be useful in diminishing the risk of AD [17–19]. While some reports have proposed the use of statins due to their cholesterol-lowering properties and their ability to decrease $A\beta$ formation [13,20], their beneficial effects remain controversial [21–23]. Statins have many positive effects in the CNS, including effects on cell survival [24,25] and neuronal plasticity [26,27]. Statins also display anti-amyloidogenic activity [13,28–31] and antioxidant [32,33] and anti-inflammatory properties [34,35]. In contrast, statin-mediated neurotoxicity has also been reported [36–42], including the inhibition of neurite outgrowth [43–45] and the impairment of neurotransmission [46,47]. In addition to their cholesterol-lowering properties, statins have pleiotropic actions related to inhibition of the mevalonate pathway, which lowers the concentrations of biologically active isoprenoid intermediates, such as geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) and farnesyl pyrophosphate (FPP).

Circulating cholesterol, however, is regulated differently than cholesterol in the brain (revised by Mendoza-Oliva et al. [48]). Due to existing controversy about the relationship between cholesterol and AD [49], it is important to understand how cholesterol in the brain is regulated and how this process is affected by statins before we can determine their potential and safety for use in treating AD. The aim of this study was to explore the effects of lovastatin, a lipophilic statin able to cross the blood–brain barrier [50], on cholesterol homeostasis and neuronal survival. We also aimed to uncover any links with APP expression and A β metabolism using a human neuroblastoma cell model and an *in vivo* lovastatin-fed rat model.

Materials and Methods

Cell Culture

Human neuroblastoma cells (MSN) [51] were maintained in RPMI 1640 (Gibco Invitrogen, Grand Island, CA, USA) medium containing nonessential amino acids plus 10% fetal calf serum (Gibco Invitrogen). Cells were grown in petri dishes (100 × 15 mm) or in 24-well plates at a density of 1 × 10⁶ cells per well in an atmosphere of 5% CO₂ /95% O₂ at 37°C. After 24 h, MSN cells were differentiated by the addition of retinoic acid (10 μ M) and nerve growth factor (NGF) (50 ng/mL), and cells were exposed to different concentrations of lovastatin (2 or 10 μ M; Calbiochem, Temecula, CA, USA) or cholesterol (25 μ M; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in ethanol (0.1 and 0.16%, respectively) and cultured in normal (10%) or serum-free media for an additional 2 or 5 days. In some experiments, cholesterol and lovastatin were added simultaneously during 2 or 5 days.

Cell Viability

Cell viability was assessed through the conversion of 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) to formazan crystals by mitochondrial respiratory chain reactions [52]. The reduction of MTT is an indicator of mitochondrial redox capacity that is used as a measure of cell viability. In brief, MTT in phosphate-buffered saline (PBS) (5 mg/mL) was added to MSN cells for 1 h at 37°C in a 1:10 (v/v) ratio after incubation with lovastatin. The incubation medium was removed, and neurons were solubilized with isopropyl alcohol (0.8 mL). The absorbance of each sample was quantified using a spectrophotometer at 570 nm (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA).

Cholesterol Measurement

The total cholesterol content of MSN cells or brain samples was quantified using the Amplex Red cholesterol assay (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Briefly, cells or tissues were homogenized in lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% desoxicolate and protease inhibitors diluted in reaction buffer. An equivalent volume of Amplex Red working solution (300 μ M Amplex Red, 2 U/mL cholesterol oxidase, 2 U/mL cholesterol esterase

and 2 U/mL horseradish peroxidase) was added. The samples were incubated at 37°C for 30 min in the dark, and the absorbance was measured at 535 nm using a spectrophotometer (microplate reader, model 550; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The cholesterol content was calculated by interpolating from a standard curve of cholesterol and then normalized with respect to the protein content from each sample. The concentration of cholesterol in the culture media was approximately 132.33 μ M; for this reason, we had to remove the serum from the media to analyze the cholesterol-lowering effect of lovastatin.

Cholesterol Labeling

MSN cells were grown on coverslips, washed twice in PBS for 5 min, and stained with filipin (Sigma-Aldrich). This blue fluorescent probe was used to study the distribution of nonesterified cholesterol [53]. The filipin stock solution (1 mM) was prepared in methanol. A working solution (20 mg/mL) was prepared by dissolving the stock solution in PBS. The working solution was applied to cells for 45 min at 37°C. MSN cells were then exposed to lovastatin (10 or 2 μ M) for 5 days in normal and serum-free conditions. Next, the cells were washed twice with PBS for 5 min and fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min. The fixed cells were permeabilized with PBS/Triton 0.25% for 20 min, washed with PBS and then incubated with 500 μ L of the filipin working solution. The cells were then washed three times in PBS and observed at 60× magnification on an inverted fluorescent microscope (Olympus IX71 375) using 360 nm excitation and collecting emissions at 460 nm.

Uptake of BODIPY-FL-LDL

To analyze the incorporation of LDL into cells, we used fluorescently labeled LDL. Cells were grown on coverslips in serum-free medium and treated in the presence or absence of lovastatin (2 μ M) for 12 h. Next, cells were incubated in fresh media containing 10 μ g/mL of BODIPY-FL-LDL (Molecular Probes). After incubation at 37°C for 5 h, cells were washed with PBS and fixed in 1% paraformaldehyde. The uptake of BODIPY-FL-LDL (Ab 515 nm, Em 520 nm) was detected using a DSU confocal microscope at 60×. Consecutive z-stacks (7–9) were flattened into a single image using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Immunohistochemistry

Cells were grown on coverslips, washed twice with PBS for 5 min, fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and washed again with PBS. Cells were permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X-100 for 10 min at room temperature and left in blocking solution (PBS /BSA 5%) overnight at 4°C. These cells were incubated for 24 h at 4°C with mouse monoclonal anti-HMGCR (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and washed three times for 5 min with PBS. Cells were then incubated in the dark with a secondary antibody Alexa Fluor-546 (1:300; Molecular Probes) for 2 h at room temperature. Cells were also incubated with phalloidin for

20 min after which they were washed three times with PBS. Finally, cells were analyzed at 100× magnification. Images were obtained on an epifluorescence microscope (Zeiss Axioskop 40; Oberkochen, Germany). Negative controls were prepared by omitting the primary antibody.

Quantitative Real-time Reverse Transcription-PCR

The real-time quantitative reverse transcription (qRT-PCR) was used to quantitate mRNA levels for HMGCR (human), using β -actin mRNA (human) to normalize the data. From 1 μ g of RNA, cDNA was synthesized using the reverse transcriptase enzyme M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). With a few modifications, the cDNA was synthesized according to manufacturer's protocol: 150 ng/ μ L of random oligonucleotides, 7.5 ng/ μ L of oligonucleotide dT20, 10 mM of dNTPs, 0.1 M DTT and 100 units of M-MLV were used in a final volume of 20 μ L. The qRT-PCR amplification was performed on a Rotor-gene Q (Qiagen, Valencia, CA, USA) using the SYBR Greener qPCR SuperMix kit (Invitrogen). Each primer was at 200 nM in a final volume of 20 μ L per reaction. The reaction parameters were as follows: incubation at 50°C for 2 min, activation at 95°C for 10 min, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, alignment with oligos for HMGCR and β -actin at 60°C for 60 s, and a final elongation at 72°C for 2 min. Specificity of the amplified products was checked by analysis of melting curves.

The oligonucleotides used for human HMGCR were as follows: F 5'-TACCATGTCAGGGGTACGTC-3' and 5'-CAAGCCTAGAGACATAATCATC R-3' (247 bp). Oligonucleotides used for human β -actin were as follows: 5'-TGAAGGTGACAGCAGTCGGTTG F-3' and 5'-R GGCTTTTAGGATGGCAAGGGAC-3' (146 bp). These were all synthesized by Sigma. Samples were run in triplicate, and the data were analyzed using the method described by Pfaffl, 2001 [54].

In vivo Model of Lovastatin-fed Rats

Male Sprague Dawley rats weighing 250 g (Harlan Laboratories, Facultad de Química, UNAM, México) were used in this study. All of the animals were maintained under a reverse light/dark cycle and a controlled room temperature (22°C) with free access to a standard rodent diet (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, USA) and tap water before experimentation. All animals were handled in accordance with local government rules, the Society for Neuroscience Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Animal Care Committee of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. All efforts were made to minimize the suffering of animals and to reduce the number used.

The animals were divided into three groups: a control group, in which rats were fed a standard diet, and 2 experimental groups. In one experimental group, the animals were fed a high-fat diet (HFD) containing 1% cholesterol (Bio-Serv, Flemington, NJ, USA). The second experimental group was fed 0.04% lovastatin added to a standard diet per the instructions of Ness *et al.* [55] Rats were maintained on one of these three diets, with free access to water, for 5 days. After the treatment, all rats were decapitated during 4th hour of the dark cycle. Samples from the liver and the

brain (including the cortex, hippocampus, and cerebellum) were quickly dissected. The fresh samples were dipped into PBS with protease inhibitors (Completem, Roche, Basel SUI) and then stored at -70°C until analysis.

Measurement of A β

A β _[1-42] and A β _[1-40] levels in MSN cells were determined using an A β -specific ELISA kit (Invitrogen). After being treated as previously described, the MSN cell culture medium was collected and analyzed. The A β concentration was determined by measuring optical densities at 450 nm on a spectrophotometer (microplate reader, model 550; Bio-Rad).

The A β concentration in brain samples was determined using the same method as above, once protein was extracted from the tissue according to the manufacturer's recommendations (A β _[1-40] ELISA; Invitrogen). Tissues were weighed and homogenized in an 8× mass of cold 5 M guanidine HCl/50 mM Tris-HCl buffer and then mixed at room temperature for 3 h. The homogenized samples were diluted (1:10) with cold BSAT-DPBS buffer (Dulbecco's phosphate-buffered saline with 5% BSA and 0.03% Tween-20 supplemented with protease inhibitors) and centrifuged at 16,000 g for 20 min at 4°C. The supernatant was kept on ice and used to quantitate A β levels. All results were normalized by tissue mass and expressed as a level relative to the control values.

Immunoblotting

After experimental treatments, MSN cells or tissues were homogenized in lysis buffer. Protein samples were loaded onto a 10% SDS-PAGE gel. After electrophoresis, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked in PBS with 5% nonfat dry milk and then incubated for 2 h at room temperature. Next, the membranes were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: mouse monoclonal antibody anti-HMGCR (1:100; Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal antibody anti-SREBP-2 (1:200; Chemicon, Temecula, CA, USA), mouse monoclonal antibody anti-Alzheimer precursor protein A4 (22C11) (1:1000; Chemicon), and mouse monoclonal anti- β -actin (1:1000; Sigma-Aldrich). Membranes were washed three times for 5 min each with PBS/0.1% Tween-20 and then incubated at room temperature for 2 h with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody: goat anti-mouse IgG (1:10,000–50,000; Santa Cruz Biotechnology). Membranes were washed three times (5–10 min each) with PBS/0.1% Tween 20 and the antibody signal was detected by chemiluminescence (ECL kit; EMD Millipore, Temecula, MA, USA) on Kodak film. Densitometric analysis of the immunoblot was carried out using ImageJ software (NIH). The results are expressed as arbitrary optic density units (ODU).

Statistical Analysis

Data are presented as means \pm SEM. Statistical significance was determined by Student's *t*-test. We used GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Bethesda, MD, CA, USA) for graphs and statistical analysis.

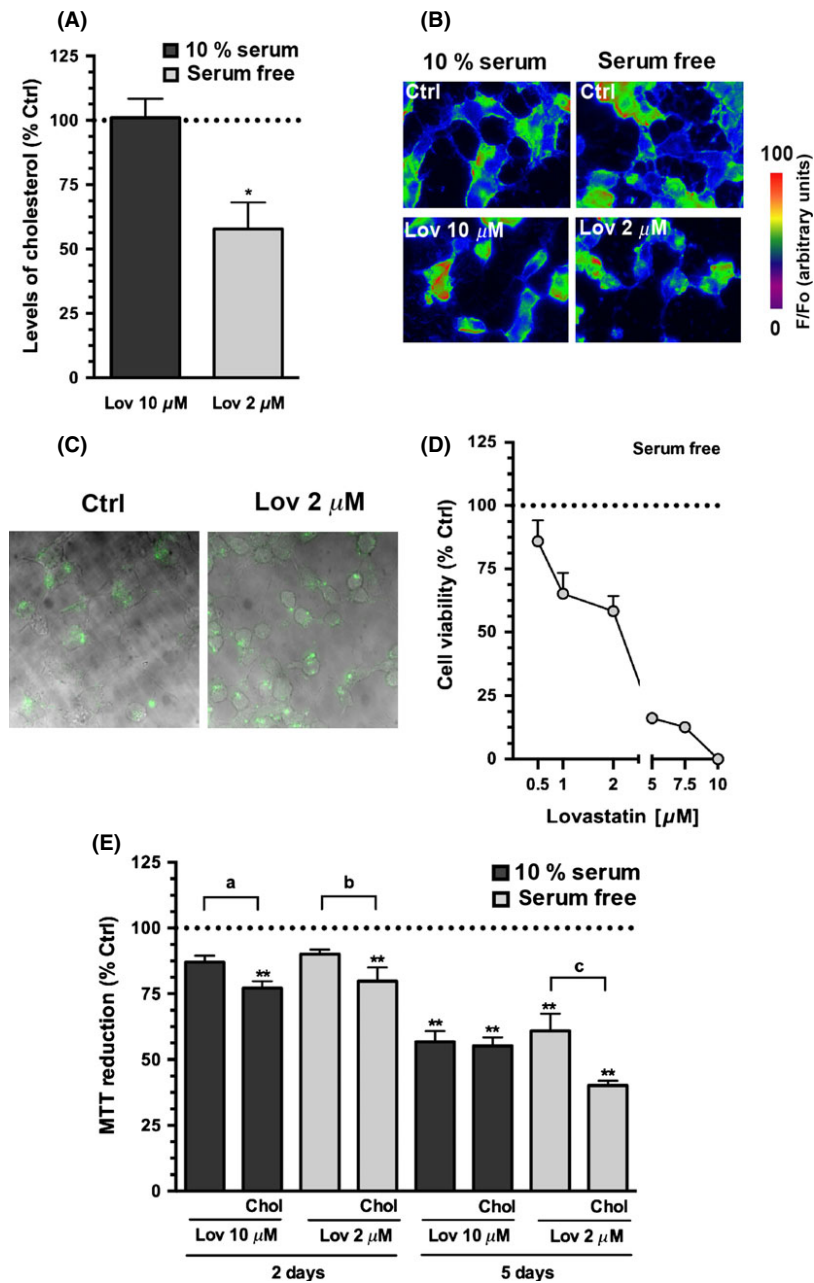


Figure 1 Effects of lovastatin on cholesterol levels and cell viability. **(A)** Cholesterol content in MSN cells quantified by the Amplex Red cholesterol assay in whole-cell lysates of neurons treated with 10 μ M lovastatin (Lov) in medium with 10% serum (dark column) or 2 μ M Lov in serum-free conditions (gray column) for 5 days. Changes in cholesterol levels are expressed as the percent change compared to control cells incubated with 10% serum or serum free in the absence of Lov (dotted lines). Each bar represents the mean \pm SEM of triplicate determinations of five to six experiments. **(B)** Fluorescent images and fluorescence intensity (arbitrary units) of filipin staining in differentiated MSN cells exposed to Lov (10 or 2 μ M) for 5 days in medium with 10% serum (left panel) and without serum (right panel) show the reduced cholesterol contents when Lov was added in serum free condition at 2 μ M. Images (60 \times) were analyzed using the ImageJ software. **(C)** The effect of Lov on LDL uptake in serum-free medium. MSN cells were treated in the absence (Ctrl) or presence of Lov (2 μ M) for 12 hours and incubated for an additional 5 hours at 37 $^{\circ}$ C in the absence (Ctrl) or presence of Lov (2 μ M) in media containing 10 μ g/mL BODIPY-FL-LDL. LDL uptake was detected by confocal fluorescence microscopy at 60 \times magnification. Consecutive z-stacks (7-9) were flattened into a single image with bright field using the ImageJ software. **(D)** Cell viability at different concentrations of Lov. Cells were treated for 5 days with different concentrations (0.5–10 μ M) of Lov (gray circles) in serum-free conditions. Each point represents the mean \pm SEM of three experiments performed in triplicate and is expressed as percent change with respect to control (dotted line). **(E)** The effects of Lov (10 or 2 μ M) on mitochondrial redox activity in the absence or presence of cholesterol (25 μ M) in medium with 10% serum (dark columns) and serum free (gray columns) at 2 or 5 days. The data were expressed as the percent of Ctrl values of each condition (dotted line). The mean \pm SEM of three to four different experiments performed in triplicate is plotted. * $P < 0.05$ vs. Ctrl, ** $P < 0.01$ vs. Ctrl, a, b, c $P < 0.05$ vs. Lov (2 or 10 μ M).

Results

Effect of Lovastatin on Cholesterol Levels and Neuronal Survival

To evaluate the effect of lovastatin on neuronal cholesterol levels, differentiated MSN cells were exposed to lovastatin for 24 h (data not shown), 48 h, and 5 days in the presence of 10% serum and in serum-free conditions to avoid the presence of cholesterol in the media. Only after 5 days in the absence of serum was lovastatin (2 μ M) able to reduce cellular cholesterol by approximately 40%, as measured by an enzymatic assay (Figure 1A) and visualized by histochemical filipin staining (Figure 1B). In the presence of 10% serum, lovastatin did not decrease cellular cholesterol levels (Figure 1A, B) because the neurons were able to take lipoproteins from the serum. This can be observed in Figure 1C, where cells were incubated with fluorescently labeled LDL (BODIPY-FL-LDL). In the serum-free condition, lovastatin-induced cell death was potentiated in a dose-dependent manner (Figure 1D). However, as shown in Figure 1E, the extent of lovastatin-dependent neuronal death for 10 μ M lovastatin in media with 10% serum was similar to the death for 2 μ M lovastatin in the serum-free condition. To determine whether the neurotoxicity was dependent on lovastatin-induced lowering of cholesterol, we examined neurotoxicity in the presence of 10% serum and with added cholesterol (25 μ M) in the serum-free condition. However, in any case, cell death was prevented by adding cholesterol (Figure 1E), suggesting that the toxicity might be associated with an additional pleiotropic mechanism mediated by the inhibition of downstream cholesterol metabolites produced as a result of HMGCR inhibition.

Lovastatin Induces Upregulation of HMGCR in MSN Cells

Next, we determined whether lovastatin affects the expression of neuronal HMGCR, the enzyme target of its inhibition, as has been observed in liver [55]. Two HMGCR bands were identified in MSN cells, which correspond to the monomeric (~97 kDa) and the degraded (~55 kDa) forms. The degradation of HMGCR is a long-term regulatory mechanism that is influenced not only by the concentration of sterols but also by the oligomeric state of the enzyme [56]. Control MSN cells express HMGCR at very low levels, but lovastatin exposure resulted in a more than 3-fold increase of HMGCR protein after 2 and 5 days of treatment. This increase corresponded to the degraded form in particular (Figure 2A, B). A 2-fold increase in HMGCR mRNA was also observed (Figure 2C). The effects of lovastatin were also accompanied by an increase of the mature form (~50–68 kDa) of the transcription factor SREBP-2 (Figure 2A). These results, which are similar to those reported in studies of the liver after statin exposure [55], suggest that HMGCR is a target of lovastatin-mediated inhibition in neurons. Furthermore, its regulation may depend on nonsterol products derived from the cholesterol pathway because an increase in HMGCR was also observed in the presence of cholesterol in the culture media (data not shown).

Systemic Administration of Lovastatin Does not Reduce Cholesterol Levels in the Brain

We decided to expand on the results obtained from cultured neurons by moving to an *in vivo* model. Rats were fed a diet containing high cholesterol (1%) or lovastatin (0.04%) for 5 days, and cholesterol levels were evaluated in the liver and in different regions of the brain. We expected the high-cholesterol diet to cause an increase in hepatic cholesterol (42%) (Figure 3A). However, cholesterol levels in the brain remained unchanged in the cerebellum, cerebral cortex, and hippocampus (Figure 3B). As has been previously reported, basal cholesterol levels were significantly higher in the brain than in the liver. To determine whether lovastatin consumption has an impact on brain cholesterol, rats were fed with lovastatin for 5 days. While this resulted in a significant reduction (30%) in hepatic cholesterol levels, there was not a significant change in the cholesterol concentration of any brain region studied (Figure 3A, B).

Systemic Administration of Lovastatin Increases HMGCR and SREBP-2 Levels in the Rat Brain

Because lovastatin induced a significant increase of HMGCR in differentiated neuroblastoma cells, we next investigated whether there was a similar regulation *in vivo*. Consistent with reports from Ness et al. [55], we found that rats fed 0.04% lovastatin for 5 days showed a marked increase in hepatic expression of HMGCR compared with rats fed a regular diet (Figure 4A). Although lovastatin did not change cholesterol levels in the brain, there was a significant increase in the HMGCR enzyme (Figure 4A). The administration of dietary cholesterol did not modify the levels of HMGCR in the liver or in the brain (Figure 4A). Together, these results demonstrate that *in vivo*, lovastatin exerts its regulatory effects in the brain at the level of HMGCR protein expression, without affecting cellular cholesterol levels. In addition to the effect of lovastatin on the expression of HMGCR, the mature form of SREBP-2 was also increased, particularly in the liver, the cerebral cortex and the hippocampus (Figure 4B).

Differential Effects of a HFD and Lovastatin on APP Levels and A β Production

Because statins have been proposed as alternative drugs for the treatment of AD due to the relationship between high cholesterol and A β production, we decided to investigate whether lovastatin regulates the level and metabolism of APP *in vivo* and *in vitro*. For the *in vitro* studies, differentiated human MSN cells expressing human APP₆₉₅ were exposed to lovastatin 10 μ M in the presence of serum or 2 μ M in the serum-free condition for 5 days. A significant increase was observed in APP levels in both conditions (Figure 5A). Unexpectedly, levels of secreted A β _[1–42] and A β _[1–40] were significantly reduced (11% and 27%, respectively) (Figure 5B). In contrast, rats fed with lovastatin for 5 days did not present elevated levels of APP or changes in A β _[1–40] in either cerebral region (Figure 5D). Rats fed with a HFD displayed a significant increase in APP in the cerebral cortex and hippocampus (21% and 23%, respectively) (Figure 5C) as well as a significant increase (45%) in A β _[1–40] in the cerebral cortex (Figure 5D).

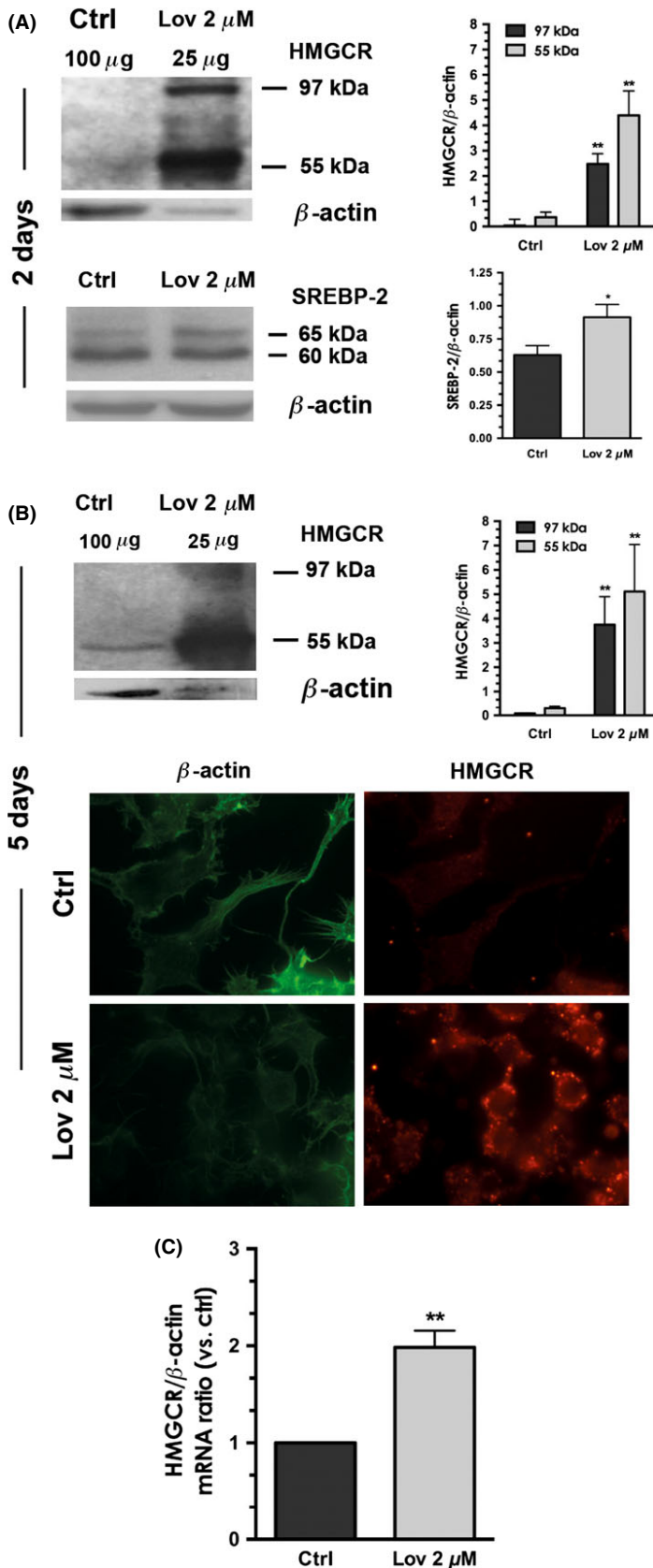


Figure 2 Lovastatin induces upregulation of HMGCR and SREBP-2 activation in MSN cells. (A) Western blot for HMGCR and the mature form of SREBP-2 in MSN cells after Lov (2 μ M) treatment in serum-free conditions during 2 days. For HMGCR levels 100 μ g of protein from control cells and 25 μ g of protein of Lov-treated cells were loaded. The graphs show the densitometric analysis of HMGCR (two bands: ~97 and 55 kDa) and mature SREBP-2 (60 and 65 kDa) levels in MSN cells. The results are normalized with loading control (β -actin). Values are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. (B) Upper panel: Western blot for HMGCR in MSN cells after Lov (2 μ M) treatment in serum-free conditions during 5 days. The graph shows the densitometric analysis of HMGCR in MSN cells. The results are normalized with loading control (β -actin). Values are the mean \pm SEM of 3–6 independent experiments. Lower panel: HMGCR immunofluorescence after treatment with Lov (2 μ M) in serum-free medium during 5 days. Left panel: actin stained with phalloidin (green). Right panel: HMGCR, anti-HMGCR (1:100) and Alexa Fluor-546 (1:300, red). Images were acquired at 100 \times . (C) HMGCR mRNA expression. MSN cells were incubated in serum-free medium with Lov (2 μ M) (dark column) for 18 h. Each bar represents the mean \pm SEM of triplicate determinations of four experiments. * $P < 0.05$ vs. Ctrl, ** $P < 0.01$ vs. Ctrl.

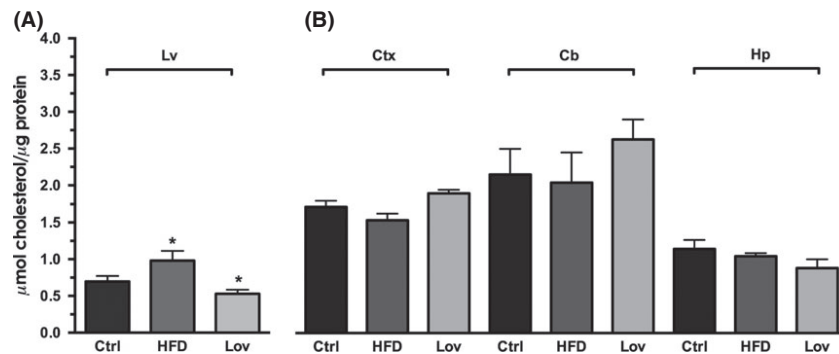


Figure 3 Determination of cholesterol concentration in liver and rat brain tissues. Rats were fed a regular diet (dark columns), HFD (gray columns), and 0.04% Lov (clear columns) for 5 days. Cholesterol concentration in (A) liver and (B) brain tissues (Ctx, Cb and Hp) was determined using the Amplex Red cholesterol assay. The results are expressed as μmol of cholesterol after being normalized by protein content. The mean \pm SEM of triplicate determinations of three experiments is plotted. * $P < 0.05$ vs. Ctrl.

Discussion

Although several lines of evidence support a relationship between high levels of circulating cholesterol and the risk of developing AD, the role of brain cholesterol in the expression of AD markers and the potential protective effects of statins remain unclear. We have demonstrated that a high-cholesterol diet increases the expression of APP *in vivo*. Furthermore, a high-cholesterol diet increases the expression of $A\beta$ *in vivo* without affecting cholesterol levels in the brain.

In clinical situations, statins are widely used to lower plasmatic cholesterol. It has also been suggested that statins could be used for the prevention and treatment of AD due to their neuroprotective effects, including $A\beta$ reduction [13,30–32], antioxidant capacities [32,33], and anti-inflammatory effects, among others. However, the implications of lowering cholesterol levels and the pleiotropic effects of statins on the CNS are not well understood. Because cholesterol and its intermediate metabolites are crucial for normal brain function, statin therapy for AD is matter of debate. In fact, there have been reports of negative consequences from treatment with statins, such as adverse cognitive effects in animals [57], psychiatric manifestations in humans [58], impairment of neurotransmission [47,59,60], altered neuroplasticity [36,38,45], and even neurotoxicity [37,42]. This study demonstrates that prolonged exposure to lovastatin, over a range of doses, induces neuronal death in MSN cells. Lovastatin-induced cell death occurred even with the addition of free cholesterol or LDL-C, suggesting that the neurotoxicity may be attributed to the pleiotropic effects associated with statins [39–42,44]. Consistent with our observations, other reports have shown that lovastatin only reduces cholesterol levels in serum-free medium. This process is accompanied by the reduction of intermediates, such as FPP and GGPP, and the reduction of protein isoprenylation in cultured neurons [61], which may contribute to the observed toxic effects of lovastatin. Although lovastatin inhibits *de novo* cholesterol synthesis, we have confirmed that cellular cholesterol levels are maintained, at least in cultured neurons. This may be the result of lipoprotein uptake from cholesterol present in the serum. An interesting finding in this work was the presence of HMGCR in neurons and its remarkable upregulation induced by lovastatin. It

is generally accepted that astrocytes are the cells that are mainly involved in cholesterol synthesis [62]. Here, we demonstrated that neurons might also participate in cholesterol regulation in the brain and that statins may modify cholesterol metabolism in these cells. *In vivo*, 5 days of lovastatin treatment was sufficient to produce a remarkable reduction in hepatic cholesterol, although brain cholesterol was not affected, similar to the results obtained from cultured cells. There are multiple reasons that could explain why lovastatin did not have an effect on total brain cholesterol levels: for example, cholesterol in the brain has greater metabolic stability and a longer half-life than cholesterol in peripheral organs [63]. It is also possible that in this model, 5 days of lovastatin treatment is not sufficient to produce levels that completely inhibit HMGCR in the brain because lovastatin concentrations in CSF (0.9–1.4 ng/mL) [50] are lower than the IC₅₀ for HMGCR inhibition in hepatocytes (2.7 ng/mL) [64]. These differences suggest that there is only partial inhibition of HMGCR in the brain in our model. We do know that lovastatin entered the brain regions analyzed due to a notable increase in the expression of the HMGCR-limiting enzyme as well as in the mature form of the transcription factor SREBP-2. The upregulation of HMGCR protein we observed is similar to that reported for the liver of rats fed with the same diet (0.04% lovastatin); in these rats, cholesterol levels were effectively reduced [55]. However, in this previous study, the authors found that reductase purified from the lovastatin-fed rats had much lower specific activity [55]. Interestingly, we observed that lovastatin exposure increased HMGCR protein levels and, paradoxically, also increased its degradation, which may indicate loss of the regulation of the enzyme by sterols or due to a mechanism unrelated to sterol concentration. In light of the fact that lovastatin inhibits synthesis of sterols and nonsterols, this result is in line with the widely held view that sterols regulate transcription and nonsterols act posttranscriptionally [65]. The notable increase in HMGCR protein and mRNA may affect the production of other biologically active intermediates in the mevalonate pathway, possibly with negative consequences for neuronal function.

High levels of circulating cholesterol have been proposed to affect the production and accumulation of $A\beta$ in the brain [10–13,29]. Therefore, statins have been proposed as an alternate ther-

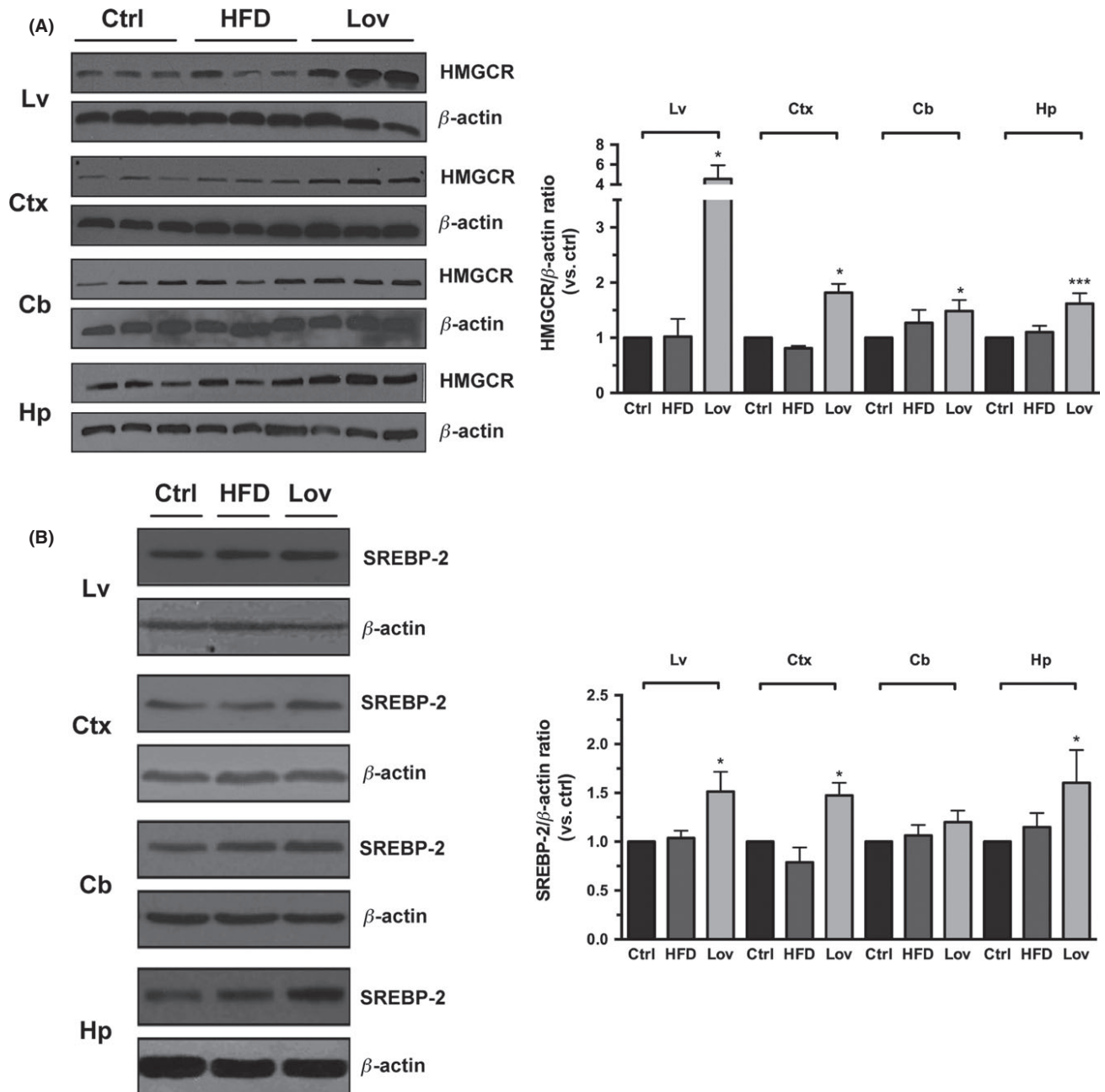


Figure 4 Levels of HMGCR and mature SREBP-2 in liver and rat brain tissues. **(A)** Western blots of HMGCR (~ 97 kDa) and **(B)** the mature form (~ 68 kDa) of SREBP-2 in liver and brain (Ctx, Cb and Hp). Rats received a regular diet (dark columns), a HFD (gray columns), and 0.04% Lov (clear columns) for 5 days. The graphs represent changes in HMGCR and SREBP-2 levels when normalized by a loading control (β -actin) and compared to controls. The mean \pm SEM of three experiments are depicted. * $P < 0.05$ vs. Ctrl. *** $P < 0.001$ vs. Ctrl.

apy for the treatment and prevention of AD. However, the role of cholesterol in the brain and the effects of statins on APP metabolism are not known. In this study, we showed that rats fed with a HFD presented increased cholesterol in the liver but not in the brain. Additionally, we observed an important rise in the production of APP in the hippocampus and cerebral cortex. However, this was accompanied by an increase in $A\beta$ levels only in the cerebral cortex, indicating that the metabolic condition of the cortex makes

it particularly sensitive to $A\beta$ accumulation. This study is the first demonstration that only 5 days of a HFD is sufficient to change the expression and processing of APP without altering the accumulation of cholesterol in the brains of normal rats. Currently, there is no mechanistic explanation for this apparent paradox. High levels of serum cholesterol may induce vascular changes that alter BBB permeability to favor the access of reactive molecules, such as cytokines or reactive oxygen species, to the CNS [66].

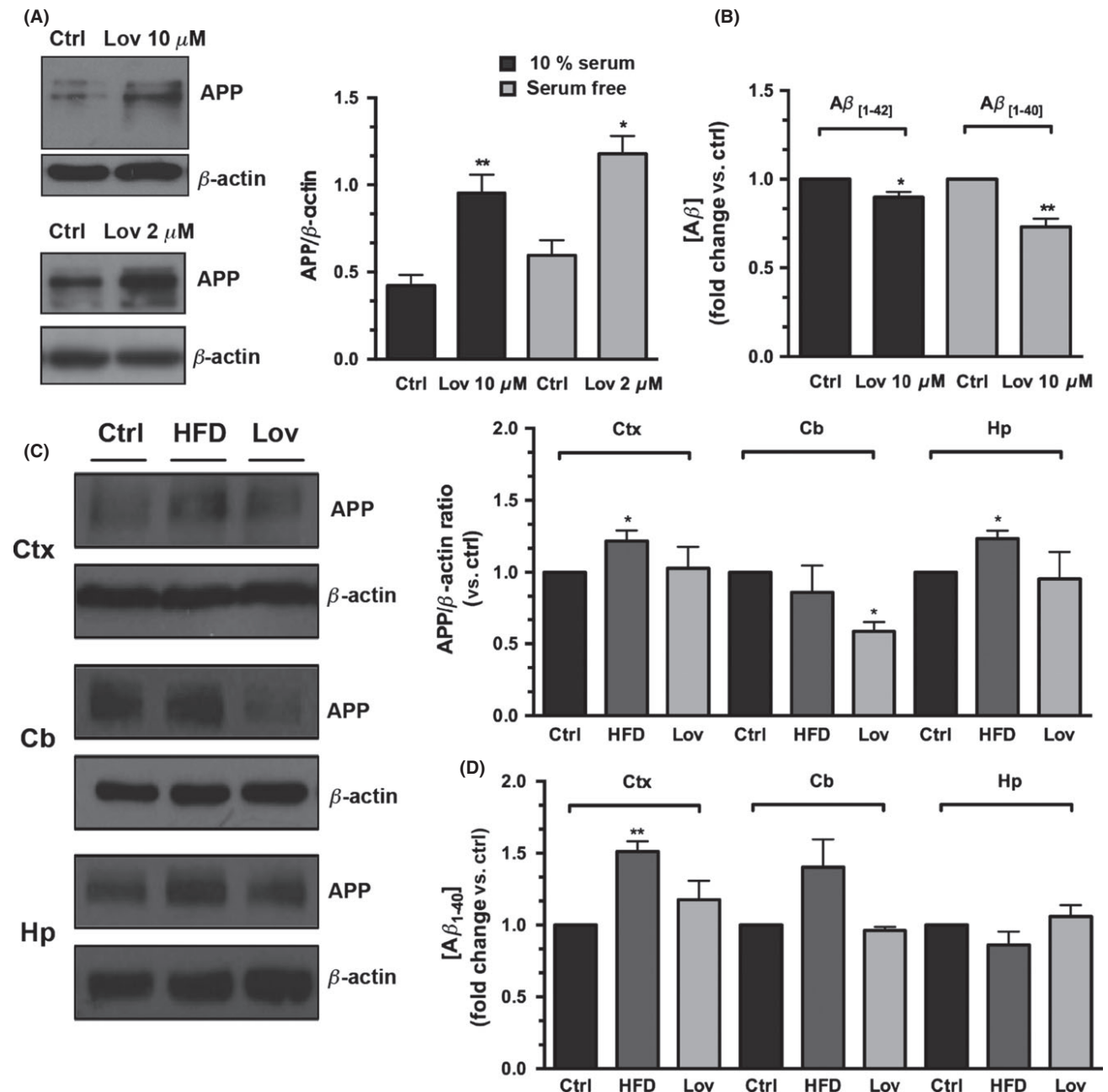


Figure 5 Differential effects of lovastatin on APP and $A\beta$ levels *in vivo* and *in vitro*. Western blots of APP in MSN cells and in rat brains after Lov treatment. **(A)** MSN cells were treated with Lov 10 μ M in 10% serum or 2 μ M in serum-free media for 5 days. The results were normalized with β -actin. Graphs represent the densitometric analysis of APP levels. The mean \pm SEM of three experiments is shown. **(B)** $A\beta$ levels in culture medium after Lov treatment. $A\beta$ [1-42] and $A\beta$ [1-40] contents are represented as fold changes with respect to control cells. The mean \pm SEM of three experiments in triplicate are plotted. **(C)** Western blot of APP levels in brain tissues (Ctx, Cb and Hp). Rats were fed with a regular diet (dark columns), HFD (gray columns), and Lov 0.04% (clear columns) for 5 days. The graphs represent changes in APP levels as compared with control. The results were normalized using a loading control (β -actin) and presented as the mean \pm SEM from three experiments. **(D)** $A\beta$ levels in rat brain (Ctx, Cb and Hp). The results were normalized by tissue protein. * $P < 0.05$ vs. Ctrl, ** $P < 0.01$ vs. Ctrl.

Consistent with our results, Ghribi et al. [67] reported that cholesterol-induced $A\beta$ and iron deposition was greater in the rabbit cortex than in the hippocampus and was associated with BBB disruption. Interestingly, the $A\beta$ load in the cerebral cortex is an early indicator for patients with AD [68].

Previous studies have found that statins have anti-amyloidogenic properties [13,20,28,69]. In this study, we demonstrated the differential effects of lovastatin treatment on the expression of APP and $A\beta$ *in vivo* and *in vitro*. In cultured neurons, lovastatin-mediated inhibition of HMGCR decreased $A\beta$ secretion, consistent

with the studies mentioned above. This effect was independent of the reduction in cholesterol, indicating an alternate mechanism is responsible for the effect of statins on APP metabolism. In contrast, *in vivo* lovastatin treatment produced a slight increase in APP without affecting A β production. It is possible that 5 days of lovastatin treatment was not sufficient to reach pharmacological doses that affect A β metabolism. However, the treatment was sufficient to produce a robust increase in molecules related to cholesterol metabolism, such as HMGCR and SREBP, in the cerebral cortex and in the hippocampus. Some studies have indicated that different metabolites of the mevalonate pathway (cholesterol and isoprenoids) have differential effects on APP expression and A β production. This finding would explain some of the apparent discrepancies between the *in vivo* and *in vitro* effects of lovastatin, depending on the doses reached in cells. For example, Ostrowski et al. [70] showed that the inhibition of protein isoprenylation by simvastatin and lovastatin in neuroblastoma cells causes the accumulation of APP through the inhibition of G proteins (Rho, Rac, Ras and Rab) that reduce APP C-terminal fragments and A β secretion. These results, together with our findings, suggest that the *in vivo* effect of statins on APP are extremely complex because multiple molecules altered by the inhibition of HMGCR are affected by statin treatment *in vitro* and *in vivo* [30,71,72]. Although we explored the short-term effects of lovastatin on basal A β production, other studies have shown that long-term administration of simvastatin is able to reduce levels of A β in transgenic mice that overproduce this peptide [73] and increases memory-related protein levels and synaptic plasticity [74,75]. However, AD

patients treated with simvastatin for 12 weeks did not exhibit changes in AD-related markers and exhibited only a modest decrease in brain cholesterol metabolism [76]. In conclusion, we demonstrated that lovastatin at the doses used, differentially affect the expression and production of APP and A β *in vivo* and *in vitro*. We showed that several of the effects of lovastatin-induced HMGCR inhibition have detrimental implications for neuronal survival *in vitro*. These effects are independent of a statin-induced reduction in cholesterol. *In vivo*, short-term administration of lovastatin does not directly reduce cholesterol levels; instead, it affects the mevalonate pathway, as indicated by the increase in mature SREBP-2 and upregulation of HMGCR we observed. These findings may help to elucidate some of the effects of lovastatin on cholesterol homeostasis in the brain and may provide additional evidence on the role of statins on APP expression and metabolism.

Acknowledgments

A. M-O received a fellowship from CONACYT, México for her PhD in the program: Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. This work also was supported by research grants from CONACYT, México 166482 and PAPIIT IN204212, UNAM.

Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ledesma MD, Dotti CG. Peripheral cholesterol, metabolic disorders and Alzheimer's disease. *Front Biosci* 2012;**4**:181–194.
- Kalaria RN. Small vessel disease and Alzheimer's dementia: pathological considerations. *Cerebrovasc Dis* 2002;**13**(Suppl 2):48–52.
- Vermee SE, Koudstaal PJ, Oudkerk M, Hofman A, Breteler MM. Prevalence and risk factors of silent brain infarcts in the population-based Rotterdam Scan Study. *Stroke* 2002;**33**:21–25.
- Jarvik GP, Austin MA, Fabsitz RR, et al. Genetic influences on age-related change in total cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol, and triglyceride levels: longitudinal apolipoprotein E genotype effects. *Genet Epidemiol* 1994;**11**:375–384.
- Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, et al. Serum total cholesterol, apolipoprotein E ϵ 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 1998;**17**:14–20.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;**297**:353–356.
- De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 2000;**113**(Pt 11):1857–1870.
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;**120**:885–890.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, et al. β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999;**286**:735–741.
- Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR. Induction of Alzheimer-like β -amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 1994;**126**:88–94.
- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, et al. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 2000;**7**:321–331.
- Shie FS, Jin LW, Cook DG, Leverenz JB, LeBoeuf RC. Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A β accumulation in transgenic mice. *NeuroReport* 2002;**13**:455–459.
- Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:6460–6464.
- Kalvodova L, Kahya N, Schwille P, et al. Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids *in vitro*. *J Biol Chem* 2005;**280**:36815–36823.
- Mendoza-Oliva A, Ferrera P, Arias C. Interplay between cholesterol and homocysteine in the exacerbation of amyloid-beta toxicity in human neuroblastoma cells. *CNS Neurol Disord Drug Target* 2013;**12**:842–848.
- Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2010;**86**:484–493.
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 2000;**356**:1627–1631.
- Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 2000;**57**:1439–1443.
- Zamrini E, McGwin G, Roseman JM. Association between statin use and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 2004;**23**:94–98.
- Fassbender K, Simons M, Bergmann C, et al. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:5856–5861.
- Scott H. Statins for the prevention of Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2001; CD003160.
- McGuinness B. Can statins prevent or help treat Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 2010;**20**:925–933.
- Butterfield D. Cholesterol-independent neuroprotective and neurotoxic activities of statins: perspectives for statin use in Alzheimer disease and other age-related neurodegenerative disorders. *Pharmacol Res* 2011;**64**:180–186.
- Bosel J, Gandor F, Harms C, et al. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurons. *J Neurochem* 2005;**92**:1386–1398.
- Bate C, Rumbold L, Williams A. Cholesterol synthesis inhibitors protect against platelet-activating factor-induced neuronal damage. *J Neuroinflammation* 2007;**4**:5.
- Evangelopoulos ME, Weis J, Kruttgen A. Mevastatin-induced neurite outgrowth of neuroblastoma cells via activation of EGFR. *J Neurosci Res* 2009;**87**:2138–2144.
- Pooler AM, Xi SC, Wurtman RJ. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme A reductase inhibitor pravastatin enhances neurite outgrowth in hippocampal neurons. *J Neurochem* 2006;**97**:716–723.
- Kojro E, Fuger P, Prinzen C, et al. Statins and the squalene synthase inhibitor zaragozic acid stimulate the non-amyloidogenic pathway of amyloid- β protein precursor processing by suppression of cholesterol synthesis. *J Alzheimers Dis* 2010;**20**:1215–1231.
- Hoglund K, Thelen KM, Syversen S, et al. The effect of simvastatin treatment on the amyloid precursor protein and brain cholesterol metabolism in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2005;**19**:256–265.

30. Won JS, Im YB, Khan M, Contreras M, Singh AK, Singh I. Lovastatin inhibits amyloid precursor protein (APP) β -cleavage through reduction of APP distribution in Lubrol WX extractable low density lipid rafts. *J Neurochem* 2008;**105**:1536–1549.
31. Hosaka A, Araki W, Oda A, Tomidokoro Y, Tamaoka A. Statins reduce amyloid β -peptide production by modulating amyloid precursor protein maturation and phosphorylation through a cholesterol-independent mechanism in cultured neurons. *Neurochem Res* 2013;**38**:589–600.
32. Barone E, Cenini G, Di Domenico F, et al. Long-term high-dose atorvastatin decreases brain oxidative and nitrosative stress in a preclinical model of Alzheimer disease: a novel mechanism of action. *Pharmacol Res* 2011;**63**:172–180.
33. Kurinami H, Sato N, Shinohara M, et al. Prevention of amyloid β -induced memory impairment by fluvastatin, associated with the decrease in amyloid β accumulation and oxidative stress in amyloid β injection mouse model. *Int J Mol Med* 2008;**21**:531–537.
34. Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, et al. Atorvastatin and pitavastatin reduce senile plaques and inflammatory responses in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurol Res* 2012;**34**:601–610.
35. Zhang YY, Fan YC, Wang M, Wang D, Li XH. Atorvastatin attenuates the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the hippocampus of an amyloid β 1-42-induced rat model of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 2013;**8**:103–110.
36. Vural K, Tuglu MI. Neurotoxic effect of statins on mouse neuroblastoma NB2a cell line. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011;**15**:985–991.
37. Michikawa M, Yanagisawa K. Inhibition of cholesterol production but not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. *J Neurochem* 1999;**72**:2278–2285.
38. Tanaka T, Tatsuno I, Uchida D, et al. Geranylgeranyl-pyrophosphate, an isoprenoid of mevalonate cascade, is a critical compound for rat primary cultured cortical neurons to protect the cell death induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibition. *J Neurosci* 2000;**20**:2852–2859.
39. Garcia-Roman N, Alvarez AM, Toro MJ, Montes A, Lorenzo MJ. Lovastatin induces apoptosis of spontaneously immortalized rat brain neuroblasts: involvement of nonsterol isoprenoid biosynthesis inhibition. *Mol Cell Neurosci* 2001;**17**:329–341.
40. Arnold DE, Gagne C, Niknejad N, McBurney MW, Dimitroulakos J. Lovastatin induces neuronal differentiation and apoptosis of embryonal carcinoma and neuroblastoma cells: enhanced differentiation and apoptosis in combination with dbcAMP. *Mol Cell Biochem* 2010;**345**:1–11.
41. Marcuzzi A, Tricarico PM, Piscianz E, Kleiner G, Vecchi Brumatti L, Crovella S. Lovastatin induces apoptosis through the mitochondrial pathway in an undifferentiated SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Cell Death Dis* 2013;**4**:e585.
42. Ferrera P, Mercado-Gomez O, Silva-Aguilar M, Valverde M, Arias C. Cholesterol potentiates β -amyloid-induced toxicity in human neuroblastoma cells: involvement of oxidative stress. *Neurochem Res* 2008;**33**:1509–1517.
43. Fan QW, Yu W, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M. Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *J Neurochem* 2002;**76**:391–400.
44. Meske V, Albert F, Richter D, Schwarze J, Ohm TG. Blockade of HMG-CoA reductase activity causes changes in microtubule-stabilizing protein tau via suppression of geranylgeranylpyrophosphate formation: implications for Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 2003;**17**:93–102.
45. Schulz JG, Bosel J, Stoeckel M, Megow D, Dirnagl U, Endres M. HMG-CoA reductase inhibition causes neurite loss by interfering with geranylgeranylpyrophosphate synthesis. *J Neurochem* 2004;**89**:24–32.
46. Kannan M, Steinert JR, Forsythe ID, Smith AG, Chernova T. Mevastatin accelerates loss of synaptic proteins and neurite degeneration in aging cortical neurons in a heme-independent manner. *Neurobiol Aging* 2010;**31**:1543–1553.
47. Mailman T, Hariharan M, Karten B. Inhibition of neuronal cholesterol biosynthesis with lovastatin leads to impaired synaptic vesicle release even in the presence of lipoproteins or geranylgeraniol. *J Neurochem* 2011;**119**:1002–1015.
48. Mendoza-Oliva A, Zepeda A, Arias C. The complex actions of statins in brain and their relevance for Alzheimer's disease treatment: an analytical review. *Curr Alzheimer Res* 2014;**11**:817–833.
49. Wood WGLL, Müller WE, Eckert GP. Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J Neurochem* 2014;**129**:559–572.
50. Botti RE, Triscari J, Pan HY, Zayat J. Concentrations of pravastatin and lovastatin in cerebrospinal fluid in healthy subjects. *Clin Neuropharmacol* 1991;**14**:256–261.
51. Reynolds CP, Biedler JL, Spengler BA, et al. Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J Natl Cancer Inst* 1986;**76**:375–387.
52. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;**65**:55–63.
53. Kruth HS. Localization of unesterified cholesterol in human atherosclerotic lesions. Demonstration of filipin-positive, oil-red-O-negative particles. *Am J Pathol* 1984;**114**:201–208.
54. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;**29**:e45.
55. Ness GC, Eales S, Lopez D, Zhao Z. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression by sterols and nonsterols in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 1994;**308**:420–425.
56. Cheng HH, Xu L, Kumagai H, Simoni RD. Oligomerization state influences the degradation rate of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem* 1999;**274**:17171–17178.
57. Maggo S, Ashton JC. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on learning and memory in the guinea pig. *Eur J Pharmacol* 2014;**723**:294–304.
58. Hyyppä MT, Kronholm E, Virtanen A, Leino A, Jula A. Does simvastatin affect mood and steroid hormone levels in hypercholesterolemic men? A randomized double-blind trial. *Psychoneuroendocrinology* 2003;**28**:181–194.
59. Matthies H Jr, Schulz S, Holt V, Krug M. Inhibition by compactin demonstrates a requirement of isoprenoid metabolism for long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 1997;**79**:341–346.
60. Linetti A, Fratangeli A, Taverna E, et al. Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *J Cell Sci* 2010;**123**:595–605.
61. Hooff GP, Peters I, Wood WG, Müller WE, Eckert GP. Modulation of cholesterol, farnesylpyrophosphate, and geranylgeranylpyrophosphate in neuroblastoma SH-SY5Y-APP695 cells: impact on amyloid β -protein production. *Mol Neurobiol* 2010;**41**:341–350.
62. Nieweg K, Schaller H, Pfrieger FW. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem* 2009;**109**:125–134.
63. Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipid* 2001;**12**:105–112.
64. Haley RW, Dietschy JM. Is there a connection between the concentration of cholesterol circulating in plasma and the rate of neuritic plaque formation in Alzheimer disease? *Arch Neurol* 2000;**57**:1410–1412.
65. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;**343**:425–430.
66. Puig KL, Floden AM, Adhikari R, Golovko MY, Combs CK. Amyloid precursor protein and proinflammatory changes are regulated in brain and adipose tissue in a murine model of high fat diet-induced obesity. *PLoS ONE* 2012;**7**:e30378.
67. Ghribi O, Golovko MY, Larsen B, Schrag M, Murphy EJ. Deposition of iron and β -amyloid plaques is associated with cortical cellular damage in rabbits fed with long-term cholesterol-enriched diets. *J Neurochem* 2006;**99**:438–449.
68. Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. Phases of β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 2002;**58**:1791–1800.
69. Murphy MP, Morales J, Beckett TL, et al. Changes in cognition and amyloid- β processing with long term cholesterol reduction using atorvastatin in aged dogs. *J Alzheimers Dis* 2010;**22**:135–150.
70. Ostrowski SM, Wilkinson BL, Golde TE, Landreth G. Statins reduce amyloid- β production through inhibition of protein isoprenylation. *J Biol Chem* 2007;**282**:26832–26844.
71. Cole SL, Vassar R. Isoprenoids and Alzheimer's disease: a complex relationship. *Neurobiol Dis* 2006;**22**:209–222.
72. Cole SL, Grudzien A, Manhart IO, Kelly BL, Oakley H, Vassar R. Statins cause intracellular accumulation of amyloid precursor protein, β -secretase-cleaved fragments, and amyloid β -peptide via an isoprenoid-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2005;**280**:18755–18770.
73. Papadopoulos P, Tong XK, Hamel E. Selective benefits of simvastatin in bitransgenic APPSwe, Ind/TGF- β 1 mice. *Neurobiol Aging* 2014;**35**:203–212.
74. Tong XK, Lecrux C, Rosa-Neto P, Hamel E. Age-dependent rescue by simvastatin of Alzheimer's disease cerebrovascular and memory deficits. *J Neurosci* 2012;**32**:4705–4715.
75. Métais C, Brennan K, Mably AJ, Scott M, Walsh DM, Herron CE. Simvastatin treatment preserves synaptic plasticity in A β PPswe/PS1dE9 mice. *J Alzheimers Dis* 2014;**39**:315–329.
76. Serrano-Pozo A, Vega GL, Lütjohann D, et al. Effects of simvastatin on cholesterol metabolism and Alzheimer disease biomarkers. *Alzheimer Dis Assoc Dis* 2010;**24**:220–226.

Artículo 2: The complex actions of statins in brain and their relevance for Alzheimer's disease treatment: an analytical review.

Mendoza-Oliva, A., Zepeda, A., Arias, C. (2014). *Curr Alzheimer Res* 11(9): 817-833.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Current Alzheimer Research, 2014, 11, 000-000

1

The Complex Actions of Statins in Brain and Their Relevance for Alzheimer's Disease Treatment: An Analytical Review

Aydé Mendoza-Oliva¹, Angélica Zepeda¹ and Clorinda Arias^{1*}

¹*Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.*

Abstract: In view that several studies have shown a positive correlation between high cholesterol and an increase in the risk for developing Alzheimer's disease (AD) statins have been proposed as alternative drugs for its treatment and/or prevention. However, the potential benefits of statins remain controversial. Although they have lipid-lowering properties, statins also have pleiotropic effects that are unrelated to cholesterol reduction and have a wide range of biological implications whose consequences in brain function have not been fully characterized. In this work we analyze different studies that have reported both, beneficial and toxic effects for statins in the central nervous system (CNS), and we revise the literature that claims their potential for treating AD. First, we present an overview of the cholesterol metabolism and its regulation in the brain in order to provide the framework for understanding the pathological association between altered cholesterol and AD. Then, we describe the cholesterol-lowering and pleiotropic properties of statins that have been reported *in vivo* and in *in vitro* models. We conclude that the effects of statins in the brain are broad and complex and that their use for treating several diseases including AD should be carefully analyzed given their multiple and broad effects.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid beta, cholesterol pathway, HMG-CoA reductase, isoprenoids, neuroprotection, neurotoxicity, statins.

INTRODUCTION

Statins are competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis [1, 2]. Discovered in 1976 by Endo and approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 1987, statins are the most common prescribed drugs to lower systemic high cholesterol levels often associated with cardiovascular disorders [3]. Recently, statins have also been proposed for treatment and prevention of AD due to the association of this disease with altered cholesterol metabolism [4, 5]. However, epidemiological and experimental studies that have examined the beneficial effects of statins for AD prevention have yielded conflicting results [6, 7] In fact, recent studies have reported deleterious effects of several statins on neuronal function both, *in vivo* and *in vitro* [8-12].

The effects of statins on cholesterol metabolism in peripheral tissues are well known and include a variety of non-lipid lowering related or pleiotropic effects, which unveil the complexity of their molecular targets within the cell [13, 14]. However the impact of the chronic use of statins and the consequent side effects in the brain are not completely known.

To analyze the effects of statins in the CNS it should be kept in mind that cholesterol homeostasis in the brain is

differentially regulated than in the periphery and that systemic cholesterol does not cross the brain blood barrier (BBB) [15]. In this work, we review the mechanisms that regulate cholesterol biosynthesis and metabolism in the brain and discuss the effects of statins when regulating these metabolic pathways. Our goal is to provide evidence on the mechanisms by which statins have been shown to modulate cholesterol in the brain and to analyze the grounds for some conflicting results.

CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS AND ITS INHIBITION BY STATINS

Cholesterol is a structural component of the animal cell membrane, that modulates its physico-chemical properties [16]. It is also a key component of lipid rafts, membrane regions actively involved in signal transduction [17] and is the precursor of many pivotal molecules such as vitamin D, [18] and steroid hormones [19]. The cholesterol pathway also known as the mevalonate pathway involves the activity of more than 20 enzymes mainly located in the endoplasmic reticulum (ER) in a complex and highly expensivemetabolic route present in virtually all animal tissues [20]. The limiting step in cholesterol biosynthesis is catalyzed by the HMG-CoA reductase that transforms HMG-CoA to mevalonate which is then converted to an isoprenoid unit [21] (Fig. 1). There is a growing number of intermediate compounds with biological activity in the cholesterol pathway, which unravels the extent of this metabolic route in regulating multiple cellular functions. In successive steps, isoprenoid units condense head to tail and form squalene, that is cyclized to yield cholesterol [22]. The bio-active intermediate compounds

*Address correspondence to this author at the Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-228, 04510 México, DF, México; Tel: +52 55 56229215; Fax: +52 55 56229182; E-mail: carias@servidor.unam.mx

such as geranyl geranyl pyrophosphate (GGPP) and farnesyl pyrophosphate (FPP) are lipid tags used for post-translational modification of a wide variety of proteins, including the γ -subunit of heterotrimeric G proteins [23]. The prenylation of these proteins is required for their attachment to the cell membrane allowing the cell to exert biological functions such as migration, differentiation, proliferation and signaling [24]. The inhibition of the cholesterol pathway by statins also reduces the prenylation of G proteins such as Rho, Rac, Ras and Rab [25] which may have deleterious consequences for cell function [26]. In addition, isoprenoids are also involved in transcription (isopentenyl tRNAs), N-glycosylation (dolichol), and mitochondrial electron transport (ubiquinone and heme A) [22].

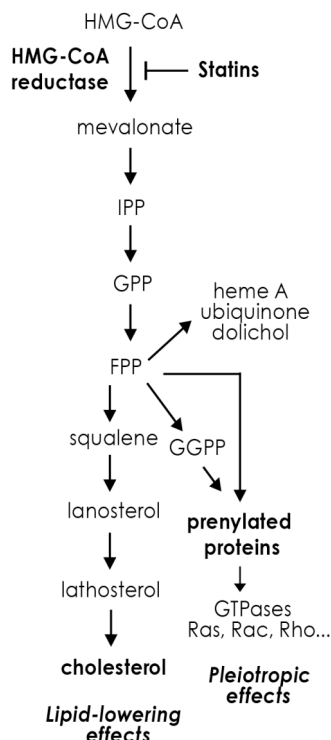


Fig. (1). Cholesterol biosynthesis pathway. HMG-CoA reductase inhibition by statins reduces cholesterol production and interferes with the formation of isoprenoids from mevalonate. Reduction in isoprenoids such as FPP and GGPP decreases prenylation of biological active proteins that may account for the broad and complex actions of statins.

REGULATION OF CHOLESTEROL SYNTHESIS

Systemic cholesterol homeostasis is controlled by synthesis, absorption of the dietary cholesterol intake, cellular efflux and degradation [27]. Biosynthesis of cholesterol is mainly regulated by its concentration in the ER [28] and is negatively modulated by plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) [29]. Much of the regulation of cholesterol synthesis takes place at this step [20] whereby the HMG-CoA reductase is subject to short and long-term regulation (Fig. 2A and B). The short-term regulation of the enzyme occurs through its phosphorylation/dephosphorylation mediated by hormonal signaling. The phosphorylation of HMG-CoA reductase, which is triggered by glucagon through adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK)

[30] decreases the enzyme's activity, while dephosphorylation induced by insulin through protein phosphatase 2A (PP2A) increases its activity [31] (Fig. 2A). Long-term regulation of HMG-CoA reductase is allosterically modulated by a negative feedback mediated by sterol contents (Fig. 2B). A cholesterol sensing mechanism in the ER regulates the expression of genes involved in cholesterol biosynthesis (HMG-CoA reductase), as well as in its uptake (through LDL receptor) [28, 32] and in its degradation [33]. Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) are the classical transcription factors that regulate the homeostasis of cellular cholesterol controlling the expression of genes related with the synthesis of cholesterol and with its uptake from LDLs [28]. SREBPs are integral membrane proteins residing in the ER. In the presence of high sterol levels, SREBPs bind to another membrane protein, the SREBP cleavage-activating protein (SCAP) [34]. The complex SCAP-SREBP is retained in the ER through its binding to the insulin-induced gene-1 (INSIG-1) [35, 36]. When sterol levels decrease, the SCAP-SREBP complex leaves the ER and is transported to the Golgi via a secretory pathway [37]. In the Golgi, SREBP is sequentially processed by site-1 protease (S1P) and site-2 protease (S2P) [38, 39] that yield the soluble and active N-terminal domain of SREBP, which then enters the nucleus and induces the expression of their target genes [40]. This elegant regulation of cholesterol metabolism is consequence of a sterol-sensing domain (SSD) present in both, SCAP and HMG-CoA reductase [41]. At a post-translational level, sterols also regulate the degradation of HMG-CoA reductase [42-44]. When cholesterol is low, HMG-CoA reductase is stable, but when cholesterol increases, it interacts through its SSD domain with INSIG-1 [45] allowing its ubiquitination and its subsequent degradation by the endoplasmic-reticulum-associated protein degradation (ERAD) pathway [45].

ON THE COMPLEXITY OF THE EFFECTS OF STATINS

Statins are pharmacological agents used to lower systemic cholesterol levels. These drugs share an HMG-like moiety and competitively inhibit the HMG-CoA reductase, occupying a part of the substrate-binding site [1, 46]. There are six statins approved for clinical use by the FDA as cholesterol lowering agents [47] and are classified in two groups: lipophilic (lovastatin, simvastatin, fluvastatin) and hydrophilic (atorvastatin, pravastatin, rosuvastatin) being pravastatin the most hydrophilic and simvastatin the most lipophilic [48]. Lovastatin, simvastatin, pravastatin and mevastatin are natural compounds extracted from the fungi such as *Aspergillus terreus*, whereas fluvastatin, atorvastatin and rosuvastatin are synthetic molecules [48]. Lipophilic statins may cross the BBB but only lovastatin has been detected in the cerebrospinal fluid (CSF) at significant levels indicating that this statin may have potential CNS-related effects [49]. All statins except pravastatin are catabolized in the liver by the cytochromeP450 (CYP450) system [50, 51]. Although these drugs are generally well tolerated, they have been associated rarely with serious complications such as rhabdomyolysis, renal failure, depression, violence and paranoia in sensitive patients [52, 53]. The proposed mechanism associated with many of the adverse effects of statins appears

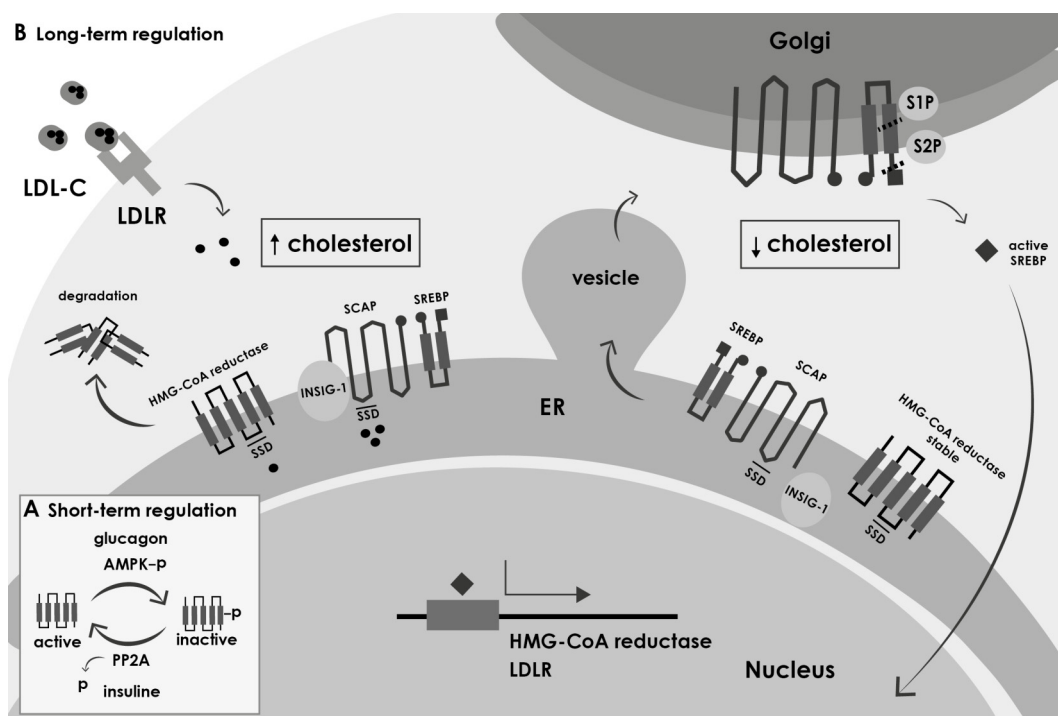


Fig. (2). Regulation of cholesterol synthesis. Biosynthesis of cholesterol is mainly regulated by its concentration in the ER. Cholesterol synthesis through HMG-CoA reductase is subject to short and long-term regulation. **A)** The white box at the bottom left corner shows the short-term regulation of cholesterol synthesis. The phosphorylation of HMG-CoA reductase, which is triggered by glucagon through AMPK decreases the activity of the enzyme, while dephosphorylation induced by insulin through PP2A increases it. **B)** Long-term regulation of HMG-CoA reductase is allosterically modulated by a negative feedback mediated by cholesterol concentration. SREBPs residing in the ER are the transcription factors regulating the homeostasis of cellular cholesterol that control the expression of HMG-CoA reductase and LDLR. In the presence of high cholesterol (\uparrow cholesterol), SREBPs bind to SCAP. The complex SCAP-SREBPs is retained in the ER through its binding to INSIG-1. When cholesterol levels decrease (\downarrow cholesterol) the SCAP-SREBP complex leaves the ER and is transported to the Golgi via the secretory pathway. In the Golgi, SREBPs are sequentially processed by S1P and S2P yielding the soluble and active SREBPs, which then enter the nucleus inducing the expression of their target genes. Cholesterol also regulates the degradation of HMG-CoA reductase. When cholesterol levels are low HMG-CoA reductase is stable, but when cholesterol increases it interacts through its SSD domain with INSIG-1 allowing its degradation.

to depend mainly on the inhibition of the cholesterol synthesis pathway.

The multiple pleiotropic effects of statins not attributable to the reduction of LDL-C have received growing attention since they can explain some of the extra benefits derived from their use [54]. Statins have anti-inflammatory, immunomodulatory, pro-angiogenic and anti-thrombotic effects [55, 56]. Therefore, the mechanism of action of statins in neurons is a fundamental issue in order to delineate their potential use for neurodegenerative disorders. A major comprehension of cholesterol metabolism in the brain is crucial to understand how it acts in nervous cells and if/how its pathological alterations can be prevented or repaired by statins.

BRAIN CHOLESTEROL METABOLISM

The brain is the organ with the highest contents of cholesterol. About 25% of the body cholesterol resides in the brain mainly in its unesterified form and is the major structural component of cell membranes and myelin sheaths [57]. In the CNS cholesterol also participates in key cellular processes including cell differentiation, dendritic and synaptic formation, axonal guidance, neurotransmission, endocytosis,

synapse plasticity and intracellular signaling as a precursor of active neurosteroids [58, 59].

Significant differences in cholesterol metabolism between the CNS and the periphery have been described. The half-life of circulating cholesterol is only of few days in contrast to brain cholesterol that may remain for 6 months in rodent and 5 years in humans [57]. The metabolism of cholesterol in the CNS is rather poorly understood as compared to our knowledge of peripheral cholesterol.

In humans, maternal cholesterol is the primary source of brain cholesterol during early stages of development [60]. The formation and maturation of the BBB at 12–18 weeks [61] of gestation impedes the uptake of lipoproteins from circulation [62]. Thus, after this developmental stage, brain cholesterol levels are independent from dietary uptake or hepatic synthesis and its production essentially (>99%) depends on *de novo* synthesis [57].

During axonal myelination, oligodendrocytes have the most cholesterol synthesis capacity; later in adulthood, the rate of synthesis of these cells decreases and cholesterol continues being synthesized mainly by astrocytes [63, 64]. Neurons are able to synthesize most of the cholesterol needed for

their growth and synaptogenesis at early stages of development [59]. But in the mature brain, neurons reduce their biosynthetic capacity probably due to the high-energy expenditure of the pathway and become dependent of the cholesterol provided by astrocytes [65, 66].

Cholesterol homeostasis in the brain is maintained through the balance between cholesterol transport via a brain-specific lipoprotein-dependent process and the endogenously synthesized cholesterol. Blood is not a source of lipoproteins in the brain; these molecules are synthesized, assembled and secreted mainly by astrocytes and traffic back to neurons [67, 68]. The ATP-binding cassette (ABC) transporters are important molecules for mediating lipid transport in the CNS, especially in the formation of apolipoprotein E (APOE) [69]. Once cholesterol is synthesized, the ABC transporter A1 (ABCA1), which is expressed in both neurons and glial cells, exports it [70-72].

There is evidence showing that cholesterol biosynthesis in the brain is also regulated by SREBPs and HMG-CoA reductase in a similar way than in peripheral tissues through feedback inhibition of gene expression and protein degradation [73]. In neurons, HMG-CoA reductase is present and active in the ER but is also found in axons where cholesterol synthesis does not take place [74] suggesting that this enzyme could have other functions in the neuron. The balance of cholesterol levels in the brain is finely modulated. Cholesterol is excreted from the brain in the form of 24-hydroxycholesterol (24-OHC) by the action of the cholesterol 24-hydroxylase (CYP46) [57, 72, 75] a specific neuronal enzyme [76] and although circulating cholesterol does not cross the BBB, its oxidized product 27-hydroxycholesterol (27-OHC) can reach the brain [77, 78]. Based on the latter, it has been hypothesized that the influx of 27-OHC into the brain may represent a link between hypercholesterolemia and the risk to develop AD [79, 80].

CHOLESTEROL DYSREGULATION IN AD

Epidemiological and experimental studies have suggested that hypercholesterolemia increases the susceptibility to develop AD [81, 82] which is characterized by the accumulation in brain of amyloid beta (A β) protein and the hyperphosphorylation of the microtubule-associated protein tau. In fact, the presence of the $\epsilon 4$ allele of APOE, which is positively associated with high-cholesterol contents in brain, is one of best-established risk factors for developing AD [4, 83-85]. Interestingly, it has been found that high circulating cholesterol at middle-age increases the risk of AD by 66% [86] although at late-ages this correlation is no longer consistent.

Recently genome-wide association studies have identified polymorphisms in genes associated with cholesterol homeostasis, including ABCA1, ABC transporter A7 (ABCA7) and clusterin (CLU) [87-89]. Also high-plasma levels of 24-OHC have been associated with AD [90, 91] and vascular dementia [92]. However, it is still unclear whether high-plasma 24-OHC levels are related directly to the development of AD or if it is a reflection of the BBB disruption or both [93]. Most of the results in this respect have shown that cholesterol regulation in AD is lost at different levels: bio-

synthesis, transport, lipoprotein assembly, lipoprotein receptors, and signaling [94].

A body of evidence suggests that cholesterol can influence the activity of the enzymes involved in the metabolism of amyloid beta precursor protein (APP) and A β production. Studies in animals have shown that excess of dietary cholesterol accelerates A β accumulation in brain and in contrast, low-cholesterol favors the non-amyloidogenic pathway of APP metabolism decreasing A β production and amyloid plaque formation [95-98]. Although the mechanisms by which cholesterol affect A β production are not entirely clear, it has been suggested that changes in membrane cholesterol levels or distribution in lipid rafts influence the activity and expression of β - and γ -secretases involved in the amyloidogenic processing of APP [95, 97, 99-102]. However, epidemiological data could not explain the relationship between systemic high-cholesterol and A β accumulation. In fact, although in a cohort of non-demented elderly adults high circulating cholesterol levels were not directly related to A β deposition, genetic factors related with high cholesterol transport were associated with A β deposition in the brain [103]. On the other hand, high-cholesterol enhances neuronal toxicity of A β by increasing reactive oxygen species (ROS) formation [104, 105]. This way, cholesterol may increase the vulnerability of brain to toxic events in the elderly at two levels: promoting A β deposition and increasing its toxicity.

EFFECTS OF STATINS IN BRAIN CHOLESTEROL METABOLISM AND THEIR USE IN AD

Epidemiological studies have reported highly variable outcomes after statin administration in AD patients making it difficult to establish their potential beneficial use in the clinics [6, 7, 106-108]. It has been suggested that controversial results are probably due to multiple variations in the experimental design such as time and doses of statin administration, ability of statins to cross the BBB, age of subjects in the studies, basal levels of cholesterol, catabolism of statins in the liver and their interaction with xenobiotics that can alter their pharmacokinetics [109]. Because of the disruption of the BBB in AD it has been considered that both lipophilic and hydrophilic statins can access the brain, altering cholesterol metabolism differently among patients depending on the BBB status.

It is interesting to establish whether statins are able to affect cholesterol metabolism in the brain and to evaluate if, as a consequence, their potential therapeutic role may involve some pleiotropic effects. Studies in AD patients [110] and in animal models have shown that simvastatin or pravastatin reduces the levels of A β both in CSF and brain [111] and decreases *de novo* synthesis of cholesterol without altering the cerebral cholesterol contents [112]. In cultured neurons lovastatin also reduces A β but does not lower total cholesterol concentrations [113]. Lovastatin and simvastatin are able to reduce the levels of 24-OHC in plasma [114] and in CSF of AD patients [110]. In other reports, both statins have been shown to strongly reduce the levels of brain membrane cholesterol and affect its distribution in synaptosomal membranes [115, 116]. Experimental evidence has shown that lovastatin and the cholesterol extracting compound, methyl- β -cyclodextrin (M β CD) alter the function of protein complexes associated with lipid rafts in cultured neurons [99].

Furthermore, treatment with simvastatin induces the up-regulation of HMG-CoA reductase mRNA in the rodent brain [117]. Lovastatin and mevastatin reduce APOE secretion from glial cells through inhibition of protein prenylation [118] (Table 1). Several statins (lovastatin, pravastatin, and simvastatin) also affect expression of genes involved in cell growth, signaling and cholesterol trafficking in the mouse brain [119]. Thus, many of the reported effects of statins in brain or cultured neurons depend on their ability to inhibit the cholesterol pathway. Despite the widespread use of statins, the consequences of inhibiting cholesterol synthesis in the CNS have not been elucidated. Some works using animal models and cell cultures have indicated the putative neuroprotection of statins [120]. However, other reports have shown some toxicity. Neuronal death induced by exposure to statins may depend on the reduction of cholesterol synthesis and on the decrease of other isoprenoids to critical levels such as to compromise neuronal function. The evidence pointing at the beneficial and deleterious effects of statins will be reviewed in detail below analyzing the role of statins as neuroprotectants vs their risk for inducing neurotoxicity.

NEUROPROTECTIVE POTENTIAL OF STATINS

As previously mentioned, different effects of statins on neuronal survival can be associated with their capacity for lowering cholesterol, but also with a variety of pleiotropic effects (Fig. 1, Table 2). Similarly, some groups have demonstrated that the pleiotropic functions of statins in AD likely play critical roles. For example, it has been proposed that the beneficial use of statins for treating this disease depends on a neurovascular protection [108] and on the reduction of oxidative and nitrosative stress [121].

a) A β Metabolism and Toxicity

It is now well established that changes in cholesterol levels result in modifications in A β production. The extraction of cholesterol from membranes using M β CD and lovastatin reduces A β production in hippocampal cultured neurons [99]. This may occur through posttranslational modifications since atorvastatin and simvastatin inhibit beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE-1) dimerization [122] activity and protein levels [123] leading to a reduction of A β levels. Moreover, in AD patients clinically treated with simvastatin for 12 months, an increase in APP products related with the non-amyloidogenic process occurred [124]. In line with the previous mentioned study, lovastatin administration at low doses to human neuroblastoma cells, increases α -secretase activity favoring the non-amyloidogenic route [125]. Lovastatin also promotes the clearance of A β [126], modulates APP distribution in lipid rafts [127] and atorvastatin diminishes maturation and phosphorylation of APP [128]. In addition, lovastatin protects human neurons from A β toxicity by inhibiting glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) activity and by increasing nuclear translocation of transcription factors such as catenin (cadherin-associated protein), beta 1 (β -catenin), transcription factor 3 (TCF-3), and lymphoid enhancer binding factor 1 (LEF-1) required for neuroprotection [129]. Altogether these studies suggest that beyond the statins ability to inhibit cholesterol synthesis as the main mechanism for their anti-amyloidogenic action, other effects also may involve the activation of different metabolic signaling pathways.

b) Neuroinflammation

Activated astrocytes and microglia are frequently observed in AD suggesting a pivotal role of inflammation in

Table 1. Statins' effects in brain cholesterol.

Effects	Model	Statin	Treatment	Ref.
Reduces levels of A β [109, 110, 112] and decreases de novo cholesterol synthesis (lathosterol) [111] without altering cholesterol contents. [111, 112]	AD patients' CSF	simvastatin	80 mg/day, 26 weeks	[109]
	CSF and brain of guinea pigs	simvastatin	0.5 % of diet, 3 weeks	[110]
	cultured hippocampal neurons	simvastatin or lovastatin	4 μ M, 48 h or 72 h	
	cultured cortical neurons			
	guinea pig brain	simvastatin	150 mg/day, 3 weeks	[111]
		pravastatin	250 mg/ day, 3 weeks	
	SH-SY5Y (APP ^{Sw-293})	lovastatin	10 μ M, 24 h	[112]
Reduces 24-OHC levels. [109, 111, 113]	AD patients' plasma	pravastatin	250 mg/ day, 3 weeks	[113]
Reduces levels of brain cells' membrane cholesterol.	mouse brain cells' membranes	lovastatin	100 mg/kg/day, 23 days	[114]
		simvastatin or lovastatin	80 mg/kg/day, 23 days	[115]
Up-regulates genes involved in cholesterol homeostasis (mRNA of HMG-CoA reductase and ABCA1).	mouse brain	simvastatin	100 mg/kg, 3 days	[116]
Reduces protein isoprenylation and APOE release.	BV-2 cells	lovastatin or mevastatin	2.5-10 μ M, 16-24 h	[117]
	hippocampal slices	lovastatin	100 μ M, 24-72 h	

Table 2. Statins' neuroprotective effects in brain.

Effects	Model	Statin	Treatment	Ref.
a) Aβ metabolism and toxicity				
Decrease of cholesterol levels by M β CD and lovastatin induces a reduction in A β production and secretion	cultured hippocampal neurons	lovastatin	10 μ M, 4 days	[98]
Inhibits the protein levels of BACE-1 ^[122] its dimerization, ^[121] and activity. ^[121, 122, 126]	bHEK cells	lovastatin or simvastatin	1, 10 >10 μ M, 16 h	[121]
	aged dog brain	atorvastatin	80 mg/day, 14.5 months	[122]
Stimulates the non-amyloidogenic pathway of APP ^[123] by increasing the α -secretase ^[124, 194] activity.	CFS of AD patients	simvastatin	20 mg/day, 12 months	[123]
	SK-N-MC and SH-SY5Y cells	lovastatin	1 and 2 μ M, 4 h	[124]
	NB2a cells (APP ^{sw-695})	atorvastatin	5 μ M, 24 h	[194]
Inhibits A β production through the reduction of APP in lipid rafts ^[126] and APP phosphorylation. ^[127]	cultured hippocampal neurons (lipid rafts fractions)	lovastatin	5-10 μ M, 36 h	[126]
	cultured cortical neurons	atorvastatin or pitavastatin	0.2-2.5 μ M, 4 days	[127]
Promotes degradation of A β via stimulation of IDE secretion.	BV-2 cells	lovastatin	5 μ M, 24 h	[125]
Protects neurons from A β toxicity reducing GSK-3 β activity and inducing Wnt signaling.	SK-NSH cells	lovastatin	4 μ M, 24 and 48 h	[128]
b) Neuroinflammation				
Attenuates the production of inflammatory cytokines (MCP-1 ^[130] IL-1 β , IL-6, and TNF- α ^[132]), reduces senile plaques, ^[130, 131] tau phosphorylation and improves cognitive function. ^[131, 132]	aged APP-Tg mouse	atorvastatin or pitavastatin	30 mg/kg/day, from 5–15 months of age (examined every 5 months)	[131]
	rat hippocampus (impaired by intracerebroventricular injection of A β)	atorvastatin	5 mg/kg/day, 3 weeks	[132]
Improves cerebrovascular function and reduces glial activation as well as number of A β plaque-associated dystrophic neurites.	aged APP-Tg mouse	simvastatin	20 mg/kg/day, 8 weeks	[133]
Inhibits the actions of Rho GTPases through reduction in isoprenylation and attenuates A β -stimulated inflammation.	BV-2 cells	lovastatin or simvastatin	different doses, 18 h	[134]
c) Antioxidant properties				
Increases GSH levels ^[120] and glutathione synthetase activity ^[138]	aged dog brain	atorvastatin	80 mg/day, 14.5 months	[120]
	streptozotocin-induced model of AD in rats	simvastatin pravastatin	5 mg/kg, 4 weeks	[138]
Reduces lipoperoxidation, ^[120, 139] protein oxidation and nitration. ^[120] Prevents the memory impairment and oxidative stress (superoxide anion formation) that occurs after A β injection. ^[140]	aged APP-Tg mouse	atorvastatin or pitavastatin	unidentified	[139]
	mouse brain (impaired by intracerebroventricular injection of A β)	fluvastatin	5 mg/kg/day, 2 weeks	[140]

(Table 2) contd....

Effects	Model	Statin	Treatment	Ref.
d) Neuronal Survival and Plasticity				
Protects neurons from excitotoxic death (by NMDA ^[142] or glutamate ^[143]) through a reduction in the association of NMDAR1 to lipid rafts. ^[144]	cultured cortical neurons	rosuvastatin or simvastatin atorvastatin mevastatin pravastatin	100-300 nM, 6 days	[142]
	cultured cortical neurons	atorvastatin	1 μ M, 2-4 days pre-treatment	[143]
	cultured cortical neurons	simvastatin	250 nmol/L, 4 days	[144]
Induces neuroprotection of glutamate-mediated excitotoxicity via activation of the TNF-R2-signaling pathway.	cultured cortical neurons	lovastatin	unidentified	[145]
Protects cells from PAF-induced neuronal damage by reducing PAF receptors.	cultured cortical or cerebellar neurons	simvastatin	100 nM, 24 h	[150]
Induces neurite outgrowth ^[151, 153] through activation of EGFR, up-regulation of NeuN, ^[151] and inhibition of RhoA signaling. ^[152, 153]	NB2a cells	mevastatin	5-10 μ M, 24 h	[151]
	cultured hippocampal neurons	pravastatin	100 μ M, 4-48 h	[153]
	PC12 cells	lovastatin	10 μ M, 24 h	[152] ^F
Enhances neurite outgrowth by activation of Akt/mTOR pathway ^[154] and increases the number and length of dendritic branches by activation of GGTase-I and Rac1. ^[155]	cultured cortical neurons	atorvastatin	0.05-10 μ mol/L, 48 h	[154]
	cultured cortical neurons	atorvastatin	0.1 μ M, 30 min-24 h	[155]
Protects neurons after injury reducing neurological deficits; ^[156, 157] improves cerebral blood flow ^[156, 158] and induces angiogenesis, ^[157, 159, 160] neurogenesis ^[159, 160] and synaptogenesis. ^[159, 160]	Traumatic brain injury (TBI), rat brain	atorvastatin or simvastatin	320 mg/kg, 14 days	[156]
	TBI, rat brain	atorvastatin or simvastatin	unidentified, 14 days	[157]
	stroke-prone spontaneously hypertensive rats	atorvastatin	2 mg/kg and 20 mg/kg, 11 weeks	[158]
	middle cerebral artery occlusion (MCAo), rat brain	atorvastatin	1 and 3 mg/kg, 14 days	[159]
			10 mg/kg, 14 days	[160]

neuronal death [130]. Thus, it has been proposed that the anti-inflammatory actions of statins might contribute to neuroprotection. According to the above, animals from a transgenic mouse model of AD that chronically received atorvastatin or pitavastatin, showed a reduced number of activated microglia as well as a decrease in the mean of the area occupied by senile plaques, a diminishment in phosphorylated tau [108, 131] and an improvement in cognitive performance [132]. Similarly, atorvastatin diminishes the memory impairment produced by intracerebroventricular injection of A β in rats, which correlates with a reduction in the levels of the inflammatory cytokines interleukin 1beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in brain [133]. Simvastatin promotes cerebral blood flow and reduces oxidative stress, glial activation and A β plaques associated to dystrophic neurites [134]. Some of these effects have been ascribed to different mechanisms not necessarily related to

the statin-dependent cholesterol lowering effect. For example, simvastatin attenuates A β -induced microglia activation and IL-1 β induction through the diminishment in isoprenylation of Rho family members [135]. On the other hand, it has also been found that in cultured hippocampal slices, statins provoke microglial activation and upregulation of TNF- α dependent on the inhibition of the mevalonate pathway and on the generation of GGPP [136]. The question of whether activated microglia positively or negatively contributes to AD progression is also unresolved. Thus, the anti-inflammatory actions of statins may be mostly indirect and the underlying molecular mechanism of action has not been elucidated yet.

c) Antioxidant Properties

The presence of oxidized proteins, lipids and DNA has been identified in tissues from AD patients, indicating an

undergoing oxidative stress process [137, 138]. The antioxidant properties of statins represent one of their pleiotropic effects. A recent study showed that atorvastatin administration significantly reduces lipoperoxidation, protein oxidation and nitration and that it increases glutathione (GSH) levels in the parietal cortex of aged beagles [121]. Similarly, in a streptozotocin model of AD, simvastatin and pravastatin prevented the decrease in GSH contents and in glutamine synthase activity in the rat hippocampus [139]. Atorvastatin and pitavastatin reduce the levels of lipid oxidation the 4-hydroxynonenal (4-HNE) product and of advanced glycation end products (AGEs) in AD mice brains [140]; and fluvastatin prevents memory impairment and oxidative stress that occurs in mice after A β injection [141]. Therefore, the reduction of oxidative damage in AD may be important for achieving the beneficial effects attributed to statins in regard to cognitive function.

d) Neuronal Survival and Plasticity

Excitotoxicity is characterized by excessive calcium entry into the neurons mediated mainly by overactivation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor subtype and might contribute to neuronal death in some neurodegenerative conditions [142]. Several statins are able to protect cultured neurons from NMDA excitotoxicity through different mechanisms. Zacco *et al.*, [143] showed that in cortical cultured neurons, different statins protect cells from NMDA toxicity seemingly by cholesterol depletion. In another work, Bosel *et al.*, [144] found that atorvastatin attenuated glutamate-induced excitotoxicity through the decrease of the NMDA receptor function and independently from the inhibition of the HMG-CoA reductase. Statins, in particular simvastatin have been also shown to reduce the association of the subunit 1 of NMDA receptors (NMDAR1) to lipid rafts [145], thus providing evidence for different mechanisms of neuronal protection. In addition, it has been reported that neuroprotection against excitotoxicity by lovastatin depends on the activation of the tumor necrosis factor receptor 2 (TNF-R2) signaling pathway [146].

High levels of the platelet-activating factor (PAF) have been found in AD brains [147]. PAF is a potent phospholipid mediator that is released under several pathological conditions [148] and mimics the toxicity induced by A β [149, 150]. Simvastatin is able to protect against PAF-induced neuronal damage reducing the number of PAF receptors in the lipid rafts, thus desensitizing neurons to PAF signaling [151].

Statins promote neurite outgrowth and neuronal plasticity through the activation of several signaling pathways, which are independent of cholesterol. For example, mevastatin induces neurite outgrowth by activating the epidermal growth factor receptor (EGFR) [152], while lovastatin and pravastatin enhance neurite outgrowth and cell differentiation by inhibiting the prenylation and consequently the activity of the small GTPase protein, RhoA [153, 154]. Atorvastatin also induces neurite outgrowth by activating the Akt/mTOR pathway in cortical neurons [155] and increases the number and length of dendritic branches by activating geranylgeranyltransferase type I (GGTase-I) and Rac1 in cortical cultured neurons [156]. Simvastatin and atorvastatin have also shown

to protect neurons after a traumatic brain injury in rats [157, 158] and to improve cerebral blood flow in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [159]. All these positive effects were dependent on the activation of molecules involved in angiogenesis, neurogenesis and synaptogenesis [160, 161].

NEUROTOXIC EFFECTS OF STATINS

Although a number of studies have described some general neuroprotective effects of statins *in vivo* and *in vitro*, clinical evidence for their efficacy in AD is still not well accepted and their prescription should be carefully considered. The therapeutic use of statins have yielded conflicting results and there is general agreement that beyond the beneficial effects mentioned above, some toxic events, which are listed in (Fig. 1) and (Table 3) are also derived from their administration.

a) Negative Implications in Neuronal Survival and Plasticity

Growing evidence confirms the neurotoxicity of some statins under certain administration schemes, although at present the main mechanism leading to toxicity has not been established. Lovastatin is neurotoxic for developing human CNS cells at pharmacological concentrations [162]. However, it remains unclear whether this neurotoxicity depends on a decrease in cholesterol contents or if it is due to a reduction of other isoprenoid products. It has been suggested that the neurotoxicity induced by mevastatin depends on the reduction of internal cholesterol levels since neurotoxicity could not be prevented after adding non-sterol metabolites [163]. It is worth mentioning that lovastatin, being a statin prone to cross the BBB is also neurotoxic to human neuroblastoma cells and is associated with an increase in ROS production [105].

Multiple mechanisms have been linked to statins' neurotoxic effects. In differentiated neuroblastoma cells, exposure to mevastatin inhibits proteasome activity and induces degeneration [164]. In the human neuroblastoma line SH-SY5Y, lovastatin induces apoptosis in a time and dose-dependent manner associated with the reduction of mevalonate [165]. In the same cellular line it was demonstrated that lovastatin induced apoptosis through the mitochondrial pathway via the activation of caspase-9 as initiator and caspase-3 as effector [166]. Thus, although in many instances the beneficial effects of statins have been correlated with reduced levels of isoprenoids [13] there is also evidence that such reduction may lead to neurotoxicity. GGPP and FPP are crucial for post-translational modifications of small GTPases [167]. In the CNS, Rho GTPases participate in cytoskeleton remodeling and are implicated in neuronal development, migration, plasticity and protection [168-170]. Lovastatin and simvastatin reduce FPP and GGPP levels in both, cultured neurons [171] and in mouse brain [172] decreasing signal transduction pathways crucial for neuronal growth and survival. Lovastatin, mevastatin and atorvastatin treatment at high concentrations have been shown to inhibit neurite growth and proliferation and to reduce the viability of differentiated neuroblastoma NB2a cells [173]. In fact, HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin has also been

Table 3. Statins' neurotoxic effects in brain.

Effects	Model	Statin	Treatment	Ref.
a) Negative implications in neuronal survival and plasticity				
Induces neuronal death [161, 162, 165] by apoptosis through the mitochondrial pathway via caspase activation [165] and through the reduction of Bcl-2 and Bcl-xL protein levels. [195]	human embryonic brain cells	lovastatin	0.01-1000 ng/ml, 3 h-12 days	[161]
	cultured cortical neurons	mevastatin	5 μ M, 48 h	[162]
	SH-SY5Y cells	lovastatin	10 μ M, 24 h	[165]
	rat brain neuroblasts	lovastatin	1-10 μ M, 24 h or 48 h	[195]
Inhibits neurite outgrowth [172, 173] and cell death [172, 174] by mechanisms that involve reduction in GGPP, [173, 174] as well as reduction in the expression and function of RhoA. [174]	PC12 cells	atorvastatin	7 μ M, 24-72 h	[173]
	cultured cortical neurones		8 μ M, 48 h	
	NB2a cells	lovastatin or mevastatin atorvastatin	1, 3, 10, 100 μ M, 24 h	[172]
	cultured cortical neurons	pravastatin	300 μ M, 72 h	[174]
Induces alterations in the microtubule system [175, 176, 196] by increasing tau phosphorylation and inducing axonal degeneration [176] linked to the lack of GGPP [175] or cholesterol. [176, 196]	cultured hippocampal neurons	lovastatin	10 μ M, different times	[175]
	cultured cortical neurons	mevastatin	300 nM, 65 h	[176]
			24, 48 or 72 h	[196]
Other mechanisms of neurotoxicity: increase of ROS production, [104] inhibition of the proteasome activity, [163] microglia activation and TNF- α up-regulation. [135]	human neuroblastoma cells	lovastatin	50-100 μ M, 24 h	[104]
	N2a cells	mevastatin	40-150 μ M, 24 h	[163]
	rat cultured hippocampal slices	mevastatin	10 μ M, 6 days	[135]
b) Adverse psychiatric effects				
Produces cognitive deficits [178] and adverse psychiatric effects (somatization, depression, [52] and anxiety [11]).	patient survey-based analysis (34-86 years)	various	various	[178]
	hypercholesterolemic patients	simvastatin	20 mg/day, 12 weeks	[52]
	guinea pigs	atorvastatin or	0.5mg/kg, 6 weeks	[11]
simvastatin		1 mg/kg, 6 weeks		
c) Neurotransmission Impairment				
Lowers number of synapses [9] and impairs synaptic vesicle release. [9, 182]	cultured hippocampal neurons	lovastatin	0.25 μ M, 7 days	[9]
	cultured hippocampal neurons	mevastatin	4 μ M, 7 days	[182]
Interferes with synaptic plasticity reducing the expression of synaptic proteins, NMDAR currents, [8] long-term potentiation [185] and evoked post-synaptic currents [183] Alters the function and dynamics of the serotonin system. [10]	cultured cortical neurons	mevastatin	300 nM, 21 days	[8]
	hippocampal slices	mevastatin	25 μ M, 60 min	[185]
	cultured hippocampal neurons	mevastatin	4 μ M, 6 h	[183]
	CHO cells (human 5-HT1A)	mevastatin	50 μ M, 56 h	[10]

shown to cause neurite loss by interfering with GGPP synthesis in cultured neurons [174]. In cortical cell cultures, pravastatin-induced neurotoxicity was prevented by its co-treatment with GGPP, which restores the amount of the active RhoA protein. [175]. Lovastatin also produces degenerative changes affecting the neuritic network and altering the microtubule system, again due to the lack of the GGPP

[176]. In line with the previous finding, it has been shown that mevastatin alters microtubule stability by increasing tau phosphorylation and inducing axonal degeneration in cultured neurons [177]. All these effects were associated to a cholesterol deficiency since they could be reverted by incubating the cells with VLDL or cholesterol. At present the only explanation for the discrepancy between neuroprotec-

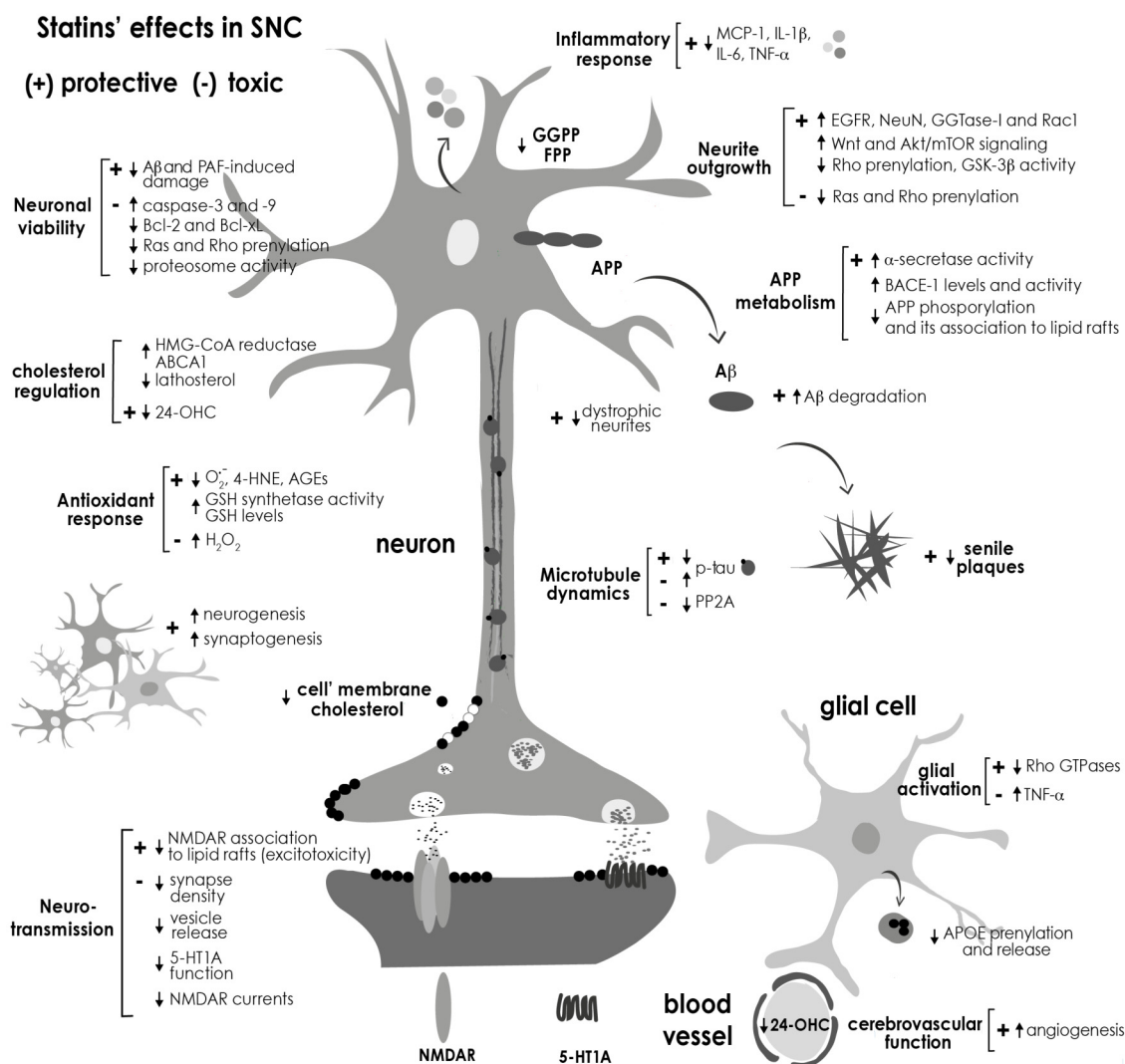


Fig. (3). Complex and broad effects of statins in CNS. The implications of statins' effects in the CNS are not completely understood. Protective or beneficial effects as well as detrimental effects have been reported after statins' administration. The plus sign (+) indicates a protective or beneficial effect in different cellular processes. The minus sign (-) represents the toxic effects of statins. Orientation of arrows indicate if statins upregulate (↑) or downregulate (↓) the depicted molecule levels as well as a cellular particular processes.

tion and neurotoxicity elicited by statins may involve differences in the doses and incubation times that are analyzed in the (Tables 2 and 3). Although the majority of studies are experimental and involve *in vitro* or *in vivo* animal models, the problem about statins having a positive or a negative contribution in AD progression remains unresolved.

b) Adverse Psychiatric Effects

Given the complexity in the behavioral effects provoked by the use of statins, the FDA has approved to change the security labels for statins prescription indicating that they may cause memory loss and confusion during medication that can however be reversible once the drug is no longer administered [178-180]. Other reported effects of statins in patients are risk of depression, aggressiveness [12, 181] and somatization [52]. In an animal model, a low dose treatment with simvastatin or atorvastatin induced mild but significant levels of anxiety-related behaviors [11]. Although at present the mechanisms by which a long-term statin treatment leads

to cognitive and emotional alterations are not well understood, recent evidence suggests some molecular mechanisms that can be associated with neuronal dysfunction.

c) Neurotransmission Impairment

In neuronal membranes, cholesterol modulates synaptic function and neurotransmitter release. Depletion of cholesterol with M β CD [182] or with mevastatin in cultured hippocampal neurons impairs synaptic vesicle release [183]. Lovastatin lowers the number of synapses and also reduces synaptic vesicle release [9], while mevastatin affects cortical neuronal morphology and synaptic protein expression, reduces NMDAR currents [8] and decreases evoked post-synaptic currents [184]. Cholesterol imbalance induced by M β CD [185] or mevastatin reduces long-term potentiation in rat hippocampal slices [186] and chronic cholesterol depletion by mevastatin results in a significant reduction and functionality of the human serotonin H-1A receptors (5-HT1A) expressed in CHO cells [10]. Such depletion could explain,

at least in part, some of the psychiatric effects related to the chronic treatment with statins. Moreover, it has been suggested that lowering cholesterol beyond certain levels may inhibit the release of neurotransmitters at synapses and disrupt neuronal function [187, 188]. In a recent study Schilling *et al.*, [189] reported that the membrane lipid raft associated proteins syntaxin-1 α and synaptophysin are altered after atorvastatin treatment in rats. Another report has also indicated that disruption of lipid rafts by mevastatin and fumonisin B1 (an inhibitor of the sphingolipid synthesis) induce depletion of excitatory and inhibitory synapses, loss of dendritic spines, and instability of membrane alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors in cultured neurons [190]. These events may account for the adverse effects of statins on cognition.

d) Age-related Vulnerability of Statins Consumption

The relation between statins and improvement of cognitive function in the elderly is currently a matter of debate. The use of statins has been questioned given the reported adverse effects in this population [178]. An increase in undesirable side effects may include the age and genetic profile of the patient, as well as the presence of some associated diseases that may affect drug action and pharmacokinetics [191]. During aging, hippocampal cholesterol synthesis decreases but total cholesterol brain contents remain stable [192]. Chronic treatment with atorvastatin reduces the hippocampal volume in AD patients [193] who may be particularly susceptible to the adverse effects of statins due to the altered cholesterol metabolism and signal transduction dysregulation present in the disease [194]. However, it should be mentioned that some clinical studies do not support the idea that cognitive considerations should be a factor to discontinue statin medication for cardiovascular and cerebrovascular disease [195].

CONCLUSION

From the predicted increase in cardiovascular diseases in the coming years, it is expected that the prescription and use of statins will aggressively rise. Thus, the need to regulate statins' consumption, in order to avoid their abuse and eliminate self-medication represents a priority. In regard to medical practice it is highly relevant to carefully consider the clinical condition of the patients, as well as their age and genetic background before selecting a particular statin for its administration. Commonly, statins are prescribed for a long time, often for a life-time. Therefore it is worth considering that statins act locally by lowering lipid levels, but may have broad pleiotropic effects, thus affecting peripheral tissues and the CNS.

Currently, there is no solid evidence to support the use of statins for the treatment or prevention of neurodegenerative diseases such as AD; even when experimental and clinical studies have suggested positive effects on their administration for treating the disease, negative outcomes may rely upon the side effects mediated by a general inhibition of the mevalonate pathway. Data pointing at the effectiveness of statins for the treatment of AD are somewhat contradictory and further research is required to clarify their beneficial

and/or toxic effects and to determine if they can be safely used to prevent or treat AD.

ABBREVIATIONS

ABC transporters =	ATP-binding cassette transporters
ABCA1 =	ABC transporter A1
ABCA7 =	ABC transporter A7
AD =	Alzheimer's disease
AGEs =	Advanced glycation end products
AMPA =	Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AMPK =	Adenosine monophosphate-activated kinase
APOE =	Apolipoprotein E
APP-Tg mouse =	APP transgenic mouse
APP =	Amyloid beta precursor protein
APP ^{sw} =	APP Swedish mutant
A β =	Amyloid beta
BACE-1 =	Beta-site APP-cleaving enzyme 1
BBB =	Brain blood barrier
CLU =	Clusterin
CNS =	Central nervous system
CSF =	Cerebrospinal fluid
CYP450 =	Cytochrome P450
CYP46 =	Cholesterol 24-hydroxylase
EGFR =	Epidermal growth factor receptor
ER =	Endoplasmic reticulum
ERAD =	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
FDA =	U.S. Food and Drug Administration
FPP =	Farnesyl pyrophosphate
GGPP =	Geranyl geranyl pyrophosphate
GGTase-I =	Geranylgeranyltransferase type I
GSH =	Glutathione
GSK-3 β =	Glycogen synthase kinase 3 beta
HMG-CoA =	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
IDE =	Insulin-degrading enzyme
IL-1 β =	Interleukin 1beta
IL-6 =	Interleukin 6
INSIG-1 =	Insulin induced gene-1
IPP =	Isopentyl pyrophosphate
LDL-C =	Low-density lipoprotein cholesterol

LEF-1	=	Lymphoid enhancer binding factor 1
MCP-1	=	Monocyte chemotactic protein 1
M β CD	=	Methyl- β -cyclodextrin
NeuN	=	Neuronal nuclei
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
NMDAR1	=	Subunit 1 of NMDA receptor
PAF	=	Platelet-activating factor
PP2A	=	Protein phosphatase 2A
ROS	=	Reactive oxygen species
S1P	=	Site-1 protease
S2P	=	Site-2 protease
SCAP	=	SREBP cleavage-activating protein
SREBP	=	Sterol regulatory element-binding protein
SSD	=	Sterol-sensing domain
TCF-3	=	Transcription factor 3
TNF-R2	=	Tumor necrosis factor receptor 2/TNF- α , tumour necrosis factor alpha
VLDL	=	Very-low-density lipoprotein
β -catenin	=	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1
24-OHC	=	24-hydroxycholesterol
27-OHC	=	27-hydroxycholesterol
4-HNE	=	4-hydroxynonenal
5-HT1A	=	Serotonin H-1A receptors

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- [1] Istvan ES. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J* 144(6): S27-32 (2002).
- [2] Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343(6257): 425-30 (1990).
- [3] Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86 (5): 484-93 (2010).
- [4] Wolozin B. A fluid connection: cholesterol and Abeta. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (10): 5371-3 (2001).
- [5] Doraiswamy PM, Xiong GL. Pharmacological strategies for the prevention of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother* 7(1): 1-10 (2006).
- [6] McGuinness B, O'hare J, Craig D, Bullock R, Malouf R, Passmore P. Statins for the treatment of dementia. *Cochrane Database Syst Rev* (8): CD007514(2010).

- [7] Scott HD, Laake K. Statins for the prevention of Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* (4): CD003160 (2001).
- [8] Kannan M, Steinert JR, Forsythe ID, Smith AG, Chernova T. Mevastatin accelerates loss of synaptic proteins and neurite degeneration in aging cortical neurons in a heme-independent manner. *Neurobiol Aging* 31(9): 1543-53 (2010).
- [9] Mailman T, Hariharan M, Karten B. Inhibition of neuronal cholesterol biosynthesis with lovastatin leads to impaired synaptic vesicle release even in the presence of lipoproteins or geranylgeraniol. *J Neurochem* 119 (5): 1002-15 (2011).
- [10] Shrivastava S, Pucadyil TJ, Paila YD, Ganguly S, Chattopadhyay A. Chronic cholesterol depletion using statin impairs the function and dynamics of human serotonin(1A) receptors. *Biochemistry* 49(26): 5426-35 (2010).
- [11] Maggo S, Clark D, Ashton JC. The effect of statins on performance in the Morris water maze in guinea pig. *Eur J Pharmacol* 674(2-3): 287-93 (2012).
- [12] While A, Keen L. The effects of statins on mood: a review of the literature. *European journal of cardiovascular nursing : journal of the Working Group on Cardiovascular Nursing of the European Society of Cardiology* 11 (1): 85-96 (2012).
- [13] Liao JK. Statins: potent vascular anti-inflammatory agents. *Int J Clin Pract Suppl* (143): 41-8 (2004).
- [14] Shaw SM, Fildes JE, Yonan N, Williams SG. Pleiotropic effects and cholesterol-lowering therapy. *Cardiology* 112(1): 4-12 (2009).
- [15] Pfrieger FW, Ungerer N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog Lipid Res* 50(4): 357-71 (2011).
- [16] Ohvo-Rekila H, Ramstedt B, Leppimaki P, Slotte JP. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* 41(1): 66-97 (2002).
- [17] Incardona JP, Eaton S. Cholesterol in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 12(2): 193-203 (2000).
- [18] Armbrrecht HJ, Okuda K, Wongsurawat N, Nemani RK, Chen ML, Boltz MA. Characterization and regulation of the vitamin D hydroxylases. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43 (8): 1073-81 (1992).
- [19] Hanukoglu I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43(8): 779-804 (1992).
- [20] Sharpe LJ, Brown AJ. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). *J Biol Chem* 288(26): 18707-15 (2013).
- [21] Friesen JA, Rodwell VW. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol* 5(11): 248 (2004).
- [22] Edwards PA, Ericsson J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem* 68: 157-85 (1999).
- [23] Fukada Y, Takao T, Ohguro H, Yoshizawa T, Akino T, Shimonishi Y. Farnesylated gamma-subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature* 346(6285): 658-60 (1990).
- [24] Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 65: 241-69 (1996).
- [25] Ostrowski SM, Wilkinson BL, Golde TE, Landreth G. Statins reduce amyloid-beta production through inhibition of protein isoprenylation. *J Biol Chem* 282(37): 26832-44 (2007).
- [26] Maeda A, Yano T, Itoh Y, Kakumori M, Kubota T, Egashira N, et al. Down-regulation of RhoA is involved in the cytotoxic action of lipophilic statins in HepG2 cells. *Atherosclerosis* 208(1): 112-8 (2010).
- [27] Cohen DE. Balancing cholesterol synthesis and absorption in the gastrointestinal tract. *J Clin Lipidol* 2 (2): S1-3 (2008).
- [28] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89(3): 331-40 (1997).
- [29] Fernandez ML, McNamara DJ. Regulation of cholesterol and lipoprotein metabolism in guinea pigs mediated by dietary fat quality and quantity. *J Nutr* 121(7): 934-43 (1991).
- [30] Clarke PR, Hardie DG. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase *in vitro* and in intact rat liver. *EMBO J* 9(8): 2439-46 (1990).
- [31] Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144(12): 5179-83 (2003).

- [32] Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, *et al.* Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (21): 12027-32 (2003).
- [33] Jo Y, Debose-Boyd RA. Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45(3): 185-98 (2010).
- [34] Radhakrishnan A, Sun LP, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell* 15(2): 259-68 (2004).
- [35] Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, *et al.* Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110(4): 489-500 (2002).
- [36] Adams CM, Reitz J, De Brabander JK, Feramisco JD, Li L, Brown MS, *et al.* Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J Biol Chem* 279(50): 52772-80 (2004).
- [37] Espenshade PJ, Li WP, Yabe D. Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(18): 11694-9 (2002).
- [38] Duncan EA, Brown MS, Goldstein JL, Sakai J. Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem* 272(19): 12778-85 (1997).
- [39] Duncan EA, Dave UP, Sakai J, Goldstein JL, Brown MS. Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *J Biol Chem* 273(28): 17801-9 (1998).
- [40] Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(20): 11041-8 (1999).
- [41] Sever N, Yang T, Brown MS, Goldstein JL, Debose-Boyd RA. Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol Cell* 11(1): 25-33 (2003).
- [42] Faust JR, Luskey KL, Chin DJ, Goldstein JL, Brown MS. Regulation of synthesis and degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase by low density lipoprotein and 25-hydroxycholesterol in UT-1 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(17): 5205-9 (1982).
- [43] Edwards PA, Lan SF, Fogelman AM. Alterations in the rates of synthesis and degradation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase produced by cholestyramine and mevinolin. *J Biol Chem* 258(17): 10219-22 (1983).
- [44] Nakanishi M, Goldstein JL, Brown MS. Multivalent control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Mevalonate-derived product inhibits translation of mRNA and accelerates degradation of enzyme. *J Biol Chem* 263(18): 8929-37 (1988).
- [45] Song BL, Sever N, Debose-Boyd RA. Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Mol Cell* 19(6): 829-40 (2005).
- [46] Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett* 72 (2): 323-6 (1976).
- [47] Fda. Consumer Health Information., (2010).
- [48] Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol* 19(1): 117-25 (2005).
- [49] Botti RE, Triscari J, Pan HY, Zayat J. Concentrations of pravastatin and lovastatin in cerebrospinal fluid in healthy subjects. *Clin Neuropharmacol* 14(3): 256-61 (1991).
- [50] Gruer PJ, Vega JM, Mercuri MF, Dobrinska MR, Tobert JA. Concomitant use of cytochrome P450 3A4 inhibitors and simvastatin. *Am J Cardiol* 84(7): 811-5 (1999).
- [51] Hatanaka T. Clinical pharmacokinetics of pravastatin: mechanisms of pharmacokinetic events. *Clin Pharmacokinet* 39(6): 397-412 (2000).
- [52] Hyyppa MT, Kronholm E, Virtanen A, Leino A, Jula A. Does simvastatin affect mood and steroid hormone levels in hypercholesterolemic men? A randomized double-blind trial. *Psychoneuroendocrinol* 28(2): 181-94 (2003).
- [53] Tuccori M, Montagnani S, Mantarro S, Capogrosso-Sansone A, Ruggiero E, Saporiti A, *et al.* Neuropsychiatric Adverse Events Associated with Statins: Epidemiology, Pathophysiology, Prevention and Management. *CNS Drugs* (2014).
- [54] Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives. *Circ J* 74(5): 818-26 (2010).
- [55] Schonbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? *Circulation* 109(21 Suppl 1): II18-26 (2004).
- [56] Phillip Owens A, 3rd, Mackman N. The antithrombotic effects of statins. *Annu Rev Med* 65: 433-45 (2014).
- [57] Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol* 12(2): 105-12 (2001).
- [58] Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, *et al.* CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science (New York, NY)* 294(5545): 1354-7 (2001).
- [59] Pfrieger FW. Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochimica et biophysica acta* 1610 (2): 271-80 (2003).
- [60] Mcconihay JA, Horn PS, Woollett LA. Effect of maternal hypercholesterolemia on fetal sterol metabolism in the Golden Syrian hamster. *J Lipid Res* 42(7): 1111-9 (2001).
- [61] Bertossi M, Virgintino D, Errede M, Roncali L. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of cortical plate microvasculature in the human fetus telencephalon. *Microvasc Res* 58(1): 49-61 (1999).
- [62] Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem* 262(29): 14352-60 (1987).
- [63] Niewieg K, Schaller H, Pfrieger FW. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem* 109(1): 125-34 (2009).
- [64] Dietschy JM, Turley SD. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45(8): 1375-97 (2004).
- [65] Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S. Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 55(1): 81-90 (1993).
- [66] Pfrieger FW. Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays* 25(1): 72-8 (2003).
- [67] Hayashi H. Lipid metabolism and glial lipoproteins in the central nervous system. *Biol Pharm Bull* 34 (4): 453-61 (2011).
- [68] Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* 76 (4): 1501-13 (1985).
- [69] Vance JE, Hayashi H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochimica et biophysica acta* 1801(8): 806-18 (2010).
- [70] Fukumoto H, Deng A, Irizarry MC, Fitzgerald ML, Rebeck GW. Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in central nervous system cells by liver X receptor agonists increases secreted Abeta levels. *J Biol Chem* 277(50): 48508-13 (2002).
- [71] Wellington CL, Walker EK, Suarez A, Kwok A, Bissada N, Singaraja R, *et al.* ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab Invest* 82(3): 273-83 (2002).
- [72] Bjorkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arteriosclerosis, thrombosis, Vasc Biol* 24(5): 806-15 (2004).
- [73] Ong WY, Hu CY, Soh YP, Lim TM, Pentchev PG, Patel SC. Neuronal localization of sterol regulatory element binding protein-1 in the rodent and primate brain: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *Neuroscience* 97(1): 143-53 (2000).
- [74] Vance JE, Pan D, Campenot RB, Bussiere M, Vance DE. Evidence that the major membrane lipids, except cholesterol, are made in axons of cultured rat sympathetic neurons. *J Neurochem* 62(1): 329-37 (1994).

- [75] Matsuda A, Nagao K, Matsuo M, Kioka N, Ueda K. 24(S)-hydroxycholesterol is actively eliminated from neuronal cells by ABCA1. *J Neurochem* 126(1): 93-101 (2013).
- [76] Bretillon L, Diczfalusy U, Bjorkhem I, Maire MA, Martine L, Joffre C, *et al.* Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is specifically expressed in neurons of the neural retina. *Curr Eye Res* 32(4): 361-6 (2007).
- [77] Gosselet F, Saint-Pol J, Fenart L. Effects of oxysterols on the blood-brain barrier: Implications for Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* (2013).
- [78] Leoni V, Masterman T, Patel P, Meaney S, Diczfalusy U, Bjorkhem I. Side chain oxidized oxysterols in cerebrospinal fluid and the integrity of blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J Lipid Res* 44(4): 793-9 (2003).
- [79] Heverin M, Bogdanovic N, Lutjohann D, Bayer T, Pikuleva I, Bretillon L, *et al.* Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 45(1): 186-93 (2004).
- [80] Shafaati M, Marutle A, Pettersson H, Lovgren-Sandblom A, Olin M, Pikuleva I, *et al.* Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in the brains of Alzheimer's patients with the Swedish APP 670/671 mutation. *J Lipid Res* 52(5): 1004-10 (2011).
- [81] Ledesma MD, Dotti CG. Peripheral cholesterol, metabolic disorders and Alzheimer's disease. *Frontiers in bioscience* 4 181-94 (2012).
- [82] Kalaria RN. Small vessel disease and Alzheimer's dementia: pathological considerations. *Cerebrovasc Dis* 13(12): 48-52 (2002).
- [83] Jarvik GP, Austin MA, Fabsitz RR, Auwerx J, Reed T, Christian JC, *et al.* Genetic influences on age-related change in total cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol, and triglyceride levels: longitudinal apolipoprotein E genotype effects. *Genetic epidemiology* 11(4): 375-84 (1994).
- [84] Gomez-Isla T, West HL, Rebeck GW, Harr SD, Growdon JH, Locascio JJ, *et al.* Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 39(1): 62-70 (1996).
- [85] Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, *et al.* Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17(1): 14-20 (1998).
- [86] Solomon A, Kivipelto M, Wolozin B, Zhou J, Whitmer RA. Mid-life serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement Geriatr Cogn Disord* 28(1): 75-80 (2009).
- [87] Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamsheer ML, *et al.* Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41 (10): 1088-93 (2009).
- [88] Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, Destefano AL, Gudnason V, Boada M, *et al.* Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* 303(18): 1832-40 (2010).
- [89] Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN, Buross J, *et al.* Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43(5): 436-41 (2011).
- [90] Bretillon L, Siden A, Wahlund LO, Lutjohann D, Minthon L, Crisby M, *et al.* Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases. *Neurosci Lett* 293(2): 87-90 (2000).
- [91] Papassotiropoulos A LD, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Rao ML, Maier W, *et al.* Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 11(9):1959-62 (2000).
- [92] Lutjohann D, Papassotiropoulos A, Bjorkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, *et al.* Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res* 41 (2): 195-8 (2000).
- [93] Hughes TM, Rosano C, Evans RW, Kuller LH. Brain cholesterol metabolism, oxysterols, and dementia. *J Alzheimers Dis* 33 (4): 891-911 (2013).
- [94] Shobab LA, Hsiung GY, Feldman HH. Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet neurology* 4 (12): 841-52 (2005).
- [95] Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC, 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 126 (1): 88-94 (1994).
- [96] Sparks DL, Kuo YM, Roher A, Martin T, Lukas RJ. Alterations of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation. Preliminary observations. *Ann N Y Acad Sci* 903 335-44 (2000).
- [97] Refolo LM, Malester B, Lafrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, *et al.* Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7 (4): 321-31 (2000).
- [98] Shie FS, Jin LW, Cook DG, Leverenz JB, Leboeuf RC. Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13 (4): 455-9 (2002).
- [99] Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (11): 6460-4 (1998).
- [100] Kalvodova. Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids *in vitro*. *J Biol Chem* (2005).
- [101] Ghribi O, Golovko MY, Larsen B, Schrag M, Murphy EJ. Deposition of iron and beta-amyloid plaques is associated with cortical cellular damage in rabbits fed with long-term cholesterol-enriched diets. *J Neurochem* 99 (2): 438-49 (2006).
- [102] Kalvodova L, Kahya N, Schwille P, Eehalt R, Verkade P, Drechsel D, *et al.* Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids *in vitro*. *J Biol Chem* 280 (44): 36815-23 (2005).
- [103] Hughes TM, Lopez OL, Evans RW, Kambh MI, Williamson JD, Klunk WE, *et al.* Markers of cholesterol transport are associated with amyloid deposition in the brain. *Neurobiol Aging* 35 (4): 802-7 (2013).
- [104] Mendoza-Oliva A, Ferrera P, Arias C. Interplay between cholesterol and homocysteine in the exacerbation of amyloid-beta toxicity in human neuroblastoma cells. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12 (6): 842-8 (2013).
- [105] Ferrera P, Mercado-Gomez O, Silva-Aguilar M, Valverde M, Arias C. Cholesterol potentiates beta-amyloid-induced toxicity in human neuroblastoma cells: involvement of oxidative stress. *Neurochem Res* 33 (8): 1509-17 (2008).
- [106] Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356 (9242): 1627-31 (2000).
- [107] Wolozin B, Kellman W, Ruisseau P, Celestia GG, Siegel G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57 (10): 1439-43 (2000).
- [108] Kurata T, Kawai H, Miyazaki K, Kozuki M, Morimoto N, Ohta Y, *et al.* Statins have therapeutic potential for the treatment of Alzheimer's disease, likely via protection of the neurovascular unit in the AD brain. *J Neurol Sci* 322 (1-2): 59-63 (2012).
- [109] Butterfield DA, Barone E, Mancuso C. Cholesterol-independent neuroprotective and neurotoxic activities of statins: perspectives for statin use in Alzheimer disease and other age-related neurodegenerative disorders. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 64 (3): 180-6 (2011).
- [110] Simons M, Schwarzler F, Lutjohann D, Von Bergmann K, Beyreuther K, Dichgans J, *et al.* Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Neurol* 52 (3): 346-50 (2002).
- [111] Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, *et al.* Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (10): 5856-61 (2001).
- [112] Lutjohann D, Stroick M, Bertsch T, Kuhl S, Lindenthal B, Thelen K, *et al.* High doses of simvastatin, pravastatin, and cholesterol reduce brain cholesterol synthesis in guinea pigs. *Steroids* 69 (6): 431-8 (2004).
- [113] Cole SL, Grudzien A, Manhart IO, Kelly BL, Oakley H, Vassar R. Statins cause intracellular accumulation of amyloid precursor protein, beta-secretase-cleaved fragments, and amyloid beta-peptide

- via an isoprenoid-dependent mechanism. *J Biol Chem* 280 (19): 18755-70 (2005).
- [114] Vega GL, Weiner MF, Lipton AM, Von Bergmann K, Lutjohann D, Moore C, *et al.* Reduction in levels of 24S-hydroxycholesterol by statin treatment in patients with Alzheimer disease. *Archives of neurology* 60 (4): 510-5 (2003).
- [115] Eckert GP, Kirsch C, Mueller WE. Differential effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and apoE-deficient mice. *Neuroreport* 12 (5): 883-7 (2001).
- [116] Kirsch C, Eckert GP, Mueller WE. Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochemical pharmacology* 65 (5): 843-56 (2003).
- [117] Thelen KM, Rentsch KM, Gutteck U, Heverin M, Olin M, Andersson U, *et al.* Brain cholesterol synthesis in mice is affected by high dose of simvastatin but not of pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 316 (3): 1146-52 (2006).
- [118] Naidu A, Xu Q, Catalano R, Cordell B. Secretion of apolipoprotein E by brain glia requires protein prenylation and is suppressed by statins. *Brain Res* 958 (1): 100-11 (2002).
- [119] Johnson-Anuna LN, Eckert GP, Keller JH, Igbayboa U, Franke C, Fechner T, *et al.* Chronic administration of statins alters multiple gene expression patterns in mouse cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 312 (2): 786-93 (2005).
- [120] Van Der Most PJ, Dolga AM, Nijholt IM, Luiten PG, Eisel UL. Statins: mechanisms of neuroprotection. *Prog Neurobiol* 88 (1): 64-75 (2009).
- [121] Barone E, Cenini G, Di Domenico F, Martin S, Sultana R, Mancuso C, *et al.* Long-term high-dose atorvastatin decreases brain oxidative and nitrosative stress in a preclinical model of Alzheimer disease: a novel mechanism of action. *Pharmacol Res* 63(3): 172-80 (2011).
- [122] Parsons RB, Price GC, Farrant JK, Subramaniam D, Adeagbo-Sheikh J, Austen BM. Statins inhibit the dimerization of beta-secretase via both isoprenoid- and cholesterol-mediated mechanisms. *Biochem J* 399 (2): 205-14 (2006).
- [123] Murphy MP, Morales J, Beckett TL, Astarita G, Piomelli D, Weidner A, *et al.* Changes in cognition and amyloid-beta processing with long term cholesterol reduction using atorvastatin in aged dogs. *J Alzheimers Dis* 22 (1): 135-50 (2010).
- [124] Hoglund K, Thelen KM, Syversen S, Sjogren M, Von Bergmann K, Wallin A, *et al.* The effect of simvastatin treatment on the amyloid precursor protein and brain cholesterol metabolism in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 19 (5-6): 256-65 (2005).
- [125] Kojro E, Fuger P, Prinzen C, Kanarek AM, Rat D, Endres K, *et al.* Statins and the squalene synthase inhibitor zaragozic acid stimulate the non-amyloidogenic pathway of amyloid-beta protein precursor processing by suppression of cholesterol synthesis. *J Alzheimers Dis* 20 (4): 1215-31 (2010).
- [126] Tamboli IY, Barth E, Christian L, Siepmann M, Kumar S, Singh S, *et al.* Statins promote the degradation of extracellular amyloid {beta}-peptide by microglia via stimulation of exosome-associated insulin-degrading enzyme (IDE) secretion. *J Biol Chem* 285 (48): 37405-14 (2010).
- [127] Won JS, Im YB, Khan M, Contreras M, Singh AK, Singh I. Lovastatin inhibits amyloid precursor protein (APP) beta-cleavage through reduction of APP distribution in Lubrol WX extractable low density lipid rafts. *J Neurochem* 105 (4): 1536-49 (2008).
- [128] Hosaka A, Araki W, Oda A, Tomidokoro Y, Tamaoka A. Statins reduce amyloid beta-peptide production by modulating amyloid precursor protein maturation and phosphorylation through a cholesterol-independent mechanism in cultured neurons. *Neurochem Res* 38 (3): 589-600 (2013).
- [129] Salins P, Shawesh S, He Y, Dibrov A, Kashour T, Arthur G, *et al.* Lovastatin protects human neurons against Abeta-induced toxicity and causes activation of beta-catenin-TCF/LEF signaling. *Neurosci Lett* 412 (3): 211-6 (2007).
- [130] Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *TheScientificWorld-Journal* 2012 756357 (2012).
- [131] Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Morimoto N, Ohta Y, Ikeda Y, *et al.* Atorvastatin and pitavastatin reduce senile plaques and inflammatory responses in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurol Res* 34 (6): 601-10 (2012).
- [132] Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Panin VL, Morimoto N, Ohta Y, *et al.* Atorvastatin and pitavastatin improve cognitive function and reduce senile plaque and phosphorylated tau in aged APP mice. *Brain Res* 1371: 161-70 (2011).
- [133] Zhang YY, Fan YC, Wang M, Wang D, Li XH. Atorvastatin attenuates the production of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in the hippocampus of an amyloid beta1-42-induced rat model of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 8: 103-10 (2013).
- [134] Tong XK, Nicolakakis N, Fernandes P, Ongali B, Brouillette J, Quirion R, *et al.* Simvastatin improves cerebrovascular function and counters soluble amyloid-beta, inflammation and oxidative stress in aged APP mice. *Neurobiol Dis* 35(3): 406-14 (2009).
- [135] Cordle A, Landreth G. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors attenuate beta-amyloid-induced microglial inflammatory responses. *J Neurosci* 25(2): 299-307 (2005).
- [136] Bi X, Baudry M, Liu J, Yao Y, Fu L, Brucher F, *et al.* Inhibition of geranylgeranylation mediates the effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors on microglia. *J Biol Chem* 279(46): 48238-45 (2004).
- [137] Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64(17): 2202-10 (2007).
- [138] Sultana R, Butterfield DA. Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 19(1): 341-53 (2010).
- [139] Tramontina AC, Wartchow KM, Rodrigues L, Biasibetti R, Quincozes-Santos A, Bobermin L, *et al.* The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats. *J Neural Transm (Vienna, Austria)* 118(11): 1641-9 (2011).
- [140] Kurata T, Miyazaki K, Morimoto N, Kawai H, Ohta Y, Ikeda Y, *et al.* Atorvastatin and pitavastatin reduce oxidative stress and improve IR/LDL-R signals in Alzheimer's disease. *Neurol Res* 35(2): 193-205 (2013).
- [141] Kurinami H, Sato N, Shinohara M, Takeuchi D, Takeda S, Shimamura M, *et al.* Prevention of amyloid beta-induced memory impairment by fluvastatin, associated with the decrease in amyloid beta accumulation and oxidative stress in amyloid beta injection mouse model. *Intern J Mol Med* 21 (5): 531-7 (2008).
- [142] Mattson MP. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromol Med* 3(2): 65-94 (2003).
- [143] Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, *et al.* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci* 23 (35): 11104-11 (2003).
- [144] Bosel J, Gandor F, Harms C, Synowitz M, Harms U, Djoufack PC, *et al.* Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem* 92(6): 1386-98 (2005).
- [145] Ponce J, De La Ossa NP, Hurtado O, Millan M, Arenillas JF, Davalos A, *et al.* Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke* 39(4): 1269-75 (2008).
- [146] Dolga AM, Nijholt IM, Ostroveanu A, Ten Bosch Q, Luiten PG, Eisel UL. Lovastatin induces neuroprotection through tumor necrosis factor receptor 2 signaling pathways. *J Alzheimers Dis* 13(2): 111-22 (2008).
- [147] Farooqui AA, Horrocks LA. Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 12 (3): 245-60 (2006).
- [148] Aihara M, Ishii S, Kume K, Shimizu T. Interaction between neurone and microglia mediated by platelet-activating factor. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 5(5): 397-406 (2000).
- [149] Bate C, Kempster S, Williams A. Platelet-activating factor antagonists protect amyloid-beta damaged neurons from microglia-mediated death. *Neuropharmacology* 51(2): 173-81 (2006).
- [150] Bate C, Tayebi M, Williams A. Ginkgolides protect against amyloid-beta1-42-mediated synapse damage *in vitro*. *Mol Neurodegener* 3: 1 (2008).

- [191] Soto-Hernández KA, Loza Escutia O, García Mendoza N. Estatinas en adultos mayores, una población creciente. *Rev Facultad de Medicina, UNAM* 56(1): 19-29 (2012).
- [192] Thelen KM, Falkai P, Bayer TA, Lutjohann D. Cholesterol synthesis rate in human hippocampus declines with aging. *Neurosci Lett* 403(1-2): 15-9 (2006).
- [193] Sparks DL, Lemieux SK, Haut MW, Baxter LC, Johnson SC, Sparks LM, *et al.* Hippocampal volume change in the Alzheimer Disease Cholesterol-Lowering Treatment trial. *Cleve Clin J Med* 75(2): S87-93 (2008).
- [194] Algotsson A, Winblad B. Patients with Alzheimer's disease may be particularly susceptible to adverse effects of statins. *Dement Geriatr Cogn Disord* 17(3): 109-16 (2004).
- [195] Kelley BJ, Glasser S. Cognitive effects of statin medications. *CNS Drugs* 28(5): 411-9 (2014).
- [196] Parvathy S, Ehrlich M, Pedrini S, Diaz N, Refolo L, Buxbaum JD, *et al.* Atorvastatin-induced activation of Alzheimer's alpha secretase is resistant to standard inhibitors of protein phosphorylation-regulated ectodomain shedding. *J Neurochem* 90(4): 1005-10 (2004).
- [197] Garcia-Roman N, Alvarez AM, Toro MJ, Montes A, Lorenzo MJ. Lovastatin induces apoptosis of spontaneously immortalized rat brain neuroblasts: involvement of nonsterol isoprenoid biosynthesis inhibition. *Mol Cell Neurosci* 17(2): 329-41 (2001).
- [198] Fan QW, Yu W, Gong JS, Zou K, Sawamura N, Senda T, *et al.* Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons. *J Neurochem* 80(1): 178-90 (2002).

Received: ?????

Revised: ?????

Accepted: ?????

Artículo 3: Interplay between cholesterol and homocysteine in the exacerbation of amyloid-beta toxicity in human neuroblastoma cells.

Mendoza-Oliva, A., Ferrera, P., Arias, C. (2013). *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12(6): 842-848.

Send Orders of Reprints at reprints@benthamscience.net

CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, 2013, 12, 000-000

1

Interplay Between Cholesterol and Homocysteine in the Exacerbation of Amyloid- β Toxicity in Human Neuroblastoma Cells

Aydé Mendoza-Oliva, Patricia Ferrera and Clorinda Arias*

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

Abstract: Amyloid- β ($A\beta$) plays an important role in Alzheimer's disease (AD) progression and is associated with synaptic damage and neuronal death. Epidemiological and experimental studies indicate that hypercholesterolemia and hyperhomocysteinemia increase susceptibility to AD; however, the exact impact and mechanisms involved are largely unknown. Few studies have addressed the combined effects of the above compounds, which are considered to be risk factors for developing AD, on $A\beta$ -induced neurotoxicity. The aim of the present work was to analyze the relationships between homocysteine (Hcy) and cholesterol and their role in $A\beta$ toxicity in human neuroblastoma cells, as well as the mechanisms associated with this neurotoxicity. In addition to finding that Hcy is involved in cholesterol homeostasis in neurons, we demonstrate that the combined effect of cholesterol and Hcy in the presence of copper significantly increases the levels of reactive oxygen species and may render neurons more vulnerable to $A\beta$.

Keywords: Cu^{2+} -amyloid- β complex, homocysteine toxicity, neuronal cholesterol accumulation, ROS production.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a devastating neurodegenerative condition characterized by a progressive loss of memory and cognitive impairment as a result of extensive synaptic loss and neuronal death. The cause of AD remains unknown, but genetic susceptibility and environmental factors both seem to play a role in the development of the disease, making it difficult to establish its precise etiology and prevention. Amyloid- β ($A\beta$) deposition in the brain is considered an important factor in AD progression, as it initiates a cascade of events associated with synaptic damage and neuronal death [1-4]. However, few studies have addressed the combined effects of diverse compounds that are considered risk factors for developing AD on $A\beta$ -induced neurotoxicity.

Cumulative evidence indicates that neuronal metabolism and the redox state are altered in this disease [5-8]. Oxidative stress may arise from chemical interactions that occur in complexes formed between $A\beta$ and highly reactive metals such as copper (Cu^{2+}) [9, 10]. The major source of reactive oxygen species (ROS) associated with the toxicity of $A\beta$ is derived from the $A\beta:Cu^{2+}$ complexes that produce H_2O_2 from molecular oxygen [11, 12]. Several studies have shown that cholesterol may be the substrate for ROS produced by $A\beta:Cu^{2+}$ complexes [13, 14]. In addition, epidemiological and experimental studies indicate that hypercholesterolemia increases susceptibility to AD. In fact, the presence of the $\epsilon 4$ allele of ApoE, which is associated with high circulating levels of cholesterol, is a well-established risk factor for developing AD in humans [15-17] and hypercholesterolemia is a

frequent finding in AD patients [18]. The brain is the organ with the highest cholesterol content, the majority of which stems from *de novo* synthesis [19]. Therefore, it has been suggested that, in addition to systemic cholesterol levels, other factors participate in the synthesis and deposition of cholesterol in the brain. Notably, Hcy has recently been found to be significantly elevated in patients with either vascular dementia or AD [20], and several studies in humans have shown a positive correlation between Hcy and high cholesterol levels [21, 22]. Although *in vitro* studies have demonstrated that Hcy leads to the increased production and secretion of cholesterol [23-25], it remains unknown whether cholesterol levels in the brain are associated with elevated Hcy. Therefore, the aim of the present work is to investigate the relationship between Hcy and cholesterol levels and their effect on $A\beta$ toxicity. We analyzed the potential of the aforementioned compounds to increase the susceptibility of differentiated human neuroblastoma cells to $A\beta$ toxicity and the mechanisms associated with this neurotoxicity.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Human neuroblastoma cells (MSN) [26] were cultured in RPMI 1640 medium containing non-essential amino acids and 10% fetal calf serum in 24 multidishes at a density of 0.5×10^6 cells per well. Cultures were maintained in an atmosphere of 5% CO_2 / 95% O_2 at 37°C. After 24 h, MSN cells were induced to differentiate by adding retinoic acid at 10 μM and nerve growth factor (NGF) at 50 ng/ml to the culture media over 5 days. In experiments to evaluate toxicity, the culture medium was replaced with fresh medium, and the cells were exposed for 24 h to different concentrations of L-homocysteine (Hcy) with or without $CuCl_2$ (dissolved in sterile Milli-Q water), cholesterol 50 μM (dissolved in ethanol and added to the cultures at a final concentration of 0.3%) or $A\beta_{1-42}$. When the effects of $A\beta_{1-42}$

*Address correspondence to this author at the Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. AP 70-228, 04510 México, D.F., México; Tel: +52 55 56229215; Fax: +52 55 56229182; E-mail: carias@servidor.unam.mx

were tested, the peptide was pre-incubated at 37°C for 7 days to allow aggregation before adding to the cells. As a control for the effects of Hcy, in some experiments, neurons were exposed to L-homocysteine (Hcys) which is an oxidized derivative of Hcy without reported toxicity. The reagents, CuCl₂, cholesterol, MTT, Hcy, Hcys and Aβ₁₋₄₂ were purchased from Sigma Chemical, St Louis, MO.

Cell Viability

The method employed in this work is commonly used in cultured cell studies to evaluate mitochondrial redox activity through the conversion of 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) to formazan crystals by mitochondrial respiratory chain reactions. In brief, MTT dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) at 5 mg/ml was added for 1 h to MSN cells in a 1/10 (v/v) ratio after a 24 h incubation with the different treatments. The incubation medium was then removed, and neurons were solubilized with isopropyl alcohol (0.8 ml). The absorbance of each sample was quantified using a spectrophotometer at 570 nm (Pharmacia Biotech, Gaithersburg, MD).

Determination of Intracellular ROS Formation

ROS were determined with a fluorometric assay using dihydrorhodamine (DHR) (Sigma St. Louis MO, USA). Cells were treated as described above and then harvested in PBS containing 0.5% protease inhibitors (Complete™, Roche). A 100 μl aliquot of the samples (approximately 100,000 cells) was centrifuged at 180xg for 5 min. Then, 180 μl of buffer (containing in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 0.8 MgSO₄, 1.8 CaCl₂, 5 glucose, 15 HEPES) and 20 μl of DHR (1 μM) were added to the pellet and incubated at 37°C for 2 min. The fluorescent product rhodamine 123 was measured using a spectrophotometer at 505 nm and interpolated in a curve of rhodamine 123.

Cholesterol Labeling

MSN cells were grown on coverslips, washed twice in PBS for 5 min, and stained with filipin (Sigma Chemical, St Louis, MO), a blue fluorescent probe to study the distribution of non-esterified cholesterol [27]. A filipin stock solution (1 mM) was prepared in methanol. A working solution (50 ng/ml) was prepared by dissolving the stock solution in PBS 1X and applied to the cells for 45 min at 37°C. Differentiated MSN cells were exposed for five days to Hcy (50 μM) or cholesterol (50 μM). At the end of this time, the cells were washed 2 times with PBS 1X for 5 min and then fixed with methanol (-20°C) for 5 min and permeabilized with PBS 1X/Triton 0.25% for another 20 min. The cells were washed again with PBS 1X and then incubated with 500 μl of the filipin working solution. The cells were then washed three times in PBS 1X and observed at 20X magnification under a Inverted Fluorescent Microscope, Olympus IX71 using 360 nm excitation and emission collected at 460 nm.

Cholesterol Measurement

Cholesterol content was quantified by the Amplex Red Cholesterol assay (Invitrogen) in whole-cell lysates prepared

from differentiated MSN cultures after 5-day incubation with Hcy or cholesterol. Briefly, cells were homogenized in buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% deoxycholate and protease inhibitors (Complete™, Roche) and diluted in a reaction buffer. Then, an equivalent of Amplex Red working solution (300 μM Amplex Red, 2 U/ml cholesterol oxidase, 0.2 U/ml cholesterol esterase and 2 U/ml horseradish peroxidase) was added. The samples were incubated at 37°C for 30 min in the dark, and absorbance was measured at 535 nm using a microplate reader (BioRad, M 550). Cholesterol content was calculated by interpolating values in a standard curve of cholesterol and normalized with respect to the protein content from each sample.

Statistical Analysis

Statistical significance was determined by ANOVA followed by Tukey's test. Data represent the mean ± SEM of at least three experiments (indicated in each figure) performed in triplicate.

RESULTS

Cultured MSN were treated with retinoic acid plus NGF to induce neuronal differentiation. The neuron-like phenotype was obvious by 72 h after incubation when the cells produced cytoplasmic extensions. After 6 days, the majority of treated MSN neuroblastoma cells presented some neurite extensions (Fig. 5A) that were positive for the microtubule-associated protein 2 (MAP-2) (data not shown). At this stage of differentiation, a dose-response analysis of the viability of undifferentiated or RA-differentiated MSN cells after Hcy treatment was performed. The analysis was performed using the MTT test, to measure cell viability of the corresponding cell samples. Significant differences in Hcy toxicity were observed between undifferentiated and differentiated human neuroblastoma cells, the primary difference being that the undifferentiated cells demonstrated resistance to Hcy toxicity. After a 24 h incubation, a significant reduction of 10% in the viability of differentiated neurons was observed in the 50 μM concentration (***p*<0.01), which progressed to 75% neuronal death at 100 μM (****p*<0.001). As suggested in previous work, Hcy toxicity depends on its reduced chemical structure [28, 29] and, as expected, to its oxidized form, Hcys did not induce neuronal death in either differentiated or undifferentiated cells (Fig. 1).

In view of the central role of Aβ on neurodegeneration in AD and the proposed role of Cu²⁺ and cholesterol in its toxicity, we tested the effect of these compounds on neuronal damage in the presence or absence of Hcy (Fig. 2A). Differentiated MSN cells showed only slight toxicity after 24 h exposure to low concentrations of Aβ₁₋₄₂ (10 μM). When cells were co-incubated with Aβ₁₋₄₂ and Hcy, the mitochondrial reducing capacity was inhibited an additional 16% (**p*<0.05). Whereas Cu²⁺ (10 μM) or cholesterol (50 μM) induced 25% neuronal death, when combined with Hcy, they reduced the number of surviving neurons by almost 40% (****p*<0.001). These results indicate that Hcy might increase the vulnerability of neuronal damage to diverse neurotoxic insults associated with neurodegeneration in AD. Neuronal

death was also exacerbated when Cu^{2+} and cholesterol were co-administered (45% of cell death) and when $\text{A}\beta$ was combined with Cu^{2+} , cholesterol or Hcy (Fig. 2B). However, when $\text{A}\beta_{1-42}$ was added in combination with Cu^{2+} /cholesterol, the mitochondrial redox activity of human neurons diminished by more than 55% ($***p < 0.001$ vs control).

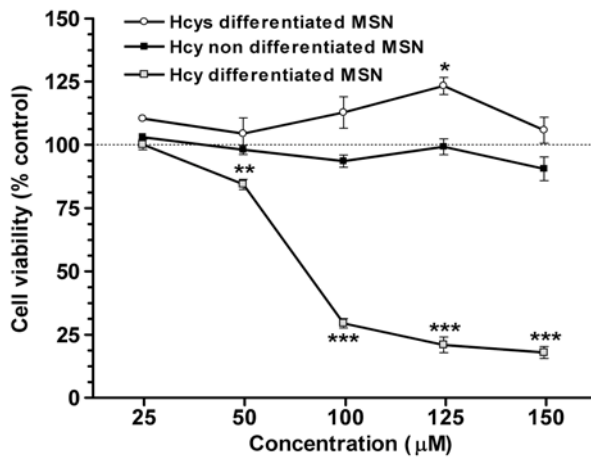


Fig. (1). Survival of MSN exposed to different concentrations of homocysteine (Hcy) and the oxidized form homocystine (Hcys). Differentiated and non-differentiated cells were treated for 24 h with different concentrations (25-150 µM) of Hcy (gray and empty squares) and Hcys (empty circles). Each point represents the mean ± SEM of triplicate determinations of three to five different experiments: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control. Statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey’s test.

Because the primary mechanism of toxicity of the studied compounds depends on their ability to increase the

production of ROS, we next examined differences in ROS concentration after a 24 h incubation with different combinations (Fig. 3A). As previously reported [14] $\text{A}\beta_{1-42}$ does not significantly change the rate of ROS generation after a 24 h incubation at 10 µM concentration, whereas Cu^{2+} , cholesterol and Hcy induced a significant 25% to 40% increase in ROS accumulation ($***p < 0.001$ vs control). No further increase of Hcy-induced ROS was observed with the addition of $\text{A}\beta_{1-42}$, but an additional 15% increase was achieved when Hcy was co-incubated with Cu^{2+} and cholesterol. Interestingly, in the cholesterol- Cu^{2+} and Hcy- Cu^{2+} conditions, $\text{A}\beta$ induced increases in ROS production by 120% and 75%, respectively, as compared to control cultures (Fig. 3B).

To further analyze the cholesterol-dependent toxicity we have incubated differentiated MSN cells with Hcy and cholesterol for 5 days (during the differentiation process) in 10% or 2% serum containing 51.16 mg/l and 10.23 mg/l of cholesterol, respectively (Fig. 4). After 5 days of cholesterol exposure, cell death reached 75% while Hcy-induced toxicity was similar to that observed after 24 h (25% of cell death). However, when neurons were incubated in low serum (2%), a higher cell survival was observed, suggesting that cholesterol and Hcy-mediated toxicity also depend on the presence of some serum components.

To determine the extent of cholesterol incorporation from the media, differentiated neurons were stained with filipin. Fig. (5A) shows the morphological features of differentiated MSN cells that were used throughout the study. An almost total absence of filipin staining of cell bodies and neurites was observed in normal MSN cells that were not exposed to cholesterol. An evident increase in staining was observed mainly in the cell body of neurons incubated with 50 µM

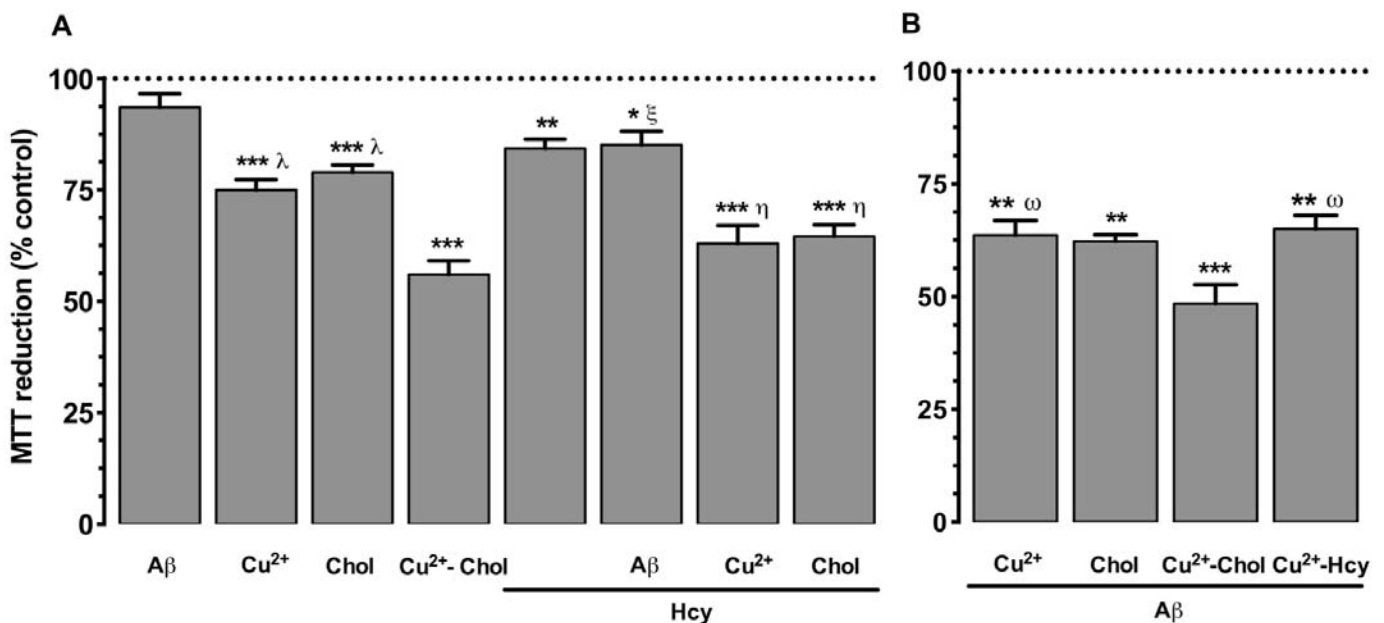


Fig. (2). Effects of Cu^{2+} , cholesterol and Hcy on mitochondrial redox activity in the absence or presence of $\text{A}\beta_{1-42}$ in differentiated MSN. **A**, cells were treated with CuCl_2 (10 µM), Chol (50 µM) or $\text{A}\beta_{1-42}$ (10 µM) with or without Hcy (50 µM) for 24 h. **B**, cells were exposed to CuCl_2 (10 µM), Chol (50 µM) or Hcy (50 µM) in the presence of $\text{A}\beta_{1-42}$ (10 µM) for 24 h. The data expressed as the percentage of control values (dotted line) are the mean ± SEM of triplicate determinations of three to six different experiments: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control; $^{\eta} p < 0.001$ vs Hcy; $^{\xi} p < 0.05$ vs $\text{A}\beta_{1-42}$; $^{\omega} p < 0.05$ vs $\text{A}\beta_{1-42}$ - Cu^{2+} -Chol. Statistical significance was determined using ANOVA followed by Tukey’s test.

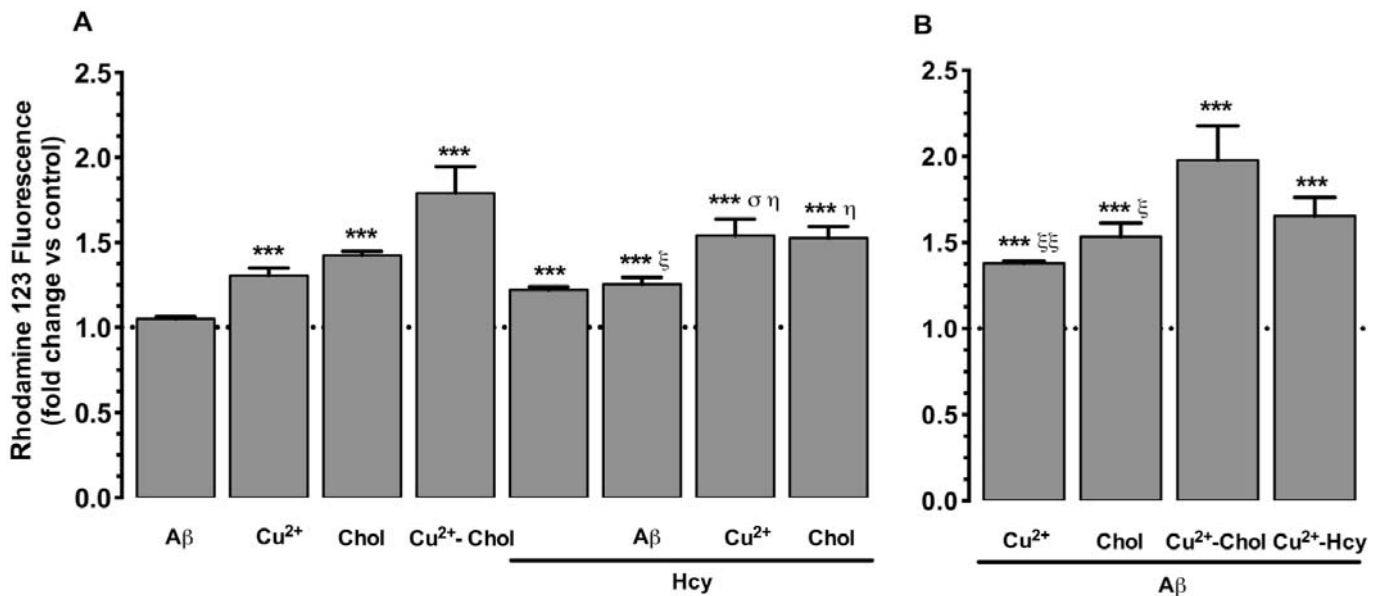


Fig. (3). Effects of Cu²⁺, cholesterol and Hcy on ROS formation in the absence or presence of Aβ₁₋₄₂ in differentiated MSN. **A**, cells were exposed to CuCl₂ (10 μM) or Chol (50 μM) with or without Hcy (50 μM) for 24 h. **B**, cells were treated with CuCl₂ (10 μM), Chol (50 μM) or Hcy (50 μM) in the presence of Aβ₁₋₄₂ (10 μM) for 24 h. Changes in rhodamine 123 fluorescence are expressed as fold increase compared with control cells (dotted line). Each bar represents the mean ± SEM of triplicate determinations of three to four different experiments: *** *p* < 0.001 vs control; ^η *p* < 0.05 vs Hcy, ^ξ *p* < 0.05 vs Aβ₁₋₄₂; ^σ *p* < 0.05 vs Cu²⁺; ^ω *p* < 0.05, ^{ωω} *p* < 0.01 vs Aβ₁₋₄₂-Cu²⁺-Chol. Statistical significance was determined using ANOVA followed by Tukey's test.

cholesterol. Surprisingly, when cells were treated for 5 days with 50 μM Hcy, an increase in filipin staining was also detected. To corroborate the rise in neuronal cholesterol after adding Hcy, a fluorometric assay to measure cholesterol content was performed. In differentiated MSN cells, 5-day incubation with 50 μM cholesterol induced a 75% increase in cholesterol compared to control, whereas Hcy induced neuronal accumulation of cholesterol to almost 25% compared to control cells (Fig. 5B).

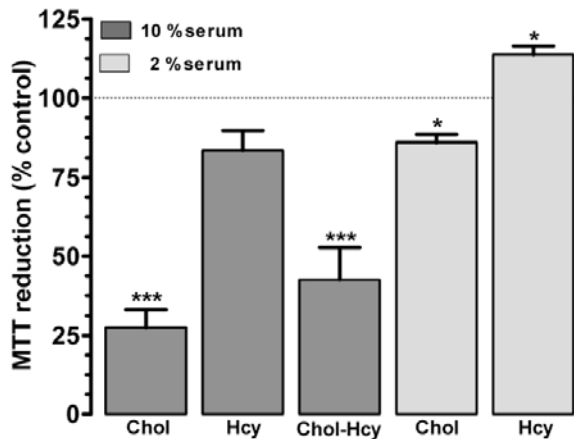


Fig. (4). Long term effects of cholesterol and Hcy on mitochondrial redox activity in MSN cells cultured in medium with different concentrations of serum. During the differentiation process, cells were exposed for 5 days to Chol (50 μM) or Hcy (50 μM) and cultured in medium with 10% serum (dark columns) or 2% serum (clear columns). The data expressed as the percentage of control values (dotted line) are the mean ± SEM of triplicate determinations of three to five different experiments: **p* < 0.05, ****p* < 0.001 vs control. Statistical significance was determined using ANOVA followed by Tukey's test.

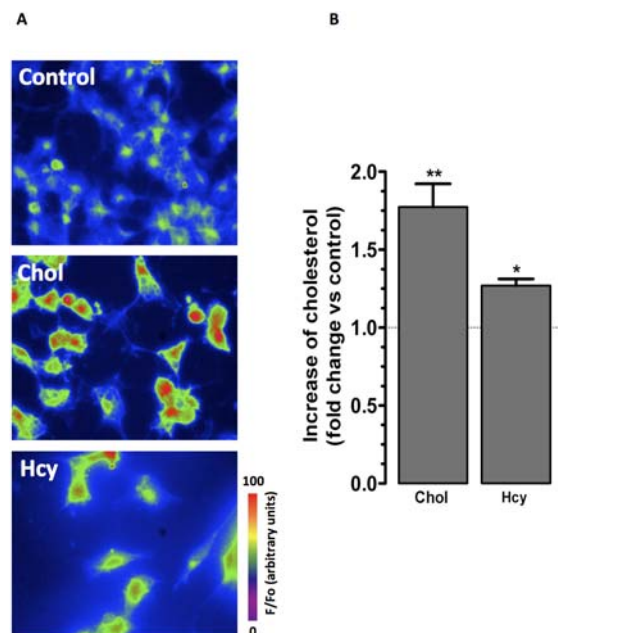


Fig. (5). Changes in cholesterol content in MSN cells. Panels show in **A**) the corresponding fluorescent images and fluorescence intensity (arbitrary units) of filipin staining in control cells, cells exposed to Chol (50 μM) or to Hcy (50 μM) for 5 days during the differentiation process. Panel **B**) shows the increase of cholesterol levels quantified by the Amplex Red cholesterol assay in whole-cell lysates of neurons treated with Chol (50 μM) or Hcy (50 μM) for 5 days during the differentiation process. Changes in cholesterol levels are expressed as fold increase compared to control cells. Each bar represents the mean ± SEM of triplicate determinations of five experiments: **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs control. Statistical significance was determined using ANOVA followed by Dunnett's test.

DISCUSSION

Accumulation of A β protein in the brain is a slow process that most likely takes several years before manifesting its neurotoxicity. In fact, the presence of amyloid plaques in elderly subjects without cognitive impairment suggests that the accumulation of the peptide by itself is not the only causative condition of neuronal damage or that, for unknown reasons, A β becomes progressively more toxic in the brain of AD patients [30, 31]. Although there is much evidence regarding the role of oxidative stress in AD [32], the anti-oxidant and pro-oxidant properties of A β and the associated conditions that might promote ROS production by A β are still a matter of great debate [33, 34].

In the present work, we demonstrated that the combined effect of different agents such as cholesterol, Hcy and copper may render neurons more vulnerable to A β , as demonstrated by higher levels of ROS production. We also found that Hcy is able to increase cholesterol in neurons that in turn, might be an additional factor to enhance A β toxicity. To our knowledge, this is the first report demonstrating such an effect on Hcy-mediated cholesterol accumulation in neurons, although this result has been previously found in hepatocytes [24, 35].

Epidemiological studies have confirmed that elevations in plasma Hcy precede the development of dementia, and there is a linear correlation between cognitive decline and Hcy circulating levels [36]. The normal Hcy concentration in the brain is approximately 10 μ M [37]; however, during pathological conditions, such as cerebral ischemia, it may reach up to 50 μ M [38]. This was the dose used in the present work to potentiate A β neurotoxicity, although previous studies have used higher concentrations of Hcy to increase amyloid toxicity in neurons [28]. We found that the exposure to 50 μ M Hcy by itself did not potentiate the toxic effects of A β in differentiated neurons. However, when Hcy was co-incubated with cholesterol or Cu²⁺, a significant increase in the production of ROS was observed, and neurotoxicity was elicited.

Several *in vitro* and *in vivo* studies have highlighted the important role played by metals such as Cu²⁺ in the diverse toxic pathways associated with AD [39]. Interestingly, the capacity of Hcy for Cu²⁺ reduction has been reported [29, 40], and it has been demonstrated that active redox forms of Cu²⁺ are present in regions affected by amyloid deposits in AD brains but not in control age-matched brains [41]. According with this, we have found that neuronal exposure to Cu²⁺ potentiated the deleterious effect of cholesterol and Hcy and increased ROS production. H₂O₂ production has also been found as a product of a catalytic reaction between A β and cholesterol in the presence of A β :Cu²⁺, suggesting that this complex may have a methaloenzyme-like activity that is able to reduce cholesterol and generate H₂O₂ [11, 13, 42, 43]. We found that neuronal exposure to high cholesterol increases the toxicity of A β ; additionally, co-incubation with A β :Cu²⁺ increases cell death. We also demonstrated that the toxicity elicited by cholesterol in conjunction with A β :Cu²⁺ exposure was correlated with ROS production, suggesting that oxidative stress is involved in the additive toxic effects on neurons. In view that experimental evidence has documented the uptake of free cholesterol from the cell surface [44] it is conceivable to assume that the cholesterol

added to MSN cells was partitioned between the cell membrane and the intracellular compartments. However, the cholesterol-dependent ROS formation by A β :Cu²⁺ complexes could be occurring at the cell surface in where the presence of these complexes must be higher.

Although there is much evidence regarding the role of oxidative stress in AD [32], there is less information linking oxidative stress and aging with cholesterol biosynthesis [18]. Here we propose a role for Hcy on neuronal cholesterol accumulation as an additional risk factor for increased A β neurotoxicity during pathological aging. Although currently the mechanism for this Hcy-dependent cholesterol accumulation is unknown, both an increase in lipoprotein oxidation and/or the activation of cholesterol biosynthesis and uptake have been reported in hepatocytes and endothelial cells [23, 24, 35].

CONCLUSION

Taken together, the present results provide evidence for a complex relationship between Hcy, which is able to increase neuronal cholesterol, and the presence of the A β :Cu²⁺ complex, which promotes ROS production and neuronal cell death. This study also suggests that A β neurotoxicity is a pathological response to aging-associated brain conditions and confirms the synergy of various agents that are potentially involved in the generation of ROS that give rise to A β neurotoxicity and provides evidence for a preventive and therapeutic approach.

ABBREVIATIONS

AD	=	Alzheimer's disease
A β	=	Amyloid- β
ROS	=	Reactive oxygen species
Hcy	=	Homocysteine
Hcys	=	Homocystine
Chol	=	Cholesterol
MTT	=	3-[4,5- dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by DGAPA, UNAM, IN204212 and CONACYT, 166482. A M-O is currently in the PhD program: Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and she receives a fellowship from CONACYT.

REFERENCES

- [1] Hardy, J.; Selkoe, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **2002**, *297*(5580), 353-356.

- [2] Selkoe, D.J. Biochemistry and molecular biology of amyloid β -protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *Handb. Clin. Neurol.*, **2008**, *89*, 245-260.
- [3] Herrup, K. Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *J. Neurosci.*, **2010**, *30*(50), 16755-16762.
- [4] Quiroz-Baez, R.; Ferrera, P.; Rosendo-Gutiérrez, R.; Morán, J.; Bermúdez-Rattoni, F.; Arias, C. Caspase-12 activation is involved in amyloid- β protein-induced synaptic toxicity. *J. Alzheimers Dis.*, **2011**, *26*(3), 467-476.
- [5] Butterfield, D.A.; Reed, T.; Newman, S.F.; Sultana, R. Roles of amyloid β -peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic. Biol. Med.*, **2007**, *43*(5), 658-677.
- [6] Nunomura, A.; Tamaoki, T.; Tanaka, K.; Motohashi, N.; Nakamura, M.; Hayashi, T.; Yamaguchi, H.; Shimohama, S.; Lee, H.G.; Zhu, X.; Smith, M.A.; Perry, G. Intraneuronal amyloid β accumulation and oxidative damage to nucleic acids in Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.*, **2010**, *37*(3), 731-737.
- [7] Bonda, D.; Wang, X.; Perry, G.; Nunomura, A.; Tabaton, M.; Zhu, X.; Smith, M.A. Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. *Neuropharmacology*, **2010**, *59*(4-5), 290-294.
- [8] Struble, R.G.; Ala, T.; Patrylo, P.R.; Brewer, G.J.; Yan, X.X. Is brain amyloid production a cause or a result of dementia of the Alzheimer's type? *J. Alzheimers Dis.*, **2010**, *22*(2), 393-399.
- [9] Miura, T.; Suzuki, K.; Kohata, N.; Takeuchi, H. Metal binding modes of Alzheimer's amyloid β -peptide in insoluble aggregates and soluble complexes. *Biochemistry*, **2000**, *39*(23), 7024-7031.
- [10] Haeflner, F.; Smith, D.G.; Barnham, K.J.; Bush, A.I. Model studies of cholesterol and ascorbate oxidation by copper complexes: relevance to Alzheimer's disease β -amyloid metallochemistry. *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, *99*(12), 2403-2422.
- [11] Huang, X.; Atwood, C.S.; Hartshorn, M.A.; Multhaup, L.E.; Goldstein, L.E.; Scarpa, R.C.; Cuajungco, M.P.; Gray, D.N.; Lim, J.; Moir, R.D.; Tanzi, R.E.; Bush, A.I. The A β peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry*, **1999**, *38*(24), 7609-7616.
- [12] Bush, A.I.; Tanzi, R.E. Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. *Neurotherapeutics*, **2008**, *5*(3), 421-432.
- [13] Opazo, C.; Huang, X.; Cherny, R.A.; Moir, R.D.; Roher, A.E.; White, A.R.; Cappai, R.; Masters, C.L.; Tanzi, R.E.; Inestrosa, N.C.; Bush, A.I. Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease β -amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H_2O_2 . *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*(43), 40302-40308.
- [14] Ferrera, P.; Mercado-Gómez, O.; Silva-Aguilar, M.; Valverde, M.; Arias, C. Cholesterol potentiates β -amyloid-induced toxicity in human neuroblastoma cells: involvement of oxidative stress. *Neurochem. Res.*, **2008**, *33*(8), 1509-1517.
- [15] Jarvik, G.P.; Austin, M.A.; Fabsitz, R.R.; Auwerx, J.; Reed, T.; Christian, J.C.; Deeb, S. Genetic influences on age-related change in total cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol, and triglyceride levels: longitudinal apolipoprotein E genotype effects. *Genet. Epidemiol.*, **1994**, *11*(4), 375-384.
- [16] Gomez-Isla, T.; West, H.L.; Rebeck, G.W.; Harr, S.D.; Growdon, J.H.; Locascio, J.J.; Perls, T.T.; Lipsitz, L.A.; Hyman, B.T. Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E $\epsilon 4$ in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, **1996**, *39*(1), 62-70.
- [17] Wolozin, B. A fluid connection: cholesterol and A β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*(10), 5371-5373.
- [18] Ledesma, M.D.; Dotti, C.G. Peripheral cholesterol, metabolic disorders and Alzheimer's disease. *Front. Biosci.*, **2012**, *4*, 181-194.
- [19] Pfrieger, F.W.; Ungerer, N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog. Lipid Res.*, **2011**, *50*(4), 357-371.
- [20] Ho, R.C.; Cheung, M.W.; Fu, E.; Win, H.H.; Zaw, M.H.; Ng, A.; Mak, A. Is high homocysteine level a risk factor for cognitive decline in elderly? A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, **2011**, *19*(7), 607-617.
- [21] Nygård, O.; Vollset, S.E.; Refsum, H.; Stensvold, I.; Tverdal, A.; Nordrehaug, J.E.; Ueland, M.; Kvalø, G. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA*, **1995**, *274*(19), 1526-1533.
- [22] Xiao, Y.; Zhang, Y.; Lv, X.; Su, D.; Li, D.; Xia, M.; Qiu, J.; Ling, W.; Ma, J. Relationship between lipid profiles and plasma total homocysteine, cysteine and the risk of coronary artery disease in coronary angiographic subjects. *Lipids Health Dis.*, **2011**, *10*, 137-143.
- [23] Werstuck, G.H.; Lentz, S.R.; Dayal, S.; Hossain, G.S.; Sood, S.K.; Shi, Y.Y.; Zhou, J.; Maeda, N.; Krisans, S.K.; Malinow, M.R.; Austin, R.C. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J. Clin. Invest.*, **2001**, *107*(10), 1263-1273.
- [24] Woo, C.W.; Siow, Y.L.; Pierce, G.N.; Choy, P.C.; Minuk, G.Y.; Mymn, D.; O, K. Hyperhomocysteinemia induces hepatic cholesterol biosynthesis and lipid accumulation via activation of transcription factors. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **2005**, *288*(5), E1002-E1010.
- [25] Wu, N.; Sarna, L.K.; Siow, Y.L.; O, K. Regulation of hepatic cholesterol biosynthesis by berberine during hyperhomocysteinemia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2011**, *300*(3), R635-R643.
- [26] Reynolds, C.P.; Biedler, J.L.; Spengler, B.A.; Reynolds, D.A.; Ross, R.A.; Frenkel, E.P.; Smith, R.G. Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1986**, *76*(3), 375-387.
- [27] Kruth, H.S.; Fry, D.L. Histochemical detection and differentiation of free and esterified cholesterol in swine atherosclerosis using filipin. *Exp. Mol. Pathol.*, **1984**, *40*(3), 288-294.
- [28] Ho, P.I.; Collins, S.C.; Dhitavat, S.; Ortiz, D.; Ashline, D.; Rogers, E.; Shea, T.B. Homocysteine potentiates β -amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J. Neurochem.*, **2001**, *78*(2), 249-253.
- [29] White, A.R.; Huang, X.; Jobling, M.F.; Barrow, C.J.; Beyreuther, K.; Masters, C.L.; Bush, A.I.; Cappai, R. Homocysteine potentiates copper and amyloid β peptide-mediated toxicity in primary cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J. Neurochem.*, **2001**, *76*(5), 1509-1520.
- [30] Geula, C.; Wu, C.K.; Saroff, D.; Lorenzo, A.; Yuan, M.; Yankner, B.A. Aging renders the brain vulnerable to amyloid β -protein neurotoxicity. *Nat. Med.*, **1998**, *4*(7), 827-831.
- [31] Fjell, A.M.; Walhovd, K.B. Neuroimaging results impose new views on Alzheimer's disease--the role of amyloid revised. *Mol. Neurobiol.*, **2012**, *45*(1), 153-172.
- [32] Sultana, R.; Mecocci, P.; Mangialasche, F.; Cecchetti, R.; Baglioni, M.; Butterfield, D.A. Increased protein and lipid oxidative damage in mitochondria isolated from lymphocytes from patients with Alzheimer's disease: insights into the role of oxidative stress in Alzheimer's disease and initial investigations into a potential biomarker for this dementing disorder. *J. Alzheimers Dis.*, **2011**, *24*(1), 77-84.
- [33] Zou, K.; Gong, J.S.; Yanagisawa, K.; Michikawa, M. A novel function of monomeric amyloid β -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J. Neurosci.*, **2002**, *22*(12), 4833-4841.
- [34] Zou, K.; Kim, D.; Kakio, A.; Byun, K.; Gong, J.S.; Kim, J.; Kim, M.; Sawamura, N.; Nishimoto, S.; Matsuzaki, K.; Lee, B.; Yanagisawa, K.; Michikawa, M. Amyloid β -protein (β)1-40 protects neurons from damage induced by A β 1-42 in culture and in rat brain. *J. Neurochem.*, **2003**, *87*(3), 609-619.
- [35] O, K.; Lynn, E.G.; Chung, Y.H.; Siow, Y.L.; Man, R.Y.; Choy, P.C. Homocysteine stimulates the production and secretion of cholesterol in hepatic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1393*(2-3), 317-324.
- [36] Seshadri, S. Elevated plasma homocysteine levels: risk factor or risk marker for the development of dementia and Alzheimer's disease? *J. Alzheimers Dis.*, **2006**, *9*(4), 393-398.
- [37] Broch, O.J.; Ueland, P.M. Regional distribution of homocysteine in the mammalian brain. *J. Neurochem.*, **1984**, *43*(6), 1755-1757.
- [38] Lipton, S.A.; Kim, W.K.; Choi, Y.B.; Kumar, S.; D'Emilia, D.M.; Rayudu, P.V.; Arnelles, D.R.; Stamler, J.S. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*(11), 5923-5928.
- [39] Roberts, B.R.; Ryan, T.M.; Bush, A.I.; Masters, C.L.; Duce, J.A. The role of metallobiology and amyloid- β peptides in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, **2012**, *120*, 149-166.
- [40] Hirashima, Y.; Seshimo, S.; Fujiki, Y.; Okabe, M.; Nishiyama, K.; Matsumoto, M.; Kanouchi, H.; Oka, T. Homocysteine and copper induce cellular apoptosis via caspase activation and nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neuronal cell line SH-SY5Y. *Neurosci. Res.*, **2010**, *67*(4), 300-306.

- [41] Hung, Y.H.; Robb, E.L.; Volitakis, I.; Ho, M.; Evin, G.; Li, Q.X.; Culvenor, J.G.; Masters, C.L.; Cherny, R.A.; Bush, A.I. Paradoxical condensation of copper with elevated β -amyloid in lipid rafts under cellular copper deficiency conditions: implications for Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *284*(33), 21899-21907.
- [42] Nelson, T.J.; Alkon, D.L. Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and β -amyloid peptide. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*(8), 7377-7387.
- [43] Puglielli, L.; Friedlich, A.L.; Setchell, K.; Nagano, S.; Opazo, C.; Cherny, R.A.; Barnham, K.J.; Wade, J.D.; Melov, S.; Kovacs, D.M.; Bush, A.I. Alzheimer disease β -amyloid activity mimics cholesterol oxidase. *J. Clin. Invest.*, **2005**, *115*(9), 2556-2563.
- [44] Yu, L.; Bharadwaj, S.; Brown J.M.; Ma, Y.; Du, W.; Davis, M.A.; Michaely, P.; Liu, P.; Willingham, M.C.; Rudel, L.L. Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J Biol Chem.*, **2006**, *281*(10), 6616-6624.

Received: August 4, 2012

Revised: February 2, 2013

Accepted: March 12, 2013