
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias



**Inhibición de la síntesis de glutatión como un modelo
celular de estrés oxidante y su relación con el metabolismo de la
proteína precursora del amiloide**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

ISAAC DELGADO LARIOS

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Mayo de 2014.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias



**Inhibición de la síntesis de glutatión como un modelo
celular de estrés oxidante y su relación con el metabolismo de la
proteína precursora del amiloide**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

ISAAC DELGADO LARIOS

Director: Ricardo David Quiroz Báez

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Mayo de 2014.



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

C. ISAAC DELGADO LARIOS
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: **"Inhibición de la síntesis de glutatión como un modelo celular de estrés oxidante y su relación con el metabolismo de la proteína precursora del amiloide"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo al **Dr. Ricardo David Quiroz Baez** y asesora a la **QFB. Patricia Suyapa Ferrera Boza**. Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 26 de noviembre de 2013


DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN




M.C. VERÓNICA PALOMERA ÁVALOS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **TESIS E INFORMES**, opción Tesis con el título: "Inhibición de la síntesis de glutatión como un modelo celular de estrés oxidante y su relación con el metabolismo de la proteína precursora del amiloide" que realizó el pasante Isaac Delgado Larios con número de código 303565866, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, a 8 de Enero del 2014



Dr. Ricardo David Quiroz Baez
 Director de Tesis.

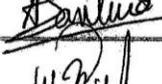


QFB Patricia Ferrara Boza
 Asesora



Dra. Marta Catalina Rivera Cervantes
 Asesora



Nombre completo de los Síndicos designados por el Comité de Titulación	Firma de aprobación	Fecha de aprobación
Dra. Graciela Gudíño Cabrera		17/01/2014
Dra. Mónica Eliea Ureña Guerrero		1/04/14
Dra. Anne Marguerite Helene Santerre		1 abril 2014
Dra. Martha Catalina Rivera Cervantes		1 Abril 2014.

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
 LICENCIADO EN BIOLÓGIA

10 Abr 2014

Localidad donde se desarrolló el trabajo:

Departamento de Investigación Básica, Dirección de Investigación,
Instituto Nacional de Geriátría, Institutos Nacionales de Salud,
Secretaría de Salud, México D.F., bajo la dirección del
Dr. Ricardo David Quiroz Báez.

AGRADECIMIENTOS

Como para agradecer no hay limitantes, quiero explayarme en esta sección, ya que me siento bendecido con tantos seres que hicieron de este trabajo un paso importante en mi vida y templaron mi espíritu.

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres (Ma. del Socorro y Raúl), por brindarme vida, amor, apoyo y educación, siendo esta última la mejor herencia que pude recibir de ustedes. A mis hermanos respetando su orden generacional: Vero, Raúl, Gaby, Willy, Cynthia, Erica, Abraham, Abel, Marcos y Samuel (Sammy no, porque ya es grande), muchas gracias por hacerme sentir parte de ustedes y por regalarme un verdadero espíritu de pertenencia. Los quiero a todos. Gracias especiales a Marcos por aguantarme y a Erica, por haber influido en mi decisión por estudiar ésta bella carrera.

A Ricardo Quiroz, por tu apoyo y comprensión. A Patricia Ferrera por tu paciencia e instrucción. A Clorinda Arias, por brindarme el espacio donde pude probarme como biólogo. A Ayde, por tu rigurosa, pero efectiva forma de enseñar. A Karina Hernández, por tus palabras de aliento. A las casi Doctoras Andrea y Eva, y a Fernanda, por mostrarme que en un laboratorio a veces tan gris, puedo encontrar amistad sincera, sano chismorreo y unas lindas sonrisas, son el alma del Labo, las quiero.

Gracias a mis sinodales las doctoras Anne Santerre, Graciela Gudiño y en especial a Mónica Ureña, por su profunda atención a mi escrito. No tengo palabras para expresar el apoyo de la Doctora Martha Rivera, que me hizo valorar mi trabajo, gracias a usted puede creer en mí y concluir este proyecto. A Gina Quiroz por tu paciencia. A la Universidad de Guadalajara, por permitirme formarme como Biólogo.

Gracias especiales a los doctores Miguel Tapia y Carlos Rosales (Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM), por permitirme realizar los trabajos de microscopía, por su gran apoyo y confianza.

Mi alma y agradecimiento se divide en dos localidades cuando de amistad se trata:

A mí chilanga banda les amo con todo el corazón, a Aby por mostrarme cuan bello puede ser un espíritu peregrino, libre y enloquecido, te admiro y quiero, también eres mi loca preferida, gracias por escuchar mis gozos, fatigas y por aguantar mis chillidos desgarradores, siempre tendré una pieza de salsa para ti. A Berenice, por compartirme de tu enorme corazón y dejarme escuchar tus palabras raras y guturales, te quiero. A Sara (y tu bella familia), porque

siempre estuviste ahí, por tus porras sabor a pulque y goooya!!!. A Astrid y sus “dos” hermanas, por ser la vecina de mi existencia. A la doctora Clara Esquivel, por sus sesiones de relajación, sus palabras llenas de sabiduría, y por compartirme de su familia bellísima. A todo el equipo del Comedor de Ciencias, gracias por alimentar mi estómago y mente, por sembrar en mí un espíritu de lucha social, gracias por dejarme ser parte de ustedes, los admiro y deseo que concluyan todos sus proyectos (y espero que los proyectos no acaben con ustedes). A mis exroomies, Pipe y Carlos, saben que los quiero, gracias por compartirme de sus conocimientos, sé que serán unos economistas ejemplares, y que Felipe nos dará empleo cuando gobierne el Banco de México. A Angélica, gracias por ser mi hermana tapachanga, por darme todo lo que me diste, por ser una confidente pendiente, una compañera de pulcata, una asesora de imagen, una nutrióloga rigurosa, una enfermera atenta, una contenedora de lágrimas, una melómana admirable, un bello ser que siempre quiero cerca.

A mis amigos del rancho, Omar Topete, porque aunque te pierdas, sé que cuento contigo, y que eres mi hermano, te quiero. A mi mejor amiga Linda, ese lazo eterno que siempre reservo cerca de mi corazón y a quien un vino, un tango y una charla nunca se le niegan, gracias por estar cerca. A Packo por ser un amigo memorable, y por compartirme de su compleja vida. A los carnales Christian (Miaw), Cristian, José Luis, Víctor (Papos), Chuy y a Fabiola, por enseñarme que la amistad es un regalo con diferentes envolturas; en especial aprecio el apoyo de Christian con sus valiosísimos conocimientos en edición. A mis amigas de la carrera Berenice y Mary (Momoni), por acompañarme y estar al pendiente en este camino. A mi biólogo de corazón, Cristóbal, gracias por compartirme tu sincera amistad, apoyo y familia.

Quiero agradecer por último a ese ser espiritual, que aunque tiene muchos nombres, me renueva y hace ver en mí y en mi entorno, el poder que da la vida; que me impulsa a admirar, respetar y conservar todo lo que en la biósfera existe, esperando que un día aprendamos a mantener este regalo que se nos brinda en cada respiro.

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	v
II. RESUMEN	vi
III. INTRODUCCIÓN	1
IV. ANTECEDENTES	3
1-. Enfermedad de Alzheimer	3
2-. Metabolismo de la proteína precursora del amiloide	6
3-. Hipótesis del amiloide	8
4-. Estrés oxidante en la enfermedad de Alzheimer.....	9
5-. Glutación, molécula antioxidante del sistema nervioso	11
6-. Modelos para Enfermedad de Alzheimer.....	12
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
VI. HIPÓTESIS.....	15
VII. OBJETIVO GENERAL	15
VIII. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	16
IX. MATERIALES Y MÉTODOS	17
1-. Cultivos celulares	17
2-. Tratamiento pro-oxidante	17
3-. Viabilidad celular:	18
*Ensayo de reducción MTT	18
*Ensayo de exclusión con azul de tripano	18
4-. Análisis morfológico en microscopía de campo claro.....	19
5-. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno.....	19
6-. Electroforesis y western blot	19
7-. Análisis estadístico	21
X. RESULTADOS	22
1-. Ensayos de viabilidad	22
2-. Análisis de la morfología celular	24
3-. Expresión de la proteína precursora del amiloide.....	27
4-. Análisis de especies reactivas de oxígeno	31
XI. DISCUSIÓN.....	32
XII. CONCLUSIONES	36
XIII. PERSPECTIVAS	37
XIV. REFERENCIAS.....	38

ABREVIATURAS

β A: β -amiloide

BSO: Butionina sulfoximina

div: días *in vitro*

EA: Enfermedad de Alzheimer

EAE: Enfermedad de Alzheimer esporádica

EAF: Enfermedad de Alzheimer familiar

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FHA: Filamentos helicoidales apareados

γ -GSC: γ -glutamil-cisteína sintetasa

GSH: Glutati3n

HO1: Hemo-oxigenasa 1

MAP: Proteína asociada a los microt3bulos

MTT: 3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolio

PN: Presenilina

PPA: Proteína precursora del amiloide

Tg: Transg3nico

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en la población de adultos mayores y su prevalencia aumenta día a día. Al tener una etiología multifactorial es complejo investigar en conjunto todos los elementos involucrados en el desarrollo de la misma. Las marañas neurofibrilares y las placas amiloideas son las lesiones representativas de la EA. En particular, las placas se forman por agregación del péptido β -amiloide (β A), fenómeno que se considera un factor primordial para comprender la evolución de la enfermedad. El péptido β A se origina a partir de la proteína precursora del amiloide (PPA) mediante la vía amiloidogénica. En individuos con EA los niveles de β A aumentan significativamente, pero a la fecha se desconoce la causa de esto.

Elevaciones en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la disminución de enzimas antioxidantes durante el envejecimiento del sistema nervioso determinan un ambiente pro-oxidante, que parece promover el aumento en los niveles del β A. En el presente trabajo se utilizó un modelo celular de neuroblastoma humano (línea MSN) para analizar la relación entre la amiloidogénesis y el estrés oxidante. Se inhibió la síntesis de la principal molécula antioxidante del sistema nervioso, el glutatión (GSH), mediante la aplicación de butionina sulfoximina (BSO), de esta forma se generó un ambiente pro-oxidante y se analizaron los niveles de expresión la PPA. Los resultados mostraron que la aplicación de BSO no elevó las ERO, ni los afectó los niveles de PPA en el modelo de neuroblastoma empleado en este trabajo. Sin embargo, se observó que el BSO en los cultivos de células de neuroblastoma, diferenciadas e indiferenciadas, altera notoriamente la permeabilidad de la membrana y la morfología celular. Es necesario investigar si dichas alteraciones originadas por el tratamiento de BSO son ocasionadas por estrés oxidante, para valorar si el modelo celular de neuroblastoma es adecuado para el estudio de los factores involucrados en la EA.

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento puede definirse como un fenómeno multifactorial, que en sistemas biológicos se caracteriza por la pérdida progresiva de la homeostasis, debido a la reducción de sus capacidades adaptativas ante diversos estímulos, ya sean intrínsecos o extrínsecos (Hernández-Ortega *et al.*, 2010). Durante esta última etapa de la vida, existe una alteración generalizada que afecta a múltiples estructuras (sistemas esquelético, muscular, digestivo, nervioso, etc.), y se manifiesta con la pérdida de movilidad, la fragilidad y la dependencia hacia terceros. Durante el envejecimiento, en el sistema nervioso se pueden desarrollar cambios fisiológicos que conducen a los procesos neurodegenerativos, tales como el desequilibrio en los niveles de neurotransmisores, la desconexión sináptica, el desbalance REDOX y la muerte neuronal (Raz y Rodrigue, 2006). Estos cambios pueden provocar el desarrollo de **demencias**, las cuales, se definen como la pérdida progresiva de las capacidades cognitivas (memoria, aprendizaje, lenguaje, etc.).

Las demencias tienen una elevada prevalencia, en el año 2005 se reportaron alrededor de 24.3 millones de casos en el mundo, y se estima un incremento de 4.6 millones de casos por año (Ferri *et al.*, 2005). Se espera que para el año 2050 existan alrededor de 115.4 millones de personas con demencia, de los cuales el 71% de los casos se presentarán en países en vías de desarrollo, como México. Las demencias tienen un fuerte impacto económico, al considerar los cuidados paliativos, el ingreso a hospitales, el gasto en medicamentos y la manutención de los pacientes, entre otros. El estimado de gasto mundial por demencias es de 604 mil millones de dólares anuales (Prince *et al.*, 2011).

En la segunda mitad del siglo XX las condiciones de salud mejoraron en la mayoría de los países, por lo que el aumento en la esperanza de vida ha permitido que la edad promedio de la población de adultos mayores aumente once años en países desarrollados y casi veinte años en países en vías de desarrollo (Cotlear *et al.*, 2010). Actualmente, México cuenta con una esperanza de vida de 79.2 años para mujeres y 74.3 años para varones, la cual se ha elevado en

alrededor de 2.5 % sólo en la última década (Banco Mundial, 2013). Al aumentar la población de adultos mayores, la incidencia de enfermedades asociadas con el envejecimiento también aumenta, por lo que el estudio de éstas es un tema de importancia e interés para la investigación en salud (Figura 1).

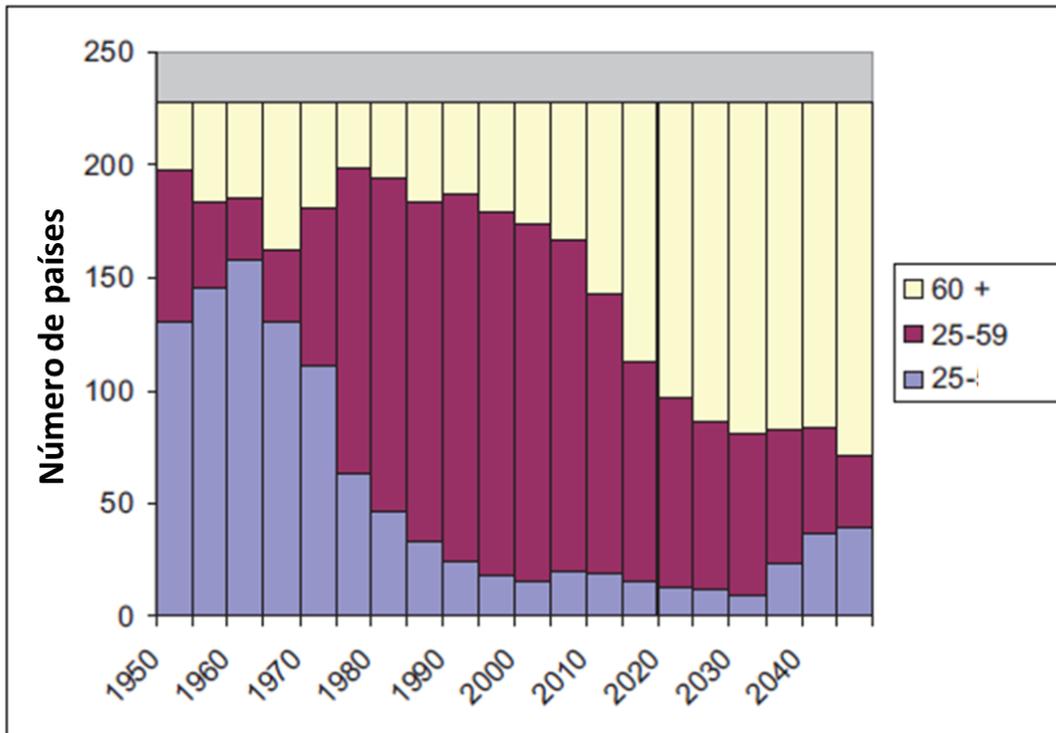


Figura 1. Aumento poblacional de adultos mayores de 1950 a 2050. La tendencia de los países de mejorar las condiciones de salud ha elevado la esperanza de vida desde hace 60 años; y se espera continúe en ascenso. Sin embargo, también se espera que al aumentar la población de ancianos, la demanda de sus necesidades también se eleve de manera importante, particularmente a nivel del sector salud. Por lo tanto, la investigación en geriatría y gerontología es un paso adelantado a los problemas futuros, tales como el aumento en la prevalencia de las demencias (Imagen modificada de Cotlear *et al.*, 2011).

ANTECEDENTES

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (**EA**) es la demencia más frecuente en la población de adultos mayores (Alzheimer's Association, 2010), pues constituye alrededor del 60% de los casos. La EA fue descrita por primera vez a principios del siglo XX por Alois Alzheimer en una paciente de 51 años (de nombre August D.), quién murió después de cuatro años de progresión de la enfermedad. Después de cien años del descubrimiento de esta patología, aún no se conocen con precisión las causas que determinan su desarrollo. La naturaleza multifactorial de la enfermedad ha dificultado el diseño de terapias que impidan la progresión del daño y no se cuenta aún con una cura o tratamiento efectivo (Selkoe, 2003). Factores como la hipertensión (Qiu, 2012), la obesidad (Freeman *et al.*, 2012) y la diabetes (Guglielmotto *et al.*, 2012), pueden aumentar el riesgo a padecer la EA. En el 2006 se reportaron 350 mil casos de Alzheimer en México, sin embargo, éstos reportes no han sido actualizados y es posible que esta cifra sea mucho mayor debido al déficit en el diagnóstico (Gutiérrez-Muños *et al.*, 2006).

Entre las características clínicas más importantes están: la pérdida progresiva de la memoria, el deterioro cognitivo, y la desorientación espacio-temporal (Selkoe, 2001). La EA puede clasificarse en dos tipos teniendo en cuenta la edad de aparición y la etiología, en EA familiar (EAF) y EA esporádica (EAE). La EAF es originada por mutaciones autosómicas dominantes, localizadas principalmente en los cromosomas 21 (gen de la proteína precursora del amiloide) y 14 (gen de presenilina 1); la edad de aparición es temprana (entre los 40 y 50 años) y sólo representa del 1 al 2% de los casos. La EAE se manifiesta después de los 65 años de edad y representa la mayoría de los casos, sin embargo el origen de sus alteraciones y el mecanismo específico de la patología en esta modalidad, no han sido determinados (Menéndez *et al.*, 2002). La presencia de la forma alélica $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (encargada del transporte de colesterol) se ha vinculado como factor de riesgo en la EAE (Mahley *et al.*, 2006).

Las manifestaciones clínicas de la EA se han dividido en tres etapas:

- 1^{ra}. Se presenta una pérdida de memoria a corto plazo y una gran desorientación espacio-temporal.
- 2^{da}. Aparecen síntomas no cognitivos como irritabilidad, cambio de ánimo, pérdida de juicio, disfasia, entre otros.
- 3^{ra}. El individuo es incapaz de reconocer a sus familiares, a su entorno y a sí mismo. Se da una dependencia total por pérdida de la conciencia, la desregulación de los esfínteres y el exceso de tono muscular. La muerte del individuo es ocasionada por el progresivo deterioro del sistema nervioso o por patologías originadas por su estado de inmovilidad, que puede ocurrir de 5 a 20 años después del diagnóstico de la enfermedad (para revisión ver Arias, 1999).

En el desarrollo de la EA dos estructuras cerebrales se han observado notablemente alteradas: la corteza cerebral y el hipocampo, siendo esta última, una de las principales áreas implicadas en los procesos de memoria y aprendizaje, funciones característicamente comprometidas en esta demencia (Wenk, 2003). Se ha propuesto que la desconexión sináptica, resultado de la pérdida de densidad dendrítica y de la muerte celular, es un evento temprano en la fisiopatología de la EA (Lee *et al.*, 2012). Ambos eventos se desencadenan por el desequilibrio en la homeostasis de Ca^{2+} (De Caluwé y Dupont, 2013) y las alteraciones en la función mitocondrial (Khatri y Man, 2013). Los marcadores histopatológicos en la EA son las marañas neurofibrilares y las placas neuríticas o amiloideas (Selkoe, 2001).

Las **marañas neurofibrilares** son agregados intraneuronales que se originan a partir de la acumulación de una proteína organizadora del citoesqueleto conocida como **tau** (del grupo de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) relacionadas con su organización estructural en el citoesqueleto); esta proteína se encarga de la estabilización de los microtúbulos axonales, al permitir el acomodo en paralelo de los mismos en el mismo sentido polar; se reconocen 6 isoformas en humanos, siendo más común en tejido nervioso, y encontrándose principalmente en neuronas (Selkoe, 2001). Al formarse los microtúbulos la proteína tau posee normalmente 2 moléculas de fosfato, sin embargo en la EA, tau se hiperfosforila, llegando a tener de 10 a 12 moléculas de fosfato. Al incrementar su fosforilación la función de tau se impide y forma agregados moleculares en diferentes zonas intracelulares constituyendo los filamentos helicoidales apareados (FHA) que dan origen a las marañas neurofibrilares, también llamadas “neuronas fantasma” (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008). Las altas concentraciones de tau agregada

se vinculan con alteraciones en el transporte axoplásmico y con la disfunción sináptica (Tai *et al.*, 2012)

Las **placas neuríticas** o **amiloideas** son agregados extracelulares compuestos principalmente por la proteína β -amiloide (β A), la cual se ha relacionado con procesos biológicos como la activación de la microglía y la astrocitosis (eventos vinculados con inflamación y apoptosis), así como con afecciones en la vascularización cerebral y reactividad con iones metálicos (Fe, Cu y Zn); dichos procesos se han identificado en regiones cerebrales como la neocorteza, el hipocampo y la amígdala (Tapia *et al.*, 1999). Al estudiar los componentes de la placa amiloidea, además del β A (que representa el 70% del peso seco de la placa), destacan proteínas como la apolipoproteína E, la antiquimiotripsina, enzimas lisosomales y antioxidantes (Robakis, 1994). En autopsias de adultos mayores no dementes se ha observado la formación de placas difusas, que a diferencia de las placas amiloideas encontradas en pacientes con la EA, no provocan inflamación y sus componentes son de distinta naturaleza como algunas proteínas asociadas e iones metálicos. Otra diferencia entre placas difusas y amiloideas, es la naturaleza del β A, ya que en las primeras se acumula principalmente la isoforma β A₄₀, y en las placas amiloideas la isoforma β A₄₂, péptido de naturaleza hidrofóbica con tendencia a agregarse (Buxbaum *et al.*, 1998) y a inducir citotoxicidad (Boyd-Kimball *et al.*, 2005). Se ha vinculado el desarrollo de placas amiloideas con las angiopatías cerebrales (Baloyannis y Baloyannis, 2012), debido a que ocasiona una baja expresión y disposición de proteínas de la barrera hematoencefálica por la influencia de β A (Liu *et al.*, 2012). El presente estudio trata de vislumbrar la dinámica metabólica de β A y su importancia patológica en la EA.

Metabolismo de la proteína precursora del amiloide

El β A, es un péptido de 39 a 43 aminoácidos, resultado del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del amiloide (PPA). En individuos sanos el β A se produce en pequeñas proporciones (a nivel de concentraciones pM), para favorecer la actividad sináptica y la plasticidad neural (Puzzo *et al.*, 2008; Cavalluci *et al.*, 2012). Sin embargo, en la EA la producción de β A se eleva y se acumula en la matriz extracelular (Selkoe, 2001).

La PPA es una glucoproteína transmembranal que se compone de tres dominios: una región C-terminal amplia, extracelular y de estructura globular; una sección transmembranal, que contiene gran parte de la secuencia del β A; y una región pequeña N-terminal en el citoplasma (Dahms *et al.*, 2010). El gen para la PPA, se codifica en el cromosoma 21, de donde se derivan 10 isoformas (secuencias que van desde 573 a 770 aminoácidos), donde la PPA₆₉₅ es la que se expresa principalmente en las neuronas (Sandbrink *et al.*, 1994). Entre las funciones reportadas para la PPA es que actúa como factor neurotrófico; participa en el transporte vesicular y la adhesión celular (Small *et al.*, 1999); favorece el mantenimiento, función y estabilidad sináptica; promueve el crecimiento y actúa como guía axonal (Ninomiya *et al.*, 1993); participa también en la regulación de la actividad de factores de transcripción y en la homeostasis de iones metálicos (para revisión ver Quiroz-Baez *et al.*, 2007).

El metabolismo de la PPA se divide en dos vías, a partir de los productos generados en éstas: la no amiloidogénica y la amiloidogénica (Figura 2). La vía no amiloidogénica es llevada a cabo por distintas proteasas con actividad de α -secretasa en la región extracelular de la PPA, liberando un fragmento con funciones neurotróficas y neuroprotectoras (α PPAs) (Gakhar-Koppole *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012), mientras que el complejo γ -secretasa actúa en la sección intramembranal cortando la región de β A y previniendo su formación (Hass y Yankner, 2012). Al estudiar las enzimas con actividad α -secretasa, se determinó que eran metaloproteasas dependientes de zinc pertenecientes a la familia de proteínas ADAM (a desintegrin and metalprotease”), de las cuales, ADAM9, ADAM10 y ADAM17 (también llamada TACE) presentan dicha actividad; estudios más detallados demostraron que ADAM10 tiene la actividad constitutiva de α -secretasa, mientras que la actividad de ADAM9 y ADAM17 es inducible (Wen *et al.*, 1997). El complejo γ -secretasa está constituido por cuatro componentes:

presenilina (PN), nicastrina, APH1 (anterior pharynx-defective 1) y PEN2 (preseniline enhancer 2); mientras que PN presenta la actividad proteolítica, nicastrina funciona como un sustrato receptor, y los ligandos APH1 y PEN2 son reguladores de la reacción (Zhang *et al.*, 2012). La acción de cada uno de los componentes de la γ -secretasa es primordial en su funcionamiento (Edbauer *et al.*, 2003).

Por otra parte, en la vía amiloidogénica participa una proteína con actividad de β -secretasa llamada BACE1 (“ β -site APP-cleaving enzyme 1”); ésta proteasa de aspartato es el paso limitante en la generación de β A, ya que al inhibir su actividad, se impide la formación del péptido (Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999). La proteasa BACE1 también regula positivamente el proceso de mielinización neuronal (Willem *et al.*, 2006). Durante el metabolismo de PPA, BACE1 corta en el sitio β de la región N-terminal (región extracelular) liberando al fragmento β PPAs, mientras que el complejo γ -secretasa al cortar en la porción membranal, libera al péptido β A (Figura 2). Se ha demostrado que el fragmento β -PPAs tiene efectos citotóxicos (Nikolaev *et al.*, 2009), además de no favorecer con funciones neuroprotectoras como lo hace el fragmento α PPAs. En condiciones fisiológicas sólo el 10% de la PPA es endocitada para ser procesada por la vía amiloidogénica (Vassar *et al.*, 1999), sin embargo, en la EA este porcentaje incrementa.

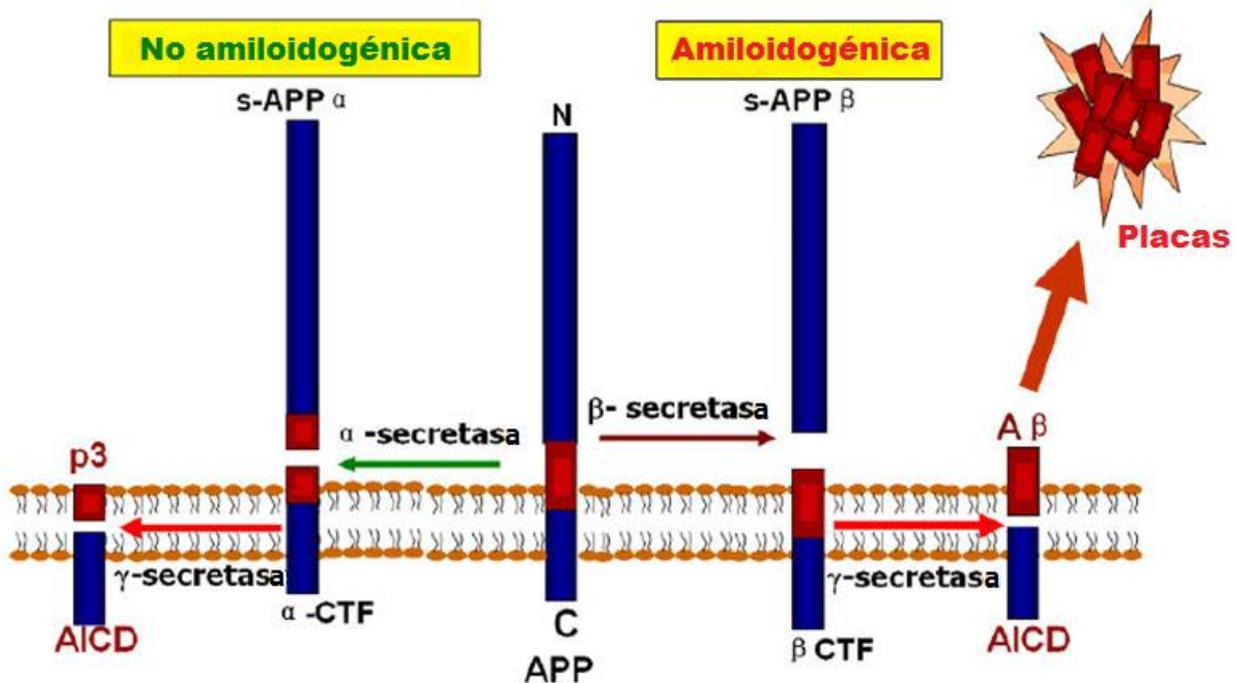


Figura 2. Metabolismo de la PPA. La acción de enzimas y los subproductos derivados distinguen a las vías amiloidogénica y no amiloidogénica. El incremento en la generación de β A, ya sea, por sobreexpresión de enzimas amiloidogénicas, por inhibición de α -secretasas, o por ambas situaciones, es un tema de constante investigación en la EA (Imagen modificada de Zhang y

Hipótesis del amiloide

Por el aumento en su producción y su participación en eventos relacionados con la EA, el β A se ha propuesto como uno de los causantes principales en el desarrollo de la enfermedad. Se ha demostrado que en presencia del β A convergen otros fenómenos degenerativos como el estrés oxidante (Practico, 2008), angiopatías (Baloyannis y Baloyannis, 2012) y la hiperfosforilación de Tau (Busciglio *et al.*, 1995).

De acuerdo con la hipótesis del amiloide (Glennner y Wong, 1984), la acumulación de la proteína β A es un evento temprano en la EA, que pudiera influir en la acumulación de tau, a la muerte neuronal, y que conlleva al desarrollo de la demencia. La hipótesis del amiloide también se apoya en la presencia de β A como componente importante de las placas amiloides, así como el factor genético de las mutaciones en PPA y presenilinas (PN1 y PN2) en los casos de EA

familiar. Se ha vinculado también a la trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down) donde se observa un aumento de la carga génica de la PPA, y el desarrollo de demencias a edades tempranas (Reitz, 2012).

Se ha demostrado el efecto de β A en modelos *in vivo* (Lee *et al.*, 2012) e *in vitro* (Quiroz-Baez *et al.*, 2009). Ratones transgénicos con genes insertados o “knock-in” para PPA, PN1 o PN2 pueden desarrollar placas amiloideas e hiperfosforilación de tau, pero tau por sí misma no induce eventos patológicos, ni procesos inflamatorios (Amstrong, 2006). Otros estudios *in vitro* realizados en cultivos hipocampales de rata han permitido demostrar que la presencia del β A fibrilar induce el incremento en la fosforilación de tau, sugiriendo que este evento sea secundario a la amiloidogénesis (Busciglio *et al.*, 1995).

Estrés oxidante en la enfermedad de Alzheimer

Otro factor determinante de la fisiopatología de la EA es el desequilibrio de la capacidad antioxidante de las neuronas durante el envejecimiento, favoreciendo un ambiente prooxidante que puede causar entre otros eventos el deterioro estructural, y por lo tanto, funcional de las células del tejido nervioso (Butterfield *et al.*, 2013). El origen del estrés oxidante es la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), moléculas reactivas que provienen del metabolismo de O_2 en todos los sistemas aerobios; son ubicuas y de vida media corta, ya que reaccionan con las biomoléculas más cercanas a su sitio de formación. Agentes oxidantes como el superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son ejemplos de ERO; así como el óxido nítrico (NO^\cdot) y el peroxinitrito ($ONOO^\cdot$) son especies reactivas de nitrógeno (ERN). La acción de estas moléculas reactivas es contrarrestada por componentes antioxidantes que pueden ser tanto enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) como no enzimáticos (glutatión, ácido ascórbico, β -tocoferol). Por otra parte, funciones como la neurotransmisión, la presión sanguínea, la activación del sistema inmunológico y la relajación muscular, son mecanismos fisiológicos vitales en los que las ERO y ERN también participan (Luna-López, 2010).

El tejido nervioso es particularmente sensible al daño oxidante, debido a su alto requerimiento de oxígeno para su actividad metabólica (alrededor del 20% del O₂ corporal) (Lareo, 2006), a que se compone en un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados, y por último, a que la presencia de enzimas antioxidantes (como la catalasa y la superóxido dismutasa) es menor, comparado con otros tejidos (Floyd y Hensley, 2002). El tripéptido glutatión (GSH) es el antioxidante con mayor concentración en el tejido nervioso (Martínez-Sarrasague *et al.*, 2006), reportándose niveles de entre 1-3mM; sin embargo, los niveles de GSH disminuyen durante el envejecimiento (Arranz *et al.*, 2007; Sekhar *et al.*, 2011).

Se ha reportado un aumento considerable de ERO tanto en pacientes con la EA (Sayre *et al.*, 2001) como en modelos transgénicos de la EA (Practicó, 2008). Algunas evidencias permiten sugerir que el estrés oxidante interviene en el procesamiento de la PPA, y modifica su expresión (Park *et al.*, 2005; Quiroz-Baez *et al.*, 2009; Bailey *et al.*, 2011); además de promover la síntesis de BACE1 a través de la activación del factor iniciador de la traducción (síntesis de proteínas) α -eIF2 y de la proteína quinasa activada por RNA doble hebra (PKR) (Mouton-Liger *et al.*, 2012). Sub-productos de oxidación de membrana, como el 4-hidroxinonal, pueden conducir al incremento en la producción de β A, como se ha demostrado en cultivos de células corticales de rata (Gwon *et al.*, 2012). Por otro lado, un estudio realizado en muestras de pacientes con EA (utilizando un análisis de microarreglos), permitió demostrar que de los 14,000 genes analizados la expresión de 1017 de ellos no está regulada en las muestras de los pacientes con la EA, de los cuales 215 están relacionados con vías de estrés oxidante (Ramamoorthy *et al.*, 2012). Diversos eventos neurotóxicos han demostrado la relación entre la conformación proteica de β A y su potencial neurotóxico en condiciones de estrés oxidante (Murakami *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2008). Los estudios anteriores permiten sugerir un vínculo estrecho entre la EA y el estrés oxidante, por lo cual, el estudio de su relación podría ayudar a comprender la enfermedad desde una perspectiva básica.

Glutación, molécula antioxidante del sistema nervioso

El glutación (GSH) es el tiol de bajo peso molecular más abundante en las células vegetales y animales (0.05-10mM), participando principalmente en la regulación de la producción de ERO y ERN (Meister, 1983). El GSH reduce peróxidos, elimina radicales libres y conjuga compuestos electrófilos (Maher y Hanneken, 2005). El GSH se sintetiza a partir de los aminoácidos ácido glutámico, glicina y cisteína, mediante la acción consecutiva de dos enzimas: la gamma-glutamil cisteína sintetasa (γ GCS) y la glutación sintetasa (Martínez-Sarrasague *et al.*, 2006). Existe también el mecanismo enzimático de la GSH mediado por las enzimas GSH peroxidasa y GSH reductasa, por el cual se controlan los niveles de ERO mediante el reciclaje de GSH reducido y el dipéptido GSH disulfuro u oxidado (GSSG) (Martínez-Sarrasague *et al.*, 2006). El GSH, además, participa en la formación de estrógenos, prostaglandinas y leucotrienos, e interviene en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Wu *et al.*, 2004). Se ha demostrado que elevaciones en los niveles de GSH tienen un efecto neuroprotector en cultivos corticales de rata tratados con β A (Boyd-Kimball *et al.*, 2005).

El compuesto DL-butionin-(S,R)-sulfoximina (BSO) es un inhibidor irreversible de la γ -glutamil cisteína sintetasa, enzima limitante en la síntesis de GSH (Griffith y Meister, 1979). El BSO ha sido utilizado como inductor de estrés oxidante en cultivos primarios de neuronas de ratón (Boyd-Kimball *et al.*, 2005) y en cultivos de neuroblastoma humano (Marengo *et al.*, 2007). En un trabajo previo del grupo (Ramos-Sánchez, 2010) se utilizó la concentración 400 μ M de BSO, para inducir estrés oxidante en células de neuroblastoma humano línea MSN en cultivo; los resultados del ensayo fluorométrico con Dihidrorodamina 123 en este trabajo demostraron un aumento de tres veces mayor en la producción de ERO respecto a las células no tratadas con el inhibidor, y manteniendo viables a los cultivos expuestos a estas condiciones. En este estudio se utilizó el compuesto BSO para probar si la disminución de los niveles de GSH ocasiona cambios en la expresión de la PPA, y estudiar así la relación entre la amiloidogénesis y el estrés oxidante.

Modelos para Enfermedad de Alzheimer

Dado que los eventos fisiopatológicos de la EA son multifactoriales se han implementado numerosos modelos experimentales en animales, en los que se aborda alguna de las características presentes en la enfermedad como: la amiloidogénesis, la hiperfosforilación de tau, el estrés oxidante, la pérdida de contactos sinápticos, la muerte neural, el envejecimiento; sin embargo, un modelo que reproduzca e integre todos estos eventos es una tarea complicada.

Se han utilizado especies animales diferentes, siendo más comunes los modelos murinos debido principalmente a que su ciclo de vida es corto, son de fácil manipulación y practicidad al elaborar pruebas *in vivo* (Schaeffer *et al.*, 2012), para explorar diferentes aspectos de la enfermedad. Además, las técnicas de biología molecular han permitido alterar el contenido genético de los roedores, logrando así generar los modelos transgénicos (Tg) ya sea con inserción de genes humanos (capaces de reproducir parcialmente las características patológicas de la enfermedad) o por medio de eliminación de genes vinculados con la EA (para evaluar el efecto de la baja o nula expresión del gen en cuestión) como la PPA, PS1, PS2, etc., modelos en los que se ha logrado observar el desarrollo de placas y el seguimiento de algunas alteraciones del comportamiento (Manzano *et al.*, 2009). El uso de modelos experimentales utilizando otras especies animales como el perro, los cetáceos y los primates, también han aportado información en procesos como la amiloidogénesis en la longevidad, condiciones poco perceptibles en modelos murinos Tg (Sarasa, 2006). Se ha demostrado la analogía entre las secuencias de PPA de pollo y humano (Carrodegua *et al.*, 2005), por lo que se ha utilizado en la producción de anticuerpos. También debe considerarse que los estudios en modelos transgénicos permiten evaluar condiciones más cercanas a la EA familiar y que el tiempo necesario para generar las características patológicas (placas amiloides y marañas neurofibrilares) suele ser de hasta 1 a 2 años (Ashe y Zahs, 2010).

Los modelos en los que se utilizan cultivos celulares también son relevantes en el estudio de la EA, ya que se reproducen rápidamente y permiten la evaluación de características específicas bajo condiciones más controladas que en los modelos animales (Yankner, 1996; Strausak *et al.*, 2001). Los cultivos primarios de neuronas de rata son ampliamente utilizados

como modelos para el estudio de la EA (Boyd-Kimball *et al.*, 2005). Los cultivos de fibroblastos obtenidos de individuos con Síndrome de Down, han permitido a los investigadores reproducir características de la EA (como la producción y agregación de βA_{42} e hiperfosforilación de tau) en células humanas (Shi *et al.*, 2012). En el presente trabajo se utilizó la línea celular MSN de neuroblastoma humano. Las ventajas de esta línea inmortal, es su alta tasa de proliferación, diferenciación y su fácil manejo (Reynolds *et al.*, 1986).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del origen multifactorial de la EA, la sobreproducción de la proteína β A y el establecimiento del estrés oxidante son dos eventos fundamentales en el desarrollo de la patología, tanto de tipo esporádico como del familiar. Considerando las evidencias que sostienen que el estrés oxidante altera el procesamiento de la PPA, en el presente trabajo se utiliza un modelo de generación de estrés oxidante en células de neuroblastoma humano, tratando de reproducir las condiciones fisiológicas que se presentan en la EA (como la disminución de GSH durante el envejecimiento). Utilizando la línea celular de neuroblastoma humano (MSN), se inducirá un cambio en el estado REDOX de las células en cultivo con un inhibidor de la síntesis de GSH y se evaluará si el desbalance REDOX originado por éste tratamiento cambia la expresión de la PPA. Este trabajo puede acercarnos al conocimiento de las interacciones entre el péptido β A y el estrés oxidante, permitiendo que sea usado como una herramienta en el estudio de los mecanismos patológicos de la EA.

HIPÓTESIS

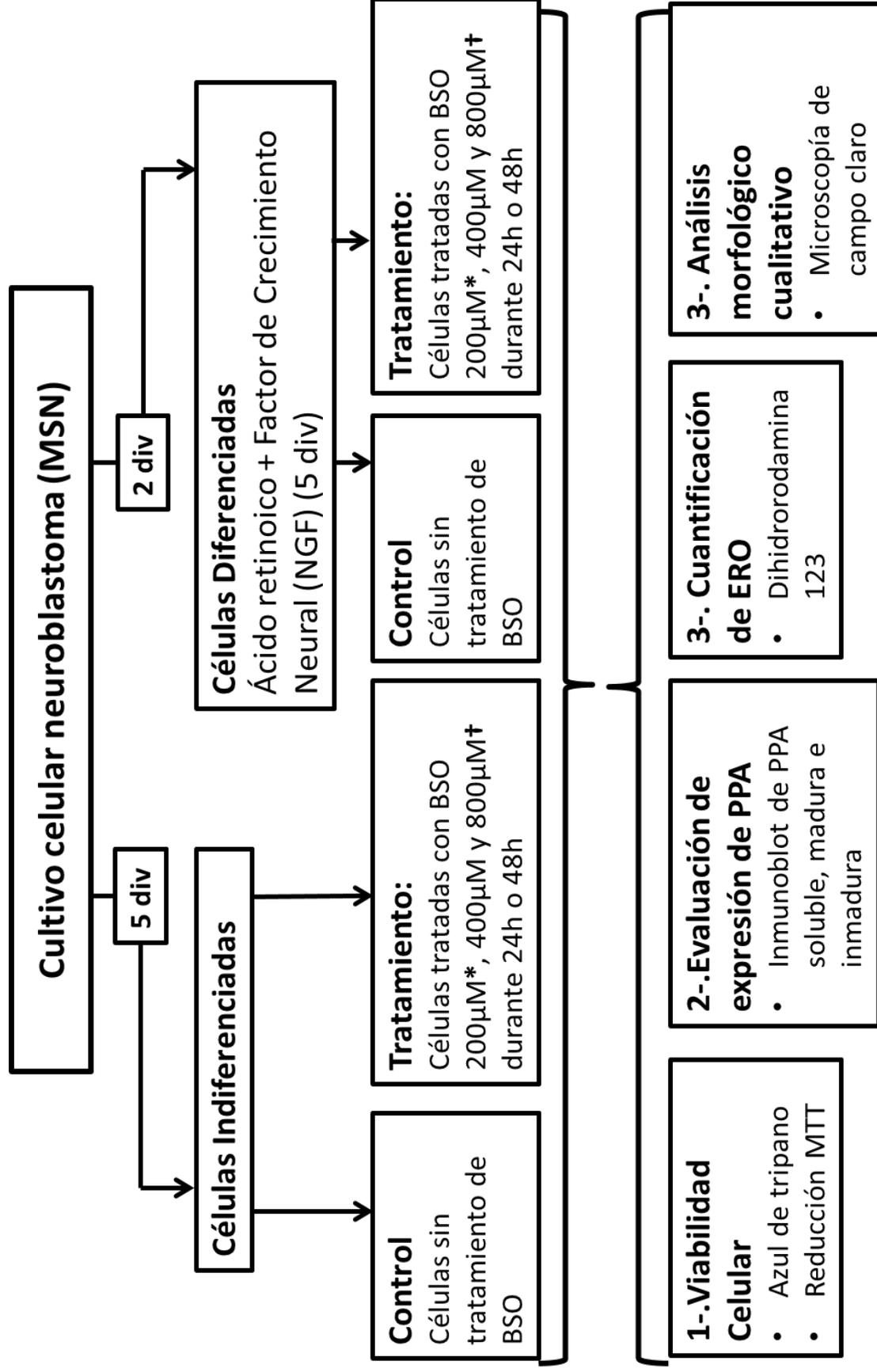
La reducción de los niveles celulares de glutatión, inducida por el BSO, alterará el equilibrio REDOX modificando la expresión de la PPA.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del BSO sobre la inducción de estrés oxidante en células de neuroblastoma humano y su relación con los cambios en la expresión de la PPA.

Objetivos Particulares:

1. Determinar la viabilidad celular por la administración de BSO, como inductor del daño oxidante, tanto en células diferenciadas como indiferenciadas de neuroblastoma humano MSN.
2. Evaluar los cambios en la expresión de la proteína precursora amiloide, en las células de neuroblastoma, como resultado de la inducción de estrés oxidante por la incubación de BSO.
3. Evaluar el efecto del BSO sobre el equilibrio REDOX, tanto en células diferenciadas como indiferenciadas de neuroblastoma humano MSN.



*: concentración utilizada únicamente en las pruebas de viabilidad celular.

† : concentración utilizada únicamente en el análisis morfológico cualitativo.

div: días in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Células de neuroblastoma humano MSN fueron sembradas en cajas de 12 y 24 pozos utilizando medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10% y aminoácidos no esenciales (1mM de glutamina, 4.7mM de serina y 3.8mM de asparagina), en una atmósfera de 95% O₂ y 5% CO₂ a 37°C hasta alcanzar una confluencia de 1X10⁶ células. Después las cajas se dividieron en dos grupos: células diferenciadas y células indiferenciadas. El procedimiento de diferenciación se llevó a cabo manteniendo las células en cultivo durante dos días *in vitro* previo al tratamiento de diferenciación, el cual consiste en la co-incubación con ácido retinoico (10μM) y el factor de crecimiento neural (NFG) (50ng/mL) durante 5 días. Por otra parte, las células indiferenciadas solo se mantuvieron en las condiciones de cultivo durante 5 días *in vitro*, hasta alcanzar la confluencia necesaria. Para los ensayos por Western blot, las células se sembraron en cajas Petri de 60mm, a una confluencia de 1X10⁷, bajo las mismas condiciones.

Tratamiento pro-oxidante

Tanto las células diferenciadas como indiferenciadas fueron tratadas con el inhibidor Butionina sulfoximina (BSO) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a concentraciones de 200, 400y 800μM, y se incubaron por periodos de 24 h y 48 h (tratamiento agudo). Los tratamientos se realizaron a la par de controles negativos, que consistieron en células no tratadas pero que se sembraron en las mismas condiciones de tiempo y espacio.

Viabilidad celular:

Ensayo de reducción MTT

Para determinar la viabilidad celular se llevó a cabo un ensayo colorimétrico por MTT(3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolio) el cual permite la evaluación de la actividad mitocondrial al cuantificar las sales de formazán que se sintetizan a partir de la reducción del MTT (por acción de las deshidrogenasas mitocondriales en presencia de NADH), bajo el siguiente protocolo: concluidos los diferentes periodos de tratamiento con el BSO, se añadió el MTT (10% v/v) a una concentración final de 10mM, y se incubó durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se desechó el medio y se añadieron 800µL de isopropanol-ácido (solución con 96% de 2-propanol y 4% de ácido clorhídrico 1N), por 20 min para disolver las sales. Las muestras se analizaron en el espectrofotómetro (Ultrospec 2000. Pharmacia Biotech) a una longitud de onda de 570nm, para determinar la proporción de oxidación del MTT; mientras mayor es la concentración de sales de formazán, mayor la proporción de células viables con actividad mitocondrial óptima. Los datos de absorbancia se graficaron en porcentaje de cada tratamiento respecto el control. Los experimentos se desarrollaron por cuadruplicado.

Ensayo de exclusión con azul de tripano

Otro ensayo que se utilizó para la evaluación de la viabilidad celular, fue el método de exclusión del colorante azul de tripano (por cambios en la permeabilidad selectiva de la membrana) que permite la cuantificación de las células que excluyen el colorante como vivas y la que lo integran (teñidas de azul) como muertas. Concluidos los periodos de tratamiento con BSO se desechó el medio, y las células fueron lavadas con 200µL de amortiguador Locke (154 mM de NaCl, 5.6 mM de KCl, 2.3mM de CaCl₂, 1mM de MgCl₂, 5.6mM de glucosa y 5.0 mM de HEPES). Después se cosecharon en 100µL del mismo amortiguador, y se homogenizaron con suavidad. Se tomaron 10µL del homogeneizado y un volumen igual de azul de tripano (0.4%), y se mezclaron. Utilizando una cámara de Neubauer, se cuantificaron las células en el microscopio invertido de campo claro (Carl Zeiss Axiovert 25), contando las células encontradas en cinco cuadrantes, este ensayo se realizó por cuadruplicado; los datos se promediaron para cada experimento.

Análisis morfológico en microscopía de campo claro

Mediante el uso de un microscopio invertido de campo claro (Olympus IX71) se analizó cualitativamente la morfología de células de neuroblastoma MSN expuestas a dos concentraciones de BSO (400 μ M y 800 μ M), por 24 y 48 h; tomando como referencia la morfología de las células no tratadas, se consideró la forma (redondeada o de huso) y su condición. La observación y análisis de la morfología celular se realizó utilizando el objetivo de 20x. Se calibraron las imágenes con una barra de 40 μ m mediante el programa Image J (Java).

Cuantificación de especies reactivas de oxígeno

Mediante un ensayo fluorométrico se analizaron los niveles de ERO utilizando el compuesto Dihidrorodamina 123 (DHR) que al oxidarse por acción de H₂O₂ (en presencia de peroxidasas) genera al compuesto fluorescente Rodamina 123. Al concluir el tratamiento de BSO 400 μ M se desechó el medio y se cosecharon las células en PBS con inhibidores de proteasas. Se centrifugó a 1200 rpm a 4°C durante 5 min. Después se desechó el sobrenadante, y al precipitado se adicionaron 180 μ L de amortiguador A (140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 0.8 mM de MgSO₄, 1.8 mM de CaCl₂, 5 mM de glucosa y 15 mM de HEPES), 20 μ L de solución DHR 1mM y se homogenizó el precipitado. Se colocaron las muestras en una caja de 96 pozos y se incubó en oscuridad durante 2 min a 37°C. Posteriormente, se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 490nm. Se realizaron tres experimentos independientes por cuadruplicado, y se evaluó la intensidad utilizando un lector de placas (Microplate Reader modelo 550, Bio-Rad).

Electroforesis y western blot

Después del tratamiento con 400 μ M de BSO, se obtuvieron las siguientes fracciones para evaluar la expresión de la PPA por western blot para lo cual se colocaron las cajas de 60mm en hielo; la primera fracción se obtiene al tomar 500 μ L del medio y para las dos fracciones restantes se cosecharon las células con el medio sobrante y se centrifugaron a 4000 rpm, se desecha el sobrenadante y el precipitado se resuspende con 300 μ L de amortiguador de lisis (tris-HCl 50mM pH 7.5, NaCl 150mM, nonidet P40 1%, desoxicolato 0.5%, cocktail de

inhibidores de proteasas), y después se sonicó a 4°C por tres ciclos (cada ciclo consiste en tres periodos de 10 segundos a 40Hz). Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm a 4°C durante 75 min. Al concluir la centrifugación, se tomó el sobrenadante que sería la fracción soluble y al precipitado se le añadieron 100µL de amortiguador de lisis y se aplicó nuevamente un ciclo de sonicación para obtener así la fracción membranal.

Se cuantificó la proteína de las diferentes fracciones (medio, fracción soluble y fracción membranal) mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) obteniendo 25µg por alícuota; para el corrimiento electroforético se desnaturalizaron las proteínas, y se adicionó un volumen equivalente (al volumen de la alícuota) de amortiguador de carga (2-βmercaptoetanol, azul de bromofenol 0.05%, y SDS (10% p/v) en baño María durante 10 min. Se cargaron las muestras en un gel de poliacrilamida-SDS al 10%, con 4µL de marcador de amplio espectro (Standard HMW-Bio-Rad, 161-0309. Lote No. 310001920).

Se llevó a cabo el corrimiento electroforético por 3 o 4 h con una corriente de 30mA. Al concluir la electroforesis, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa en una cámara semiseca (Semi-dry transfer cell, modelo Trans-blot SD, Bio-Rad) con amortiguador de transferencia (25mM de tris-base, 192mM de glicina y 20% de metanol) durante 20 min, y bajo las siguientes condiciones: 30 min a 25V y 40 min a 10V. Una vez transferidas las proteínas a la membrana se bloqueó incubándola con una solución de PBS-leche libre en grasa al 5% durante 2h a 37°C o durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubó la membrana con los anticuerpos primarios monoclonales: anti PPA (1:500, Chemicon Internacional, MAB348 lote No. 2024170) y anti α-tubulina (1:500, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, T-9026, lote No. 049K4767) por 48h a 4°C. Después de tres lavados de 5 min con PBS 1x, se incubó la membrana en una solución con el anticuerpo secundario (acoplado a peroxidasa) anti-ratón IgG (1:8000 Santa Cruz Biotechnologies, sc2005, lote No. L2011) durante 2 h a temperatura ambiente.

Después de tres lavados de 5 min cada uno, se reveló por medio de un kit de Diaminobencidina (Vector Laboratories, SK-4100). El análisis de expresión de las bandas se realizó mediante densitometría óptica utilizando el programa Image J (Java); y se graficó como porcentaje de expresión con respecto el control.

Análisis estadístico

La prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) de una vía con comparaciones *post-hoc* por *prueba de Tukey* fué usada para los ensayos de viabilidad. Se utilizó la prueba t de Student no pareada para analizar los resultados del Western-blot y los ensayos de ERO. Los gráficos presentados se realizaron mediante el programa Graphpad Prism 5.

RESULTADOS

Ensayos de viabilidad

Reducción de MTT: los datos de absorbancia entre las distintas condiciones experimentales, se analizaron como diferencia porcentual respecto a los valores encontrados en la muestra del grupo control. Los resultados muestran que en el grupo de células diferenciadas, tratadas durante 24 h con BSO, hubo una disminución significativa de la actividad mitocondrial respecto al control, esta disminución fue de alrededor del 10% en los tratamientos de 200 μ M de BSO y del 20% en la concentración de 400 μ M (Figura 3). En los demás grupos experimentales no se observó esta tendencia a disminuir la actividad mitocondrial.

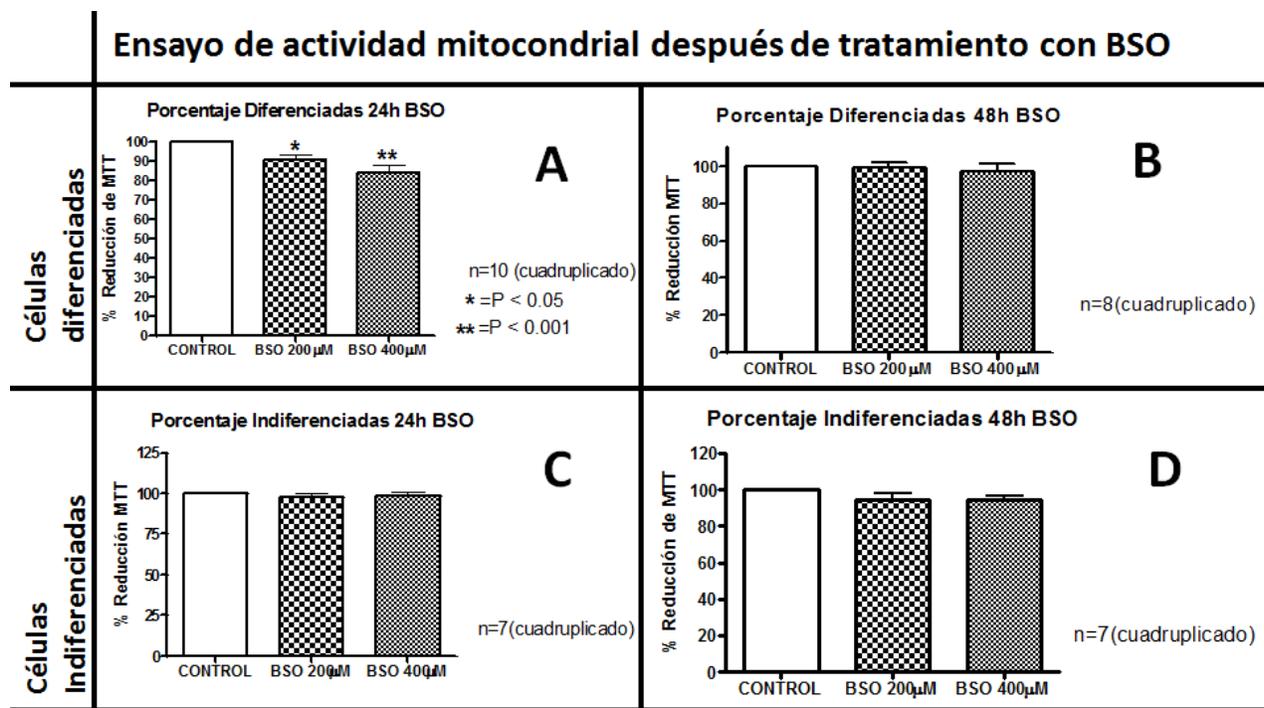


Figura 3. Actividad mitocondrial posterior al tratamiento de BSO. La viabilidad de células diferenciadas expuestas a BSO (200 μ M y 400 μ M) durante 24 h es afectada significativamente respecto al control (A). Este efecto no se observó con 48h de exposición al BSO en células diferenciadas (B), ni tampoco en los tratamientos de 24 y 48 h (C y D) en células indiferenciadas. Los valores representan la media \pm el error experimental de 7-10 experimentos independientes con determinaciones por cuadruplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, por ANOVA de una vía, respecto a la condición control.

Exclusión de azul de tripano: Se evaluaron los datos por porcentajes, aunque fueron graficados únicamente los datos porcentuales de células vivas encontradas en los grupos experimentales con respecto a los controles. En el análisis del gráfico se observa que los cuatro grupos experimentales presentaron un menor porcentaje de viabilidad con respecto al encontrado en los controles, diferencia que fue de alrededor del 20% a la concentración de 400µM de BSO (Figura 4).

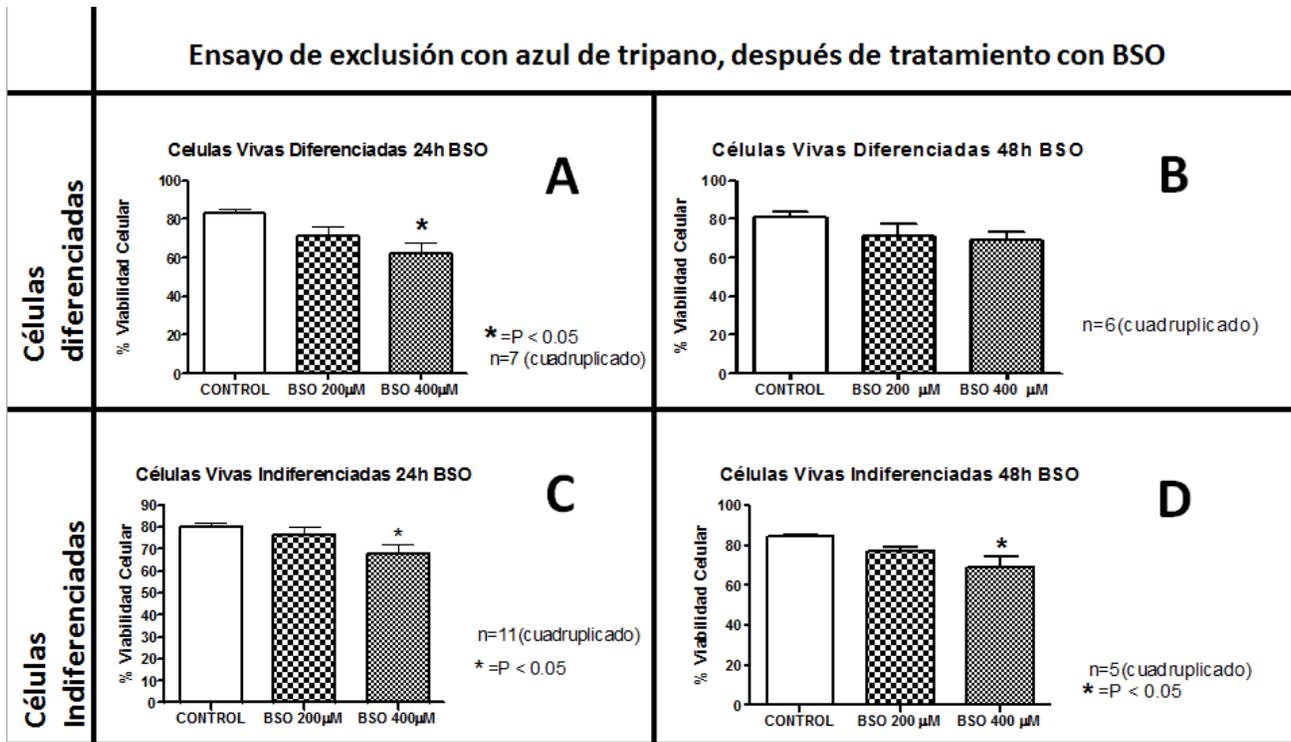


Figura 4. Porcentaje de viabilidad posterior a tratamiento con BSO. La exposición de las células diferenciadas (A) e indiferenciadas (C) a 400 µM de BSO por 24 h afecta significativamente la viabilidad celular, al disminuirla en alrededor del 20%. La exposición a BSO por 48 h en células diferenciadas (B), aunque disminuyó la viabilidad no lo hizo de manera significativa. En cambio, en células indiferenciadas la exposición a BSO 400 µM por 48 h si disminuyó significativamente la viabilidad celular (D). Los datos representan la media ± el error experimental de 5-11 experimentos independientes con determinaciones por cuadruplicado. *P<0.05 por ANOVA de una vía, respecto a la condición control.

Análisis de la morfología celular

Además, de la disminución en la viabilidad celular, se caracterizaron las alteraciones morfológicas de las células bajo las diferentes condiciones experimentales.

Al analizar la morfología celular se observó que el tratamiento con 400 μ M de BSO produjo alteraciones notorias tanto en los cultivos de células diferenciadas como en las indiferenciadas, las cuales se manifestaron más claramente al aumentar el tiempo de exposición al BSO (Figuras 5 y 6). También se observó que las alteraciones morfológicas fueron más evidentes en las células diferenciadas, donde la proporción de células alteradas morfológicamente fue mayor. La forma alargada y la presencia de numerosos procesos que presentan las células diferenciadas en el grupo control, contrastaron evidentemente con la morfología de las células tratadas con BSO, las cuales presentaron una forma predominantemente redondeada (flecha) o en algunos casos, colapsada (cabeza de flecha) (Figura 5). Las células indiferenciadas expuestas a 400 μ M de BSO, también perdieron la forma de huso tomando la forma redondeada (Figura 6); sin embargo, las alteraciones fueron menos significativas en este tipo de células que en las que fueron diferenciadas.

Para evaluar si los cultivos de células de neuroblastoma MSN presentaban alguna tolerancia al BSO se utilizó además, en una concentración de 800 μ M (Figura 7), la cual indujo alteraciones morfológicas altamente significativas en células diferenciadas e indiferenciadas, pudo notarse una alteración crítica de los cultivos a 800 μ M de BSO con 24 h de exposición (notándose un gran número de células redondeadas y la pérdida de procesos neuríticos), este efecto fue aún más evidente al aumentar el tiempo de exposición a 48 h, lo que ocasionó el colapso de un gran número de células. En estas condiciones, nuevamente se observó que las alteraciones morfológicas ocasionadas por el BSO fueron mayores en las células diferenciadas, que en las células indiferenciadas.

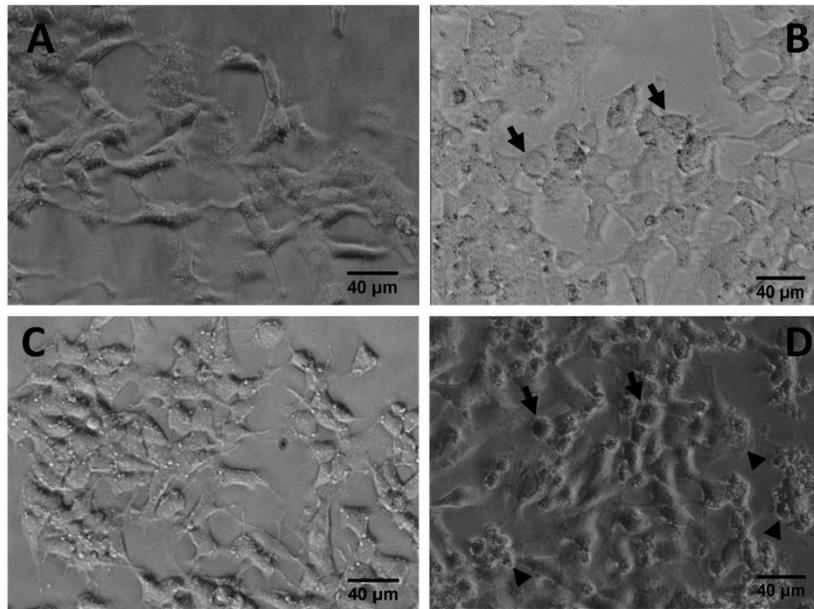


Figura 5. Alteraciones morfológicas producidas por 400 μ M de BSO en células de MSN diferenciadas. A y C: Control, B: exposición a BSO por 24 h y D: exposición a BSO por 48 h. El tratamiento con BSO 400 μ M indujo alteraciones morfológicas que fueron evidentes al prolongar el tiempo de exposición. Las flechas indican células redondeadas, y las cabezas de flecha las células encogidas o colapsadas. Barra de calibración 40 μ m.

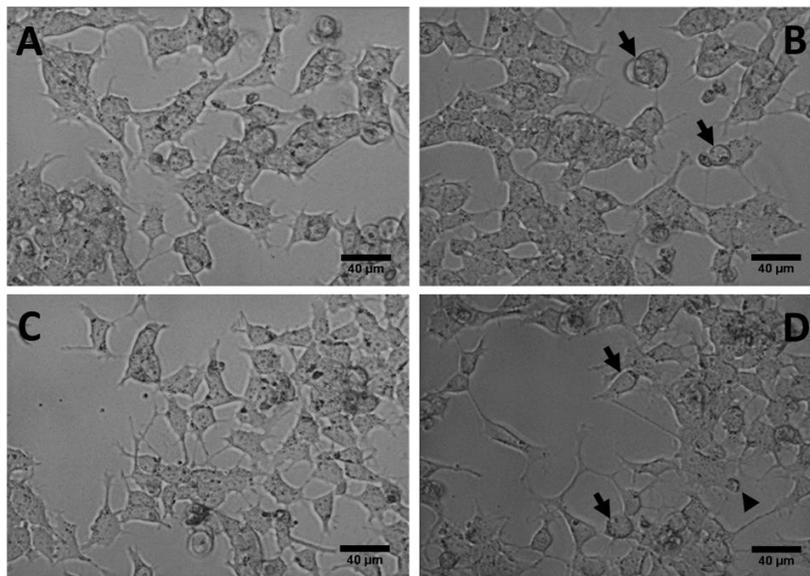


Figura 6. Alteraciones morfológicas producidas por 400 μ M de BSO en células de MSN indiferenciadas. A y C: Control, B: exposición a BSO por 24 h y D: exposición a BSO por 48 h. El tratamiento con BSO 400 μ M indujo alteraciones morfológicas que fueron más pronunciadas al prolongar el tiempo de exposición. Las flechas negras indican células redondeadas, y las cabezas de flecha las células encogidas o colapsadas. Sin embargo, dichas alteraciones son menos evidentes que en células diferenciadas. Barra de calibración 40 μ m.

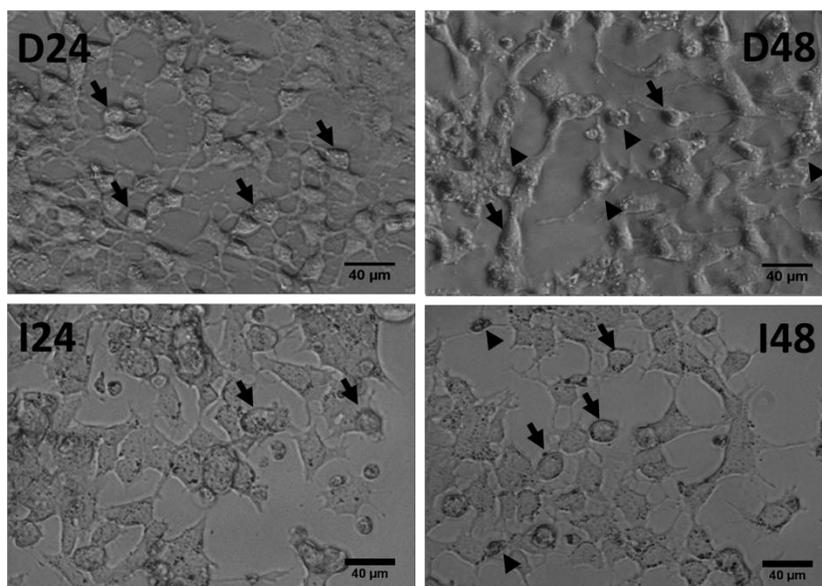


Figura 7. Alteraciones morfológicas producidas por 800 μM de BSO en células de MSN diferenciadas e indiferenciadas. D24: diferenciadas expuestas por 24 h; D48: diferenciadas expuestas por 48 h; I24: indiferenciadas expuestas por 24 h; e I48: indiferenciadas expuestas por 48 h. El tratamiento con BSO 800 μM indujo alteraciones morfológicas que fueron más pronunciadas al prolongar el tiempo de exposición. En las células diferenciadas se observó un efecto más evidente, con un gran número de células redondeadas (flechas) y colapsadas (cabezas de flecha) comparado con las células indiferenciadas, donde la morfología se modificó en menor proporción. Barra de calibración 40 μm .

Expresión de la proteína precursora del amiloide

La expresión de la PPA fue evaluada por western-blot en tres fracciones (medio, fracción soluble y fracción membranal), utilizando un anticuerpo anti-PPA N-terminal, el cual reconoce los tres diferentes tipos de PPA: la PPA soluble (120kDa), la PPA madura (130kDa) y la PPA inmadura (110kDa). Este análisis se llevó a cabo con los tratamientos de BSO a 400 μ M, ya que ésta concentración fue usada en un proyecto previo del grupo de trabajo, y se reportó que inducía un aumento significativo en la generación de ERO, sin afectar la viabilidad de los cultivos de neuroblastoma (Ramos-Sánchez, 2010).

Al analizar la expresión protéica de PPA, no se observaron cambios significativos en el nivel de expresión en ninguna de las fracciones analizadas con respecto al control, en ningún grupo experimental evaluado, ni en los cultivos de células diferenciadas ni en las indiferenciadas, a la concentración de 400 μ M de BSO (Figuras 8-11). En la fracción membranal no se logró detectar expresión para PPA en ninguna de las muestras de las diferentes condiciones experimentales evaluadas.

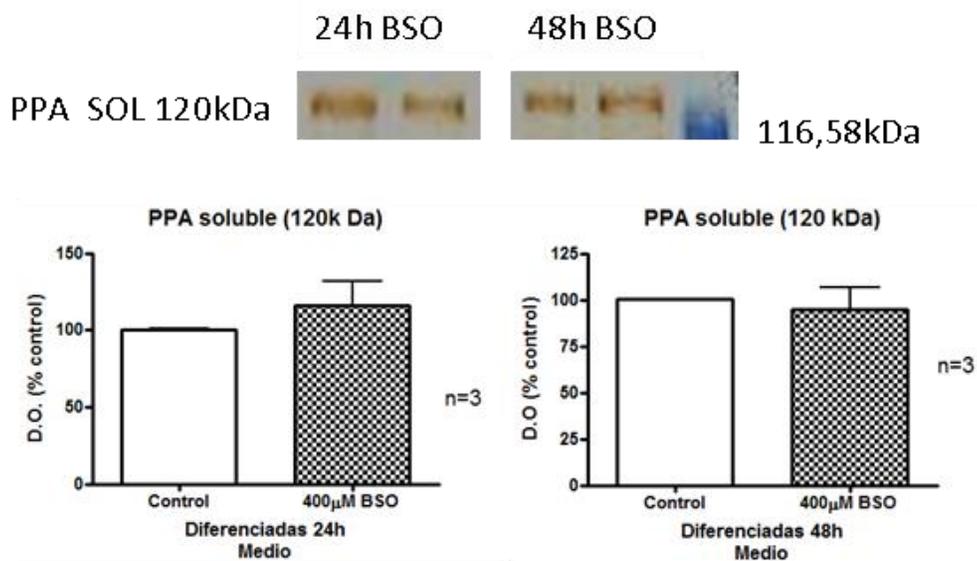


Figura 8: Expresión de PPA soluble en el medio de células MSN diferenciadas. Western blot de células MSN diferenciadas, expuestas a BSO 400 μ M durante 24 h y 48 h, muestran a la PPA soluble (120 kDa). La expresión de PPA no mostró cambios en los periodos de exposición. Los datos representan la media \pm el error experimental de la media de tres experimentos independientes. T-Student no pareada.

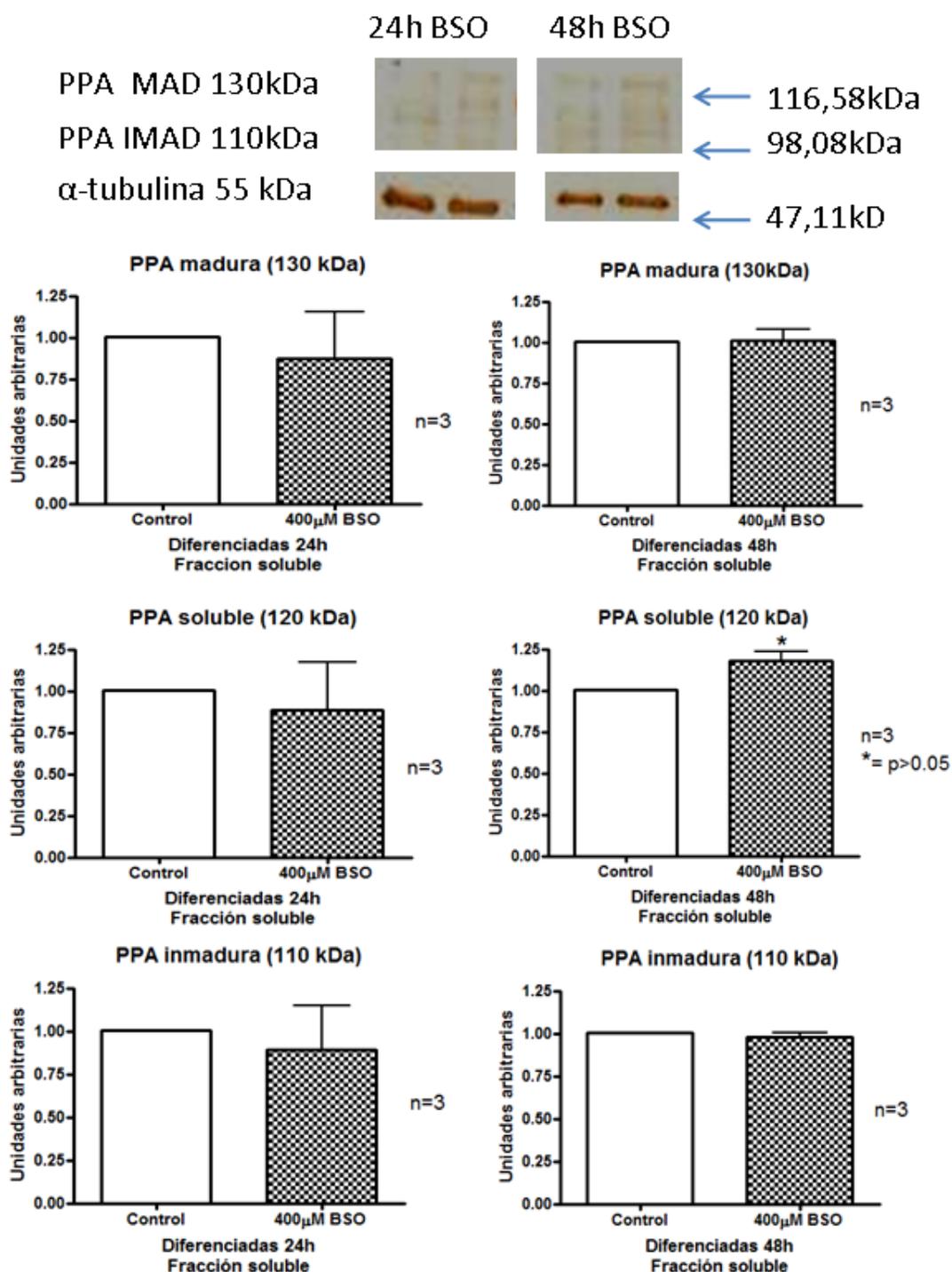


Figura 9. Expresión de PPA en fracción soluble de células MSN diferenciadas. Western blot de células MSN diferenciadas, expuestas a BSO 400µM durante 24 h y 48 h, muestran a la PPA madura (130kDa), PPA soluble (120 kDa) y PPA inmadura (110 kDa). La expresión de PPA no mostró cambios en los periodos de exposición, excepto en la PPA soluble a 48 h de tratamiento, con un incremento de 10%. Los datos representan la media ± el error experimental de la media de tres experimentos independientes. *P<0.05 por T-Student no pareada, respecto al control.

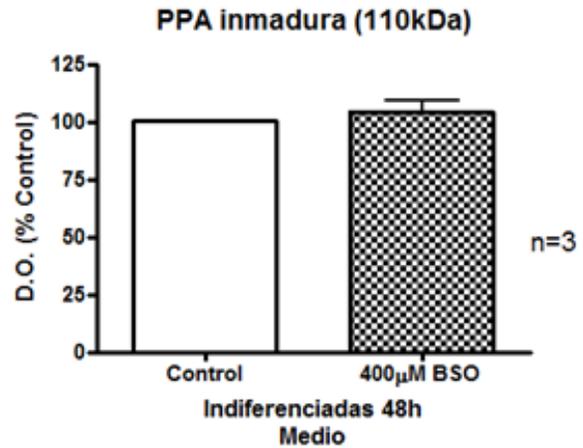
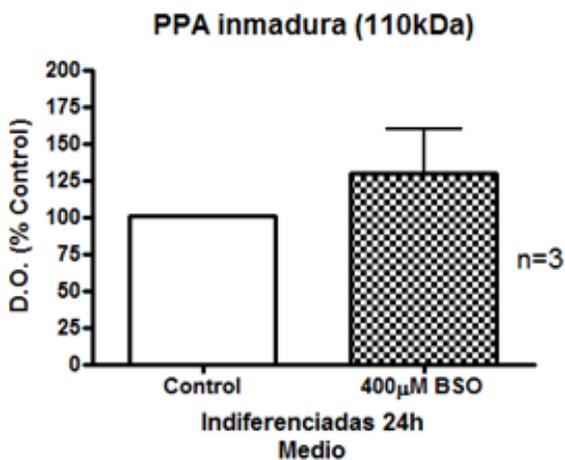
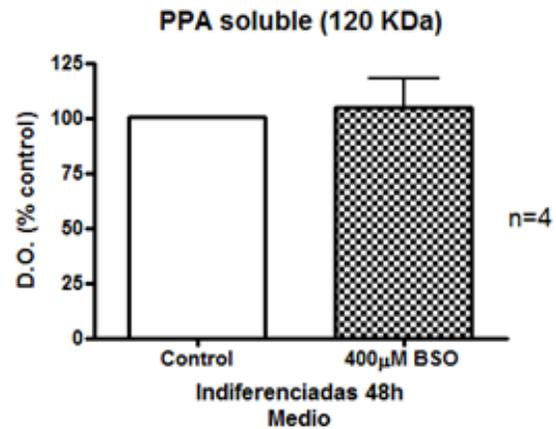
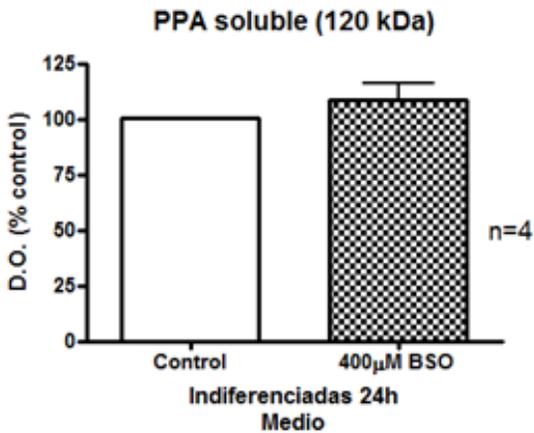
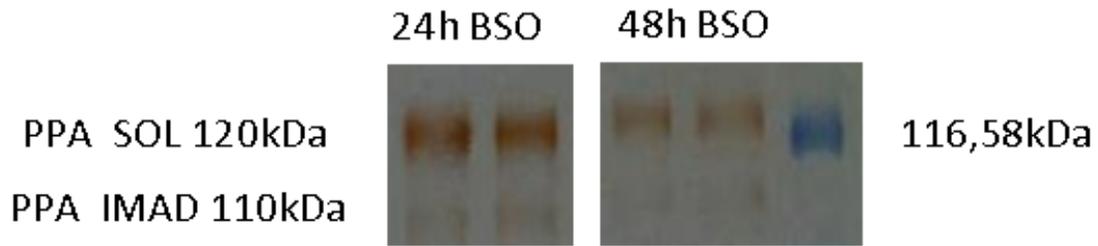


Figura 10: Expresión de PPA en el medio de células MSN indiferenciadas. Western blot de células MSN indiferenciadas, expuestas a BSO 400µM durante 24 h y 48 h, muestran a la PPA soluble (120 kDa) y PPA inmadura (110 kDa). La expresión de PPA no mostró cambios en los periodos de exposición. Los datos representan la media ± el error experimental de la media de tres experimentos independientes. T-Student no pareada.

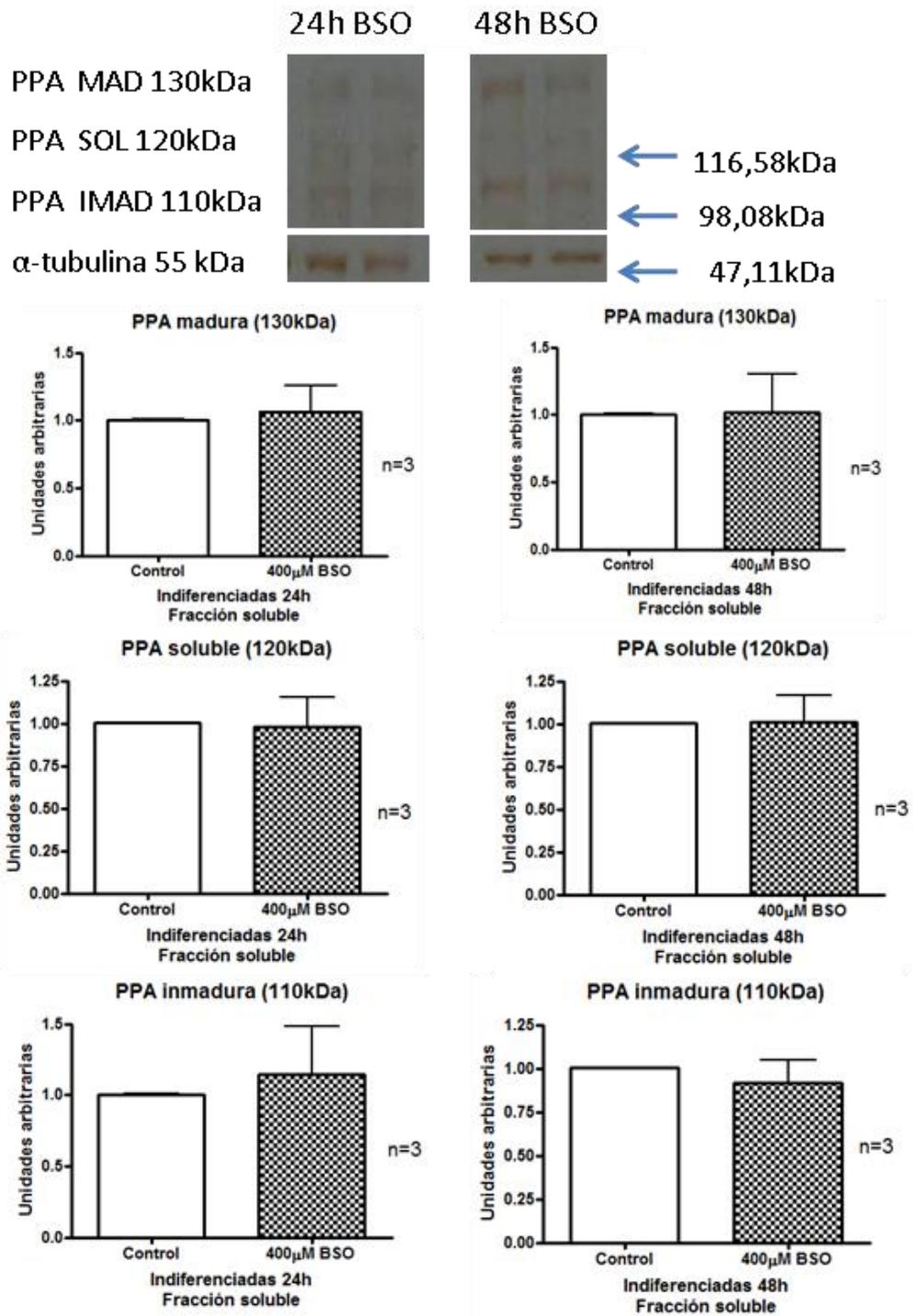


Figura 11. Expresión de PPA en fracción soluble de células MSN indiferenciadas. Western blot de células MSN indiferenciadas, expuestas a BSO 400 μ M durante 24 h y 48 h, muestran a la PPA madura (130kDa), PPA soluble (120 kDa) y PPA inmadura (110 kDa). La expresión de PPA no mostró cambios en los periodos de exposición. Los datos representan la media \pm el error experimental de la media de tres experimentos independientes. T-Student no pareada.

Análisis de especies reactivas de oxígeno

Al analizar los resultados de los ensayos de Dihidrorodamina 123 se demuestra que en los distintos tratamientos con BSO evaluados en este trabajo, tanto en células diferenciadas como en aquellas que no se les indujo la diferenciación, no se registran cambios significativos en los niveles de ERO, al compararlas con los registrados en los grupos control respectivos (Figura 12); con excepción de las células indiferenciadas con 48h de exposición al BSO en donde se observó una disminución estadísticamente significativa (de alrededor del 20%) en los niveles de ERO, respecto al control.

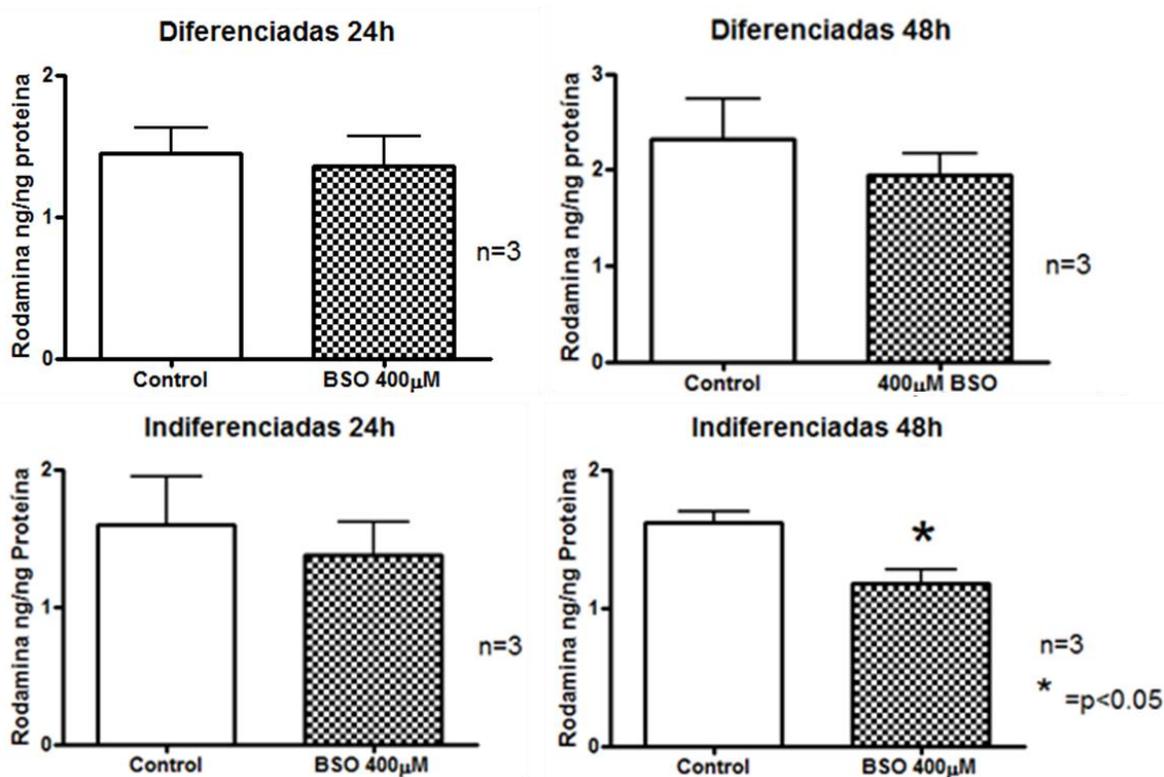


Figura 12. Análisis de ERO en tratamientos de BSO 400µM en células de neuroblastoma MSN. La producción de ERO no se incrementó en tratamientos agudos de BSO a una concentración de 400µM, tanto en células diferenciadas como indiferenciadas en los periodos de 24 y 48 h de exposición. Un decremento significativo de ERO se observó en células indiferenciadas con 48 h de tratamiento. *=P<0.05, error estándar. Tres experimentos independientes por triplicado. Prueba t-Student no pareada.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió la relación entre el estrés oxidante y la alteración en la expresión de la PPA utilizando un modelo *in vitro* en el cual se induce el incremento de la producción de ERO por medio de la inhibición de la síntesis del GSH, mediante la co-incubación con inhibidor BSO (Marengo *et al.*, 2007).

Para valorar si el tratamiento con BSO induce daño se evaluó la sobrevivencia celular utilizando dos pruebas, las cuales permiten identificar dos mecanismos diferentes asociados al proceso de daño: el ensayo con MTT permite identificar la pérdida de la actividad mitocondrial, mientras que la incorporación de azul de tripano evalúa la pérdida de la integridad de la membrana celular. Los resultados muestran de manera general, que el BSO induce cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática lo que permite la incorporación de azul de tripano en células no viables para todas las condiciones experimentales probadas, particularmente cuando se utilizó a la dosis de 400 μ M de BSO. Por otro lado, los resultados del ensayo de actividad mitocondrial no muestran diferencias significativas, a excepción de la condición en la que las células de neuroblastoma MSN diferenciadas expuestas a BSO por 24h a 400 μ M disminuyeron significativamente su capacidad de reducir al MTT. Estos resultados permiten sugerir que los tiempos de exposición al BSO empleados en este trabajo, inducen particularmente cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática, y que para observar efectos significativos sobre la actividad mitocondrial probablemente sea requerido un tiempo mayor de exposición al BSO. En este sentido, se ha demostrado que la membrana celular se ve notoriamente afectada por el estrés oxidante en eventos neurodegenerativos (Yadav y Tiwari, 2014), al modificar la conformación de los esfingolípidos. Por otra parte, la oxidación mitocondrial puede inducir mecanismos moleculares de protección en respuesta a estrés como la activación de algunos mecanismos antioxidantes como la Hemo-oxigenasa-1 (HO1), lo que previene alteraciones de la respiración celular (Bansal *et al.*, 2013). Estos reportes podrían

explicar la divergencia observada en los resultados entre las dos pruebas de viabilidad celular que se utilizaron en este trabajo. Aunque evidentemente, la viabilidad celular se ve comprometida en la condición de exposición a 400 μ M de BSO (por 24 y 48 h), ya que al disminuir los niveles de GSH el desequilibrio REDOX podría modificar diversos procesos celulares, tales como la regulación de la apoptosis, la síntesis de ADN y de proteínas, entre otras (Wu *et al.*, 2004).

Otra posibilidad que podría explicar las diferencias entre las pruebas de viabilidad utilizadas, es que la reducción del compuesto MTT (llevada a cabo por reductasas mitocondriales) (Slater *et al.*, 1963) podría elevarse por acción de las ERO. Esto ocasionaría que aunque la actividad mitocondrial se vea afectada en las células tratadas, se genere un falso positivo por la acción de las ERO que se producen por el tratamiento con BSO, lo que nos impediría observar diferencias significativas entre grupos y tratamientos.

Los datos anteriores y el análisis morfológico de las células de neuroblastoma MSN, demuestran que en todas las condiciones experimentales el tratamiento con BSO induce daño celular, que se relacionó con alteraciones morfológicas severas, tanto en las células diferenciadas como en las indiferenciadas, al incrementar el tiempo de exposición y la concentración del BSO (Figuras 5-7). En este sentido, los resultados sugieren que a nivel de las modificaciones de la morfología celular, las células de neuroblastoma MSN fueron más sensibles al tratamiento con BSO en su estado diferenciado. Los cambios en la permeabilidad de la membrana observados mediante la incorporación de azul de tripano podrían estar asociados a los cambios observados a nivel de la morfología celular, ya que se ha reportado que el estrés oxidante puede afectar significativamente la conformación de la membrana (Mason *et al.*, 1997; Freikman *et al.*, 2008), lo que se relaciona con lo observado en este trabajo, donde las células de neuroblastoma MSN, tanto diferenciadas como indiferenciadas, modifican significativamente su morfología celular como respuesta a los tratamientos con BSO, al transformarse de células de morfología prismática y expandida, a células redondeadas de menor tamaño.

Es necesario realizar más estudios para determinar el curso temporal del daño inducido por BSO, así como determinar si dicho daño es definitivamente causado por el estrés oxidante que induce la disminución en la concentración de GSH, para de esta forma determinar si la línea MSN de neuroblastoma puede utilizarse como modelo para valorar los cambios estructurales y moleculares causados por el desbalance REDOX. En este sentido, estudios previos de nuestro grupo de trabajo (Ramos-Sánchez, 2010), demostraron que al tratar con BSO a células de neuroblastoma MSN, en concentraciones de 20, 50 y 100 μ M, hasta por 120h, se elevan significativamente los niveles de ERO, pero estas elevaciones no afectaron significativamente la viabilidad celular. En nuestros resultados, si hubo afectaciones en la morfología y viabilidad celulares, pero no se lograron determinar cambios en los niveles de ERO. Por lo anterior, se propone que sería importante utilizar otras pruebas de detección de ERO.

Por otro lado, se ha observado que algunas líneas celulares de neuroblastoma bajo ciertas condiciones experimentales, muestran resistencia a BSO, aún al utilizarlo en una concentración de 1mM y por exposiciones de 24, 48 y 72 h (Marengo *et al.*, 2007; Furfaro *et al.*, 2012). Esto sugeriría, que la línea MSN de neuroblastoma podría desarrollar tolerancia al fármaco. Por lo anterior, se decidió evaluar el efecto del BSO a la concentración de 800 μ M, que indujo tanto en células diferenciadas como indiferenciadas de neuroblastoma MSN, alteraciones morfológicas severas en cualquiera de los dos tiempos de aplicación evaluados (Figura 7). Este resultado permitiría sugerir que bajo las condiciones experimentales probadas en este trabajo las células de la línea de neuroblastoma MSN no presentaron resistencia demostrable al BSO.

Numerosos estudios han vinculado al estrés oxidante con la PPA, tanto a nivel del metabolismo, como en los cambios de expresión de la proteína misma. Así, el estrés oxidante se ha relacionado directamente con el desarrollo de procesos amiloidogénicos (Sayre *et al.*, 2001; Practicò, 2008; Mouton-Liger *et al.*, 2012). Trabajos de Tamagno *et al.* (2008), utilizando cultivos de neuroblastoma demostraron una influencia directa del estrés oxidante sobre la expresión de BACE1 y la actividad de γ -secretasa. También se ha probado la correlación entre el

aumento de expresión de BACE1 y la lipoperoxidación en tejidos de pacientes con EA (Borghi *et al.*, 2007). Algunos trabajos más (Shen *et al.*, 2008; Quiroz-Baez *et al.*, 2009), han expuesto que el estrés oxidante puede disminuir la expresión de PPA y aumentar la producción de βA_{42} en cultivos de neuroblastoma tratados con distintos agentes pro-oxidantes (peróxido de hidrógeno, cloruro ferroso, cafeína, etc.). Sin embargo, en las condiciones experimentales del presente trabajo, utilizando la línea de neuroblastoma MSN e induciendo estrés oxidante con un tratamiento de BSO, no se logró demostrar cambios estadísticamente significativos en la expresión de PPA, en ninguna de las condiciones analizadas (Figuras 8-11).

Por último, en los resultados de este trabajo se observó que las células indiferenciadas tratadas con BSO 400 μ M pueden disminuir los niveles de ERO al transcurrir 48h de exposición al BSO (Figura 12). Esto podría relacionarse con el estudio de Furfaro *et al.* (2012), que al utilizar la línea GI-ME-N de neuroblastoma tratada con BSO, reportó la activación de una vía antioxidante de señalización inducida por estrés oxidante que modula la actividad de un factor de transcripción, el “Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2” (Nrf2) y la enzima HO1. Se ha propuesto que este mecanismo antioxidante podría estar sobreactivado en las células de neuroblastoma, lo que posibilitaría la resistencia a distintos tipos de fármacos.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo evidencian un proceso de daño celular, por lo menos a nivel de la permeabilidad de la membrana plasmática y de la morfología de las células de neuroblastoma tratadas con BSO, utilizado como un inhibidor de la producción de GSH para inducir daño oxidante.

CONCLUSIONES

- La exposición de las células de neuroblastoma MSN, diferenciadas e indiferenciadas, a BSO 400 μ M por 24 y 48 h induce daño celular, asociado a cambios en la integridad de la membrana plasmática y a alteraciones en la morfología celular, los cuales no pudieron asociarse a alteraciones en la función mitocondrial, a aumentos en los niveles de ERO o a cambios en el nivel de expresión de PPA.
- En general, de acuerdo con los resultados obtenidos, se sugiere que las células diferenciadas de neuroblastoma MSN son más susceptible al daño que induce el BSO, bajo el esquema de experimentación empleado en este trabajo.

PERSPECTIVAS

- A pesar de que en un trabajo de tesis previo (Ramos-Sánchez, 2010) se señaló que la concentración de BSO de 400 μ M era óptima para incrementar los niveles de ERO en los cultivos celulares de neuroblastoma MSN, los resultados del presente trabajo hacen necesario revalorar curvas dosis-respuesta al BSO en relación con la generación de ERO, así como cursos temporales, para de esta forma determinar la dosis efectiva del inhibidor BSO y el tiempo al cual promueve el estrés oxidante en la línea MSN, sin afectar la viabilidad de los cultivos, lo que permitirá valorar los cambios moleculares que determinan la expresión de marcadores relacionados con la EA, como la expresión de PPA.
- El ensayo de detección de ERO, por medio de la Dihidrorodamina 123, ha demostrado no percibir la acción de algunas moléculas reactivas, como el anión superóxido (Henderson y Chapell, 1993), por tal motivo es necesario explorar pruebas alternas que determinen el incremento de ERO mediado por BSO. La lipoperoxidación (por análisis de moléculas como 4-hidroxinonal o malondialdeído), la oxidación de proteínas (por incremento de carbonilos), entre otras pruebas, pueden demostrar la acción de ERO, y probar así si la línea MSN de neuroblastoma posibilita el estudio de algunas características fisiológicas de la EA.
- Dado que en el presente trabajo no se detectaron elevaciones en la generación de ERO es importante analizar las posibles causas que impidieran su acumulación. Por tal motivo es necesario determinar si realmente los niveles de GSH disminuyen por el tratamiento con BSO en las células de la línea MSN de neuroblastoma.
- Finalmente, sería importante determinar si cascadas de señalización anti-estrés oxidante, como la vía HO-1/Nrf-2 (Furfaro *et al.*, 2012) o el incremento de SOD

(Marengo *et al.*, 2007) se activan en las células de neuroblastoma MSN en respuesta al tratamiento con BSO.

REFERENCIAS

- Alzheimer's Association (2010) "Alzheimer's disease facts and figures". *Alzheimer Dement.* 4(2):158–194.
- Amstrong R.A. (2006) "Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease". *Folia Neuropathol.* 44(1):1–11.
- Arias C. (1999) "Enfermedad de Alzheimer" en Farías M.C. (ed.) "Enfermedades neurodegenerativas, mecanismos celulares y moleculares". México. Fondo de Cultura Económica.
- Arranz L., C. Fernández, A. Rodríguez, J.M. Ribera, M. de la Fuente (2007) "Cambios con el envejecimiento en los valores de glutatión de células inmunitarias y plasma. Efecto de la administración de N-acetilcisteína". *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* 42(2):96-102.
- Ashe K.H. y K.R. Zahs (2010) "Probing the biology of Alzheimer's disease in mice". *Neuron* 66:631–645.
- Bailey J.A., B. Maloney, Y.W. Gea y D.K. Lahiri (2011) "Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid β -peptide interacting domain (A β ID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis". *Gene* 488(1–2):13–22.
- Banco Mundial. Ingreso 16 de Julio del 2013:<http://search.worldbank.org/data?qterm=esperanza%20de%20vida%20mexico&language=ES>

- Bansal S., G. Biswas y N.G. Avadhani (2013) "Mitochondria-targeted heme oxygenase-1 induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in macrophages, kidney fibroblasts and in chronic alcohol hepatotoxicity". *Redox Biol.* 23(2):273-283.
- Baloyannis S. J. e I. S. Baloyannis (2012) "The vascular factor in Alzheimer's disease: A study in Golgi technique and electron microscopy". *J. Neurol. Sci.* 322:117–121.
- Borghi R., S. Patriarca, N. Traverso, A. Piccini, D. Storace, A. Garuti, G. Cirmena, P. Odetti, M. Tabaton (2007) "The increased activity of BACE1 correlates with oxidative stress in Alzheimer's disease". *Neurobiol. Aging* 28:1009–1014.
- Boyd-Kimball D., R. Sultana, H.M. Abdul y D.A. Butterfield (2005) "γ-glutamylcysteine ethyl ester-induced up-regulation of glutathione protects neurons against Aβ (1–42)-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease". *J. Neurosci. Res.* 79(5):700-706.
- Busciglio J., A. Lorenzo, J. Yeh, y B.A. Yankner (1995) "β-Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding". *Neuron* 14(4):879–888.
- Butterfield D.A., A.M. Swomley y R. Sultana (2013) "Amyloid b-Peptide (1–42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression". *Antioxid. Redox Signal.* 19(8):823-835.
- Buxbaum J.D., K.N Liu, Y. Luo, J.L. Slack, K.L. Stocking, J.J. Peschon, R.S. Johnson, B.J. Castner, D.P. Cerretti y R.A. Black (1998) "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor". *J. Biol. Chem.* 273(43):27765-27767.
- Carrodeguas J.A., A. Rodolosse, V. Garza, A. Sanz-Clemente, R. Pérez-Pé, A.M. Lacosta (2005) "The chick embryo appears as a natural model for research in beta-amyloid precursor protein processing". *Neuroscience* 134:1285-1300.
- Cavallucci V., M. D'Amelio y F. Cecconi (2012) "Aβ Toxicity in Alzheimer's Disease". *Mol. Neurobiol.* 45:366–378.
- Cotlear D., R. Lee y A. Mason (2010). "Some economic consequences of global aging. A discussion note for the World Bank" The World Bank. Ingreso el 12-1-13: <http://siteresources.worldbank.org/HEALTHNUTRITIONANDPOPULATION/Resources/281627-1095698140167/SomeEconomicConsequencesOfGlobalAging.pdf>
- Dahms S.O., S. Hoefgen, D. Roeser, B. Schlott, K.H. Gührs y M.E. Than (2010) "Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein". *Proc Natl. Acad. Sci.* 107(12):5381–5386.

- De Caluwé J. y G. Dupont (2013) "The progression towards Alzheimer's disease described as a bistable switch arising from the positive loop between amyloids and Ca(2+). *J. Theor. Biol.* 331:12-18.
- Edbauer D., E. Winkler, J.T. Regula, B. Pesold, H. Steiner y C. Haass (2003) "Reconstitution of gamma-secretase activity". *Nat. Cell Biol.* 5:486-488.
- Ferri C.P., M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P.R. Menezes, E. Rimmer y M. Scazufca (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study". *Lancet.* 366(9503): 2112-2117.
- Floyd R.A. y K. Hensley (2002) "Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases". *Neurobiol. Aging* 23(5):795-807.
- Freeman L.R., L. Zhang, K. Dasuri, S.O. Fernandez-Kim, A.J. Bruce-Keller, J.N. Keller (2012) "Mutant amyloid precursor protein differentially alters adipose biology under obesogenic and non-obesogenic conditions". *Plos One* 7(8)e43193.
- Freikman I., J. Amer, J.S. Cohen, I. Ringel y E. Fibach (2008) "Oxidative stress causes membrane phospholipid rearrangement and shedding from RBC membranes: an NMR study". *Biochim. Biophys. Acta* 1778(10):2388-2394.
- Furfaro A. L., J.R. Macay, B. Marengo, M. Nitti, A. Parodi, D. Fenoglio, U.M. Marinari, M. A. Pronzato, C. Domenicotti, N. Traverso (2012) "Resistance of neuroblastoma GI-ME-N cell line to glutathione depletion involves Nrf2 and heme oxygenase-1". *Free Radic. Biol. Med.* 52(2):488-496.
- Gakhar-Koppole N., P. Hundeshagen, C. Mandl, S.W. Weyer, B. Allinquant, U. Muller y F. Ciccolini (2008) "Activity requires soluble amyloid precursor protein to promote neurite outgrowth in neural stem cell derived neurons via activation of the MAPK pathway". *Eur. J. Neurosci.* 28:871-882.
- Glenner G. y C.R. Wong (1984) "Alzheimer's disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122(3):1131-1135.
- Griffith O.W. y A. Meister (1979) "Potent and Specific Inhibition of Glutathione Synthesis by Buthionine Sulfoximine (S-n-Butyl Homocysteine Sulfoximine)". *J. Biol. Chem.* 254(16):7558-7560.

- Guglielmotto M., M. Aragno, E. Tamagno, I. Vercellinatto, S. Visentin, C. Medana, M.G. Catalano, G. Boccuzzi y M. Tabaton (2012) "AGEs/RAGE complex upregulates BACE1 via NF- κ B pathway activation". *Neurobiol. Aging* 33(1):13-27.
- Gutiérrez-Muños V.H., A. Vallejos-Paras y G. García-Ruiz (2006) "Enfermedad de Alzheimer". *Epidemiología* (ISSN 1405-2636) 23(42):1-3.
- Gwon A.R., J.S. Park, T.V. Arumugam, Y.K. Kwon, S.L. Chan, S.H. Kim, S.H. Baik, S. Yang, Y.K. Yun, Y. Choi, S. Kim, S.C. Tang, D.H. Hyun, A. Cheng, C.E. Dann, M. Bernier, J. Lee, W.R. Markesbery, M.P. Mattson y D.G. Jo (2012) "Oxidative lipid modification of nicastrin enhances amyloidogenic γ -secretase activity in Alzheimer's disease". *Aging Cell* 11:559–568.
- Hass M.R. y B.A. Yankner (2005) "A gamma-secretase-independent mechanism of signal transduction by the amyloid precursor protein". *J. Biol. Chem.* 280:36895-36904.
- Henderson L.M. y J.B. Chappell (1993) "Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation?". *Eur. J. Biochem.* 217(3):973-980.
- Hernández-Ortega K., P. Ferrera y R.D. Quiroz-Baez (2010). "Papel de la apoptosis y la senescencia celular en el envejecimiento del sistema nervioso central". En: Gutiérrez Robledo L.M. y J.H. Gutiérrez Ávila (eds.) "Envejecimiento humano, una visión transdisciplinaria". México. Secretaria de Salud.
- Iqbal K. e I. Grundke-Iqbal (2008) "Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention". *J. Cell. Mol. Med.* 12(1):38-55.
- Khatri N. y H.Y. Man (2013) "Synaptic Activity and Bioenergy Homeostasis: Implications in Brain Trauma and Neurodegenerative Diseases". *Front. Neurol.* 4:e199.
- Lareo L.R. (2006) "Costo energético de procesos cerebrales con especial énfasis en aprendizaje y memoria" *Revista de la Facultad de Ciencias (Universidad de Bogotá)*. 11(2):77-84.
- Lee S.H., K.R. Kim, S.Y. Ryu, S. Son, H.S. Hong, I. Mook-Jung, S.H. Lee y W.K. Ho (2012) "Impaired short-term plasticity in mossy fiber synapses caused by mitochondrial dysfunction of dentate granule cells is the earliest synaptic deficit in a mouse model of Alzheimer's disease". *J. Neurosci.* 32(17):5953-5963.
- Lee H., N. Pancholi, L. Esposito, L.A. Previll, X. Wang, X. Zhu, M.A. Smith y H. Lee (2012) "Early Induction of Oxidative Stress in Mouse Model of Alzheimer Disease with Reduced Mitochondrial Superoxide Dismutase Activity". *PLoS One* 7(1):e28033
- Liu W.Y., Z.B. Wang, L.C. Zhang, X. Wei y L. Li (2012) "Tight junction in blood-brain barrier: an overview of structure, regulation, and regulator substances". *CNS Neurosc. Ther.* 18:609–615.

- Lowry O.H, N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193(1):265-275.
- Luna-López, A. (2010) "Mecanismos endógenos de generación de especies reactivas de oxígeno y respuesta celular antioxidante ante el estrés oxidativo" en Gutiérrez Robledo L.M. y J.H. Gutiérrez Ávila (eds.) "Envejecimiento humano, una visión transdisciplinaria". México. Secretaria de salud.
- Ma T., Y.B. Zhao, Y.D. Kwak, Z. Yang, R. Thompson, Z. Luo, H. Xu y F.F. Liao (2009) "Statin's excitoprotection is mediated by APP and the subsequent attenuation of calpain-induced truncation events, likely via rho-ROCK signaling". *J. Neurosci.* 29: 11226-11236
- Maher P. y A. Hanneken (2005) "Flavonoids protect retinal ganglion cells from oxidative stress-induced death". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46(12):pp. 4796-4803.
- Mahley R.W., K.H. Weisgraber y Y. Huang (2006) "Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(15):5644–5651.
- Manzano S., J.L. González, A. Marcos, M. Payno, C. Villanueva y J. Matías-Guiu (2009) "Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer". *Neurología* 24(4):255-262.
- Marengo B., C. De Ciucis, D. Verzola, V. Pistoia, L. Raffaghello, S. Patriarca, E. Balbis, N. Traverso, D. Cottalasso, M.A. Pronzato, U.M. Marinari, y C. Domenicotti (2007) "Mechanisms of BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine)-induced cytotoxic effects in neuroblastoma". *Free Radic. Biol. Med.* 1(3):474-482.
- Martínez-Sarrasague M., D.A. Barrado y M. Zubillaga (2006) "Conceptos actuales del metabolismo del glutatión; utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis". *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 40(1):45-51.
- Mason R.P., M.F. Walter y P.E. Mason (1997) "Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis". *Free Radic. Biol. Med.* 23(3):419-425.
- Meister A. (1983) "Transport and metabolism of glutathione and gamma-glutamyl amino acids". *Biochem. Soc. Trans.* 11(6):793-794.
- Menéndez S.G., N. Padrón Pérez y J.J. Llibre-Rodríguez (2002) "Péptido beta amiloide. Proteína tau y enfermedad de Alzheimer". *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 21(4):253-261.
- Mouton-Liger F., C. Paquet, J. Dumurgier, C. Bouras, L. Pradier, F. Gray y J. Hugon (2012) "Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2 α pathway". *Biochim. Biophys. Acta* 1822(6):885-896.
- Murakami K, K. Irie, H. Ohgashi, H. Hara, M. Naga, T. Shimizu y T. Shirasawa (2005) "Formation and stabilization model of the 42-mer A β radical: implications for the

long lasting oxidative stress in Alzheimer's disease". J. Am. Chem. Soc. 127(43):15168-15174.

- Nikolaev A., T. McLaughlin, D.D. O'Leary y M. Tessier-Lavigne(2009) "APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases". Nature 457:981–989.
- Ninomiya H, J.M. Roch, M.P. Sundsmo, T.A. Otero, T. Saitoh(1993) "Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid beta/A4 protein precursor that promotes fibroblast growth". J. Cell Biol. 121(4):879-886.
- Park L., J. Anrather, P. Zhou, K. Frys, R. Pitstick y C. Ladecola (2005) "NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species Mediate the Cerebrovascular Dysfunction Induced by the Amyloid Peptide". J. Neurosci. 25(7):1769–1777.
- Practicò D. (2008) "Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal". Trends Pharmacol. Sci. 29(12):609-615.
- Prince M., R. Bryce y C. Ferri (2011) "World Alzheimer Report 2011: The benefits of early diagnosis and intervention". Reino Unido. Alzheimer Association Publications.
- Puzzo D., L. Privitera, E. Leznik, M. Fa, A. Staniszewski, A. Palmeri y O. Arancio (2008) "Picomolar amyloid-positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus". J. Neurosci. 28:14537–14545.
- Qiu C. (2012) "Preventing Alzheimer's disease by targeting vascular risk factors: hope and gap". J. Alzheimer Dis. 32(3):721-731.
- Quiroz-Baez R.D., T. Montiel, K. Hernández-Ortega, P. Ferrera, L. Massieu y C. Arias (2007) "Amyloid- β protein metabolism and toxicity: Role of oxidative stress" en Santamaria A. y M.E. Jimenez (eds.) "New perspectives on brain cell damage, neurodegeneration y neuroprotective". India. Research Signpost.
- Quiroz-Baez R.D., E. Rojas y C. Arias (2009) "Oxidative stress promotes JNK-dependent amyloidogenic processing of normally expressed human APP by differential modification of α -, β - and γ -secretase expression". Neurochem. Int. 55(7):662-670.
- Ramamoorthy M., P. Sykora, M. Scheibye-Knudsen , C. Dunn, C. Kasmer, Y. Zhang, K.G. Becker, D.L. Croteau, y V.A. Bohr (2012) "Sporadic Alzheimer disease fibroblasts display an oxidative stress phenotype". Free Radic. Biol. Med. 53(6):1371-1380.
- Ramos Sánchez J. (2010) "Efecto de la deficiencia de glutatión sobre la viabilidad neuronal y el metabolismo de la proteína precursora del amiloide". Tesis de licenciatura. UNAM.

- Raz N. y K.M. Rodrigue (2006) "Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers". *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30(6):730-748.
- Reitz C. (2012) "Alzheimer's Disease and the Amyloid Cascade Hypothesis: A Critical Review". *Int. J. Alzheimer Dis.* 1-11e369808
- Reynolds C.P., J.L. Biedler, B.A. Spengler, D.A. Reynolds, R.A. Ross, E.P. Frenkel y R.G. Smith (1986) "Characterization of human neuroblastoma cells lines established before and after therapy". *J. Natl. Cancer Inst.* 76(3):375-387.
- Robakis N.K. (1994) " β -amiloid and amyloid precursor protein: chemistry, molecular biology, and neuropathology". En: Terry R.D., R. Katzman y K.L. Bick (eds.) "Alzheimer Disease". Estados Unidos. Raven Press.
- Sandbrink R., C.L. Masters y K. Beyreuther (1994) "Beta A4-amyloidprotein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons" *J. Biol. Chem.* 269:1510–1517.
- Sarasa M. (2006) "Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer". *Rev. Neurol.* 42(5):297-301.
- Sayre L.M., M.A. Smith y G. Perry (2001) "Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease". *Curr. Med. Chem.* 8(7):721-738.
- Schaeffer E.L., M. Figueiro, y W.F. Gattaz (2012) "Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models". *CLINICS* 66(1):45-54.
- Sekhar R.V., S.G. Patel, A.P. Guthikonda, M. Reid, A. Balasubramanyam, G.E. Taffet y F. Jahoor (2011) "Deficient synthesis of glutathione underlies oxidative stress in aging and can be corrected by dietary cysteine and glycine supplementation". *Am. J. Clin. Nutr.* 94(3):847-853.
- Selkoe D.J. (2001) "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy". *Physiol. Rev.* 81(2):741–766.
- Selkoe D.J. (2003) "Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman". *Neurochem. Res.* 28(11):1705–1713.
- Shen C., Y. Chen, H. Liu H, K. Zhang, T. Zhang, A. Lin y N. Jing (2008) "Hydrogen peroxide promotes A β production through JNK-dependent activation of γ -secretase". *J. Biol. Chem.* 283(25):17721-17730.

- Shi Y., P. Kirwan, J. Smith, G. MacLean, S.H. Orkin y F.J. Livesey (2012) "A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in down syndrome". *Sci. Transl. Med.* 4:124-129.
- Sinha S., J.P. Anderson, y R. Barbour (1999) "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain". *Nature* 402:537-540.
- Slater T.F., B. Sawye y U. Straeuli (1963) "Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: points of coupling of four different tetrazolium salts". *Biochim. Biophys. Acta* 8(77):383-393.
- Small D.H., H.L. Clarris, T.G. Williamson, G. Reed, B. Key, S. Mok, K. Beyreuther, C.L. Masters y V. Nurcombe (1999) "Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease". *J. Alzheimers Dis.* 1:275-285.
- Strausak D., J.F. Mercer, H.H. Dieter, W. Stremmel y G. Multhaup (2001) "Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes and Wilson disease". *Brain Res. Bull.* 55(2):175-185.
- Tai H.C., A. Serrano-Pozo, T. Hashimoto, M.P. Frosch, T.L. Spires-Jones y B.T. Hyman (2012) "The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system". *Am. J. Pathol.* 181(4):1426-1435.
- Tamagno E., M. Guglielmotto, M. Aragno, R. Borghi, R. Autelli, L. Giliberto, G. Muraca, O. Danni, X. Zhu, M.A. Smith, G. Perry, D. Jo, M.P. Mattson y M. Tabaton (2008) "Oxidative stress activates a positive feedback between the γ - and β -secretase cleavages of the β -amyloid precursor protein". *J. Neurochem.* 104(3):683-695.
- Tapia R., F. Peña y C. Arias (1999) "Neurotoxic and synaptic effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases". *Neurochem. Res.* 24(11):1423-1430.
- Vassar R., B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers y M. Citron. (1999) "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE". *Science* 286(5440):735-741.
- Wen C., M.M. Metzstein, e I. Greenwald (1997) "SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signaling". *Development* 124(23):4759-4767.
- Wenk G.L. (2003) "Neuropathologic changes in Alzheimer's disease". *J. Clin. Psychiatry.* 64:7-10
- Willem M., A.N. Garratt, B. Novak, M. Citron, S. Kaufmann, A. Rittger, B. DeStrooper, P. Saftig, C. Birchmeier y C. Haass (2006) "Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1". *Science* 314:664-666.

- Wu G., Y.Z. Fang, S. Yang, J.R. Lupton y N.D. Turner (2004) "Glutathione metabolism and its implications for health". J. Nutr. 134(3):489-492.
- Yadav R.S. y N.K. Tiwari (2014) "Lipid Integration in Neurodegeneration: An Overview of Alzheimer's Disease". Mol. Neurobiol. [Artículo en prensa]
- Yankner B.A. (1996) "New clues to Alzheimer's disease: unraveling the roles of amyloid and tau". Nat. Med. 2(8):850-852.
- Zhang H., Q. Ma, Y. Zhang y H. Xu (2012) "Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein". J. Neurochem. 120(1):9–21.
- Zhang C.y A.J. Saunders (2007) "Therapeutic targeting of the alpha-secretase pathway to treat Alzheimer's disease". Discov. Med. 7(39):113-117.