

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**APROXIMACIÓN *IN VITRO* A LA PATOGÉNESIS DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER FAMILIAR**

M^a TERESA MUÑOZ DE GALDEANO

JULIO, 2010

Memoria presentada por
M^a TERESA MUÑOZ DE GALDEANO
Para aspirar al Grado de
DOCTORA EN FARMACIA
(BIOLOGÍA MOLECULAR)

Directores de esta Tesis:

Dra. María Recuero Vicente
Doctora en Ciencias Químicas
(Biología Molecular)

y

Dr. Fernando Valdivieso Amate
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Madrid, Julio 2010

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular/Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM), gracias a una beca Financiada por Obra Social Caja Madrid.



A mis padres

A mi pequeña gran familia: Chule y Luis

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

8OHdG.....	8-hidroxi-2-deoxiguanosina
8OHG.....	8-hidroxi-guanosina
ADAM.....	Metaloproteasa de la Familia de las Desintegrinas
AICD.....	Dominio Intracelular de la Proteína APP
AIF.....	Factor Inductor de Apoptosis
APH-1.....	Fenotipo defectuoso de la Faringe Anterior 1
APOE- ϵ 4.....	Alelo ϵ 4 del gen de la apolipoproteína E
ApoE.....	Apolipoproteína E
<i>APOE</i>	Gen de la Apolipoproteína E
ApoE3.....	Isoforma E3 de la apolipoproteína E
ApoE4.....	Isoforma E4 de la apolipoproteína E
<i>APP</i>	Gen de la Proteína Precursora del β -amiloide
APP.....	Proteína Precursora del β -amiloide
APS.....	Persulfato amónico
ATCC.....	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATP.....	Adenosin 5' trifosfato
A β	Péptido β -amiloide
A β 40.....	Péptido β -amiloide (1-40)
A β 42.....	Péptido β -amiloide (1-42)
BACE.....	Proteasa que Corta en el Sitio β de la Proteína APP o β -secretasa
BACE1.....	Proteasa que Corta en el Sitio β de la Proteína APP o β -secretasa 1
BACE2.....	Proteasa que Corta en el Sitio β de la Proteína APP o β -secretasa 2
Bax.....	Bcl2 asociada a proteína X
BSA.....	Seroalbúmina bovina
cDNA.....	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
cit-C.....	Citocromo C
CO.....	Monóxido de Carbono
CO ₂	Dióxido de carbono

COX.....	Citocromo C Oxidasa
C-terminal.....	Extremo Carboxilo Terminal
CTF.....	Fragmentos carboxi terminales
DAPI.....	dicloruro de 4',6-diamino-2-fenilindol
DMSO.....	Dimetilsufóxido
DNA.....	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP.....	desoxinucleótidos trifosfato
dsRNA.....	RNA de doble cadena
EA.....	Enfermedad de Alzheimer
EDTA.....	Ácido etilen-diamino-tetraacético
ELISA.....	Inmunoensayo Ligado a Enzima
EO.....	Estrés Oxidativo
FSC.....	Suero Bovino Fetal
GAPDH.....	Gen de la gliceraldehido 3P-deshidrogenasa
GFP.....	Proteína verde fluorescente
GSK-3.....	Quinasa 3β de la Glucógeno Sintasa
H ₂ DCFDA.....	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
HEPES.....	Ácido N-(2-hidroxietil) primeracina-N'-(2-etanosulfónico)
HNE.....	4-hidroxi-2-transnonenal
HO-1.....	Proteína Hemoxigenasa-1
HSV-1.....	Virus del Herpes Simplex tipo 1
IP.....	Yoduro de Propidio
kDa.....	kiloDalton
KPI.....	Dominio Inhibidor de Serínproteasas de la familia Kunitz
MEM.....	Medio Esencial de Eagle modificado
mRNA.....	RNA mensajero
MTT.....	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADPH/NADH.....	Nicotinamida Adenín Dinucleótido Fosfato
NIA.....	Instituto Nacional del Envejecimiento

NINCDS-ADRDA.....	Instituto Nacional de Enfermedades Neurológicas y de la Comunicación y la Asociación de Enfermedad de Alzheimer y Síndromes Relacionados
NP40.....	Nonidet-P40
N-terminal.....	Extremo Amino Terminal
PARP-1.....	Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa 1
PBS.....	Tampón fosfato salino
PCM.....	Parque Científico de Madrid
PCR.....	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Pen-2.....	Reforzador de la Presenilina 2
<i>PSEN1</i>	Gen de la Presenilina 1
PSEN1.....	Presenilina 1
<i>PSEN2</i>	Gen de la Presenilina 2
PSEN2.....	Presenilina 2
PTP.....	Poros de Transición de la Permeabilidad
PVDF.....	Difluoruro de Polivinilideno
RE.....	Retículo Endoplásmico
RNA.....	Ácido Ribonucleico
RNAi.....	RNA de interferencia
RNAsa A.....	Ribonucleasa A
RNAsas.....	Ribonucleasas
ROS.....	Especies Reactivas de Oxígeno
RT-PCR.....	Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa
sAPP.....	Fragmento soluble de la proteína APP
sAPP- α	Fragmento α soluble de la proteína APP
sAPP- β	Fragmento β soluble de la proteína APP
SDS.....	sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE.....	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Presencia de SDS
SMOC.....	Servicio de Microscopía Óptica y Confocal
SNC.....	Sistema Nervioso Central
SNP.....	Sistema Nervioso Periférico

SOD.....	Superóxido Dismutasa
tau.....	Proteína asociada a microtúbulos
TEMED.....	N,N,N,N,-Tetrametil etil endiamina
TGN.....	TransGolgi
X.....	Xantina
Xo.....	Xantina oxidasa
XXo.....	Sistema Xantina/Xantina oxidasa
α -CTF.....	Fragmento α carboxi terminal
β -CTF.....	Fragmento β carboxi terminal

ÍNDICE

1.SUMMARY	41
2.INTRODUCCIÓN	45
2.1. “Sobre un proceso peculiar de enfermedad de la corteza cerebral”.....	45
2.2. Enfermedad de Alzheimer Genética.....	48
2.2.1. Proteína Precursora del Amiloide, APP.....	49
2.2.2. Presenilinas.....	53
2.3. Estrés Oxidativo en relación con la neurodegeneración en la EA.....	54
2.3.1. EA, Estrés oxidativo y Apoptosis.....	57
2.3.2. EA, Estrés oxidativo y Metabolismo/Procesamiento del APP.....	59
3.OBJETIVOS	63
4. MATERIALES y MÉTODOS	69
4.1. Reactivos.....	69
4.2. Cultivos celulares.....	70
4.2.1. Línea celular.....	70
4.2.2. Plásmidos.....	70
4.2.3. Generación de líneas celulares de neuroblastoma humano que expresan de forma estable la proteína APP ₆₉₅ humana wild type o mutante.....	71
4.2.4. Tratamiento de estrés oxidativo.....	71
4.3. Péptidos.....	72
4.4. Anticuerpos.....	73
4.4.1. Anticuerpos que reconocen la proteína APP.....	73
4.4.2. Anticuerpos que reconocen el péptido Aβ.....	73
4.4.3. Anticuerpos utilizados en la caracterización de la muerte apoptótica de los cultivos celulares.....	74

4.4.4. Otros anticuerpos.....	74
4.4.5. Anticuerpos secundarios.....	75
4.5. Sondas Fluorescentes.....	75
4.6. Preparación de las muestras celulares.....	76
4.6.1. Obtención de lisados celulares totales.....	76
4.6.2. Obtención de medios condicionados de los cultivos celulares.....	76
4.7. Análisis de las proteínas.....	77
4.7.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).....	77
4.7.2. Inmunomarcado después de electroforesis en geles de poliacrilamida (“ <i>Western Blot</i> ”).....	77
4.8. Ensayo de la viabilidad celular.....	78
4.8.1. Ensayos de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).....	78
4.9. Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	79
4.10. Análisis por citometría de flujo.....	79
4.11. Determinación de las actividades α y β secretasas por ensayo fluorimétrico.....	80
4.12. Ensayo Inmunocitoquímica.....	80
4.13. Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA).....	81
4.14. Análisis de la expresión génica diferencial por RT-PCR en placa.....	81
4.14.1. Aislamiento del RNA total.....	81
4.14.2. Síntesis de c-DNA por retrotranscripción.....	82
4.14.3. PCR cuantitativa específica para HO-1.....	82
4.14.4. PCR cuantitativa específica para APP, APP _{WILD TYPE} y SK-APP _{SWE}	82
4.15. Análisis de la expresión génica por microarrays de DNA.....	83
4.15.1. Análisis estadístico de los resultados.....	84

4.16. Silenciamiento génico por la técnica de interferencia en el RNA (RNAi): transfección de “shRNA”	84
4.16.1. Fundamento de la Técnica de RNAi.....	84
4.16.2. Transfección mediante nucleofección de plámidos codificando shRNAs específicos de HO-1.....	85
4.17. Análisis estadístico.....	86
5.RESULTADOS.....	91
5.1. Generación de líneas celulares neuronales de expresión de APP.....	91
5.1.1. Generación y caracterización del neuroblastoma humano SK-N-MC transfectado establemente con cDNA APP-695 _{WILD TYPE} y cDNA APP-695 _{SWEDISH} (KM670/671NL)....	91
5.1.2. Caracterización de la expresión de APP en las líneas celulares establemente transfectadas.....	93
5.2. Consecuencias del EO sobre la muerte celular en las líneas SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE}	97
5.2.1. Efecto del EO y de la mutación “Swedish” en la viabilidad celular.....	97
5.2.2. Efecto del EO y la mutación APP “Swedish” sobre la muerte celular apoptótica: degradación del sustrato de caspasa, PARP Poli(ADP-ribosa) polimerasa y activación de caspasa-3.....	101
5.2.3. Cuantificación de la muerte celular por EO de las líneas celulares SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE} en presencia de EO.....	103
5.3. Metabolismo y procesamiento del APP en el modelo celular de EA familiar: línea SK-APP _{SWE} en presencia de EO.....	106
5.3.1. Metabolismo y Procesamiento del APP en presencia del EO.....	107
5.3.1.1. Niveles de holoAPP y fragmento N-terminal APP secretado (sAPP)	
5.3.1.2. Fragmentos C-terminales derivados del APP: α , β y γ -CTFs.....	110
5.3.1.3. Actividad β -secretasas.....	112

5.3.1.4. Niveles de las especies del péptido A β secretado: A β 40 y A β 42..	113
5.3.1.5. Localización intracelular de los fragmentos derivados del APP: sAPP- α y CTFs.....	114
5.3.2. Efecto de la expresión de la mutación “Swedish” y el EO en el metabolismo/ procesamiento del APP.....	116
5.3.2.1. Niveles de holoAPP y fragmento APP secretado (sAPP).....	116
5.3.2.2. Fragmentos derivados del APP: α , β -CTFs.....	120
5.3.2.3. Actividades α y β -secretasas.....	122
5.3.2.4. Localización intracelular de los fragmentos derivados del APP: sAPP intracelular y CTFs.....	124
5.4. Análisis genómico/funcional del modelo celular de EA familiar.....	130
5.4.1. Estudio de la expresión génica diferencial mediante microarrays de DNA..	130
5.4.2. Análisis de la sobreexpresión de HO-1 en la línea celular SK-APP _{SWE}	133
5.4.2.1. Análisis de los niveles de mRNA HO-1 mediante ensayos de RT-PCR.....	133
5.4.2.2. Detección y cuantificación de los niveles de la proteína HO-1.....	134
5.5. Estudio funcional de la HO-1 en la línea SK-APP _{SWE}	135
5.5.1. Silenciamiento del gen <i>HMOX-1</i> en la línea celular SK-APP _{SWE} mediante la técnica de RNA de interferencia.....	135
5.5.2. Efecto de la inhibición de la expresión de HO-1 sobre la viabilidad celular de la línea SK-APP _{SWE}	138
6. DISCUSIÓN.....	143
6.1. Generación y caracterización del modelo neuronal de expresión de APP wild type y mutante.....	143
6.2. Consecuencias del EO sobre la muerte celular en las líneas SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE}	145
6.3. Consecuencias del EO sobre el metabolismo/procesamiento del APP.....	148

6.4. Alteraciones en el metabolismo/procesamiento del APP en el modelo celular de EA familiar.....	153
6.5. Análisis genómico/funcional del modelo celular de EA familiar.....	157
6.6. Hipótesis sobre los mecanismos patogénicos en la EA familiar.....	160
7.CONCLUSIONES.....	165
8.BIBLIOGRAFÍA.....	171
ANEXO I: contenido en formato CD	

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

I.1	Imágenes de una tomografía de emisión de positones (PET) de enfermos de EA.....	46
I.2	Lesiones características de la EA.....	47
I.3	Mutaciones de la proteína APP.....	49
I.4	Proteína APP isoforma 770.....	50
I.5	Procesamiento (Metabolismo) de la proteína APP y producción del péptido β amiloide ($A\beta$)....	52
I.6	Tráfico de membrana de la proteína APP.....	53
I.7	Las modificaciones oxidativas afectan a todas las macromoléculas celulares.....	55
I.8	Degradación molecular del oxígeno.....	56
I.9	Producción de estrés oxidativo.....	57
M.1	Mecanismo de acción de los RNA de interferencia.....	85
R.1	Análisis de las colonias wild type seleccionadas después de la transfección con el cDNA del APP ₆₉₅ wild type humano por su resistencia a geneticina.....	92
R.2	Observación al microscopio óptico de las líneas celulares estables SK-pCDNA3, SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE}	92
R.3	Observación al microscopio óptico de las líneas celulares estables SK-pCDNA3, SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE/LON}	93
R.4	Caracterización de la expresión de la proteína APP en las líneas celulares establecidas SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE}	94
R.5	Caracterización de la expresión de la proteína APP en las líneas celulares establecidas SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE/LON}	95
R.6	Estudio de la expresión génica del APP _{WT} y APP _{SWE}	95
R.7	Estudio de la expresión génica del APP _{WT} y APP _{SWE/LON}	96
R.8	Efecto del EO sobre la viabilidad de las líneas celulares SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE}	98
R.9	Efecto del EO sobre la viabilidad de las líneas celulares SK-pCDNA3, SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE/LON} (S/L).....	99

R.10 Efecto del sistema XXo sobre la producción de ROS en los cultivos celulares SK-pC, SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE}	100
R.11 Incremento por EO de la señal apoptótica dependiente de caspasas en las líneas celulares SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE}	102
R.12 Incremento por EO de la señal apoptótica dependiente de caspasas en las líneas celulares SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE/LON}	103
R.13 Análisis por citometría de flujo de la apoptosis en las líneas celulares SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE} en presencia de EO.....	104
R.14 Análisis por citometría de flujo de la apoptosis en las líneas celulares SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE/LON} en presencia de EO.....	105
R.15 El EO incrementa los niveles intracelulares del fragmento N-terminal del APP (sAPP intracelular) en la línea celular parental SK-N-MC.....	107
R.16 Daño celular inducido por el sistema XXo en la línea SK-N-MC.....	109
R.17 Efecto del EO sobre la secreción de sAPP- α en la línea celular SK-N-MC.....	109
R.18 El sistema XXo incrementa los niveles de los fragmentos C-terminales de APP en la línea parental SK-N-MC.....	111
R.19 Actividad β -secretasa en la línea parental SK-N-MC expuesta al sistema XXo.....	112
R.20 Efecto del EO sobre la secreción de las especies 1-40 y 1-42 del péptido A β	113
R.21 Acumulación de los fragmentos N- y C- terminales derivados de la proteína APP, tras la exposición al EO de la línea celular C2.....	114
R.22 El EO induce la acumulación intracelular del fragmento sAPP- α en las líneas celulares SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE} , previa a la muerte celular.....	116
R.23 El EO produce un incremento en el APP celular en la línea celular SK-APP _{SWE} al tiempo de muerte celular.....	117
R.24 Efecto del EO sobre la secreción de sAPP- α en las líneas celulares SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE} previo a la muerte celular.....	118
R.25 El EO induce una disminución del sAPP- α extracelular en la línea celular SK-APP _{SWE} al tiempo de muerte celular.....	119
R.26 Incremento de los fragmentos C-terminales - α y - β en condiciones de EO en las líneas celulares estables SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE}	121

R.27 Efecto del EO sobre las actividades α y β -secretasa en las líneas celulares SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE}	123
R.28 Detección de los fragmentos del APP (sAPP- α y CTFs) en respuesta al EO.....	124
R.29 Acumulación de los fragmentos derivados de la proteína APP tras la exposición al EO en el tiempo de muerte celular reducida (24 horas) en las líneas celulares SK-APP _{WT} y SK-APP _{SWE}	125
R.30 Aumento en la acumulación de fragmentos C-terminales y pérdida de la señal sAPP- α en la línea SK-APP _{SWE} expuesta al EO hasta el tiempo de muerte celular (48 horas) en comparación con la línea SK-APP _{WT}	127
R.31 Incremento en la señal de co-localización lisosomal de fragmentos C-terminales en la línea SK-APP _{SWE} expuesta al EO al tiempo de muerte celular (48 horas) en comparación con la línea SK-APP _{WT}	129
R.32 Cambio de la expresión génica en la línea celular SK-APP _{SWE} en presencia de EO analizado por Microarray de cDNA.....	131
R.33 Cambio de la expresión génica en la línea celular SK-APP _{SWE} en ausencia de EO analizado por Microarray de cDNA.....	131
R.34 RT-PCR cuantitativa específica para el mRNA de HO-1.....	133
R.35 Sobreexpresión de la proteína HO-1 en la línea celular SK-APP _{SWE}	134
R.36 Alta eficiencia de transfección por nucleofección de la línea SK-APP _{SWE} con el plásmido de expresión del shRNA específico para HO-1.....	136
R.37 Eficacia de la transfección del plásmido de expresión shRNA-HO-1 en la línea celular SK-APP _{SWE}	137
R.38 Efecto del silenciamiento de HO-1 en la viabilidad celular de la línea celular SK-APP _{SWE} en condiciones basale y de EO.....	138
R.39 Efecto del silenciamiento de HO-1 en la viabilidad celular de las células SK-APP _{SWE} expuestas al EO.....	139
D.1 Hipótesis sobre los mecanismos patogénicos en la EA familiar.....	161-162

ÍNDICE DE TABLAS

M.1 Mutaciones APP.....70

M.2 Secuencia de los oligonucleótidos APP_{WT} y APP_{SWE}.....83

ÍNDICE DE ESQUEMAS

M.1 Reacción radicalaria mediada por la xantina.....72

R.1 Epítomos de los anticuerpos 22C11 y anti C-terminal en la proteína APP.....93

R.2 Estructura de la proteína APP y epítomos de reconocimiento de los anticuepos utilizados.....108

R.3 La vía catabólica del grupo hemo.....132

SUMMARY

1. SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that appears under two forms: the late form or sporadic Alzheimer disease (SAD) and the early form or familial Alzheimer disease (FAD). The FAD is a dominant autosomal disease caused by mutations in the APP, PS-1 and PS-2 genes. On the other hand, the age is the risk factor better established for the AD and oxidative stress (OS) associated is considered an earliest event for the disease. In order to investigate the effects, in the neuronal death and in the APP metabolism/processing, produced by APP mutations in the presence of OS we generated stably transfected cellular lines of an human neuroblastoma expressing the wild type APP and the "Swedish" (KM670/671NL) APP. Our results, using the free radical generating system xanthine/xanthine oxidase, demonstrated that the APP mutations sensitize the cells to the damage induced by the OS. Also, we have studied the APP metabolism/processing in our FAD cellular model: the "Swedish" APP expression in combination with OS. We found that the OS alone regulates the APP metabolism/processing, modulating the production of the amino terminal proteolytic fragment (soluble extracellular APP, sAPP α) and of the intracellular carboxyl terminal fragments: α CTF (non amyloidogenic) and β CTF (amyloidogenic). Regarding the FAD cellular model we found that the cellular response in the APP metabolism/processing was altered. Corroborating, alterations related with OS response in the mutant cellular line, the genomic study of the FAD model revealed the overexpression of the heme oxygenase-1 (HO-1) gene, an enzyme related with the AD; finally, with the functional analysis using the novel technique of gene silencing, we found that the inhibition of the HO-1 expression, in the mutant cell line, increased the neuronal death by the OS. The present results show a dynamic cellular model for the study of FAD, whose altered mechanisms could serve as therapeutic target in the AD.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCION.

2.1. “Sobre un proceso peculiar de enfermedad de la corteza cerebral”

Así es como el Dr. Alois Alzheimer (1864 -1915) daba a conocer el primer caso de una forma diferente de demencia en la conferencia de psiquiatría en Tübingen (Alemania), el 3 de Noviembre de 1906. En este trabajo, el Dr. Alzheimer describió los síntomas desarrollados por la paciente Auguste D., de 51 años, que presentaba una rápida pérdida de memoria y una desorientación espacio-temporal. Murió a los cuatro años y medio del comienzo de la enfermedad (Moller y cols. 1998; Small y cols. 2006). En 1910, Kraepelin la nombraría como “Enfermedad de Alzheimer” (EA).

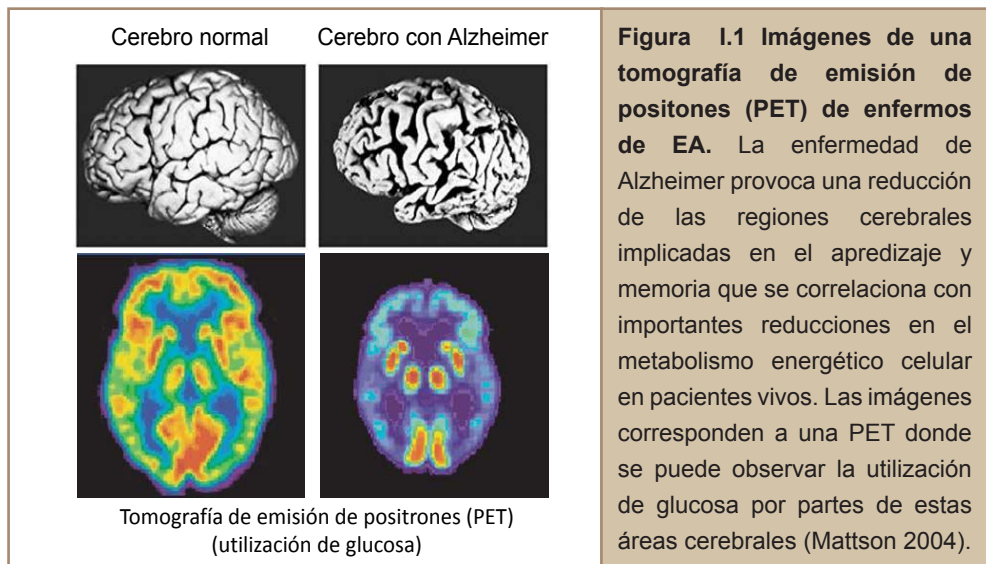
La demencia se conoce como un síndrome caracterizado por un deterioro intelectual que ocurre en adultos que, en casos severos, puede incluso interferir en las relaciones laborales y sociales. Estos cambios cognitivos incluyen no sólo desórdenes en la memoria sino que además, el deterioro en otras áreas cognitivas como el uso del lenguaje, la percepción, la praxis y la habilidad para aprender diferentes acciones cotidianas, resolución de problemas, pensamientos abstractos y realizar juicios, entre otros (Katzman 1986).

Así, la de Alzheimer, ha llegado a ser la enfermedad neurodegenerativa del siglo XXI. Hoy en día sabemos que es la forma más común de demencia, ocupando el 50-60% de los casos y se establece como el mayor problema de salud pública debido al incremento en la expectativa de vida del mundo occidental (Selkoe 2001; Blennow y cols. 2006). Además, su prevalencia es de aproximadamente un 1% en la población de 60 a 64 años, duplicándose cada 4 ó 5 años, llegando hasta un tercio de la población mayor de 80 años y la mitad de la población de 95 o más años (Fratiglioni y cols. 1999; Selkoe 2001; Nestor y cols. 2004; Blennow y cols. 2006).

Un avance importante en la evaluación de la EA fue la fundación del Instituto Nacional del Envejecimiento (*NIA*, del inglés *Nacional Institute of Aging*) que junto con otras instituciones afines, lograron adoptar un consenso para unificar las pruebas de diagnóstico de la enfermedad. Con todo ello, desarrollaron una escala de valoración de la misma (NINCDS-ADRDA) estableciéndose, por primera vez, el criterio para la valoración clínica de la EA, estructurándola en tres categorías: posible, probable y definitiva (esta última con confirmación histopatológica) (McKhann y cols. 1984; Jellinger 2006).

Las características clínicas de la EA siguen siendo las descritas en su día por el Dr. Alzheimer: afasia (pérdida de la capacidad del habla), apraxia (incapacidad total o parcial de realizar movimientos voluntarios) y agnosia (alteración de la percepción que incapacita al paciente para

reconocer personas, objetos o sensaciones que antes eran familiares). Las regiones cerebrales implicadas en el aprendizaje y en la memoria, incluyendo los lóbulos frontal y temporal, están reducidos en tamaño como consecuencia de la degeneración de las sinapsis y muerte de las neuronas.



El progreso de la enfermedad daña de forma selectiva, además, circuitos neurológicos críticos para los procesos anteriormente descritos, incluyendo las neuronas del neocórtex, hipocampo, amígdala, el sistema colinérgico del cerebro anterior y el núcleo monoaminérgico del tallo cerebral (Price y cols. 1998). Utilizando todos los métodos posibles y disponibles de diagnóstico como son los neuropsicológicos, la neuroimagen -resonancia magnética, tomografía de emisión de positrones (PET) (Mueller y cols. 2005)- y junto con otros biomarcadores característicos de la EA en plasma y líquido cerebroespinal podemos acotar con relativo éxito el diagnóstico de la EA (Blasko y cols. 2005; Mueller y cols. 2005; Castano y cols. 2006; van Oijen y cols. 2006). Pero al existir otras enfermedades que cursan con pérdida de memoria, el diagnóstico definitivo de la EA requiere el examen *post-mortem* del cerebro del paciente, el cual debe contener el número suficiente tanto de placas seniles como de ovillos neurofibrilares (Mattson 2004).

“La microscopía de los tejidos tratados con la tinción de Bielschowsky, mostró una degeneración notablemente peculiar de las células nerviosas corticales caracterizándose, esencialmente, por una aglomeración de fibrillas que cambiaron sus propiedades de tinción y resistiendo a la desintegración celular, quedando como los únicos remanentes de la célula. Además, había un número extraordinario de parches peculiares diseminados a lo largo de toda la corteza” (Alzheimer 1911; Alzheimer y cols. 1991). Así quedaban descritas las dos lesiones típicas que hoy definen la EA:

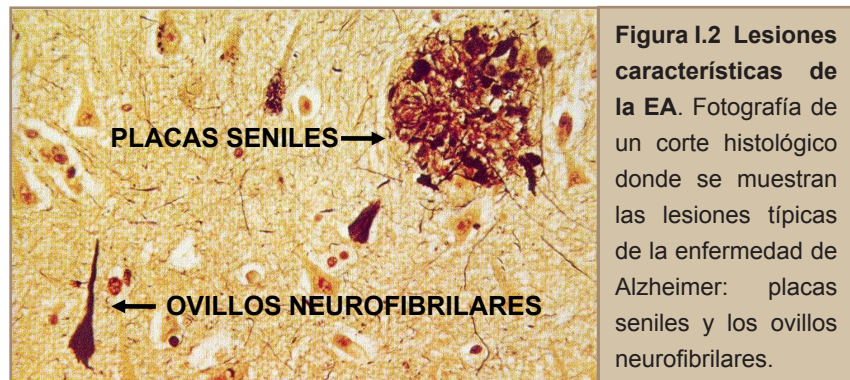


Figura 1.2 Lesiones características de la EA. Fotografía de un corte histológico donde se muestran las lesiones típicas de la enfermedad de Alzheimer: placas seniles y los ovillos neurofibrilares.

Ovillos neurofibrilares: lesiones intracelulares en los que la proteína asociada al citoesqueleto, tau, se encuentra hiperfosforilada y, debido a ello, plegada de forma anómala (Morishima-Kawashima y cols. 2002).

Placas Seniles: lesiones extracelulares producidas por el depósito y agregación de un péptido de 40-43 aminoácidos, denominado péptido β -amiloide (péptido A β), derivado del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del amiloide (APP) (Allsop y cols. 1983; Glenner y cols. 1984; Masters y cols. 1985).

Atendiendo a la edad de aparición de los síntomas y a la forma de herencia, podemos diferenciar dos tipos de EA. Así, hablamos de **EA familiar o monogénica** cuando observamos una herencia autosómica dominante con una penetrancia prácticamente del 100%; o bien de **EA esporádica** cuando, a pesar de encontrar cierta agregación familiar, no encontramos ningún patrón de herencia mendeliano, considerando esta forma de EA una enfermedad multifactorial donde hallamos tanto factores de riesgo genéticos como no genéticos implicados en su patogénesis, si bien la cantidad y la proporción de los mismos todavía no están determinadas.

En 1993 dos grupos de investigación independientes encontraron una asociación entre el alelo $\epsilon 4$ de gen de la Apolipoproteína E (ApoE, proteína; APOE, gen) y la EA (Corder y cols. 1993; Poirier y cols. 1993). El alelo $\epsilon 4$ de este transportador de colesterol en el cerebro, aumenta el riesgo de la forma esporádica en tres veces para individuos heterocigotos y en 15 veces para individuos homocigotos (Farrer y cols. 1997), manteniéndose además en todas las poblaciones analizadas, por lo que se considera el factor de riesgo genético mejor definido para la EA esporádica pero no siendo ni necesario ni suficiente para desarrollar la misma. Además del alelo $\epsilon 4$, nuestro grupo ha descrito distintos polimorfismos de riesgo para la enfermedad a lo largo de la región promotora del gen de APOE, indicándonos que cambios en los niveles de expresión de determinados genes también pueden influir en los mecanismos patogénicos de la enfermedad (Bullido y cols. 1998; Artiga y cols. 1998a; Artiga y cols. 1998b).

Entre los factores de riesgo no genéticos encontramos la edad avanzada debido a que el envejecimiento asociado a la misma se reconoce como uno de los pasos previos al daño neuronal (Amaducci y cols. 1994), el sexo femenino (Fischer y cols. 1991), traumatismo craneal severo con pérdida de conocimiento (Graves y cols. 1990), enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo asociados a las mismas tales como hiperlipidemias o diabetes (Breteler 2000) y ciertas infecciones como la del *Herpes Simplex* tipo I (HSV-1) (Itzhaki y cols. 1997).

Atendiendo a esto último, los trabajos del grupo de la Dra. Itzhaki sugirieron que la combinación de la presencia de genoma de HSV-1 en el cerebro y ser portador del alelo APOE- ϵ 4 confiere un riesgo muy fuerte para el desarrollo de la EA (Itzhaki y cols. 2004). Por otro lado, nuestro laboratorio observó que la isoforma 4 de ApoE (ApoE4) es más eficiente que la isoforma 3 (ApoE3) para transportar el virus hasta el cerebro en su ruta hematógica (Ramírez Moreno 2006), y que la llegada al cerebro de este virus es dependiente de los niveles de ApoE (Burgos y cols. 2002).

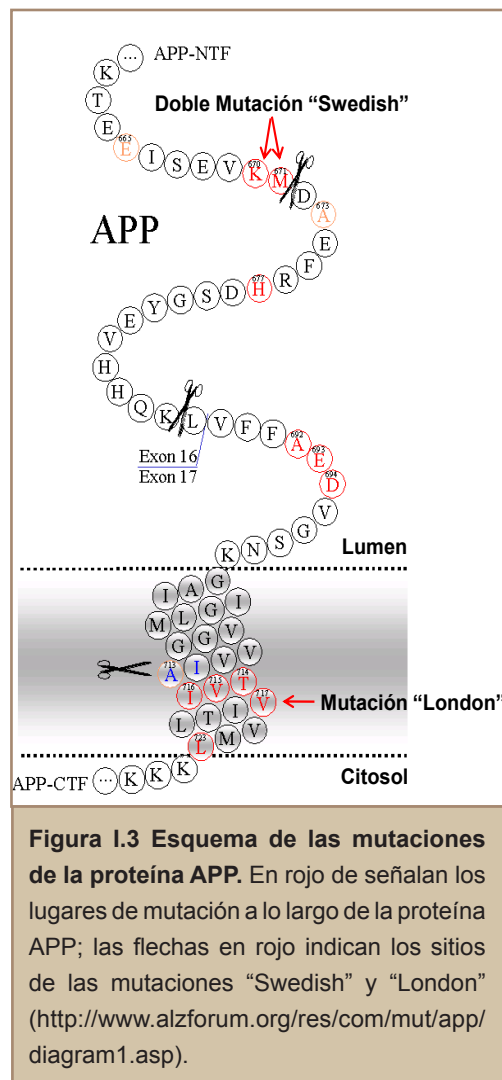
En cuanto a la edad de aparición de los síntomas, la EA familiar presenta una aparición presenil, antes de los 60-65 años; mientras que los síntomas de la EA esporádica aparecen a partir de los 65 años en adelante. Si hablamos en porcentaje, la forma familiar de la EA correspondería a un 5% de la totalidad de casos, mientras que la forma esporádica abarcaría un 95% de los casos (Corder y cols. 1993).

Pero, a pesar de las diferencias entre los dos tipos de EA, queda claro que ante el análisis de casos familiares *versus* casos esporádicos, las dos formas son fenotípicamente muy parecidas, incluso indistinguibles, salvo por la temprana aparición de los síntomas de la EA familiar, anteriormente citada. Igualmente, las manifestaciones clínicas de la EA familiar son parecidas o similares de los de la EA esporádica. Esta equivalencia entre los dos tipos de EA sugiere fuertemente que ambas formas pueden compartir mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo y evolución de la enfermedad (Selkoe 2001).

2.2. Enfermedad de Alzheimer Genética

Tres son los loci hasta ahora conocidos que son claves en la etiopatogénesis de la EA familiar: el gen de la proteína precursora del amiloide (APP, proteína; *APP*, gen) situado en el cromosoma 21 (Goate y cols. 1991), el gen de la Presenilina 1 (PSEN1, proteína; *PSEN1*, gen) situado en el cromosoma 14 (Sherrington y cols. 1995) y el gen de la Presenilina 2 (PSEN2, proteína; *PSEN2*, gen) situado en el cromosoma 1 (Levy-Lahad y cols. 1995a). Hasta la fecha, se han encontrado en diferentes familias de EA, 27 mutaciones en el gen del APP, 157 mutaciones en el gen de la PSEN1 y 10 mutaciones en el gen de la PSEN2 (*Alzheimer Disease & Frontotemporal dementia Mutation Database*, available at <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/default.cfm>). Todas las

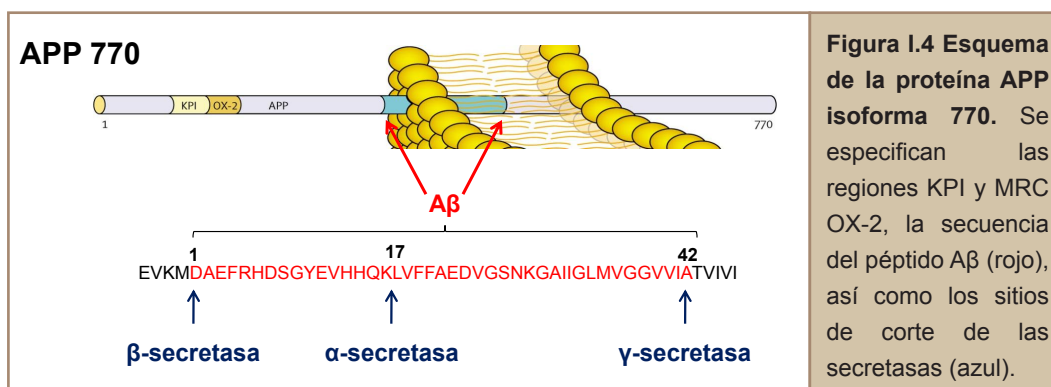
mutaciones producidas a lo largo de estos tres genes alteran el metabolismo del APP de una forma precisa: aumentan la producción de la especie -formada por 42 aminoácidos- de A β menos soluble y, por tanto, de mayor poder de agregación que conforman el núcleo de las placas seniles (Hardy 1997).



2.2.1. Proteína precursora del amiloide, APP:

En 1987, el grupo de Kang aisló y secuenció por primera vez la proteína precursora del amiloide (APP) (Kang y cols. 1987) la cual, forma parte de una larga familia de proteínas de transmembrana cuya expresión constitutiva y su conservación evolutiva se ve en muchos tipos celulares (Selkoe y cols. 1987; Johnstone y cols. 1991). En cuanto a las funciones que se le atribuyen encontramos propiedades tróficas, adhesión celular y posible función de receptor de membrana (Thinakaran y cols. 2008). En concreto, estamos ante una proteína integral de membrana tipo I, cuya estructura primaria presenta una gran similitud a la de dichos receptores de superficie, con una secuencia señal, un único dominio de transmembrana y un pequeño tallo citoplasmático (Newton y cols. 2006).

El gen del APP está localizado en el cromosoma 21(21q21.2-3) y contiene 19 exones, de los cuales, el 7, 8 y 15 pueden sufrir un procesamiento alternativo dando lugar a 10 isoformas diferentes (Yoshikai y cols. 1990) (<http://us.expasy.org/uniprot/P05067>). Las tres isoformas más relevantes en la EA son el **APP₇₅₁**, **APP₇₇₀** -ambas expresadas en tejidos tanto del sistema nervioso central (SNC) como periférico (SNP)-, y **APP₆₉₅** -restringida exclusivamente a tejidos del SNC-. El APP₇₅₁ contiene en el ectodominio, un inserto de 56 aminoácidos -codificado por el exón 7- con homología con el inhibidor de serín proteasas de la familia Kunitz (KPI) (Tanzi y cols. 1988); asimismo la isoforma APP₇₇₀ contiene la secuencia completa de APP, y además del dominio KPI, incluye un dominio de 19 aminoácidos semejante al antígeno MRC OX-2 de neuronas y timocitos, codificado por el exón 8 (Clark y cols. 1985); y por último, la isoforma APP₆₉₅ carece tanto del dominio KPI como MRC OX-2 (Golde y cols. 1990). Las tres isoformas contienen la secuencia codificada por los exones 16 y 17, correspondientes al péptido A β , del que los 28 aminoácidos N-terminales están localizados en el dominio extracelular, y el resto, en el dominio transmembrana de la proteína APP, por tanto, las tres tienen la capacidad de generar péptido A β , al ser procesadas proteolíticamente por las APP secretasas.



A modo de resumen diremos que han sido identificados dos sitios principales de corte proteolítico cerca de la membrana y otro más, dentro de ella -tomando como referencia el extremo amino de la proteína APP- que reciben el nombre de sitios de corte α , β y γ , respectivamente (Turner y cols. 2003). Estos cortes son llevados a cabo por tres enzimas llamadas α , β y γ -secretasas.

Así, α -secretasa ha sido identificada como una zinc metaloproteínasa que corta el APP entre los residuos Lys613-Leu614 de su secuencia de aminoácidos. Existen diferentes candidatos " α -secretasa", siendo todos pertenecientes a la familia de las ADAM (del inglés *a disintegrin and metalloproteinase family*). Estructuralmente, las ADAM son proteínas integrales de membrana tipo 1 con una estructura multidominio que incluye: un péptido señal, un pro-dominio, un dominio catalítico metaloproteínasa, un dominio rico en desintegrina/cisteína, un dominio de transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático.

Una vez sintetizadas, las ADAM son transportadas al aparato de Golgi, donde su pro-dominio es eliminado por las furinas, activándose así su actividad proteasa. Tras este procesamiento, ADAM se localiza en la superficie de la membrana plasmática, donde se ha visto que procesa numerosas moléculas de adhesión celular, factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento (Huovila y cols. 2005). Dos de las proteínas de esta familia, ADAM10 y ADAM17, son candidatos para α -secretasas que cortarán al APP en su sitio α . Las dos ADAM citadas se expresan en cerebro, ADAM10 en neuronas mientras que ADAM17 lo hace principalmente en células de la glia (Suzuki y cols. 2006). Además del procesamiento del APP, ADAM10 participa en la regulación del crecimiento de neuritas en células de mamíferos (Maretzky y cols. 2005) y ratones transgénicos deficientes en ADAM10 mueren con múltiples disfunciones incluidas las del sistema nervioso central (Hartmann y cols. 2002)

BACE (*beta-site APP-cleaving enzyme*) es una aspartil proteasa de transmembrana tipo I que tiene dos homólogos: BACE1 y BACE2. Diversos estudios han demostrado que BACE1 se expresa en mayor cantidad en neuronas y es por tanto allí, donde presentan su actividad β -secretasa (Dominguez y cols. 2005). Una vez sintetizada, BACE1 es transportada hacia al aparato de Golgi donde sufrirá el corte de su pro-dominio -mediante una furina proteasa dependiente de calcio- activándose así su actividad proteasa, y una N-glicosilación y fosforilación en su dominio citoplasmático, siendo este último dominio de gran importancia para que se dé este paso de maduración de BACE1 (Capell y cols. 2000). Ya en la membrana citoplasmática, BACE1 es internalizada dentro de endosomas donde su actividad β -secretasa ha sido localizada (Kinoshita y cols. 2003). Así, BACE madura es transportada en vesículas endosomales hasta el APP donde lo cortará en su sitio β . Ahora bien, en neuronas, todavía no está claro si BACE1 es transportada a través de los cuerpos axonales o por el contrario es transportada principalmente en el compartimento somatodendrítico (Lazarov y cols. 2005).

Y por último, la γ -secretasa es una aspartil proteasa con una secuencia de baja especificidad que corta al APP en su dominio de transmembrana. Este enzima forma parte de un complejo que se encuentra formado por APH-1, Nicastrina, PSEN1 o PS-2 y Pen-2 (Jacobsen y cols. 2009). Estos componentes de membrana asociados, se ensamblan de forma ordenada durante el tráfico de membrana entre el Retículo Endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi, formando así el sitio activo del complejo γ -secretasa (Takasugi y cols. 2003).

Procesamiento proteolítico del APP

El APP sufre primero el corte de β - o α -secretasa en el dominio extracelular, liberándose un fragmento C-terminal de la proteína cuyo tamaño se diferencia tan sólo en 17 aminoácidos, dependiendo del enzima que actúe. Este fragmento C-terminal que queda anclado a la membrana -C99, si el corte es de β - y C83 si es de α -secretasa- será procesado por la γ -secretasa, originando

desde el fragmento C99, las especies de A β 1-40 y 1-42 mayoritariamente junto con el fragmento y C-terminal o AICD (del inglés *amyloid intracelular domain*) de 6 kDa; esto es lo que se denomina **Ruta Amiloidogénica**. Para el fragmento C83 ocurre lo mismo salvo que en este caso el péptido originado es mucho más pequeño, llamado p3, generándose también el AICD; esto es lo que se denomina **Ruta No Amiloidogénica** (Turner y cols. 2003; Thinakaran y cols. 2008).

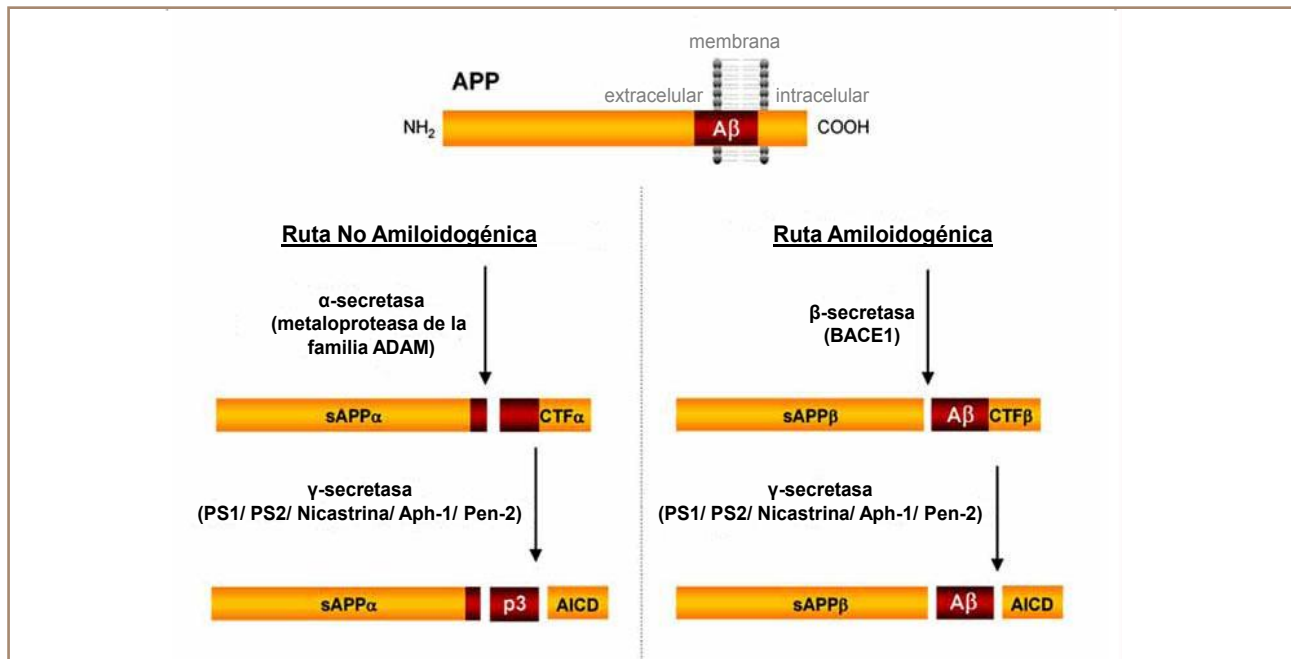
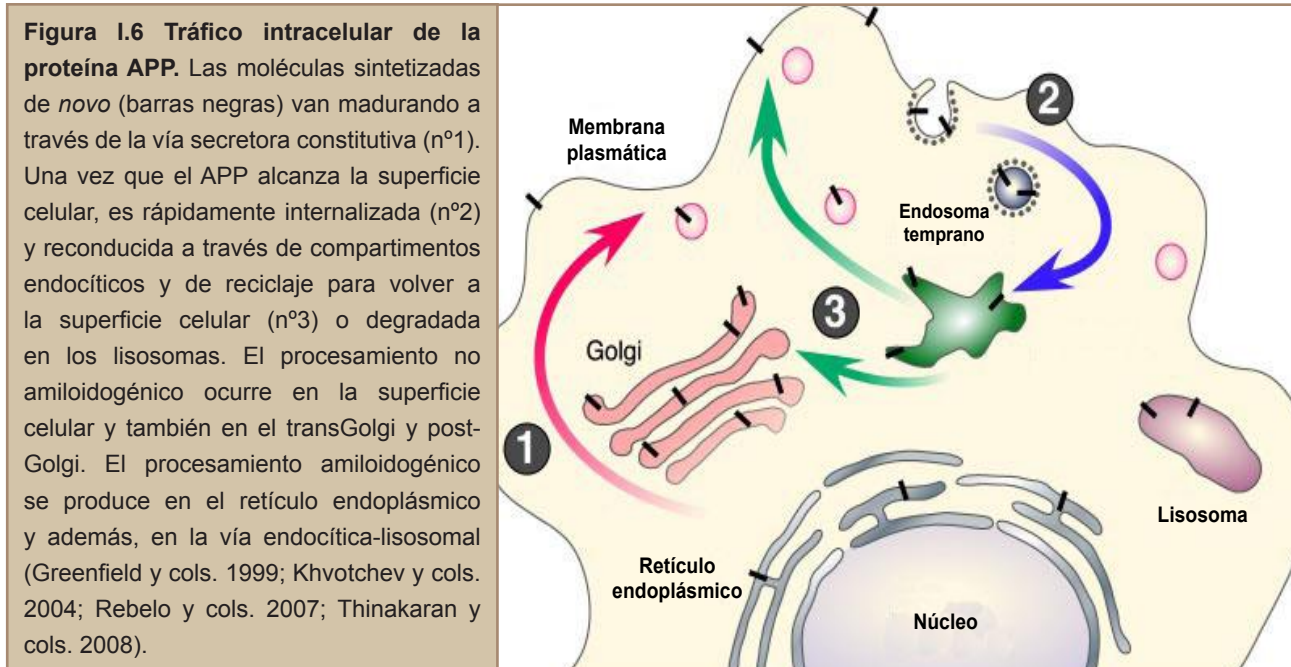


Figura I.5 Procesamiento (Metabolismo) de la proteína APP y producción del péptido β -amiloide (A β). En la ruta no amiloidogénica, el APP es proteolizado por la α -secretasa. El fragmento soluble generado, sAPP- α , es liberado al medio extracelular mientras que el fragmento C-terminal (α -CTF) permanece anclado a la membrana. Este último será proteolizado por el complejo γ -secretasa, originando un pequeño fragmento llamado p3 y el fragmento C-terminal de dominio intracelular (AICD o γ -CTF). En la ruta amiloidogénica, el corte proteolítico del APP por la β -secretasa, origina el fragmento soluble sAPP- β que es liberado al medio extracelular. El fragmento β -CTF anclado a la membrana es posteriormente proteolizado por el complejo γ -secretasa. Este último corte conduce hacia la producción del péptido A β y al AICD (Nathalie y cols. 2008).

El APP puede estar localizado en numerosas estructuras membranosas de la célula tal y como el RE, compartimentos del Golgi, y la propia membrana celular (Schubert y cols. 1991; Shigematsu y cols. 1992; Caporaso y cols. 1994). La proteína APP recién sintetizada, madura a través de la ruta secretora constitutiva, siendo N- y O-glicosilada -en los compartimentos celulares anteriormente citados- y sulfatada en los residuos de tirosina (Dyrks y cols. 1988; Refolo y cols. 1989), así como fosforilada en sus dominios extracelular y citoplásmico (Oltersdorf y cols. 1990; Walter y cols. 1997). Tras este proceso de maduración, las vesículas de membrana que contienen APP son transportadas a lo largo del cuerpo axonal para luego sufrir un proceso de transcitosis que las llevará hacia las dendritas (Suzuki y cols. 2006). Después de alcanzar la membrana celular, el APP puede sufrir un proceso de re-internalización en los lisosomas para ser sometido a un proceso de procesamiento proteolítico (Haass y cols. 1992; Suzuki y cols. 2006). Ahora bien, el sitio celular exacto donde se

lleva a cabo dicho procesamiento, no está claro aunque si se sabe que en metabolismo del APP se ve afectado por el estado en el que se encuentre la vía secretora de las proteínas (Stokin y cols. 2005).



1.2.2. Presenilinas:

Las presenilinas 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2) son proteínas integrales de membrana con ocho posibles dominios transmembrana y un lazo hidrofílico entre los dominios 6 y 7 y en las que el extremo N-terminal, el lazo hidrofílico y el extremo C-terminal se encuentran orientados hacia el citoplasma (Doan y cols. 1996; De Strooper y cols. 1997; Li y cols. 1998).

El gen *PSEN1* se encuentra en el cromosoma 14 (Sherrington y cols. 1995) y el gen de *PSEN2* en el cromosoma 1 (Rogaev y cols. 1995; Levy-Lahad y cols. 1995a). Las mutaciones en estos genes son autosómicas dominantes, con una gran penetrancia, y con aparición de los síntomas de EA antes de los 65 años, incluso en algunos casos, dicha aparición se presentan antes de los 30 años de edad (Vetrivel y cols. 2006). En cuanto a su situación subcelular, la PSEN1 ha sido localizada en múltiples organelas incluyendo el RE, compartimentos intermedios del RE/Golgi, el aparato de Golgi, endosomas, lisosomas, fagosomas, membrana plasmática y mitocondria (Vetrivel y cols. 2006).

PSEN1 y PSEN2 forman parte del complejo proteico γ -secretasa, equipando a dicho complejo del sitio catalítico enzimático. Este complejo en forma de barril y anclado en la membrana celular, lo completan la proteína transmembrana tipo I, Nicastrina y las proteínas de transmembrana tipo II, Aph-1 y Psen-2 (Selkoe y cols. 2007). Pero, a pesar de que esta sea su función principal, la PSEN1 está implicada en otros procesos celulares mediados por la interacción con otras proteínas.

La lista incluye: miembros de la familia de proteínas armadillo, incluida β -Catenina; la proteína de membrana de la superficie celular, E-cadherina; la quinasa 3β de la glucógeno sintasa, GSK-3; proteína asociada a microtúbulos, tau; molécula anti-apoptótica Bcl-X_l y β -secretasa, BACE-1 entre otras (Thinakaran y cols. 2004).

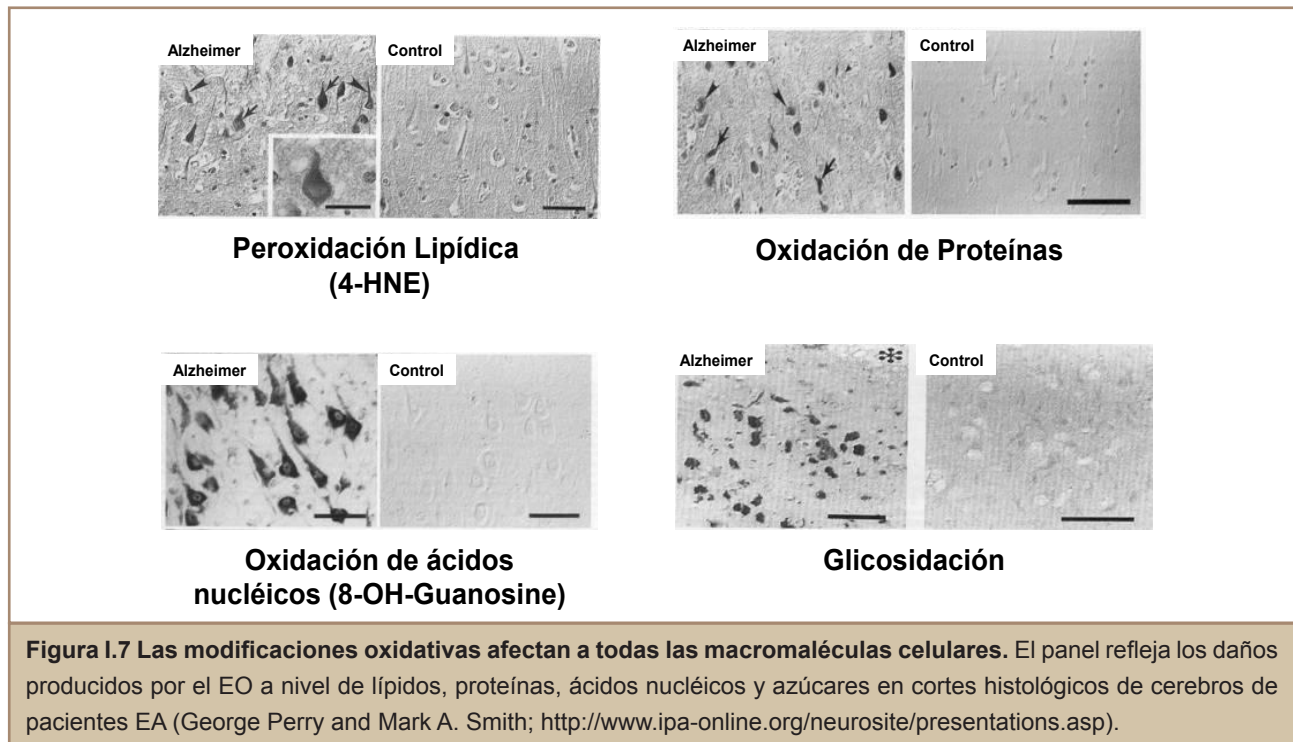
2.3. Estrés oxidativo en relación con la neurodegeneración en la EA

El estrés oxidativo (EO) está definido como el desequilibrio entre aquellos procesos bioquímicos que conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *oxygen reactive species*), y los correspondientes mecanismos de eliminación de dichos ROS, llamados cascadas antioxidantes (Sayre y cols. 2008).

El órgano más aeróbico que existe en el cuerpo humano, debido a su alta tasa metabólica, es el cerebro. Aunque éste sólo representa el 2% del total de la masa corporal, consume un 20% del oxígeno total (Moreira y cols. 2008). Además de este hecho, el cerebro es especialmente vulnerable al daño oxidativo debido también a su alto contenido en ácidos grasos insaturados fácilmente peroxidados; a que es rico en hierro, que al acumularse por efecto del envejecimiento, este puede actuar como un potente catalizador en la formación de ROS; y por último a la escasez en enzimas anti-oxidantes en comparación con otros órganos: su contenido en catalasa es sólo 10-20% del hígado o el corazón (Floyd y cols. 2002; Mattson y cols. 2002); la glutatión transferasa -cuya responsabilidad es la eliminación de 4-hidroxi-2-transnonenal (HNE) provenientes de la peroxidación de lípidos- se encuentra disminuida en distintas regiones cerebrales de pacientes EA; la superóxido dismutasa (SOD) -el mayor mecanismo de defensa contra posibles daños celulares producidos por ROS- muestra unos niveles elevados en su expresión en cerebros EA si los comparamos con cerebros control; la hemoxigenasa 1 (HO-1) -que oxida grupos hemo para la producción de biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ion hierro- co-localiza con astrocitos GFAP-positivos, ovillos neurofibrilares y placas seniles (Moreira y cols. 2008). Todo esto provoca en estas células quiescentes bien una disfunción permanente bien una salida hacia la apoptosis.

La edad es el mejor factor de riesgo establecido para la EA y el EO asociado a ella, se considera un evento proximal en esta enfermedad (Gibson y cols. 2005). Numerosos estudios revelan que el EO precede en el tiempo a las principales manifestaciones neuropatológicas de la EA. Dichas modificaciones oxidativas se han visto en los estadios tempranos de la enfermedad, considerándose que la oxidación de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos son cambios tempranos de la misma, pudiendo ser detectados tanto en fluidos provenientes de pacientes EA como en modelos celulares y animales de esta enfermedad (Smith y cols. 2000; Nunomura y cols. 2006). Así, la oxidación del DNA y RNA puede ser detectado por el aumento en los niveles de 8-hidroxi-2-

deoxiguanosina (8OHdG) y 8-hidroxiguanosina (8OHG); el de las proteínas, por elevados niveles de proteínas carboniladas y de nitrotirosina; la peroxidación lipídica, por altos niveles de malonaldehído e isoprostanos; y la oxidación de los azúcares, por un aumento en proteínas glicadas y glicosiladas (Sayre y cols. 2008).



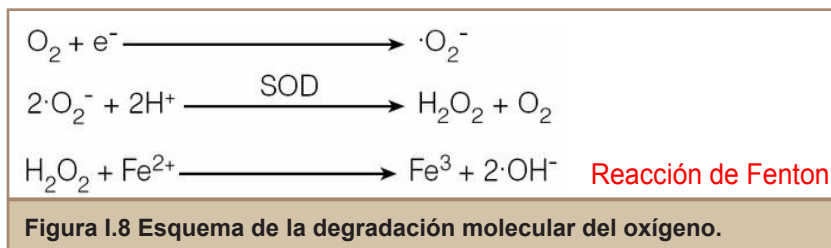
Diferentes grupos de investigación han descrito que incluso mutaciones implicadas en la EA familiar causan EO. La muerte celular y/o una reducción en las defensas anti-oxidantes inducidas por EO han sido demostradas en: líneas celulares que expresan APP mutante, PSEN1 o PSEN2 (Eckert y cols. 2001a); ratones transgénicos que expresan APP mutante humano y/o PSEN1; ratones “*knock in*” para PSEN1 mutante humana (Takahashi y cols. 2000; Schuessel y cols. 2006); en fibroblastos y linfoblastos de pacientes de EA familiar con mutaciones en el gen del APP y PSEN1 (Cecchi y cols. 2002) así como en muestras de córtex cerebral de dichos pacientes (Bogdanovic y cols. 2001; Nunomura y cols. 2004).

I. Fuentes generadoras de ROS

La mitocondria juega un papel crucial en la supervivencia de las células neuronales o en su muerte después de un daño en el sistema nervioso central (SNC) porque regula tanto el metabolismo energético de la célula como sus vías apoptóticas. Así, dicha producción de energía viene acompañada por la generación de ROS, como subproductos de los procesos de fosforilación

oxidativa llevada a cabo por la mitocondria. Inevitablemente, si las cantidades de ROS no se eliminan correctamente, provocarían un desequilibrio en las cascadas antioxidantes, aparecería el EO y consecuentemente, el daño neuronal (Moreira y cols. 2008). Por tanto, la habilidad de las células para la detoxificación de los ROS es clave para su homeostasis interna y su supervivencia.

En la mitocondria se estima que el 2-4% del oxígeno consumido durante el transporte de electrones no se reduce a agua por la citocromo C oxidasa, sino que se forma el anión semiquinona, que puede transferir uno o dos electrones al oxígeno molecular con la posterior formación del anión superóxido (O_2^-). Además de este origen, el O_2^- puede provenir de metaloenzimas mutadas o dañadas, que participen en el metabolismo oxidativo. El O_2^- puede ser transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y por la reacción de Fenton junto con iones de metales de transición -tales como Fe(II) o Cu(II)-, el peróxido de hidrógeno puede ser transformado en radicales hidroxilos (Sayre y cols. 2008).



En relación con la EA, diversos estudios han observado daños en la mitocondria, siendo el defecto más consistente de todos ellos, el déficit en enzimas esenciales responsables del metabolismo de los ROS tales como el complejo de α -ketoglutarato dehidrogenasa, el complejo piruvato dehidrogenasa o la citocromo oxidasa. Todas estas anomalías conducen a la producción de ROS (Su y cols. 2008).

Como fuentes exógenas generadoras de ROS en los organismos, son: antibióticos, medicamentos (p.e. paracetamol), contaminantes (p.e. dióxido de nitrógeno, ozono, humo del cigarro), quimioterapia y la exposición a radiaciones ultravioleta o ionizantes (Finkel y cols. 2000).; existen otras fuentes de O_2^- y de H_2O_2 , son las enzimas oxidativas, como la xantina oxidasa, las NADPH/ NADH oxidasas, la acil CoA oxidasa, los citocromos P-450, y pequeñas moléculas autooxidables tales como las catecolaminas y las quinonas (Dalton y cols. 1999; Gamaley y cols. 1999).

II. Efectos fisiopatológicos de los ROS

Los efectos fisiopatológicos derivados de la acción de estos productos del EO pueden desarrollarse por los siguientes mecanismos:

1. El radical libre del producto primitivo puede alquilar diferentes componentes tisulares tales como membranas celulares, RE, enzimas produciendo necrosis o déficit metabólico, o de defensa, o transtornos en la división celular (cáncer) por alteración de los ácidos nucleicos (Repetto 1997).
2. Las formas de “oxígeno activado” actúan preferentemente oxidando fuertemente los lípidos celulares -especialmente los insaturados- y también los compuestos con grupos SH -como el glutatión-, iniciando lo que se conoce como EO, que da lugar a procesos inflamatorios y citotóxicos (Repetto 1997).



2.3.1. EA, estrés oxidativo y apoptosis

A modo de recordatorio diremos que la apoptosis se considera como la muerte celular programada que ocurre normalmente en casi todos los tejidos del organismo. Por este mecanismo, aquellas células que presentan alguna disfunción o están dañadas son eliminadas de ese tejido sin perturbar de modo adverso a las demás células que le rodean.

Brevemente, tras una *upregulation* y/o translocación de proteínas pro-apoptóticas -tales como p53, Bax y Par-4- hacia la mitocondria, se produce en esta, la formación del poro de transición de la permeabilidad (PTP, del inglés *permeability transition pore*) liberando así citocromo C (cit-C) y/o el factor inductor de apoptosis (AIF, del inglés *apoptosis-inducing factor*) al citosol. Este hecho provoca

la activación de las cistein proteasas llamadas caspasas -en particular, la 3 y 9- que tienen como sustrato numerosas proteínas citoplasmáticas, nucleares y proteínas asociadas a membrana. Por último, en la membrana citoplasmática, la fosfatidilserina se transloca desde en interior al exterior de la bicapa lipídica, ejerciendo de señal de reconocimiento para la eliminación de la célula apoptótica por parte de los macrófagos y microglía (Mattson 2006).

Aunque existen diferentes fuentes de ROS, la mayor de dichas fuentes es la cadena respiratoria mitocondrial. La muerte neuronal inducida por el EO agrupa tanto necrosis como apoptosis; la forma de muerte dependerá del grado y severidad en que se haya producido el daño oxidativo (Onyango y cols. 2006). Dicha disfunción mitocondrial ha sido descrita en cerebros de pacientes de Alzheimer (Hirai y cols. 2001) y ha sido propuesta como un mecanismo subyacente en la patogénesis de la enfermedad desde que el defecto en el metabolismo energético es un componente importante en la EA (Beal 1995; Blass y cols. 1999). Este defecto viene provocado por una deficiencia en citocromo C oxidasa (COX) -el defecto más consistente hasta ahora descrito en las enzimas que participan en el transporte de electrones mitocondrial para la EA-. La disfunción en la COX provoca un incremento de ROS, reduce las reservas energéticas y perturba el metabolismo energético (Mutisya y cols. 1994; Smith y cols. 1996; Davis y cols. 1997) lo que conduce a un deterioro en el funcionamiento en la cadena transportadora de electrones (Stewart y cols. 2000); este hecho provoca un descenso en la producción de ATP, un incremento en la formación de radicales libres tóxicos, y una alteración en la homeostasis del calcio.

Todos los acontecimientos enumerados anteriormente, desembocan en la oxidación del DNA mitocondrial -observado en cerebros de pacientes EA y contribuyen a la formación de péptidos con mayor poder de agregación (Smith y cols. 2000; Shan y cols. 2003)- oxidación de proteínas y lipidos -proteínas nitradas han sido localizadas en el hipocampo y neocórtex de pacientes EA (Smith y cols. 1997) fibroblastos y linfoblastos de pacientes EA familiar muestran un incremento de productos de lipoperoxidación en comparación con muestras de pacientes control (Cecchi y cols. 2002)- y una apertura en el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (Halliwell 1999), lo que termina en la iniciación del proceso de muerte neuronal por apoptosis.

Diferentes estudios de investigación han evidenciado mecanismos relacionados con el procesamiento del APP, producción del A β , localización extra/intracelular del mismo, etc, pero verdaderamente, los mecanismos responsables que subyacen a la masiva degeneración y muerte de células neuronales de cerebros de los pacientes, en los estadios tempranos de la EA familiar, se nos presentan desconocidos.

Si partimos del hecho de que el EO y la producción de ROS son eventos proximales a esta enfermedad y que las mutaciones relacionadas con la EA, aumentan este EO, la pregunta que surge es ¿cuáles son los pasos que inician la cascada bioquímica que conducen a la muerte neuronal? Dicha cuestión está siendo dirigida a través de los estudios *in vitro* e *in vivo* realizados por los diferentes grupos de investigación.

2.3.2. EA, estrés oxidativo y metabolismo/procesamiento del APP

Los resultados obtenidos con el estrés oxidativo producido por diferentes tratamientos celulares, tales como hiperglucemia, glutamato, proteínas príon, perturbación en la homeostasis del calcio (Mattson 2002; Ferreiro y cols. 2006; Tahirovic y cols. 2007; Schaeffer y cols. 2008) y la hipoxia crónica (Guglielmotto y cols. 2009) refuerzan la hipótesis de que el estrés oxidativo es una vía común básica de acumulación de A β .

Por otro lado, Nordstedt y cols. observaron que la edad incrementaba el contenido tanto en la isoforma madura del APP como en los C-terminales amiloidogénicos, pudiendo relacionar y dar al mismo tiempo, una explicación de la conexión de la EA y la edad (Nordstedt y cols. 1991). Además, se ha demostrado, a través de diferentes estudios, que el incremento de la expresión del APP y sus fragmentos C-terminales se asocian con el proceso de muerte neuronal ya que en modelos *in vivo* se ha podido observar que dichos fragmentos C-terminales del APP quedan acumulados en el núcleo celular, uniéndose a las proteínas adaptadoras del núcleo Fe65 y CP2, alterando el proceso de transcripción de proteínas (Chang y cols. 2005). La translocación de los fragmentos C-terminales al núcleo también se relacionan con la muerte neuronal en modelos *in vivo* de otros grupos de investigación (DeGiorgio y cols. 2000). Además recientemente se ha descrito que además del A β intracelular también el fragmento C-terminal de 99 aminoácidos induce muerte celular apoptótica dependiente de mitocondria (Park y cols. 2009).

Por primera vez en nuestro laboratorio, nos disponemos a ofrecer resultados sobre cómo el EO influye de manera muy directa en el metabolismo y procesamiento del APP. A través de cultivos *in vitro*, hemos estudiado las consecuencias de los radicales libres originados a partir del sistema Xantina/Xantina oxidasa (XXo) en el metabolismo/procesamiento del APP.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Sabemos que mutaciones en tres genes -APP (Goate y cols. 1991), PSEN1 (Sherrington y cols. 1995) y PSEN2 (Rogaev y cols. 1995; Levy-Lahad y cols. 1995a)- son los responsables de la mayoría de los casos de EA de naturaleza génica y herencia autosómica dominante, aunque la totalidad de los casos de dicha enfermedad son esporádicos (Nussbaum y cols. 2003). Ésta última forma de EA tiene causas desconocidas, probablemente porque es heterogénea y debida al envejecimiento en concierto con otros factores genéticos y ambientales.

Precisamente, el envejecimiento es el factor de riesgo más óbvio de la enfermedad y tanto el estrés oxidativo (EO) que lleva asociado como el daño oxidativo provocado parece ser el primer acontecimiento en la EA (Moreira y cols. 2005; Nunomura y cols. 2006). El EO se define como el desequilibrio entre los procesos bioquímicos que conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), por tanto, la capacidad de la célula de destoxificar los ROS es crucial para la homeostasis y su supervivencia (Harman 1981). Lo que está menos claro es la naturaleza del mecanismo que liga la muerte celular y el EO, por lo que son de gran interés los estudios de las posibles alteraciones celulares que ocurren en presencia de este estrés.

Además, la exposición al EO conduce a un aumento -dependiente de la edad- en los niveles celulares de proteínas, de lípidos y de ácidos nucleicos modificados oxidativamente; esto predispone al organismo al desarrollo de desórdenes relacionados con la edad en los que se produce deterioro en la función cognitiva y posteriormente, una integridad metabólica afectada (Stadtman 2002).

Por todo lo expuesto anteriormente, nos pareció muy interesante el desarrollo de un modelo de neurodegeneración basado en la EA familiar combinando mutaciones en un gen implicado en la EA familiar con el principal factor de riesgo de la EA, el EO asociado a la edad. Este modelo sería de gran utilidad para el estudio de los mecanismos patogénicos implicados en la EA.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

I. Definición del modelo celular de EA familiar.

1. Generación y caracterización de líneas neuronales que expresen establemente APP wild type y mutante.
2. Estudio de la muerte celular por medio de la monitorización de marcadores celulares asociados a procesos apoptóticos, inducidos por el EO.

II. Estudio del metabolismo y procesamiento del APP en el modelo celular de EA familiar:

1. Consecuencias del EO en el metabolismo/procesamiento del APP.
2. Consecuencias de la combinación del EO y la expresión de la proteína APP mutante en el metabolismo/procesamiento del APP.

III. Estudios genómico/funcional del modelo celular de EA familiar:

1. Análisis de expresión génica diferencial.
2. Silenciamiento de gen(es) relevante(s).

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES y MÉTODOS

4.1. REACTIVOS

Todos los reactivos empleados en el desarrollo de esta Tesis son de grado analítico.

Los siguientes reactivos fueron suministrados por **Merck**: cloruro sódico (NaCl), ácido clorhídrico (HCl), glicerol, glicina, acetato sódico, bromuro de etidio, citrato sódico, cloruro magnésico ($MgCl_2$), hidróxido sódico (NaOH), EDTA, etanol, metanol, citrato sódico y paraformaldehído.

Los siguientes reactivos fueron suministrados por **Sigma**: suero bovino fetal, seroalbúmina bovina (BSA), beta-mercaptoetanol, dimetilsulfóxido (DMSO), Triton X-100, deoxicolato sódico, N-dodmci- -D maltosa, Ponceau S, Hepes, dicloruro de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), fluoruro sódico (NaF), ortovanadato sódico, ácido ocadaico, Trizima base y sodio dodecil sulfato (SDS).

Los siguientes reactivos fueron suministrados por **BioRad**: acrilamida, bisacrilamida, azul de bromofenol, TEMED y persulfato amónico (APS).

Los siguientes reactivos fueron suministrados por **Fluka**: Nonidet-P40 (NP40)

Los siguientes reactivos fueron suministrados por **GibcoBRL**: agarosa.

Los siguientes reactivos fueron suministrados por **Calbiochem**: Tween-20.

Los siguientes reactivos fueron suministrados por **Roche**: Inhibidores de proteasas.

Los siguientes reactivos fueron suministrados por **Nestlé**: leche desnatada en polvo.

Los reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa fueron suministrados: Amplitaq DNA polimerasa, tampón de reacción 10X y $MgCl_2$ por **Biotoools** y desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) por **Applied Biosystem**.

Además de los reactivos generales mencionados se han empleado otros más específicos cuya procedencia se indica en los apartados correspondientes.

4.2. CULTIVOS CELULARES

4.2.1. Línea celular:

En la realización de este trabajo se han utilizado las células de neuroblastoma humano, SK-N-MC (ATCC, Ref. HTB-10), que se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM) y fueron suplementadas con el 10% de suero bovino fetal (FSC), glutamina 2mM, piruvato 1mM, aminoácidos no esenciales (alanina, aspártico, glutamina, prolina y asparragina) y una mezcla de antibióticos (estreptomicina y penicilina G). Se cultivaron a 37°C e una atmósfera humidificada de CO₂ al 7%.

4.2.2. Plásmidos:

Todos los plásmidos han sido secuenciados en el Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid (PCM), verificando así la presencia de las correspondientes mutaciones.

Los plásmidos utilizados para la transfección de las células, pCDNA3-APP^{695 WILD TYPE}, pCDNA3-SK-APP^{SWEDISH} (K670M/N671L) y pCDNA3-SK-APP^{SWEDISH/LONDON} (K670M/N671L+V717I) fueron suministrados, amablemente, por el Dr. Jordi Pérez-Tur y la Dra. Karen Jansen, de la Clínica Mayo (Departamento de Farmacología; Jacksonville, Florida, USA).

APP 695	595/596	641	642
APP 770	670/671	715	717
Wild type	K/M	I	V
Swedish	N/L	I	V
Swedish/London	N/L	I	I

Tabla M.1 Mutaciones APP. La numeración superior corresponde a la isoforma de APP 695 y la inferior a la isoforma 770. Se indica la posición de los aminoácidos exactos donde se producen las mutaciones en cada isoforma. Los aminoácidos que aparecen en rojo son aquellos que han mutado con respecto a los que conforman la proteína wild type. Se indica, además, el nombre de la familia donde se han descrito dichas mutaciones.

4.2.3. Generación de líneas celulares de neuroblastoma humano que expresan de forma estable la proteína APP₆₉₅ humana wild type o mutante.

Varios cultivos de SK-N-MC se transfectaron con los siguientes plásmidos:

- pCDNA3 sin inserto.
- pCDNA3-APP_{695 WILD TYPE}
- pCDNA3-APP_{695 SWEDISH} (KM670/671NL).
- pCDNA3-APP_{695 SWEDISH/LONDON} (KM670/671NL+V717I).

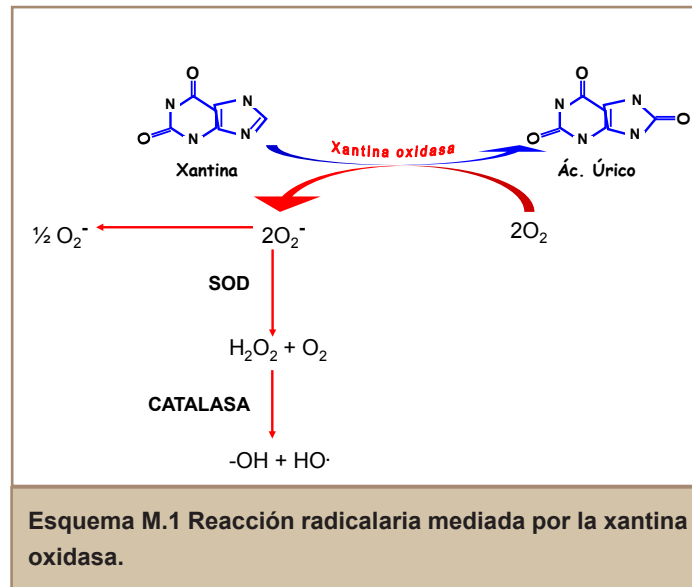
La transfección se llevó a cabo con 15 µg de DNA plasmídico, mediante el método de transfección con fosfato cálcico (Sambrook 1989) durante 15 horas. Transcurrido ese tiempo, el medio fue sustituido por medio completo y, 6 horas después, las células se sembraron a diluciones 1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000 sobre placas P100; cumplidas 24 horas, se añadió Geneticina (Gibco) para la selección de las colonias, a una concentración final de 400 µg/ml. Se realizaron cambios de medio cada 3-4 días, añadiendo siempre su antibiótico de selección. Las colonias seleccionadas por su resistencia a geneticina fueron expandidas y el nivel de expresión de la proteína APP fue analizado mediante un ensayo de inmunomarcado después de electroforesis con el anticuerpo 22C11. Aquellas colonias SK-APP_{WT} o SK-APP_{SWE} que expresaban una cantidad de proteína similar fueron crecidas y establecidas como líneas celulares. Además, para confirmar que dichos niveles de proteína correlacionaban con niveles de RNA mensajero (mRNA), las líneas celulares establecidas fueron sometidas a un análisis de RT-PCR específica para APP (ver apartado 3.11.3. de Materiales y Métodos)

4.2.4. Tratamiento de estrés oxidativo:

Según el tipo de placa utilizada para cada experimento, la densidad celular a la que sembramos las células fue diferente. Así, en placas de M-6 fue de 5×10^5 células/pocillo; en M-24 fue de 2×10^5 ó $1,5 \times 10^5$ según experimento; y para una M-96 fue de 2×10^4 .

Cuando dichos cultivos celulares se encuentran en una confluencia de aproximadamente el 75-80%, procedimos al cambio de medio, por medio fresco -para crear las mismas condiciones metabólicas en cada pocillo- durante 1h. Transcurrido ese tiempo, el medio vuelve a ser renovado bien por medio fresco (control), bien por medio con tratamiento a las concentraciones y tiempos establecidos para cada ensayo.

Para la inducción del EO, se utilizó el sistema xantina/ xantina oxidasa: el stock de xantina (X: Sigma) se prepara a una concentración de 0.1M en NaOH (1N); la xantina oxidasa (Xo) fue suministrada por Roche. Las concentraciones óptimas de X y Xo fueron previamente establecidas (Vicente Cenzano 2007; Recuero y cols. 2009).



4.3. PÉPTIDOS

Aβ40 (Beta amiloide [1-40]): Se obtuvo de Quality Controlled Biochemicals, Inc. (QCB, Inc.) y corresponde a la secuencia:



Aβ42 (Beta amiloide [1-42]): Se obtuvo de Quality Controlled Biochemicals, Inc. (QCB, Inc.) y corresponde a la secuencia:



Los péptidos liofilizados se reconstituyeron en agua miliQ estéril a una concentración final de 0.25 mM.

4.4. ANTICUERPOS

4.4.1. Anticuerpos que reconocen la proteína APP

22C11. El clon 22C11 es un anticuerpo monoclonal de ratón (Chemicon International, Inc.) que reconoce un epítipo de la región N-terminal, correspondiente a los aminoácidos 66-81, de la proteína APP (Hilbich y cols. 1993). El anticuerpo MAB 438 se ha utilizado para inmunomarcado después de electroforesis y para inmunocitoquímica a una concentración final de 0.25 µg/ml.

Anti-APP, C-terminal. Anti-APP C-terminal es un anticuerpo policlonal de conejo (Sigma-Aldrich) que reconoce un epítipo de la región C-terminal, correspondiente a los aminoácidos 676-695 de la proteína APP, tanto de su forma total como de sus fragmentos originados en su procesamiento proteolítico. Se utilizó para inmunomarcado después de electroforesis a una dilución de 1:2000 y en inmunocitoquímica a una dilución de 1:50.

6E10. 6E10 es un anticuerpo monoclonal de ratón en su forma de ascites (Covance) que es específico para los residuos 1-16 de la secuencia de Aβ humano. Se ha utilizado para inmunomarcado después de electroforesis a una dilución final de 1:400 y para inmunocitoquímica a una dilución final de 1:100.

4.4.2. Anticuerpos que reconocen el péptido Aβ

R208 y R224. Los anticuerpos R208 y R226 son anticuerpos policlonales de conejo que reconocen específicamente los péptidos Aβ40 y Aβ42, respectivamente. Ambos fueron amablemente cedidos por el Dr. P.D. Mehta, del *State Institute for Basic Research* de Nueva York. Se utilizaron para ensayos de ELISA a una dilución de 1:2500.

4.4.3. Anticuerpos utilizados en la caracterización de la muerte apoptótica de los cultivos celulares

Anti-fragmento p85 de la proteína PARP-1. Anti-fragmento p85 de la proteína PARP-1 es un anticuerpo policlonal de conejo (Promega) que reconoce el fragmento de 85 kDa originado en el procesamiento proteolítico de PARP (*poly ADP-ribose polymerase*) que tiene lugar durante la muerte por apoptosis. El anticuerpo no reconoce la proteína entera de 116 kDa. Se utilizó para inmunomarcado después de electroforesis a una dilución de 1:500.

Anti-Caspasa-3. Anti-Caspasa-3 es un anticuerpo policlonal de ratón (Cell-Signaling) que reconoce el fragmento de la caspasa-3 activa (17-19 kDa), no reconociendo a ni la proteína entera ni otros fragmentos de otras caspasas. Se utilizó para inmunomarcado después de electroforesis a una dilución de 1:500.

4.4.4. Otros anticuerpos

Anti-HO-1 (Hsp32). Anti-HO-1 (Hsp32) es un anticuerpo policlonal de conejo (MBL) que reconoce a la proteína HO-1. Se utilizó para inmunomarcado después de electroforesis a una dilución de 1:1000.

Anti-CD63. Anti-CD63 es un anticuerpo monoclonal de ratón (Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biology, The University of Iowa, 028 Biolog Building East; Iowa City, IA 52242) del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC) del CBMSO. Se utilizó en inmunocitoquímica a una dilución 1:50.

Anti- α -tubulina. Anti- α -tubulina (clon B-5-1-2) es un anticuerpo monoclonal de ratón (Sigma) que reconoce un epítipo C-terminal de la isoforma α de la tubulina. Se utilizó para inmunomarcado después de electroforesis a una concentración final de 0.1 μ g/ml.

4.4.5. Anticuerpos secundarios

Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse (Sigma-Aldrich): dilución utilizada para inmunocitoquímica 1:500

Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit (Sigma-Aldrich): dilución utilizada para inmunocitoquímica 1:500

Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse (Sigma-Aldrich): dilución utilizada para inmunocitoquímica 1:500

Anti monoclonal acoplado a peroxidasa (Vector Laboratories): dilución utilizada para inmunotransferencia proteica 1:50000

Anti policlonal acoplado a peroxidasa (Nordic): dilución utilizada para inmunotransferencia proteica 1:10000

4.5. SONDAS FLUORESCENTES

4.5.1. Dihidrocloreuro de 4',6'-Diamidino-2-fenilindol: El dihidrocloreuro de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) es un agente fluorescente, permeable en la membrana, que se une de forma reversible al surco menor del DNA de doble cadena, formando un complejo estable cuya fluorescencia es 20 veces mayor que la del DAPI no unido a DNA. El DAPI unido a DNA se excita a una longitud de onda de 364 nm y emite a una longitud de onda de 454 nm. Se utilizó en inmunocitoquímica. Fue solubilizado en agua a una concentración de 5 mg/ml y se utilizó a una concentración de 5 µg/ml

4.5.2. Yoduro de propidio: El yoduro de propidio (IP, Molecular Probes) es un agente intercalante de DNA y RNA uniéndose a ellas de forma estequiométrica, cuando la integridad de la membrana plasmática está dañada (Darzynkiewicz y cols. 1994), utilizado habitualmente para determinar el contenido de DNA en estudios de ciclo celular; la presencia de contenido de DNA menor que 2C (contenido hipodiploide) indica existencia de células apoptóticas. El yoduro de propidio se excita a una longitud de onda de 535 nm y emite a una longitud de onda de 617 nm. Se utilizó en el análisis por citometría de flujo a una concentración final de 0.15 mM.

4.5.3. Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína: El diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA, Molecular Probes) es un compuesto no polar que difunde rápidamente en las células, donde es hidrolizado por esterasas intracelulares al derivado no fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína. La sonda reacciona preferentemente con peróxido de hidrógeno e iones superóxido (Bass y cols. 1983; Cathcart y cols. 1983; Royall y cols. 1993). La oxidación de la sonda genera un producto polar y fluorescente -2',7'-diclorofluoresceína- que se excita a una longitud de onda de 502 nm y emite a una longitud de onda de 523 nm. Se utilizó a una concentración final de 30 µM, estando el stock a una concentración de 30 mM en DMSO.

4.6. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS CELULARES

4.6.1. Obtención de lisados celulares totales

Las células, en las condiciones que se indican en cada apartado correspondiente, se recogieron de la placa y se lavaron con PBS 1x mediante centrifugación a 310 x g, durante 5 minutos. Posteriormente, fueron lisadas directamente en tampón de muestra que contiene Tris-HCL 25 mM pH 6,3, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.01%. Las muestras se calentaron a 100°C durante 3 minutos y posteriormente se congelaron a -70°C hasta su utilización.

4.6.2. Obtención de medios condicionados de los cultivos celulares

A los medios condicionados (5 ml de medio por placa de P-100 ó 2 ml de medio por pocillo de placa M-6) se les añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini EDTA-free, Roche) y se centrifugaron a 310 x g durante 5 minutos. Tras esto, los sobrenadantes ya clarificados se concentraron mediante liofilización durante 24h, siendo después reconstituidos en PBS 1x en un volumen tal, que quedaran concentrados 10 veces respecto a los medios recogidos. Una vez reconstituidos, se congelaron a -70°C hasta su utilización.

4.7. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS

4.7.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se realizó según el método discontinuo de Laemmli (Laemmli 1970). Se utilizaron geles concentradores al 3% en acrilamida y geles separadores de porcentaje de acrilamida variable (8, 10, 12, 15 ó 10-16%) en función del peso molecular de las proteínas a analizar. Se usaron los patrones de alto peso molecular Precision Plus Protein Standards™ (BioRad); y de bajo peso molecular Low-Range Rainbow Molecular Weight Markers™ (Amersham Bioscience).

4.7.3. Inmunomarcado después de electroforesis en geles de poliacrilamida (“*Western Blot*”)

La inmunotransferencia se realizó de acuerdo con el método de Harlow y Lane (Harlow 1988). Brevemente, las proteínas resueltas en los geles de poliacrilamida-SDS tal y como se describe en el apartado anterior, se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa (BioRad) con un tamaño de poro de 0.45 μm o bien a un filtro de Immobilon-P^{SO} Membrane, PVDF (Millipore) -activado previamente 10 minutos con metanol y lavado 3x con agua miliQ- con un tamaño de poro de 0.2 μm , durante un tiempo determinado para cada proteína analizada y con una corriente de 1.3 mA/cm² mediante el método de transferencia electroforética semi-seca llevado a cabo con los aparatos de transferencia Trans-Blot SD cell™ (BioRad). Eventualmente, para la detección de caspasa-3, las proteínas resueltas en los geles de poliacrilamida-SDS del 15%, se transfirieron a un filtro de PVDF durante 35 minutos y con un voltaje constante de 100V, mediante el método de transferencia líquida llevado a cabo con los aparatos de transferencia Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad).

Tras visualizar las proteínas transferidas mediante la tinción con rojo Ponceau S, la reactividad no específica fue bloqueada por incubación, durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, bien con BSA al 3 ó 5% bien con leche al 5% -según la proteína a analizar- en PBS 1x y Tween-20 0.2%. Las membranas se incubaron después, durante 2 horas, a temperatura ambiente con los diferentes anticuerpos primarios -especificados en el apartado 3.3 de Materiales y Métodos- diluidos en PBS 1x con BSA o leche al 1% ó 3% y Tween-20 0.1% ó 0,05%. Tras varios lavados en PBS 1x ó TBS-Tween-20 0.05%, las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa -especificados en el apartado 3.3.6 de Materiales y Métodos- en PBS 1x-BSA o leche al 1%. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron

con el reactivo quimioluminiscente intensificado ECL (Amersham Bioscience). Posteriormente, las bandas resultantes se cuantificaron mediante densitometría (densitómetro GS-800 “Calibrated Imaging Densitometer” de BioRad).

En todos los casos se utilizó la cantidad de α -tubulina para normalizar la media, ya que la cantidad de esta proteína se mantiene constante en las células y no varía con los tratamientos. La proteína α -tubulina se visualiza por inmunomarcado, como se ha descrito en el párrafo anterior, utilizando el anticuerpo primario correspondiente.

4.8. ENSAYO DE LA VIABILIDAD CELULAR

La sal de tetrazolio, MTT, es un compuesto permeable en la célula que se reduce a formazán, compuesto coloreado que puede ser cuantificado mediante un ensayo colorimétrico. La capacidad de reducción de este compuesto ha sido interpretada como indicativa del estado redox celular (Altman 1976; Shearman y cols. 1995), de la integridad mitocondrial (Rago y cols. 1991; Berridge y cols. 1993) y en el análisis de de la proliferación celular y citotoxicidad (Mosmann 1983).

4.8.1. Ensayos de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Sembramos 2×10^4 células/pocillo 48 horas antes de iniciar el tratamiento de EO, placas de M-96 pocillos (Nunc) en medio de cultivo, a 37°C en atmosfera humidificada con CO₂ al 7%.

El ensayo consistió en una modificación del protocolo original descrito por Hansen (Hansen y cols. 1989). Dos horas antes de finalizar los tratamientos de los cultivos celulares, se adicionó el MTT (stock 5 mg/ml en PBS 1x) sobre el medio de cultivo a una concentración final de 0.5 mg/ml, dejándolo incubar durante 3 horas a 37°C, protegido de la luz. Transcurrido ese tiempo, se añadió sobre el medio, un volumen de 100 μ l de tampón de lisis (20% SDS en 50% N,N-dimetilformamida, pH 4,7) y se incubó durante toda la noche a 37°C en oscuridad. La cantidad de formazán producida, se valoró midiendo la absorbancia del medio de cada pocillo, a una longitud de onda de 550 nm, en un lector de placas de ELISA Microplate Reader model 680 (BioRad).

4.9. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Las células se sembraron a una densidad de 3×10^4 células/pocillo, 48 horas antes de comenzar los tratamientos en placas de 96 pocillos (Costar) en medio de cultivo.

La determinación de la producción de ROS se llevó a cabo mediante la utilización de la sonda diacetato de diclorofluoresceína -H₂DCFDA- modificando las técnicas ya descritas (Rosenkranz y cols. 1992). Brevemente, tras lavar las células con tampón HKRB (HEPES 20 mM, NaCl 103 mM, KCl 4.77 mM, CaCl₂ 0.5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosa 15 mM) pH 7.3, se adicionó sobre el medio la sonda a una concentración final de 30 μ M y se incubaron durante 2 horas protegidas de la luz. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio y se lavaron las células con tampón HKRB suplementado con 2% FSC, añadiendo a cada pocillo 100 μ l, y se incubaron las placas durante 1 hora a 37°C, protegidas de la luz. Transcurrido este tiempo se midió la fluorescencia utilizando el fluorímetro Infinite® 200 series (Tecan) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm.

4.10. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las distintas líneas celulares se sembraron a una densidad de 5×10^5 células/pocillo, en placas de M-6 (Falcon) y se incubaron a los tiempos determinados en el ensayo en presencia y ausencia del tratamiento de EO, el sistema XXO.

Tras levantarlas de su soporte plástico en su propio medio mediante raspado -para así recoger tanto las células que permanecían adheridas como las células muertas que flotaban en el medio- las centrifugamos durante 5 minutos a 310x g, lavándolas a su vez con PBS 1x. A continuación, procedimos a su fijado en etanol al 30% en PBS 1x durante la noche a 4°C. Acabado el periodo de fijación, centrifugamos el contenido celular, durante unos segundos a 9720x g, para después volver a lavar las células con PBS 1x en un proceso de centrifugación igual que el anterior. Tras esto, realizamos la tinción incubándolas con 300 μ l de buffer de ciclo celular compuesto por citrato sódico 0,1%, NP40 0,3%, RNAsa A 0,02% (Boehringer Mannheim) y yoduro de propidio 0,05%, durante 45 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se dejaron a 4°C hasta su lectura. Las células tratadas y fijadas fueron analizadas posteriormente mediante citometría de flujo usando el citómetro FACScalibur (BD Biosciences) y el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular se calcularon utilizando el programa Cell Quest-Pro (BD bioscience), eliminando del análisis los agregados celulares. La apoptosis se determinó como el porcentaje de células con un contenido de DNA subG0/G1 en la zona del histograma intensidad de IP-área (Robinson 1997).

4.11. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES α y β SECRETASAS POR ENSAYO FLUORIMÉTRICO

Para la realización de este ensayo, sembramos doble pocillo de las distintas líneas celulares a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en placas de M-6 (Falcon). Tras la exposición de los cultivos celulares al tratamiento del sistema xantina/xantina oxidasa durante los tiempos determinados para este ensayo, procedimos a su levantamiento de su soporte plástico, centrifugándolas a $310 \times g$ para la obtención del sedimento celular. La cuantificación de proteína de cada muestra la obtuvimos mediante el ensayo BCA Protein Assay Kit (Pierce). La determinación de las actividades α y β -secretasas se obtuvieron mediante el kit comercial α -Secretase Activity Kit y β - Secretase Activity Kit, respectivamente; ambos de R & D systems y siguiendo las instrucciones del proveedor. La fluorescencia fue medida utilizando el fluorímetro Infinite® 200 series (Tecan) -longitud de onda de excitación: 360 nm; longitud de onda de emisión: 510 nm.

4.12. ENSAYO INMUNOCITOQUÍMICA

Las distintas líneas celulares se sembraron sobre cubreobjetos sin tratar a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/pocillo. Tras el tiempo de tratamiento determinado para este ensayo, los cubreobjetos se fijaron utilizando paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, transcurridos los cuales, se lavaron lentamente con PBS 1x 1x, tres veces.

Después de ser fijadas, las células se permeabilizaron y bloquearon toda la noche a 4°C con una solución de bloqueo compuesto por suero de caballo 2%, Tritón X-100 0,2% en PBS 1x pH 7.4. Pasado ese tiempo, se incubaron con el primer anticuerpo, diluido en solución de bloqueo, durante 2h a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se realizaron tres lavados con solución de bloqueo, cada uno de 10 minutos. Los anticuerpos secundarios acoplados a fluoresceína o Texas-red -diluidos en solución de bloqueo- se incubaron durante 1 hora y media, a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la tinción de los núcleos con la sonda fluorescente DAPI para continuar con tres lavados de 10 minutos con PBS 1x.

Posteriormente, los cubreobjetos fueron lavados con agua y se deshidrataron con etanol al 100%. Los cubreobjetos, una vez deshidratados, se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia, Mowiol® (Sigma-Aldrich). Se guardaron a 4°C hasta su utilización.

Las muestras se visualizaron en el microscopio de fluorescencia invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color, utilizando un objetivo 63X/1,40 oil Plan-Apochromat y 100X/1.3 oil iris Plan-Neofluar. Para realizar el análisis confocal de las muestras se

utilizó el microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss), utilizando un objetivo 63X/1,40 oil Plan-Apochromat.

Para adquirir las imágenes se utilizó una cámara SPOT RT Slider (Diagnostic), empleando el software Metavue. Para las imágenes del confocal se empleó el software Zeiss ZEN 2008 sp2. El procesamiento de las imágenes se realizó utilizando el programa Adobe Photoshop 7.0 y Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Incorporated), indistintamente.

4.13. INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMA (ELISA)

3.13.1. Ensayo ELISA “sándwich” para la cuantificación de A β

Con el fin de detectar y cuantificar los niveles de A β 40 y A β 42 secretado en la línea C2 (SK-N-MC-APP₆₉₅) se utilizó el ELISA “sándwich” desarrollado por nuestro laboratorio y descrito ya previamente (Serrano Carballal 2003; Recuero y cols. 2004).

Así mismo, y con el mismo propósito, se utilizó -para líneas celulares estables de SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}- el kit A β [1-40] Human ELISA Kit (Invitrogen).

4.14. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL POR RT-PCR EN PLACA

3.14.1. Aislamiento del RNA total

Todo el material utilizado en esta técnica estaba libre de RNAsas.

Se sembraron 5×10^5 sobre pocillos de M-6 (Falcon) de cada una de las líneas celulares y transcurrido el tiempo de cultivo en basal (sin tratamiento) o con el tratamiento de EO y especificado en cada ensayo, las células se lavaron en PBS 1x y por centrifugación a 310x g durante 5 minutos, se recogió el sedimento celular. El RNA total fue aislado con un kit de extracción en columnas High Pure RNA Isolation kit (Roche), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Con el fin de valorar la cantidad y calidad del RNA obtenido, este fue analizado en el equipo Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies).

4.14.2. Síntesis de c-DNA por retrotranscripción

La retrotranscripción -transcribir el RNA a cDNA (ácido dexosirribonucleico complementario)- se llevó a cabo con el kit High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems) en un volumen final de 50 μ l, para 500 ng de RNA total. Los tubos con la mezcla de reacción se llevaron al termociclador GeneAmp PCR system 2400 o 9600 (Perkin-Elmer) donde se siguió el protocolo descrito por el fabricante; 25°C durante 10 minutos seguido de 37°C durante 2 horas. El producto obtenido se conservó a -20°C hasta su uso.

4.14.3. PCR cuantitativa específica para HO-1

El cDNA (0,5 μ l) obtenido para cada condición -células incubadas con medio sólo o con XXO, a los tiempos indicados para cada experimento- es ensayado para el gen de interés. Todas las medidas se realizan por triplicado.

El ensayo de PCR a tiempo real para el mRNA de HO-1 fue diseñado con la herramienta ProbeFinder (Roche), utilizando la sonda de la Universal ProbeLibrary, específica para el mRNA HO-1 (#15, cat. no. 04685148001, Roche). El cDNA fue amplificado con los *primers* específicos para la secuencia diana y utilizados a una concentración final de 200 nM.

HO-1	<i>Upper</i> 5'-CAGTCAGGCAGAGGGTGATAG-3' <i>Lower</i> 5'-CCTGCAACTCCTCAAAGAGC-3'
------	---

La PCR a tiempo real se llevó a cabo en el aparato ABI Prism 7900HT SD (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron las estándar de amplificación del aparato, utilizando “*Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®]UNG*” (Applied Biosystems). La cuantificación relativa del mRNA de HO-1 se determinó por el método del $\Delta\Delta C_t$ utilizando el software SDS v2.1.1; como gen endógeno control se utilizó el de *GAPDH* y el *18S* indistintamente, ya que la expresión de ambos, no presenta cambios en ningún momento. Para comprobar que la PCR a tiempo real carecía de contaminación con DNA genómico o cualquier otra impureza de los reactivos, se utilizaron como blancos, pocillos sin cDNA.

4.14.4. PCR cuantitativa específica para APP, APP_{WILD TYPE} y SK-APP_{SWE}

Para analizar los niveles de mRNA de APP en nuestras líneas celulares, se diseñó la siguiente PCR cuantitativa en colaboración con Ana Martínez de nuestro laboratorio.

Se realizó una cuantificación absoluta como relativa; la absoluta para ver la cantidad específica de expresión de cada APP (WT o Swedish); y la relativa, para ver la cantidad total de APP expresado normalizado con GAPDH.

Los reactivos empleados para la cuantificación absoluta -con rectas patrón de plámidos SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}- fueron: Sybr® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems); primers 0,5 µM (Isogen) y 5 ng de cDNA. El volumen total de PCR fue de 10 µl. Las condiciones de PCR son: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 62°C, y seguido de una desnaturalización lenta (*melting*) realizando medidas continuas.

APP WILD TYPE	Upper 5'- GGAGGAGATCTCTGAAGTGAAGA-3' Lower 5'- GCACCTTTGTTTGAACCCACAT -3'	Tabla M.2 Secuencia de los oligonucleótidos APP_{WT} y APP_{SWE} Estos oligonucleótidos han sido utilizados en los ensayos RT-PCR para la cuantificación del mRNA del APP y para la determinación del genotipo de las líneas celulares estables APP wild type y mutante.
APP MUTANTE "Swedish"	Upper 5'-CGGAGGAGATCTCTGAAGTGAATC-3' Lower 5'- GCACCTTTGTTTGAACCCACAT -3'	

Los reactivos empleados para la cuantificación relativa -además de los ensayos específicos de cada gen- fueron la "Universal PCR Master Mix, No AmpErase®UNG" (Applied Biosystems) y 5 ng de cDNA. El volumen total de PCR fue de 10 µl. Las condiciones de PCR son las mismas que para la cuantificación absoluta.

4.15. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR MICROARRAYS DE DNA

Los estudios de la expresión génica de las líneas celulares, SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}, se llevaron a cabo bajo la plataforma Agilent.

Las células se sembraron en placas de M-6 (Falcon) a una densidad de 5x10⁵ células/pocillo y tras ser tratadas con el sistema XXo durante los tiempos especificados para el ensayo, se les retiró el medio y se procedió a su levantado utilizando PBS 1x libre de RNAsas y Cell Scrapper (Falcon). Posteriormente, se les sometió a un proceso de centrifugación a 380x g durante 5 minutos para la obtención del sedimento celular. Dicho sedimento se guardó a -70°C hasta su utilización.

La extracción de los RNAs se llevó a cabo en el Servicio de Genómica del PCM, (UAM, Madrid) y la comprobación de la calidad de los mismos se realizó mediante ensayos electroforéticos con RNA, en pequeños chips de plástico en el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent), por el Servicio de Genómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO, Madrid). Los resultados (cualitativos y cuantitativos) se visualizaron en formato de gel.

Los RNAs totales cuantificados y evaluados en cuanto a su calidad, se enviaron a la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) donde fueron realizados los estudios de análisis de expresión génica utilizando microarrays de DNA de Agilent technologies.

4.15.1. Análisis estadístico de los resultados

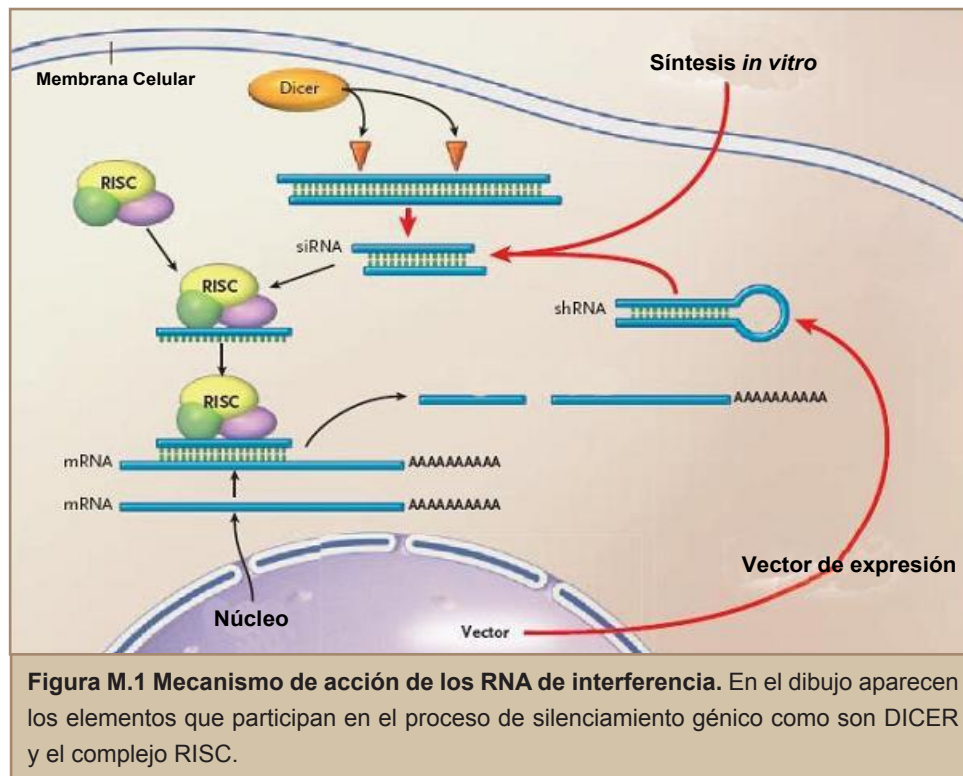
El estudio de los resultados obtenidos del microarray fue llevado a cabo por Sergio Callejas del laboratorio de Genómica de la Dra. Dopazo (CNIC).

4.16. SILENCIAMIENTO GÉNICO POR LA TÉCNICA DE INTERFERENCIA EN EL RNA (RNAi): TRANSFECCIÓN DE “shRNA”

4.16.1. Fundamento de la Técnica de RNAi.

La técnica del RNAi representa un gran avance en la terapéutica ya que tiene la habilidad de silenciar potente y específicamente, la expresión de genes que son responsables de alguna enfermedad. Los shRNA (del inglés *short hairpin RNAs*) son una clase de RNAs pequeños formados por un cuerpo de unas 19-29 pares de bases, y un *loop* de unos 4-10 nucleótidos que serán procesados por Dicer -RNAsa clase III- para originar un pequeño RNA interferente -RNAi-. Los shRNA se expresan desde vectores para producir RNAi (Kim y cols. 2007). La introducción de RNA de doble hebra (dsRNA) proveniente de un virus RNA o artificial, en una célula u organismo, inicia una compleja cascada de eventos, los cuales culminan con la degradación del RNA mensajero (mRNA) de secuencia homóloga al dsRNA originalmente introducido (Hannon 2002).

Brevemente, la ribonucleasa citoplasmática tipo III -que actúa sobre el RNA de doble cadena (dsRNA)- denominada Dicer, fragmenta el dsRNA en porciones de 21-25 pares de nucleótidos de longitud, los denominados siRNA o RNA interferentes pequeños. Estos siRNAs inducen la formación de un complejo de proteínas que se conocen por RISC (del inglés RNA-Induced Silencing Complex) (Hannon 2002). El RISC contiene una helicasa, la cual se encargará de separar las dos hebras del siRNA, el cual es incorporado en el complejo proteico RISC, después de separar las dos hebras del siRNA elimina una y se mantiene unido a la hebra antisentido que dejará expuesta al citoplasma celular, permitiéndole reconocer moléculas de mRNA que contienen una secuencia complementaria perfecta. Una vez que se unen, la molécula del mRNA es fragmentada y degradada. El gen correspondiente es así silenciado a través de un mecanismo postranscripcional (Reynolds y cols. 2004).



4.16.2. Transfección mediante nucleofección de plámidos codificando shRNAs específicos de HO-1.

La nucleofección -una forma especializada de electroporación- es una técnica que combina parámetros específicos eléctricos con reactivos específicos para diferentes tipos celulares (Gresch y cols. 2004). Se ha comprobado que tiene una alta y significativa tasa de transfección junto con una buena viabilidad celular (Zeitelhofer y cols. 2007) en comparación con otros métodos de transfección como el método de coprecipitación DNA/fosfato cálcico (Goetze y cols. 2004) o el convencional método de electroporación (Maasho y cols. 2004; Iversen y cols. 2005).

Para ello utilizamos el aparato desarrollado por Amaxa Biosystems, el Nucleofector®II. Brevemente, partimos de cuatro shRNAs (SureSilencing shRNA Plasmid) -que coexpresan GFP (del inglés *Green Fluorescence Protein*)- específicos para el gen diana, *HO-1*, y suministrados por SuperArray Bioscience Corporation. La preparación del stock de los plásmidos para la transfección se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor. Antes de empezar con el procedimiento, preparamos la mezcla de nucleofección añadiendo 0.5 ml del suplemento de nucleofección a 2.25 ml de la solución V de nucleofección (Cell line V Nucleofector Kit, Amaxa). En eppendorfs estériles (Eppendorf) se resuspendieron 4×10^6 células de la línea SK-APP_{SWE} en un volumen final de 100 μ l de solución de nucleofección y se añadió 15 μ g de DNA. Dicha suspensión fue trasvasada a las cubetas de nucleofección proporcionadas en el kit y transferidas al Nucleofector® para realizar la electroporación (programa C009).

Tras la nucleofección, 500 μ l de medio de cultivo fue añadido en las cubetas y la suspensión de células ya transfectadas fue sembrada en las placas con el volumen adecuado de medio y preincubadas a 37°C y 5% CO₂. Después de 24h post-transfección, la eficiencia de la misma fue evaluada con fluorescencia de GFP en el microscopio invertido Axiovert 135 (Zeiss) acoplado a cámara CCD Cohu RS-170 monocroma para observación en placas de cultivo, con el objetivo 10X/0.3. Plan Neofluar Ph1 y utilizando el filtro de fluorescencia FITC (450-490 FT 510 LP 520). Las imágenes obtenidas fueron procesadas con los programas Adobe Photoshop 7.0 y Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Incorporated), indistintamente.

Una vez confirmado que la transfección ha transcurrido satisfactoriamente, se procedió al análisis de la inhibición de la expresión de la HO-1 por inmunomarcado después de electroforesis (ver apartado 3.3.5. y 3.6 de Materiales y Métodos).

4.17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar. Las diferencias estadísticas fueron determinadas utilizando el test *t* de Student de tres colas para evaluar diferencias entre dos grupos. Se establece que las diferencias son significativas para valores con una $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el programa Microsoft Excel®.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES NEURONALES DE EXPRESION DE APP

Al comenzar el presente estudio, nuestro laboratorio había establecido dos modelos celulares donde se ponía de manifiesto tanto el papel de la sobreexpresión del APP en la línea celular humana SK-N-MC sobre la muerte celular (Serrano Carballal 2003; Recuero y cols. 2004) como la caracterización de un modelo de muerte celular apoptótica por EO en dicha línea celular, SK-N-MC (Vicente Cenzano 2007; Recuero y cols. 2009).

El sistema nervioso puede responder de forma adaptativa o bien puede sucumbir al envejecimiento. En las enfermedades neurodegenerativas, la muerte neuronal puede verse favorecida y aumentada por mutaciones genéticas específicas (mutaciones en el APP, huntingtina, α -sinucleína) y/o factores medioambientales tales como toxinas, la propia dieta e incluso algunos -como los ROS- que promueven alteraciones celulares. Todos ellos van a contribuir a una disfunción sináptica y a la muerte neuronal (Mattson y cols. 2006).

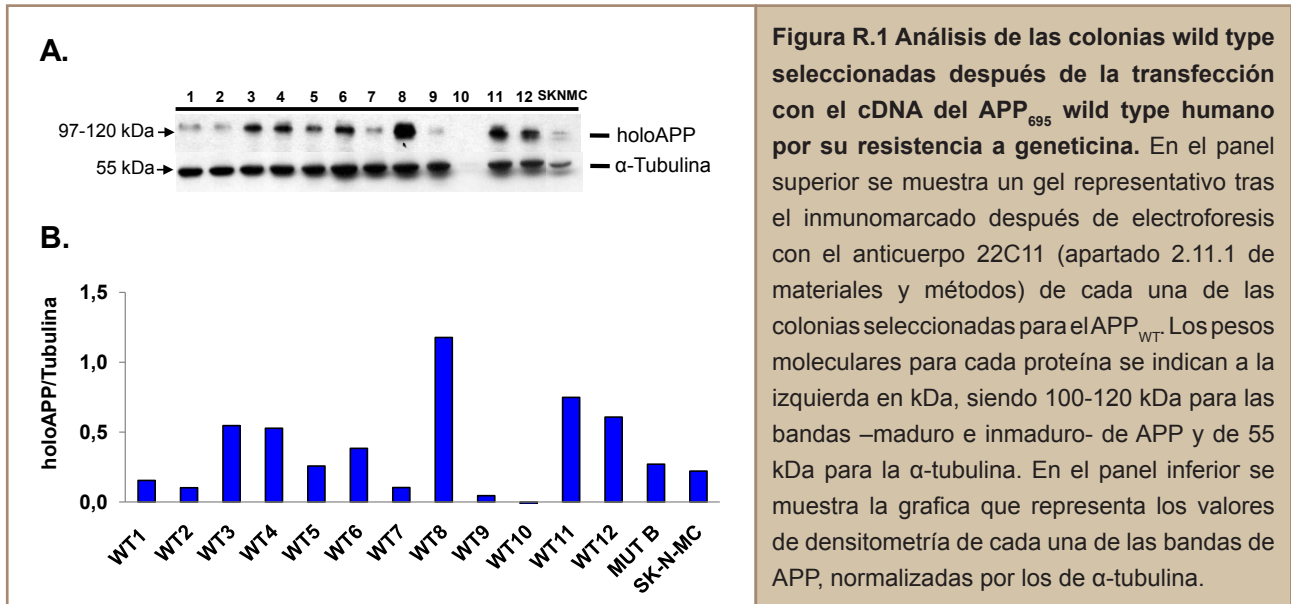
Con el propósito de investigar los efectos producidos por mutaciones en el APP, en presencia de EO, tanto en la muerte neuronal como en el metabolismo/procesamiento del APP, nos pareció muy interesante generar un modelo celular de neurodegeneración donde coexistan estos dos factores.

5.1.1. Generación y caracterización del neuroblastoma humano SK-N-MC transfectado establemente con cDNA APP-695_{WILD TYPE} y cDNA APP-695_{SWEDISH} (KM670/671NL)

A pesar de las dificultades ya descritas para obtener líneas neuronales humanas establemente transfectadas (Fukuchi y cols. 1992), nos propusimos la generación de líneas celulares de neuroblastoma humano que expresasen la isoforma 695 de la proteína humana APP, con fenotipo wild type o mutante "Swedish" (K670M/N671L). Como hemos descrito en la introducción, la elección del APP₆₉₅ no es casual ya que esta es la isoforma que más se expresa en neuronas en sus primeros estadios de diferenciación (Yoshikawa y cols. 1992).

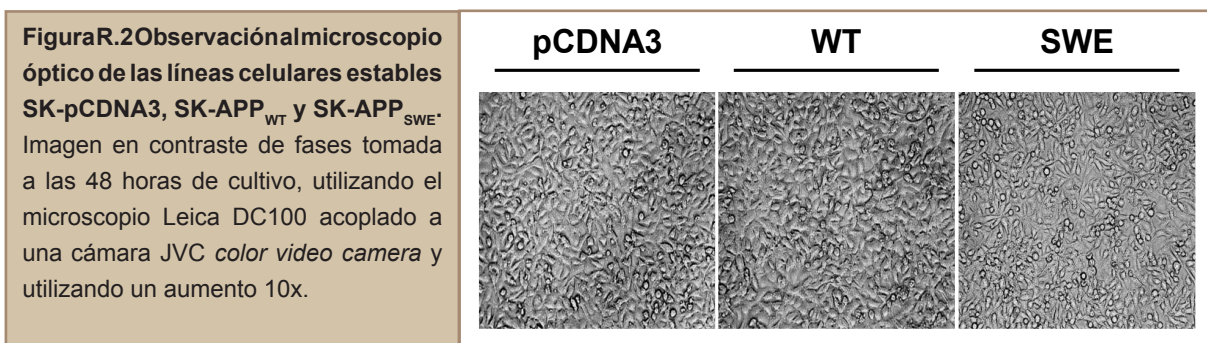
Para ello, transfectamos de forma estable la línea celular de neuroblastoma humano, SK-N-MC, con los vectores de expresión pCDNA3, que contenían el cDNA del APP-695_{WILD TYPE} (SK-APP_{WT}) o el cDNA del APP-695_{SWEDISH} (SK-APP_{SWE}), tal y como fue descrito en el apartado 3.2.3. de Materiales y Métodos. Se seleccionaron 20 colonias de SK-APP_{WT} y 20 colonias de SK-APP_{SWE}

resistentes a geneticina, y todas ellas fueron analizadas mediante inmunomarcado después de electroforesis específico para la proteína APP (figura R.1).



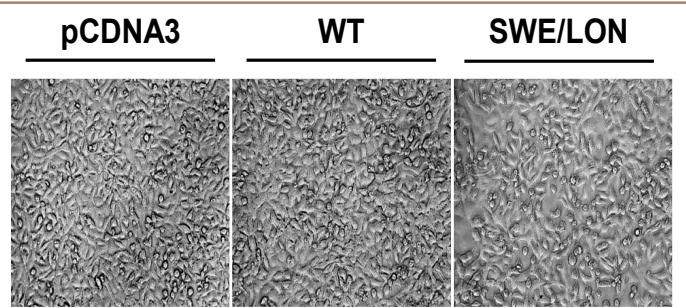
Para la línea SK-APP_{WT} se seleccionó la colonia 8 y para la línea SK-APP_{SWE} se seleccionó la colonia 5 en base a su incremento en los niveles de APP. Así mismo, y con el fin de obtener un cultivo control, transfectamos la misma línea de neuroblastoma humano, SK-N-MC, con el vector de expresión pCDNA3, pero sin inserto (SK-pC).

Ambas colonias seleccionadas presentaban una expresión óptima de APP, con respecto al APP endógeno de la línea SK-pC, siendo expandidas y establecidas como líneas celulares (figura R.2)



Durante el transcurso de la presente tesis se seleccionaron, además, colonias resistentes a geneticina después de la transfección estable de la línea SK-N-MC con el vector pCDNA3-SK-APP_{SWEDISH/LONDON} (K670M/N671L+V717I) (SK-APP_{SWE/LON}) (figura R.3).

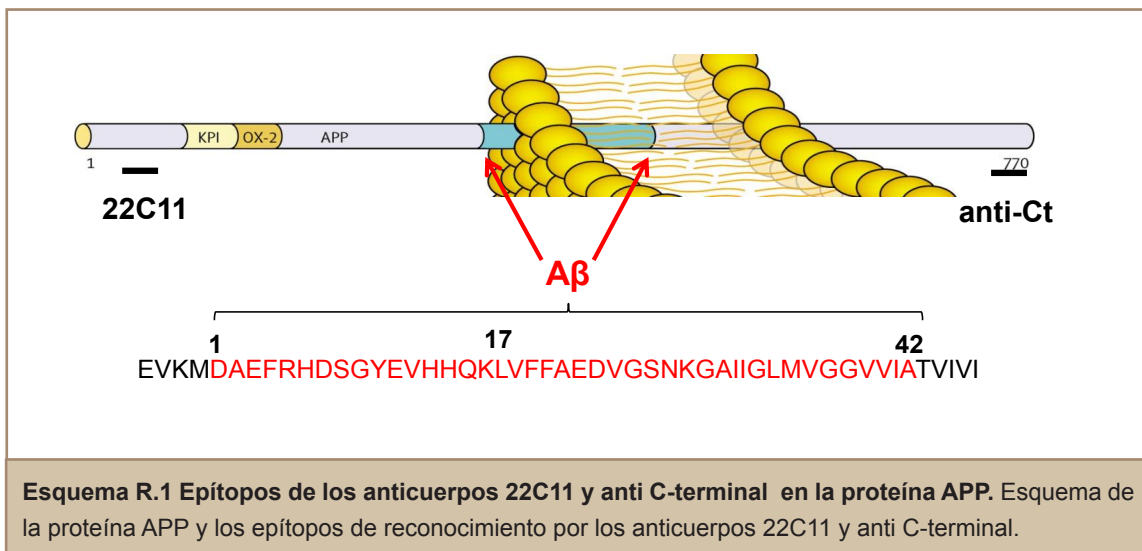
Figura R.3 Observación al microscopio óptico de las líneas celulares estables SK-pCDNA3, SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE/LON}. Imagen en contraste de fases tomada a las 48 horas de cultivo, utilizando el microscopio Leica DC100 acoplado a una cámara JVC color video camera y utilizando un aumento 10x.



La línea celular SK-APP_{SWE/LON} se generó como refuerzo de los estudios de la caracterización de la muerte con la línea celular SK-APP_{SWE}.

5.1.2. Caracterización de la expresión de APP en las líneas celulares establemente transfectadas.

Con el fin de caracterizar la expresión de APP por parte de las líneas celulares estables, SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}, así como la integridad de la proteína expresada, llevamos a cabo experimentos de inmunomarcado después de electroforesis utilizando anticuerpos que reconocían diferentes epítomos de la proteína APP (22C11 y anti-C terminal) (esquema R.1).



En primer lugar, se analizó la expresión de APP de las líneas celulares establecidas a partir de las colonias seleccionadas -según hemos explicado en el apartado anterior- utilizando el anticuerpo 22C11.

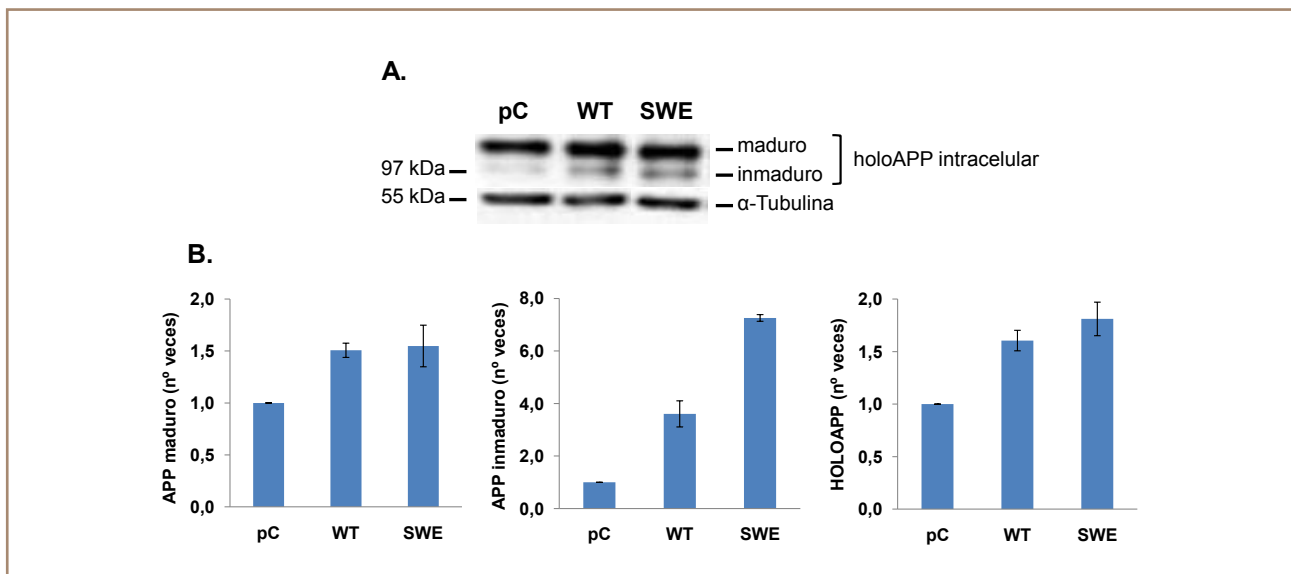


Figura R.4 Caracterización de la expresión de la proteína APP en las líneas celulares establecidas SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}. Inmunomarcado después de electroforesis de la proteína APP en las líneas celulares cultivadas durante 48 horas. A) Se muestra un gel representativo de las bandas inmunorreactivas al anticuerpo 22C11 (panel superior); en el panel inferior se muestran las bandas para el α -tubulina. B) Cuantificación mediante densitometría de los niveles de la proteína APP en los cultivos celulares de SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}. Los valores fueron normalizados por los de α -tubulina y se expresan como el número de veces con respecto a la línea control SK-pC. La media \pm error estándar resulta de tres experimentos independientes.

Como se observa en la figura R.4, el establecimiento de de las líneas celulares a partir de las colonias SK-APP_{WT}-8 y SK-APP_{SWE}-5 no supuso la pérdida de expresión de la proteína. La cuantificación mediante densitometría de las bandas marcadas con el anticuerpo 22C11, reveló unos niveles de expresión de -aproximadamente- 1.5-2 veces para ambas líneas celulares, en comparación con la línea control SK-pC. Las bandas de APP inmunomarcadas corresponden a la forma madura (banda superior) e inmadura (banda inferior) que migran de acuerdo al tamaño esperado de 100-120 kDa (Weidemann y cols. 1989). La integridad de la proteína APP fue corroborada mediante experimentos de inmunomarcado después de electroforesis frente al anticuerpo anti C-terminal en el que se obtuvieron los mismos niveles de APP (datos no mostrados). Estos resultados confirmaron, por tanto, la expresión de APP por parte de las líneas celulares así como la integridad de la proteína. Varios experimentos similares de inmunomarcado nos revelaron unos niveles de expresión de proteína APP en la línea celular SK-APP_{SWE/LON} comparables a los de la línea SK-APP_{SWE} (figura R.5).

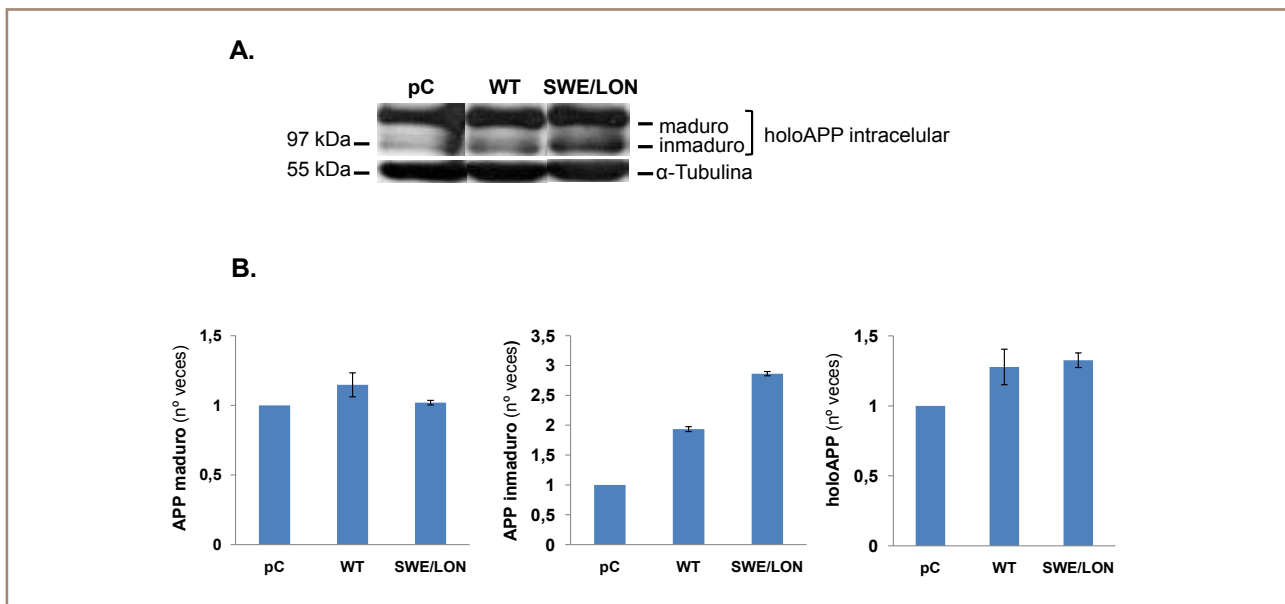
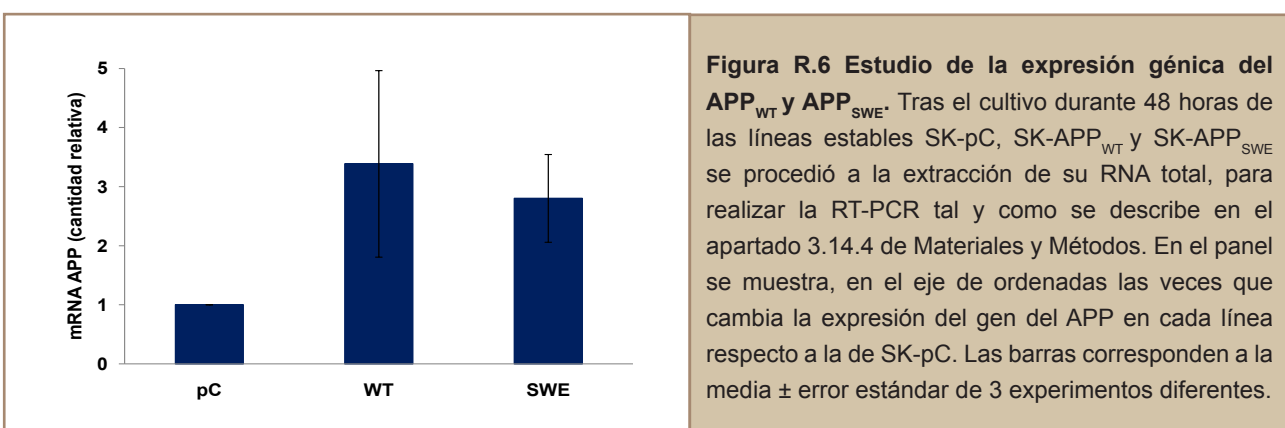
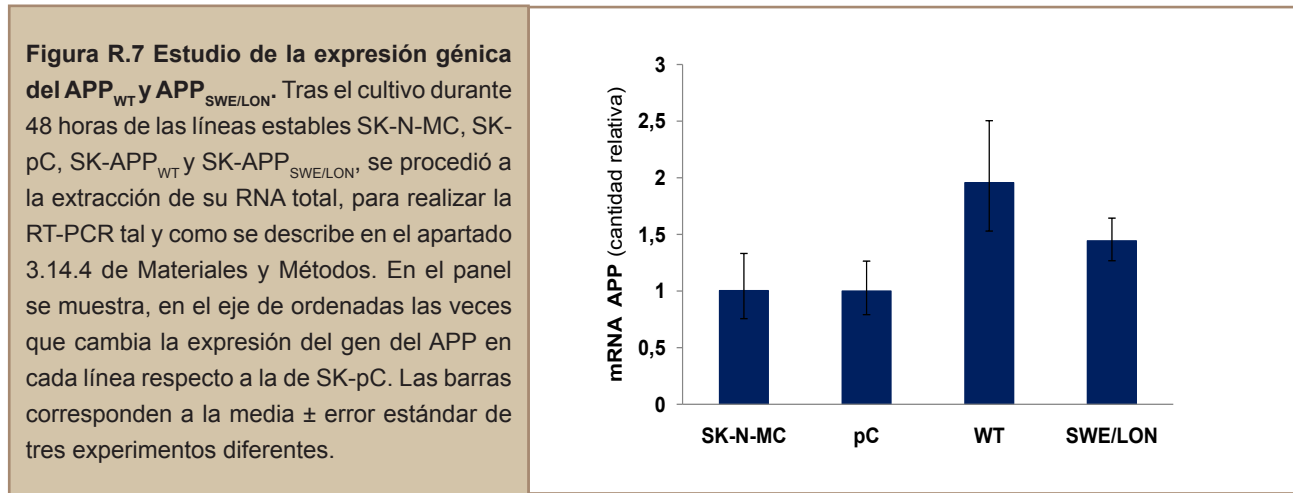


Figura R.5 Caracterización de la expresión de la proteína APP en las líneas celulares establecidas SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE/LON}. Inmuno-marcado después de electroforesis de la proteína APP en las líneas celulares cultivadas durante 48 horas. A) Se muestra un gel representativo de las bandas inmunorreactivas al anticuerpo 22C11 (panel superior); en el panel inferior se muestran las bandas para el α-tubulina. B) Cuantificación mediante densitometría de los niveles de la proteína APP en los cultivos celulares de SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE/LON}. Los valores fueron normalizados por los de α-tubulina y se expresan como el número de veces con respecto a la línea control SK-pC. La media ± error estándar resulta de tres experimentos independientes.

Persiguiendo el mismo fin que en los párrafos anteriores, quisimos comprobar los niveles de APP a nivel del RNA mensajero en las líneas celulares establecidas. Para ello, se llevaron a cabo análisis de RT-PCR específica para APP total (figura R.6).



Los datos obtenidos de la cuantificación relativa al mRNA de APP de la línea SK-pC, nos revelaron un número de veces de expresión del mRNA de APP, en las líneas SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} del mismo orden de magnitud que el obtenido en la proteína. Del mismo modo realizamos la cuantificación relativa a la línea SK-pC en la estable SK-APP_{SWE/LON} (figura R.7)



Como sucediera con las otras dos líneas, los datos obtenidos de la cuantificación del mRNA estaban en concordancia con los niveles de proteína obtenidos tras el inmunomarcado específico para el APP, en la línea celular SK-APP_{SWE/LON}. También podemos concluir de la figura R.7, que el vector de expresión, pCDNA3 sin inserto -en la línea SK-pC- no afecta a la expresión de la proteína ya que presentaba un patrón de expresión similar al de la línea celular parental SK-N-MC.

Mediante ensayo de RT-PCR igualmente pudimos comprobar la expresión de APP mutante en las líneas celulares utilizándose una sonda específica para la mutación “Swedish” en el APP (datos no mostrados).

Para concluir este apartado de caracterización de las líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} realizamos la medida del péptido Aβ₄₀ secretado mediante un ensayo de ELISA, según el apartado 3.13. de Materiales y Métodos. Brevemente, tras 48 horas de cultivo los medios de cultivo de las líneas SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} fueron recogidos y procesados según el apartado 3.6.2. de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos (datos no mostrados) revelaron unos niveles de péptido Aβ₄₀ comprendidos entre 5-10 pg/ml en la línea celular SK-APP_{SWE}, estando en los límites de detección de la técnica, no detectándose en la línea “Wild Type”; de lo que se concluye que estos cultivos celulares producen unos niveles de Aβ muy bajos y por tanto, difíciles de monitorizar mediante dicha técnica.

5.2. CONSECUENCIAS DEL EO SOBRE LA MUERTE CELULAR EN LAS LÍNEAS SK-APP_{WT} Y SK-APP_{SWE}

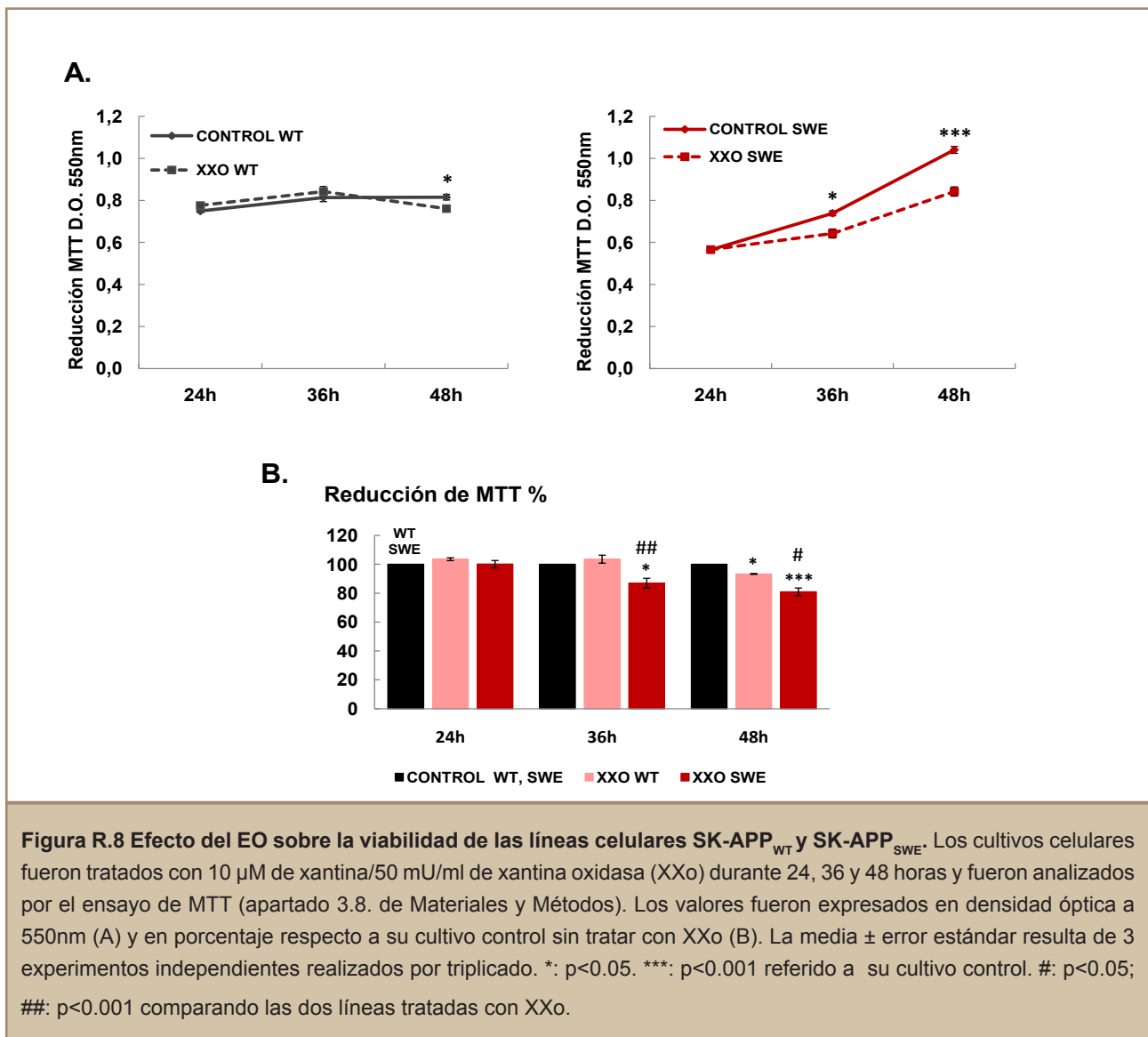
Hasta ahora sabemos -gracias a los estudios de ligamiento genético- que los genes del APP, PS1 y PS-2 están asociados a los casos de EA familiar. Pero el mecanismo por el cual participan en la neurodegeneración asociada a la enfermedad aún no es conocido. El proceso neurodegenerativo podría iniciarse como consecuencia del EO asociado al envejecimiento (Floyd y cols. 2002) que causaría la muerte y desaparición de las neuronas más sensibilizadas por el estrés del RE causado por mutaciones o por sobreexpresión de proteínas (Katayama y cols. 2001). En este sentido se debe señalar que existen evidencias de muerte programada en neuronas de los cerebros de pacientes con Alzheimer (Stadelmann y cols. 1999; Rohn y cols. 2002).

Los estudios del efecto del EO sobre la apoptosis fueron realizados en primer lugar en la línea celular estable SK-APP_{SWE/LON} (Muñoz de Galdeano 2007). Los resultados obtenidos en dicho estudio, refuerzan los que se describen a continuación, en otra línea celular mutante en el APP, SK-APP_{SWE}.

5.2.1. Efecto del EO y de la mutación “Swedish” en la viabilidad celular.

Previamente, en el laboratorio se había caracterizado un modelo de estrés oxidativo leve pero prolongado en el tiempo -hasta 48 horas-, en la línea celular SK-N-MC (Vicente Cenzano 2007; Recuero y cols. 2009) utilizando el sistema Xantina/Xantina oxidasa (XXo) que genera radicales libres (esquema M.1).

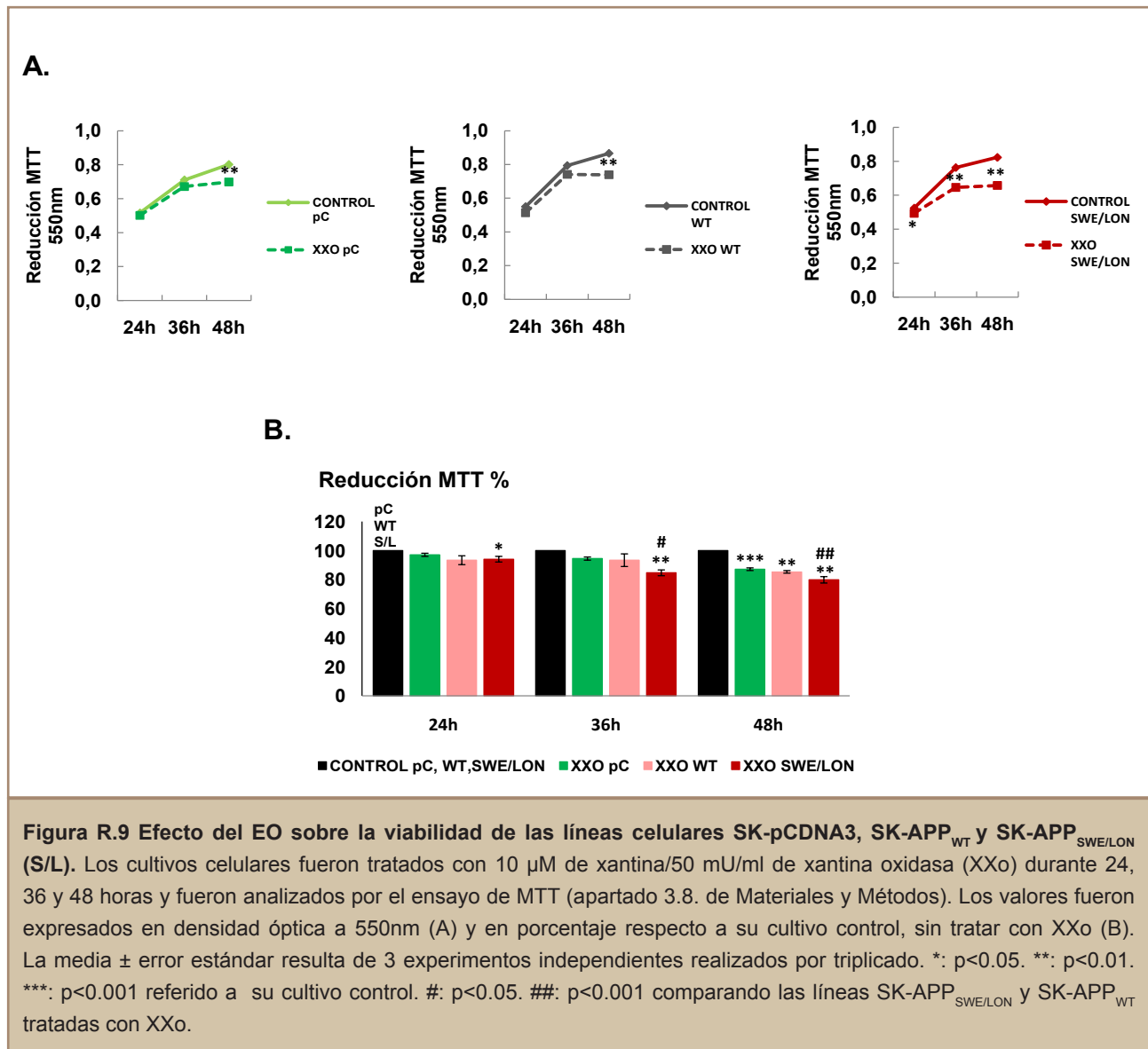
Con el fin de analizar el efecto que tenía el EO sobre las líneas celulares estables SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}, estas líneas fueron tratadas con este sistema a las concentraciones descritas (apartado 3.2.4. de Materiales y Métodos) y durante un curso temporal de 24, 36 y 48 horas (figura R.8).



Al comparar los valores de densidad óptica (figura R.8A) podemos observar el área creada entre el curso temporal de los cultivos control con los cultivos tratados de la línea celular SK-APP_{SWE}. Dicho área es mayor en estas células que la creada en las células de SK-APP_{WT}. De la figura R.8B se desprenden tres resultados: primero, el tratamiento con el sistema XXo produce una reducción en la viabilidad de los cultivos celulares, haciéndose más patente a tiempos largos de la cinética, es decir, con un EO sostenido en el tiempo; segundo, al comparar los cultivos SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} tratados con XXo, la reducción de la viabilidad es significativamente mayor en la línea celular SK-APP_{SWE} aproximadamente de un 20% a tiempos largos; tercero, en el tiempo de 36 horas la pérdida de viabilidad de la línea celular SK-APP_{SWE} tratada -aproximadamente de un 15%- se adelanta en el tiempo si comparamos con el cultivo celular de SK-APP_{WT}, que no presenta disminución alguna de la viabilidad celular.

Por tanto, el EO con el sistema XXo provoca una pérdida en la viabilidad celular en nuestros cultivos celulares estables y esta pérdida es significativamente mayor si el EO está presente en la línea celular SK-APP_{SWE}.

Los estudios previos realizados en la línea celular SK-APP_{SWE/LON} arrojan unos resultados parecidos (figura R.9)



Como ocurría en la línea SK-APP_{SWE}, el área creada por el tratamiento en los cultivos de SK-APP_{SWE/LON} es mayor que en la línea control - SK-pC- y SK-APP_{WT} como se desprende de la figura 8A; y al igual que para la línea SK-APP_{SWE}, se volverían a observar tres tipos de resultados: primero,

el EO mantenido en el tiempo provoca una pérdida de viabilidad en los cultivos celulares tratados; segundo, dicha pérdida de viabilidad se hace más significativa para los cultivos de SK-APP_{SWE/LON} -aproximadamente del 20%- en comparación con los de SK-APP_{WT}, ambos tratados con el sistema XXo; y tercero, como ya vimos para la línea SK-APP_{SWE}, en los cultivos de SK-APP_{SWE/LON} también se cumple que la muerte está adelantada en el tiempo -a 36 horas la pérdida de viabilidad es de 15% aproximadamente- en comparación con los cultivos de SK-APP_{WT} donde no se observa cambio alguno en la viabilidad.

En la figura R.9, también destacamos la presencia de la línea celular control SK-pC. De los datos obtenidos podemos sugerir que la expresión de la proteína APP_{WT} no sensibiliza a la muerte celular por EO, ya que el cultivo control SK-pC y el cultivo de SK-APP_{WT} presentan un comportamiento similar ante el tratamiento con el sistema XXo, no apreciándose cambios significativos en su viabilidad.

En la etiología de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se incluyen elevados niveles de oxidantes que son críticos en la inicialización en el daño y muerte celular así como en la progresión de la enfermedad (Behl y cols. 1995; Turnbull y cols. 2001). Los ROS y sus productos derivados son capaces de producir ese daño oxidativo pudiendo provocar ese efecto citotóxico cuando se producen en exceso. Estudios previos, ya han demostrado que el sistema XXo produce daño o pérdida celular mediada por ROS (Sato y cols. 1998; Fatokun y cols. 2007). La eficiencia del sistema XXo, en cuanto a la producción de ROS en la línea parental SK-N-MC, había sido corroborada previamente en el laboratorio (Vicente Cenzano 2007), y de manera similar procedimos a la medición de ROS utilizando la sonda fluorescente H₂DCFDA tal y como se detalla en el apartado 3.9. de Materiales y Métodos, en nuestras líneas celulares SK-pC, SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} (figura R.10).

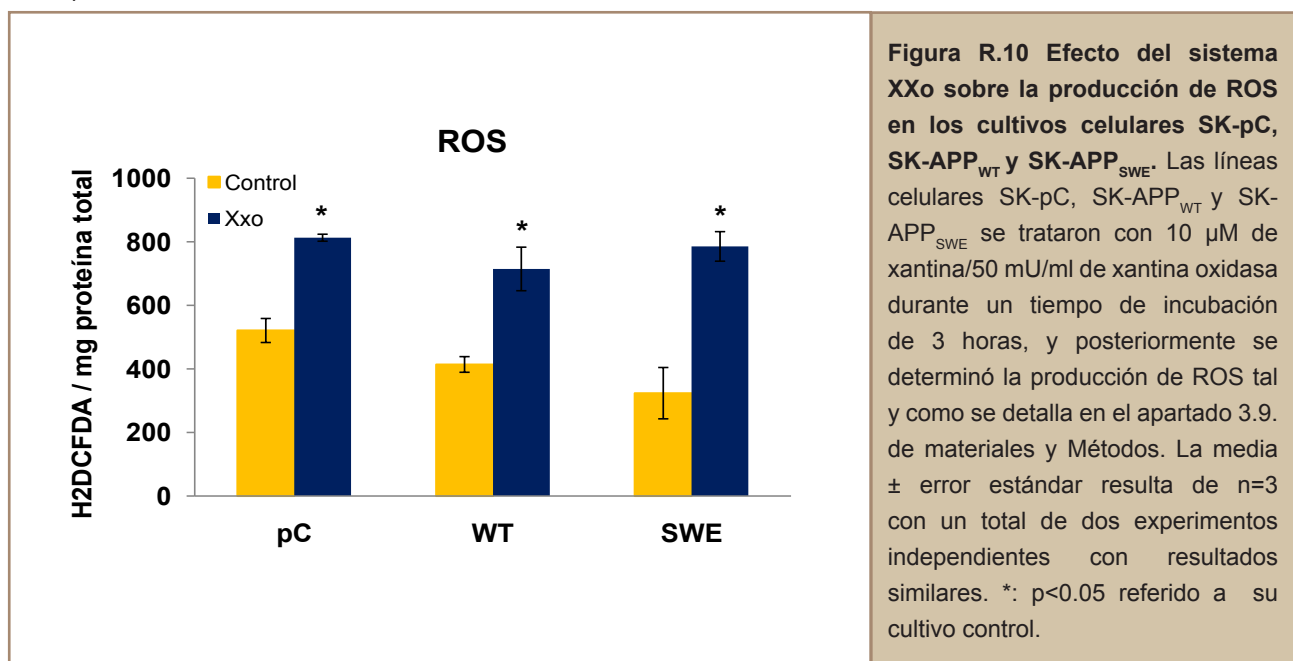


Figura R.10 Efecto del sistema XXo sobre la producción de ROS en los cultivos celulares SK-pC, SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}. Las líneas celulares SK-pC, SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} se trataron con 10 μM de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa durante un tiempo de incubación de 3 horas, y posteriormente se determinó la producción de ROS tal y como se detalla en el apartado 3.9. de materiales y Métodos. La media ± error estándar resulta de n=3 con un total de dos experimentos independientes con resultados similares. *: p<0.05 referido a su cultivo control.

Los resultados de la figura R.10 muestran que en todas las líneas celulares el sistema XXo produce un aumento significativo en la producción de ROS de acuerdo con lo esperado.

4.2.2. Efecto del EO y la mutación APP “Swedish” sobre la muerte celular apoptótica: degradación del sustrato de caspasa, PARP (poli (ADP-ribosa) polimerasa) y activación de caspasa-3.

La muerte celular por apoptosis requiere del funcionamiento de una maquinaria celular especializada que incluye la activación por procesamiento proteolítico de una familia de cisteínproteasas, denominadas caspasas (Alnemri y cols. 1996; Hengartner 2000); Así, podemos monitorizar si un cultivo sufre muerte apoptótica analizando la activación de las caspasas y la degradación de sus sustratos, entre los cuales se encuentran la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (Kaufmann y cols. 1993; Duriez y cols. 1997; Ha y cols. 2000).

En el modelo puesto a punto en el laboratorio con la línea celular SK-N-MC, se ha demostrado que el sistema XXo genera una señal apoptótica que conduce a la activación de las caspasas; los resultados que se obtuvieron sugieren que el EO causado por el sistema XXo conduce a una cascada apoptótica específica donde se ve implicada la caspasa-3 de una manera dependiente de citocromo c (Vicente Cenzano 2007; Recuero y cols. 2009).

Por todos estos motivos, para analizar la muerte celular apoptótica por EO en las líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}, cuantificamos los niveles del fragmento p85, producto de la degradación de PARP-1 (figura R.11).

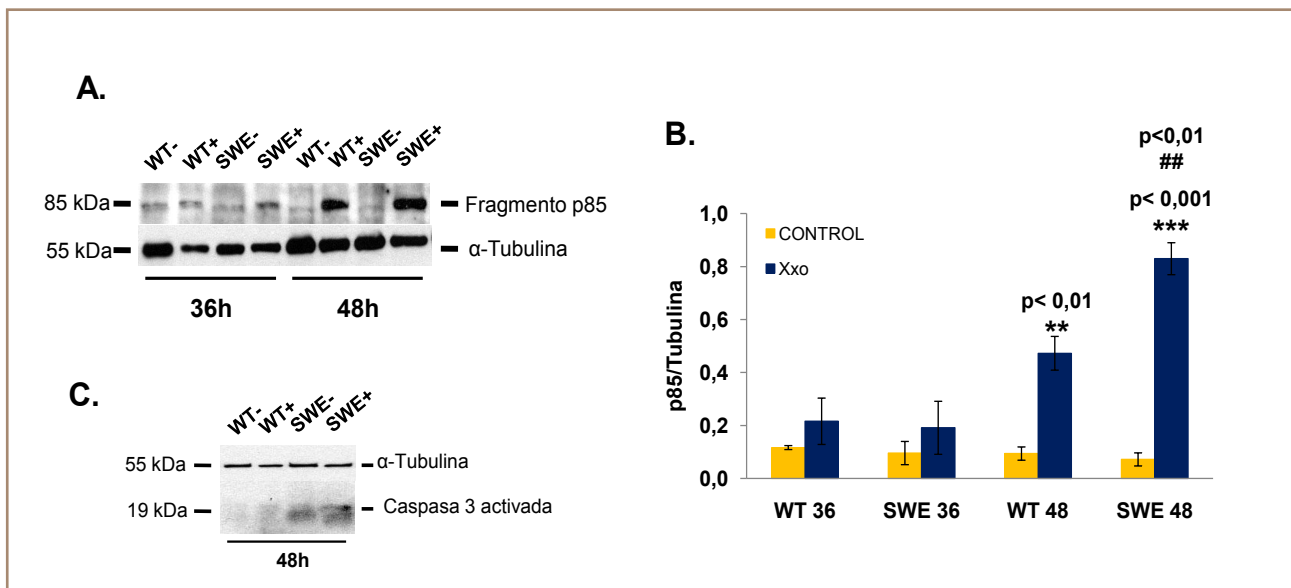
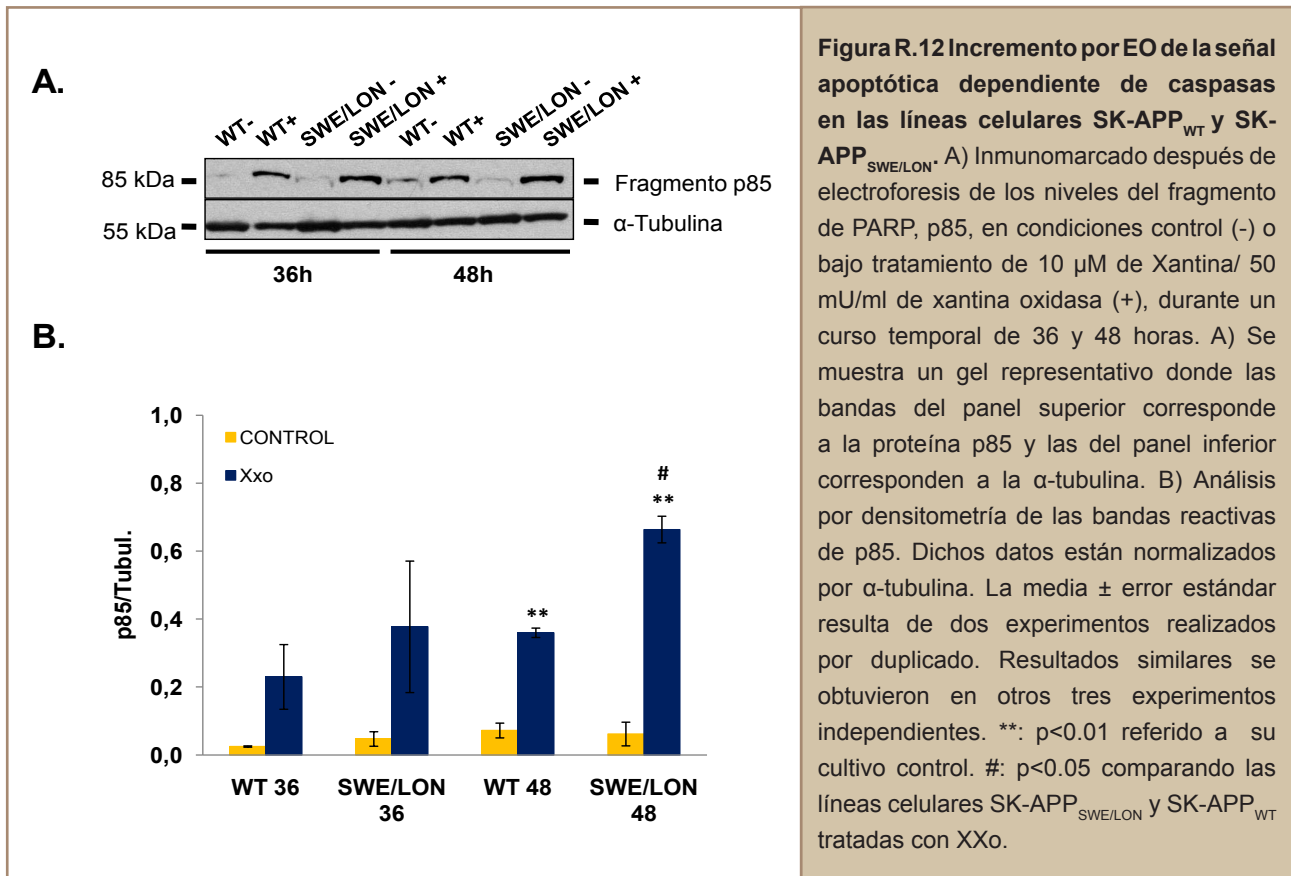


Figura R.11 Incremento por EO de la señal apoptótica dependiente de caspasas en las líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}. A) Inmunomarcado después de electroforesis de los niveles del fragmento de PARP, p85, en condiciones control (-) o bajo tratamiento de 10 μ M de Xantina/ 50 mU/ml de xantina oxidasa (+), durante un curso temporal de 36 y 48 horas. Se muestra un gel representativo donde las bandas del panel superior corresponden a la proteína p85 y las del panel inferior corresponden a la α -tubulina. B) Análisis por densitometría de las bandas reactivas de p85. Dichos datos están normalizados por α -tubulina. La media \pm error estándar resulta de dos experimentos realizados por duplicado. Resultados similares se obtuvieron en otros tres experimentos independientes. **: $p < 0.01$. ***: $p < 0.001$ referido a su cultivo control. ##: $p < 0.001$ comparando las líneas celulares SK-APP_{SWE} y SK-APP_{WT} tratadas con XXo. C) Inmunomarcado después de electroforesis de los niveles de caspasa-3 activa, en condiciones control (-) o bajo tratamiento de 10 μ M de Xantina/ 50 mU/ml de xantina oxidasa (+), durante un tiempo de incubación de 48 horas. Se muestra un gel representativo de tres experimentos independientes donde las bandas del panel superior corresponden al α -tubulina y las del panel inferior a las bandas del fragmento de la caspasa-3 activa.

Como se puede apreciar en la figura R. 11A, el anticuerpo anti-p85 revela una banda de mayor intensidad en los tiempos largos de exposición al sistema XXo -48h-, haciéndose notablemente más patente en el cultivo de SK-APP_{SWE}. En el mismo gel cabe resaltar la no aparición del fragmento p85 en los cultivos controles. De la cuantificación por densitometría del inmunomarcado después de electroforesis (figura R.11B) se desprenden dos hechos: primero, que los niveles del fragmento p85 son significativamente mayores a tiempos tardíos con el tratamiento con el sistema XXo tanto en los cultivos SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}; y segundo, en el tiempo de 48 horas y comparando las líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} bajo tratamiento de EO, se revela una fragmentación de PARP-1 significativamente superior en los cultivos mutantes para APP. Además, el incremento en la degradación de PARP-1 en la línea SK-APP_{SWE} correlacionaba con unos mayores niveles del fragmento activo de caspasa-3 (figura R.11C). Por tanto, todos estos resultados vienen a mostrar un incremento en la muerte apoptótica por EO en la línea SK-APP_{SWE}.

Al igual que con la viabilidad celular, también caracterizamos el efecto del EO en la muerte celular apoptótica de la otra línea celular de APP mutante, SK-APP_{SWE/LON} (figura R.12).



Del mismo modo que ocurría en los resultados anteriores, de la figura R.12 se desprende que a tiempos tardíos, el sistema XXo provoca un aumento en los niveles del fragmento p85, siendo éste, más acusado y significativo en el cultivo celular de SK-APP_{SWE/LON}.

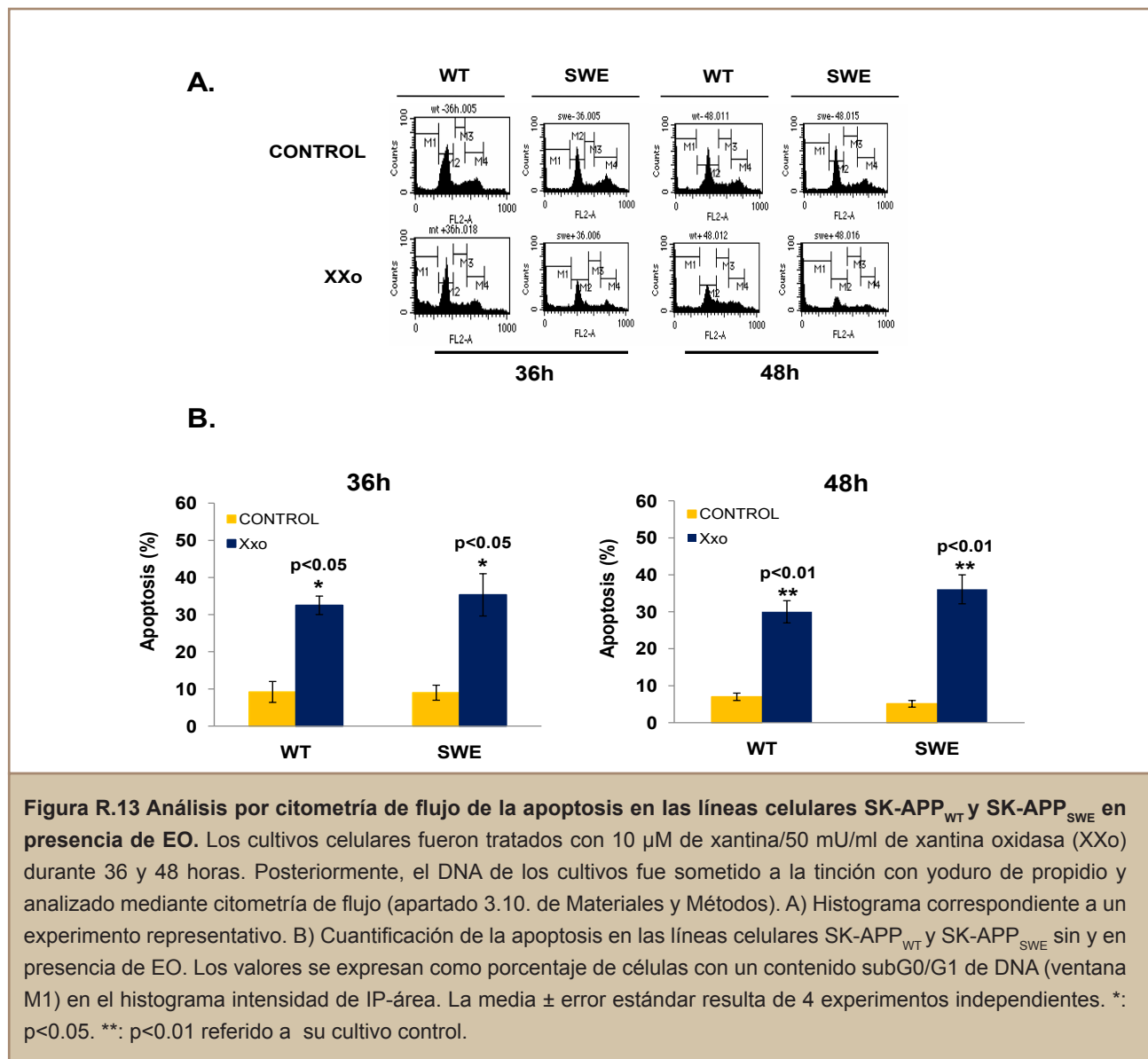
Los resultados presentados demuestran que mutaciones en el APP incrementan las señales de la vía de apoptosis intrínseca que induce el EO producido por el sistema XXo.

5.2.3. Cuantificación de la muerte celular por EO de las líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} en presencia de EO

Se ha descrito la implicación de programa apoptótico de la muerte celular en la neurodegeneración que tiene lugar en la EA (Su y cols. 1994; Mattson 2000; Rohn y cols. 2001a; Rohn y cols. 2001b). La muerte por apoptosis presenta una serie de características morfológicas que

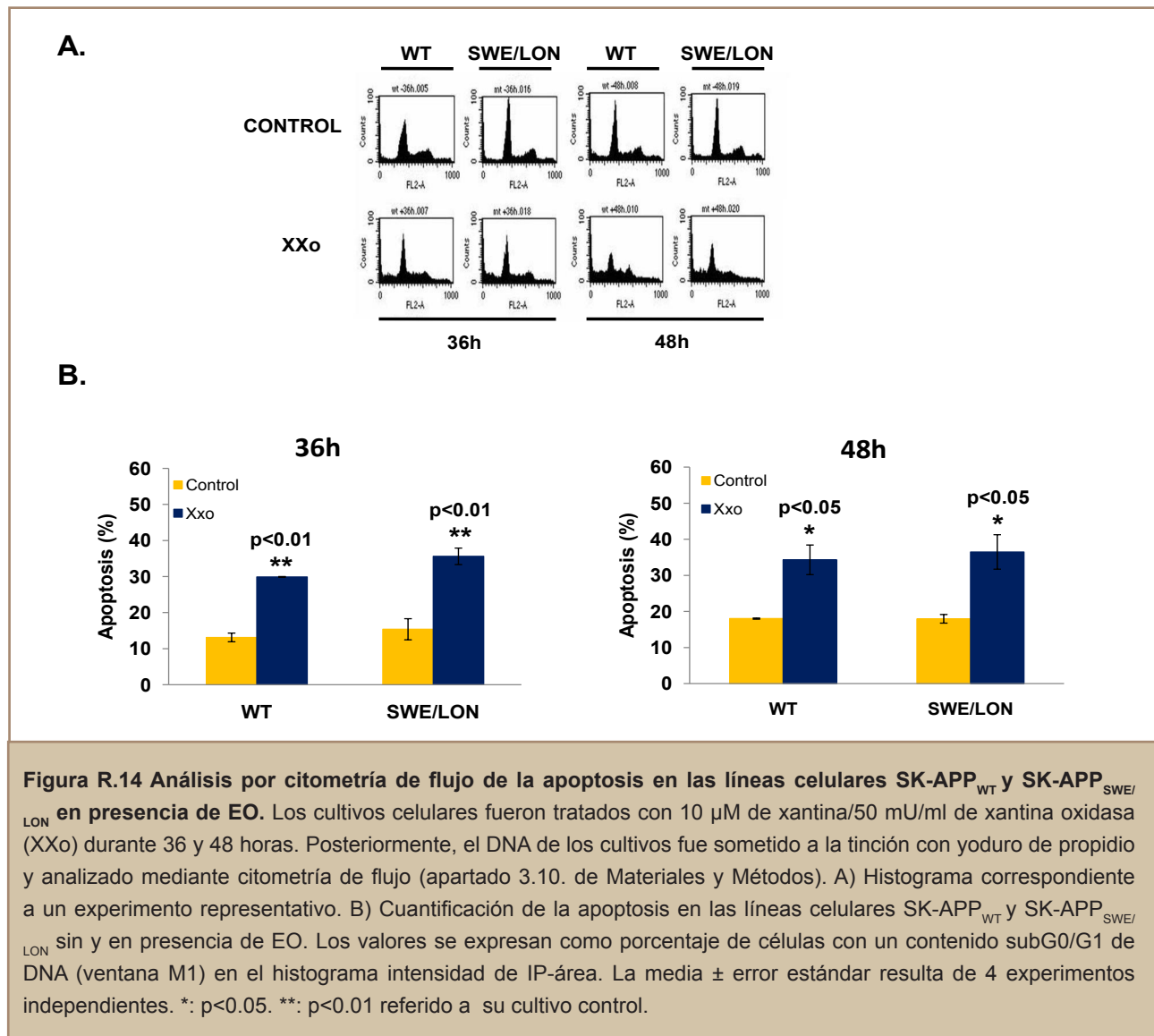
incluyen la formación de vesículas en la membrana y reducción del volumen celular, condensación y fragmentación nuclear (Kerr y cols. 1972; Wyllie y cols. 1980).

Por todo ello y con el fin de cuantificar más exhaustivamente la muerte que presentan las líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} en presencia de EO, analizamos la apoptosis por citometría de flujo después de la tinción con yoduro de propidio (figura R.13).



Tras el abordaje experimental y a la luz de los datos obtenidos, volvemos a comprobar en nuestras líneas celulares, que la exposición de las mismas al EO provoca un aumento de la muerte celular en los cultivos a tiempos largos del tratamiento. Como se muestra en la figura R.13, el incremento en el porcentaje de células con contenido subG0/G1 de DNA (región M1 en los distintos histogramas) fue significativo (*: p<0.05, a 36 horas; **: p<0.01, a 48 horas) en los cultivos celulares

tratados a 48 horas. A 36 horas, en la línea SK-APP_{WT} tratada con el sistema XXo fue del 32.4% ± 2.4 y de 35.5% ± 5.6 en la línea SK-APP_{SWE} expuesta al EO. Además, a 48 horas, el porcentaje de células en la región M1 de las células tratadas fue del 30% ± 3 y del 36% ± 3.9 en la línea SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}, respectivamente, obteniéndose un 6% de incremento en el porcentaje de apoptosis que produce el EO para la línea SK-APP_{SWE} respecto a SK-APP_{WT}. El ensayo de cuantificación de muerte celular apoptótica se llevó a cabo también en la línea celular SK-APP_{SWE/LON} (figura R.14).



Una vez más volvemos a comprobar y corroborar el efecto que tiene el EO sobre la muerte celular en las líneas estables. En los histogramas (figura R.14A) podemos observar cómo aumenta el porcentaje de células con contenido subG0/G1 de DNA en los cultivos tratados con respecto a los controles, siendo este porcentaje (figura R.14B) ligeramente superior al tiempo de 48 horas en la línea celular SK-APP_{SWE/LON} tratada con el sistema XXo (36.4% ± 4.7) al compararlo con la línea celular SK-APP_{WT} con el mismo tratamiento (34.3% ± 4.1). Para las 36 horas post-tratamiento,

los porcentajes de muerte celular por apoptosis fueron de 29.9 ± 0.09 y 35.6 ± 2.2 para las líneas tratadas SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE/LON} respectivamente, obteniéndose también un incremento en la línea SK-APP_{SWE/LON} casi del 6% de apoptosis inducido por el sistema XXo.

El conjunto de resultados obtenidos demuestra que, en presencia de EO –inducido por el sistema XXo–, existen marcadores indicativos de la activación del programa apoptótico en nuestras líneas celulares estables SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}, siendo relevante que este programa de muerte se muestra mucho más acusado en las líneas portadoras de mutaciones en la proteína del APP –SK-APP_{SWE} y SK-APP_{SWE/LON}– y podemos concluir, a tenor de todo lo último probado y descrito, que parece haber una correlación directa entre EO, las mutaciones en el APP y la muerte celular, y más concretamente, que la mutación “Swedish” en el APP podría sensibilizar a las neuronas a la inducción de la apoptosis después de su exposición al EO. Por todo ello, la expresión celular de APP mutante en combinación con la exposición al EO por el sistema XXo puede ser un modelo celular óptimo de aproximación al estudio de los mecanismos patogénicos de la EA familiar.

A partir de este punto y dado que la mutación “Swedish” se ha descrito en pacientes con EA temprana (Mullan y cols. 1992), fue seleccionada la línea SK-APP_{SWE} para todo el trabajo de investigación posterior.

5.3. METABOLISMO Y PROCESAMIENTO DEL APP EN EL MODELO CELULAR DE EA FAMILIAR: LÍNEA SK-APP_{SWE} EN PRESENCIA DE EO

En la literatura científica, poco o muy poco hay descrito sobre el papel que pudiera ejercer el EO sobre el metabolismo y procesamiento de la proteína APP. El propio A β es un producto del procesamiento proteolítico del APP, que bajo condiciones patológicas, puede tener efectos neurotóxicos (Gouras y cols. 2005) agregándose al final para formar las placas de amiloide. Diferentes estudios han descrito los efectos que provoca la adición exógena de este péptido sobre el metabolismo del APP, afectando al procesamiento (Schmitt y cols. 1997; Carlson y cols. 2000) y/o induciendo la expresión del APP (Le y cols. 1995; Moreno-Flores y cols. 1998). Incluso, se ha observado que los niveles tanto de α -secretasa –ADAM10– como del fragmento APP- α soluble (sAPP α), están disminuidos en el líquido cefalorraquídeo de pacientes de EA (Colciaghi y cols. 2002). Así, desde un punto de vista patológico, no sólo la presencia del A β es relevante, sino que también lo sería el descenso de este fragmento soluble, sAPP α , hecho que está relacionado con el daño en la memoria y con la neurodegeneración en el hipocampo y en el córtex (Turner y cols. 2003; Thornton y cols. 2006).

Por todo lo anteriormente dicho, quisimos investigar el metabolismo/procesamiento del APP en nuestro modelo celular de EA familiar: la edad (estrés oxidativo) en combinación con la expresión de la mutación “Swedish” APP, asociada a la EA familiar. Para esta investigación nos propusimos en primer lugar, estudiar el efecto del EO por sí sólo en dicho proceso, en la línea celular parental (SK-N-MC).

5.3.1. Metabolismo y Procesamiento del APP en presencia del EO.

Aunque si había antecedentes en el laboratorio acerca de un modelo de muerte celular apoptótica por el sistema XXo (Recuero y cols. 2009), resultaba totalmente novedoso estudiar el efecto de este sistema que genera radicales libres, en el metabolismo/procesamiento de APP.

5.3.1.1 Niveles de holoAPP y fragmento N-terminal APP secretado (sAPP):

Comenzamos por analizar los niveles de holoAPP o APP entero, así como los del fragmento N-terminal (sAPP) producido por las α y/o β - secretasas (ver figura I.5 de la Introducción) y que se libera al espacio extracelular (figura R.15).

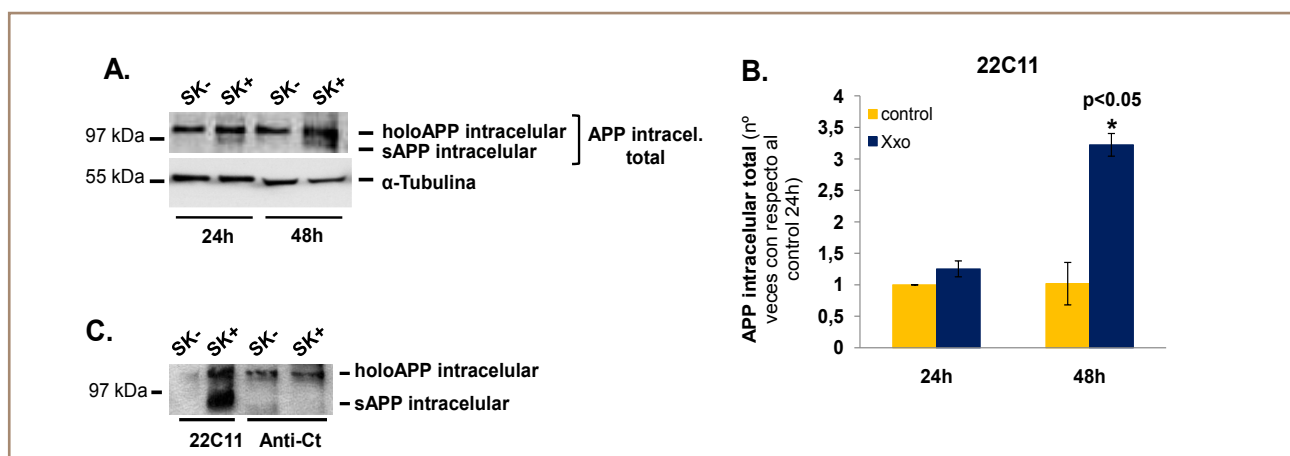
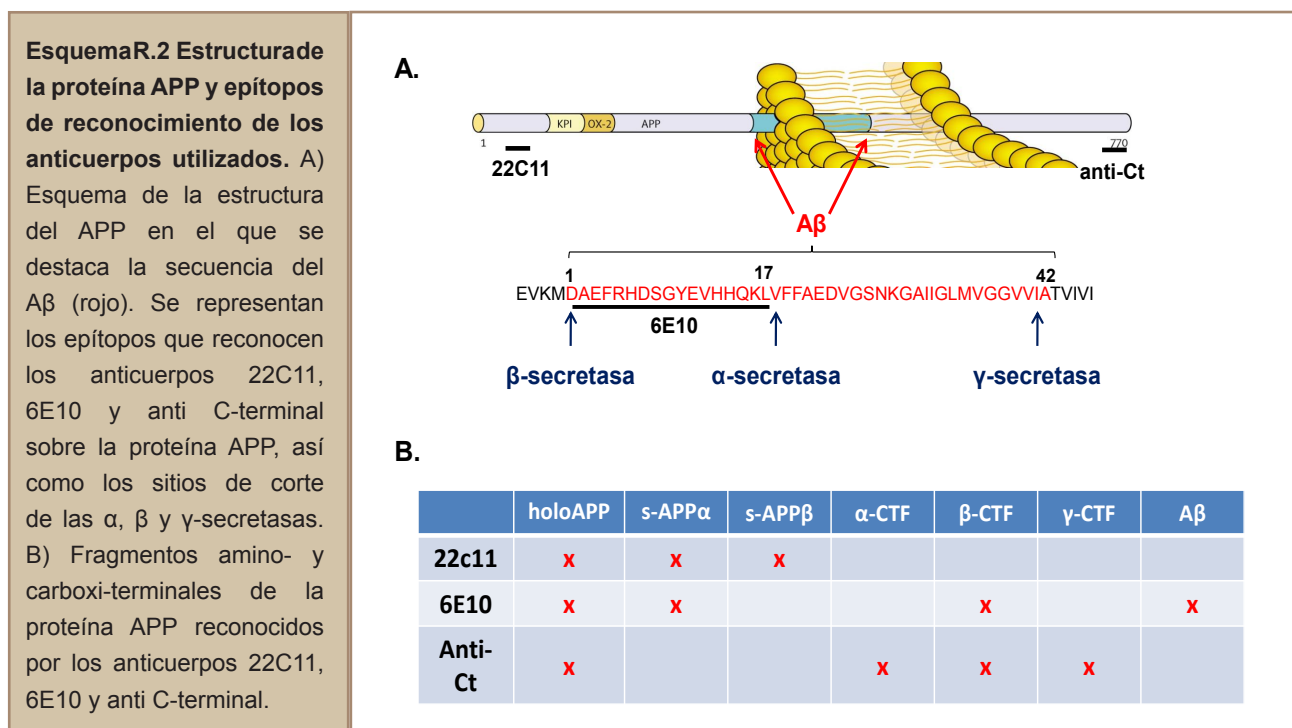


Figura R.15 El EO incrementa los niveles intracelulares del fragmento N-terminal del APP (sAPP intracelular) en la línea celular parental SK-N-MC. Los cultivos celulares de la línea SK-N-MC tratados (+) con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 24 y 48 horas fueron procesados para inmunomarcado después de electroforesis (apartado 3.7. Materiales y Métodos) de la proteína intracelular holoAPP y del fragmento sAPP. A) El gel representativo del inmunomarcado con 22c11 muestra en la parte superior, las bandas para el sAPP y holoAPP. En la parte inferior se muestran las bandas inmunorreactivas para el α -tubulina. B) Análisis densitométrico de los niveles de APP intracelular total. El gráfico muestra la media \pm el error estándar de los valores densitométricos normalizados por α -tubulina. Los valores se expresan en número de veces respecto al control (-) de 24 horas para 3 experimentos independientes. *: p < 0.05, con respecto al control 24 horas. C) Inmunomarcado después de electroforesis de las bandas de holoAPP y sAPP intracelular, utilizando los anticuerpos 22C11 y anti C-terminal. Se muestra un gel representativo de células tratadas 24 horas con XXo.

Los cultivos celulares de SK-N-MC fueron expuestos al EO durante los tiempos de 24 y 48 horas (figura R.15), tras lo cual procedimos a realizar el inmunomarcado después de electroforesis de los extractos celulares totales, utilizando el anticuerpo 22C11. Este anticuerpo que cuyo epítipo corresponde al extremo amino del APP (esquema R.2) reconoce tanto al holoAPP (la proteína APP entera sin procesar) como a los fragmentos N-terminales procesados del APP, sAPP- α y sAPP- β . El análisis con 22C11 (figura R.15A) nos muestra que al tiempo de 24 horas post-tratamiento no se aprecia ningún efecto significativo sobre los niveles de expresión del holoAPP aunque sí aparecía una banda inferior a la del holoAPP; a 48 horas post-tratamiento el anticuerpo 22C11 nos revela un incremento de las dos bandas inmunorreactivas (figura R.15C), la superior corresponde al holoAPP y la inferior que, en principio, podría ser el fragmento N-terminal procesado y que debería ser secretado, el sAPP.



Para averiguar si la banda inferior correspondía al fragmento sAPP, hicimos una comparación, en un mismo gel, de las bandas inmunorreactivas de APP intracelular total utilizando los anticuerpos 22C11 y anti C-terminal (figura R.15B). El anticuerpo anti C-terminal se une al extremo C-terminal del APP (esquema R.2) y reconoce solamente el holoAPP en la franja de peso molecular que se analiza en el gel. El inmunomarcaje reveló que el anti C-terminal sólo detectaba el holoAPP, la banda superior de las dos reconocidas por el 22C11. La comparación similar en un mismo gel, entre el anticuerpo 22C11 y 6E10, mostró el patrón similar de dos bandas (datos no mostrados). Por tanto, pudimos deducir que el sistema XXo produce un incremento en los niveles del sAPP intracelular (sAPP- α), que, aunque es más ligero, se aprecia ya a 24 horas, tiempo en el que el sistema XXo no induce muerte celular en SK-N-MC (Vicente Cenzano 2007). Se muestra en la

figura R.16, un ensayo de viabilidad por reducción de MTT en las células SK-N-MC expuestas durante 24 y 48 horas al sistema XXo, donde la pérdida de viabilidad celular a 24 horas es mínima. El incremento de sAPP intracelular en cultivos celulares, ha sido descrito con otro inductor de EO -el péptido A β - cuando este es añadido a los cultivos durante 24 horas (Henriques y cols. 2009).

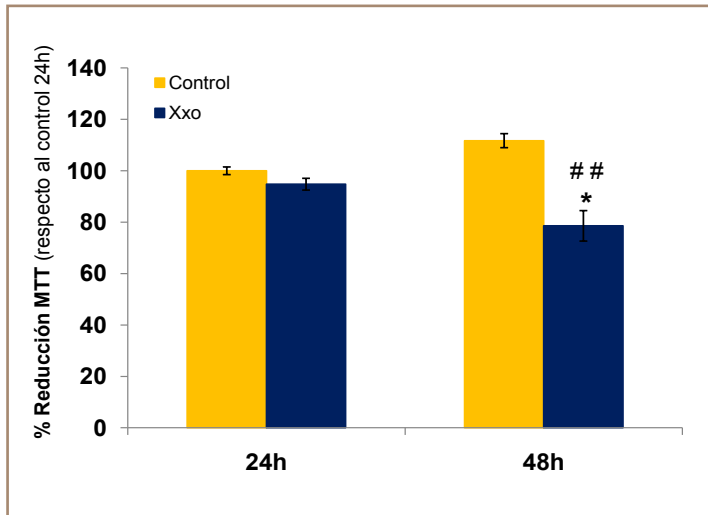


Figura R.16 Daño celular inducido por el sistema XXo en la línea SK-N-MC. Los cultivos celulares de SK-N-MC fueron tratados con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 24 y 48 horas. El daño celular fue analizado mediante el ensayo de reducción del MTT (apartado 3.8. de Materiales y Métodos). Los valores se expresaron como relativos a la D.O. de 550 nm con respecto al control de 24 horas. La media \pm el error estándar resulta de 3 experimentos realizados por triplicado. *: $p < 0.05$ respecto al control de 24 horas; ##: $p < 0.01$ respecto al control de 48 horas.

A continuación, analizamos el efecto del sistema XXo sobre la secreción de los fragmentos sAPP al medio de cultivo.

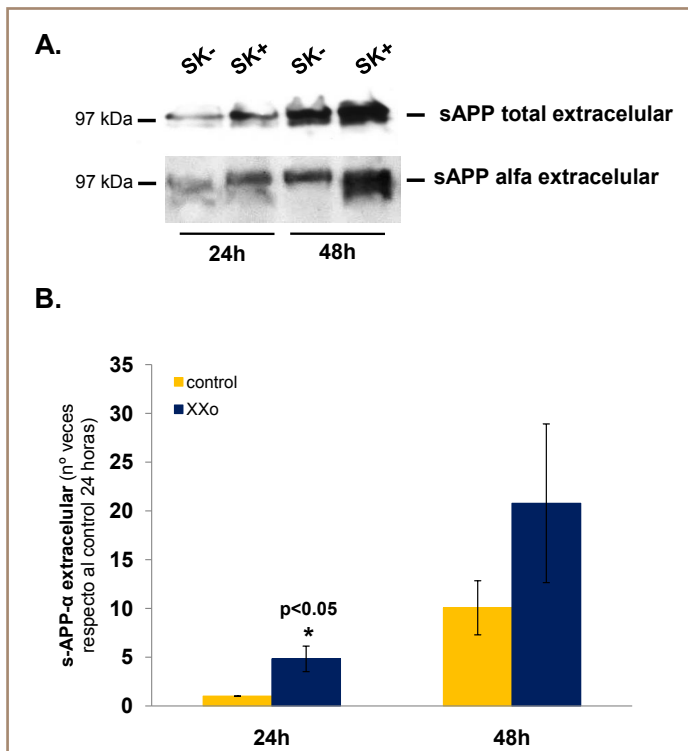


Figura R.17 Efecto del EO sobre la secreción de sAPP- α en la línea celular SK-N-MC. Los cultivos celulares de la línea SK-N-MC fueron tratados (+) con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 24 y 48 horas; los medios de cultivo fueron recogidos y procesados según el apartado 3.6. de Materiales y Métodos. A) Inmunomarcado después de electroforesis de las bandas de sAPP- α en los correspondientes medios de cultivo, utilizando el anticuerpo 22c11 (panel superior) y 6E10 (panel inferior), según el apartado 3.7. de Materiales y Métodos. Se muestra un gel representativo para cada anticuerpo. B) Análisis por densitometría de los niveles del fragmento sAPP- α en el medio de cultivo. La gráfica muestra la media \pm el error estándar expresada en número de veces con respecto al control (-) de 24 horas, para 3 experimentos independientes. *: $p < 0.05$ respecto al control 24 horas.

El medio de cultivo de las células tratadas con el sistema XXo durante los tiempos de 24 y 48 horas fue recogido y procesado tal y como se describe en el apartado 3.6.2. de Materiales y Métodos, para su posterior análisis por inmunomarcado después de electroforesis utilizando el anticuerpo 6E10, (esquema R.2), detectando específicamente el fragmento soluble, sAPP- α , en el *pool* de sAPP total, derivado del procesamiento no amiloidogénico (α -secretasa) de la proteína APP. Para analizar el sAPP total se realizó en paralelo, utilizando los mismos medios de cultivo, un inmunomarcado después de electroforesis con el anticuerpo 22C11. Tanto al tiempo de 24 horas como de 48 horas post-tratamiento con el sistema XXo, se observa un incremento en los niveles de sAPP- α en el medio de cultivo de las células SK-N-MC, en comparación con el medio control (figura R.17A) si bien el incremento en sAPP- α a 48 horas no resultó ser significativo (figura R.17B). Resultados similares se obtuvieron en cuanto a los niveles de las bandas de sAPP total, reveladas con 22C11, lo que indica que probablemente la contribución al *pool* del sAPP total es de sAPP- α . Estos resultados muestran que, tras 24 horas de tratamiento, el sistema XXo promueve una liberación de sAPP- α en medio de cultivo sin que esto afecte de forma significativa a la expresión de holoAPP (figura R.15B). Por ello, concluimos que el fomento de la secreción de sAPP- α por el sistema XXo podría ser debido a un incremento de la vía del procesamiento del APP por la α -secretasa. Además, un tratamiento prolongado (hasta las 48 horas) con el sistema XXo podría provocar un efecto de bloqueo en la secreción del sAPP- α intracelularmente producido (figura R.15). El procesamiento proteolítico y el tráfico del APP, que están íntimamente relacionados entre sí (Small y cols. 2006), estarían siendo afectados por el sistema XXo.

5.3.1.2 Fragmentos C-terminales derivados del APP: α , β y γ CTFs

A modo de recordatorio, la proteína APP sufría un procesamiento proteolítico llevado a cabo por tres enzimas: α , β y γ -secretasas (figura I.5), de cuyas actividades se generaban los fragmentos α , β y γ -CTF. El α -CTF -generado por el α -secretasa- produce el fragmento p3 + γ -CTF/AICD por acción del complejo γ -secretasa; y el β -CTF -generado por el β -secretasa- produce el fragmento A β + γ -CTF/AICD por acción del complejo γ -secretasa).

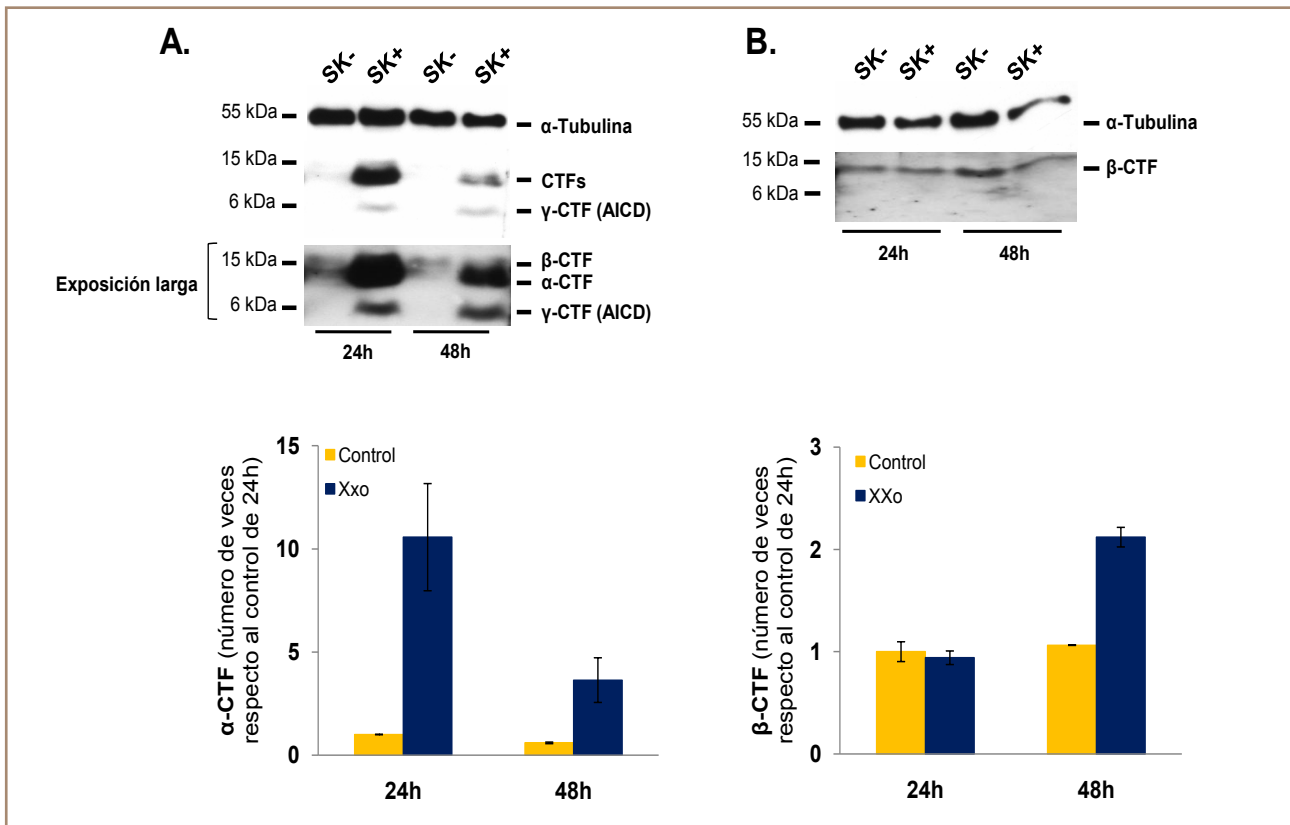


Figura R.18 El sistema XXo incrementa los niveles de los fragmentos C-terminales de APP en la línea parental SK-N-MC. Los cultivos celulares fueron tratados con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 24 y 48 horas. A) Los fragmentos C-terminales del APP (α , β y γ -CTFs) fueron analizados mediante inmunomarcado después de electroforesis utilizando el anticuerpo anti C-terminal según el apartado 3.7. de Materiales y Métodos. Se muestra un gel representativo en el que las bandas reactivas corresponden a los distintos fragmentos C-terminales; el panel superior corresponde a la banda de α -tubulina. La gráfica muestra la media \pm error estándar de los valores de densitometría normalizada por tubulina. Los datos están expresados como el número de veces respecto al control de 24 horas de 3 experimentos independientes. B) El fragmento β -CTF se analizó mediante inmunomarcado después de electroforesis utilizando el anticuerpo 6E10 según el apartado 3.7. Materiales y Métodos. Se muestra un gel representativo de las bandas inmunoreactivas del fragmento β -CTF; el panel superior corresponde a la banda de α -tubulina. La gráfica muestra la media \pm error estándar de los valores de densitometría normalizados por α -tubulina. Los datos están expresados como número de veces respecto al control de 24 horas de tres experimentos independientes.

Después de la exposición al EO de los cultivos de SK-N-MC, los fragmentos C-terminales - α , β y γ - que se mantuvieron asociados la célula tras el corte proteolítico del APP, fueron detectados en extractos totales mediante inmunomarcado después de electroforesis utilizando el anticuerpo anti C-terminal. Así, pudimos comprobar que el tratamiento con el sistema XXo incrementaba los niveles de α -CTF y γ -CTF/AICD siendo este último, indetectable en condiciones “control” (figura R.18A). Además, el incremento en α -CTF fue de nuevo mayor al tiempo de 24 horas de tratamiento, al igual que la secreción del sAPP- α (figura R.17). Sin embargo, al tiempo de 24 horas, aunque

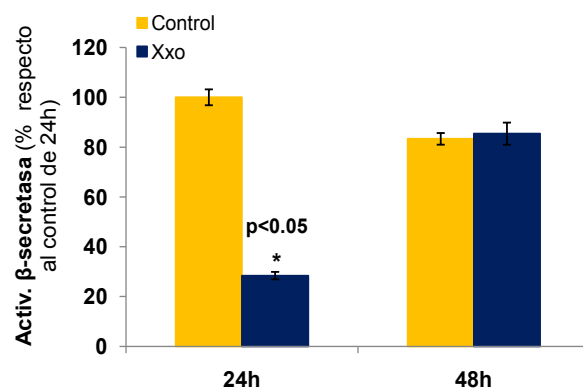
no observamos cambios en los niveles de β -CTF cuando monitorizamos este fragmento con el anticuerpo específico, 6E10 (figura R.18B) o incluso es apreciado un ligero descenso; al tiempo de 48 horas, si se detectó un incremento.

La acumulación de los α -CTF y γ -CTF/AICD podría depender de la línea celular utilizada. Sin embargo, cuando otro neuroblastoma humano –SH-SY-5Y- fue tratado durante 24 horas con el sistema XXo, encontramos también un incremento en los niveles de estos fragmentos (datos no mostrados). Estos resultados podrían explicar el incremento de la secreción del sAPP- α (a 24 horas) bajo tratamiento del sistema XXo, confirmando que el APP esta siendo procesado por la vía α -secretasa.

5.3.1.3 Actividad β -secretasa

El balance entre las vías α y β -secretasas tiene una relevancia fisiológica (Citron y cols. 1992; Felsenstein y cols. 1994); y los resultados hasta ahora obtenidos, sugieren un desbalance en las actividades α y β por el sistema XXo a tiempo de 24 horas, previo a la muerte celular, y que parece invertirse a las 48 horas post-tratamiento.

Figura R.19 Actividad β -secretasa en la línea parental SK-N-MC expuesta al sistema XXo. Los cultivos celulares tratadas con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 24 y 48 horas fueron procesados y analizados para la actividad β -secretasa según el apartado 3.11. de Materiales y Métodos. La media \pm error estándar resulta de 3 experimentos independientes. Los valores son expresados como % respecto al control de 24 horas. *: $p < 0.05$ respecto al control 24h.



Por ese motivo, se procedió al análisis de la actividad β -secretasa en los cultivos de SK-N-MC bajo tratamiento con el sistema XXo a los tiempos de 24 y 48 horas. Los datos obtenidos (figura R.19) revelan una disminución significativa de la actividad β -secretasa al tiempo de 24 horas; actividad que se recupera al tiempo de 48 horas tras el tratamiento con el sistema XXo. Estos resultados, junto con el incremento del fragmento β -CTF a 48 horas descrito en el apartado anterior, indican que podría haber una correlación entre dicho incremento y la recuperación de la actividad β -secretasa al tiempo de apoptosis (48 horas).

5.3.1.4 Niveles de las especies del péptido Aβ secretado: Aβ40 y Aβ42

Siguiendo en la línea de investigación de la actividad β-secretasa, y en relación con el procesamiento amiloidogénico a las 48 horas de tratamiento con el sistema XXo, quisimos cuantificar los niveles de Aβ secretado en el medio de cultivo celular después del tratamiento con XXo. Debido a que las concentraciones de Aβ detectado en los cultivos de la línea parental, SK-N-MC fueron muy bajas, en su defecto, utilizamos la línea celular estable que sobreexpresa APP-695, llamada línea SK-APP₆₉₅ (Serrano Carballal 2003; Recuero y cols. 2004). Antes de mostrar estos resultados, diremos que en esta línea celular SK-APP₆₉₅, también se observó un incremento en los niveles de α-CTF y γ-CTF en condiciones de EO, a las 24 horas de tratamiento, tiempo al que no se encontraron cambios significativos en los niveles de holoAPP (datos no mostrados); además, la pérdida de viabilidad celular a 24 y 48 horas por el tratamiento con XXo fue similar a la línea parental SK-N-MC. Por tanto la sobreexpresión de APP no afectaba a dicho proceso.

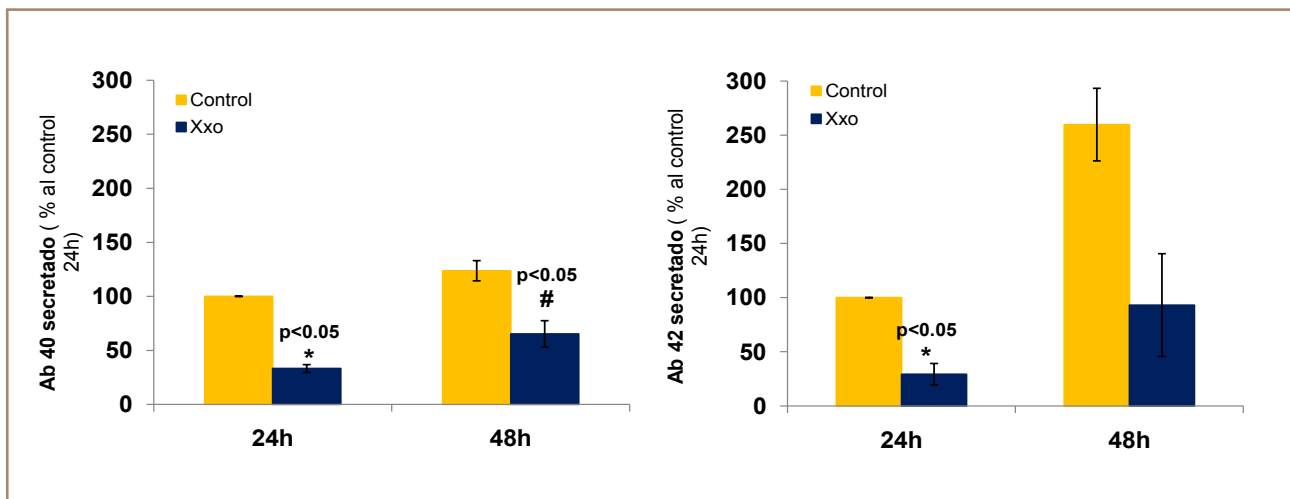


Figura R.20 Efecto del EO sobre la secreción de las especies 1-40 y 1-42 del péptido Aβ. Los cultivos celulares de la línea SK-APP₆₉₅ fueron tratados con 10 μM de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante los tiempos de incubación indicados. Cuantificación mediante ELISA sándwich específico para las especies Aβ-40 y Aβ-42 en el medio de cultivo (apartado 3.13. de Materiales y Métodos). Las gráficas muestran la media ± error estándar de los valores de densidad óptica expresados como porcentajes referidos al control de 24 horas para 3 experimentos independientes. *: p<0.05 con respecto al control de 24 horas. #: p<0.05 respecto al control de 48 horas.

Tras la exposición de los cultivos celulares de SK-APP₆₉₅ al tratamiento con el sistema XXo durante los tiempos de 24 y 48 horas, los distintos medios de cultivos fueron recogidos y procesados según el apartado 3.13. de Materiales y Métodos y las dos principales especies de Aβ (Aβ40 y Aβ42) fueron cuantificadas utilizando un ELISA sándwich, según el apartado 3.13. de Materiales y Métodos. La figura R.20 muestra que los niveles del Aβ40 y Aβ42 secretado se encuentran reducidos significativamente a 24 horas de exposición a XXo, siendo esta reducción más o menos igual para las dos especies. Sin embargo, a 48 horas en presencia de XXo, hay tendencia a la recuperación en los niveles de Aβ secretado.

5.3.1.5 Localización intracelular de los fragmentos derivados del APP: sAPP- α y CTFs

Seguidamente, nos propusimos ampliar y confirmar los datos obtenidos mediante aproximaciones bioquímicas que mostraban que el sistema XXo provoca un incremento de los niveles intracelulares de los fragmentos derivados del APP: CTFs (α y β) y sAPP- α . Así pues, mediante la técnica de inmunocitoquímica, procedimos al análisis de la localización intracelular de los fragmentos de APP utilizando para ello la línea celular SK-APP₆₉₅ debido a que las especies intracelulares derivadas del amiloide - β -CTF y A β - representan una población relativamente pequeña dentro del *pool* de la proteína endógena, que les hace especialmente difícil su monitorización (ver figura R.18B). Para ello, desarrollamos el análisis de inmunofluorescencia de doble marcaje de células SK-APP₆₉₅ expuestas durante 24 horas al sistema XXo, utilizando en anticuerpo 6E10 (verde) y el anti C-terminal (rojo) para obtener así imágenes confocales (figura R.21).

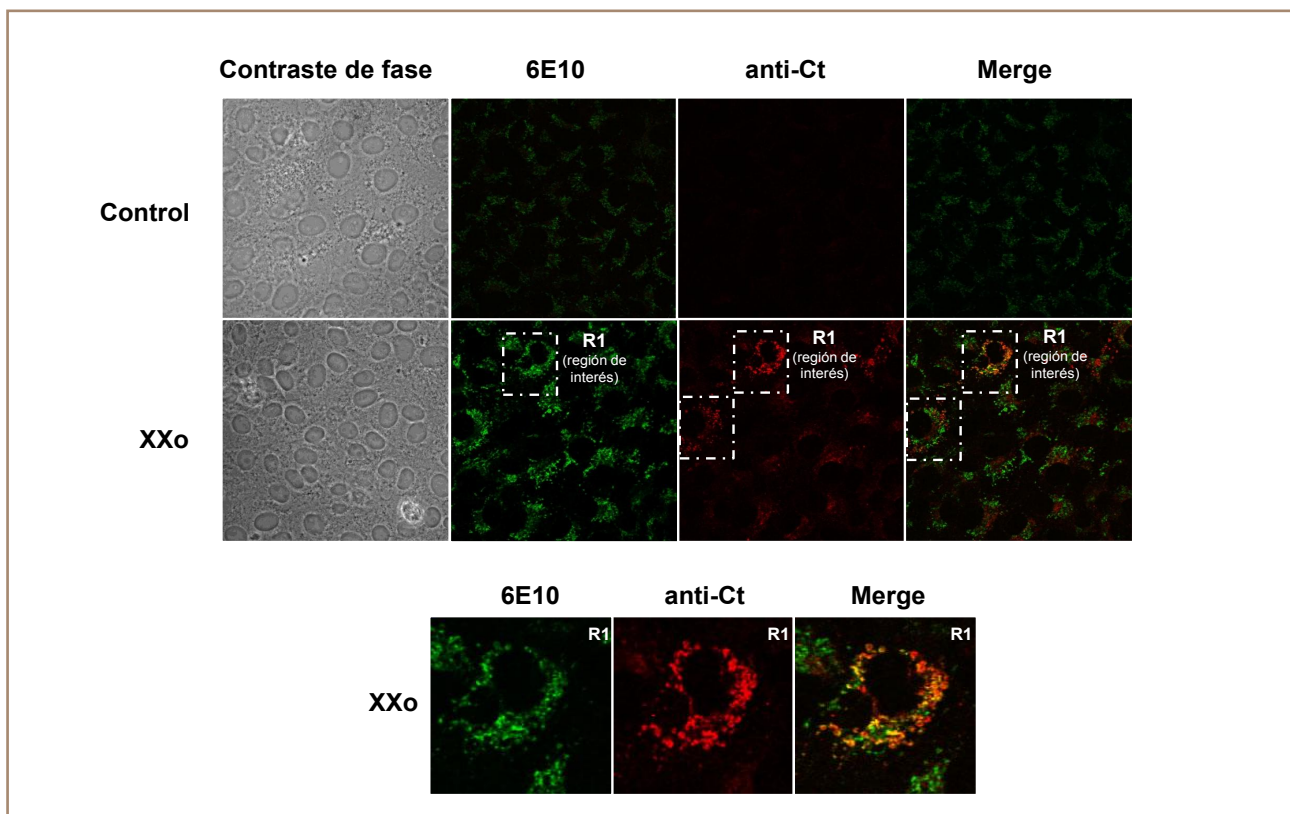


Figura R.21 Acumulación de los fragmentos N- y C- terminales derivados de la proteína APP, tras la exposición al EO de la línea celular SK-APP₆₉₅. Los cultivos de las células SK-APP₆₉₅ fueron tratados con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 24 horas. Se muestra un panel representativo de las imágenes confocales de fluorescencia y en contraste de fase e inmunomarcadas para los anticuerpos 6E10 y anti C-terminal (apartado 3.12. de Materiales y Métodos); en los recuadros en blanco se muestran las co-localizaciones (amarillo) de las señales positivas para el anticuerpo 6E10 (verde) y positivas para el anticuerpo C-terminal (rojo). Las imágenes fueron adquiridas con Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) utilizando el objetivo 63X/1.4 oil Plan-Apochromat.

Las especies proteicas acumuladas e inmunorreactivas al 6E10, probablemente estén compuestas por holoAPP, sAPP- α y/o β -CTF y una pequeña cantidad de péptido A β (esquema R.2). Y los inmunorreactivos para el anti C-terminal podrían componerse de APP CTFs y del holoAPP. Sin embargo, en condiciones basales, el anticuerpo anti C-terminal no daba grandes cantidades de señal fluorescente, por lo que cabe concluir que las especies inmunorreactivas al anti C-terminal no son holoAPP.

Las localizaciones positivas al 6E10, en condiciones basales, lo hicieron en pequeñas vesículas distribuidas por todo el citoplasma; mientras que el tratamiento con XXo condujo a una dramática acumulación de “clusters” positivos al 6E10, algunos negativos al anti C-terminal (recuadros en blancos). Dado el perfil inmunorreactivo de estos “clusters”, es razonable concluir que se trata de estructuras vesiculares -¿TGN, post-TGN?- continentales de sAPP- α , siendo esto coherente con las estructuras subcelulares donde se acumula sAPP intracelular. Estos clusters se hayan concentrados en el citoplasma y cerca de la membrana plasmática. Densidades vesiculares similares e inmunorreactivas para el 6E10 se han encontrado en cultivos celulares expuestos a otro inductor de EO como el péptido A β (Henriques y cols. 2009).

Las localizaciones positivas para el anti C-terminal pero negativas para el 6E10 fueron detectadas después del tratamiento con el sistema XXo en vesículas -¿del Golgi?- en el citoplasma, demostrándose así la acumulación de fragmentos α -CTF. El Golgi es uno de los sitios subcelulares conocidos donde se produce el procesamiento del APP y por tanto donde se da la producción de CTFs y de sAPP.

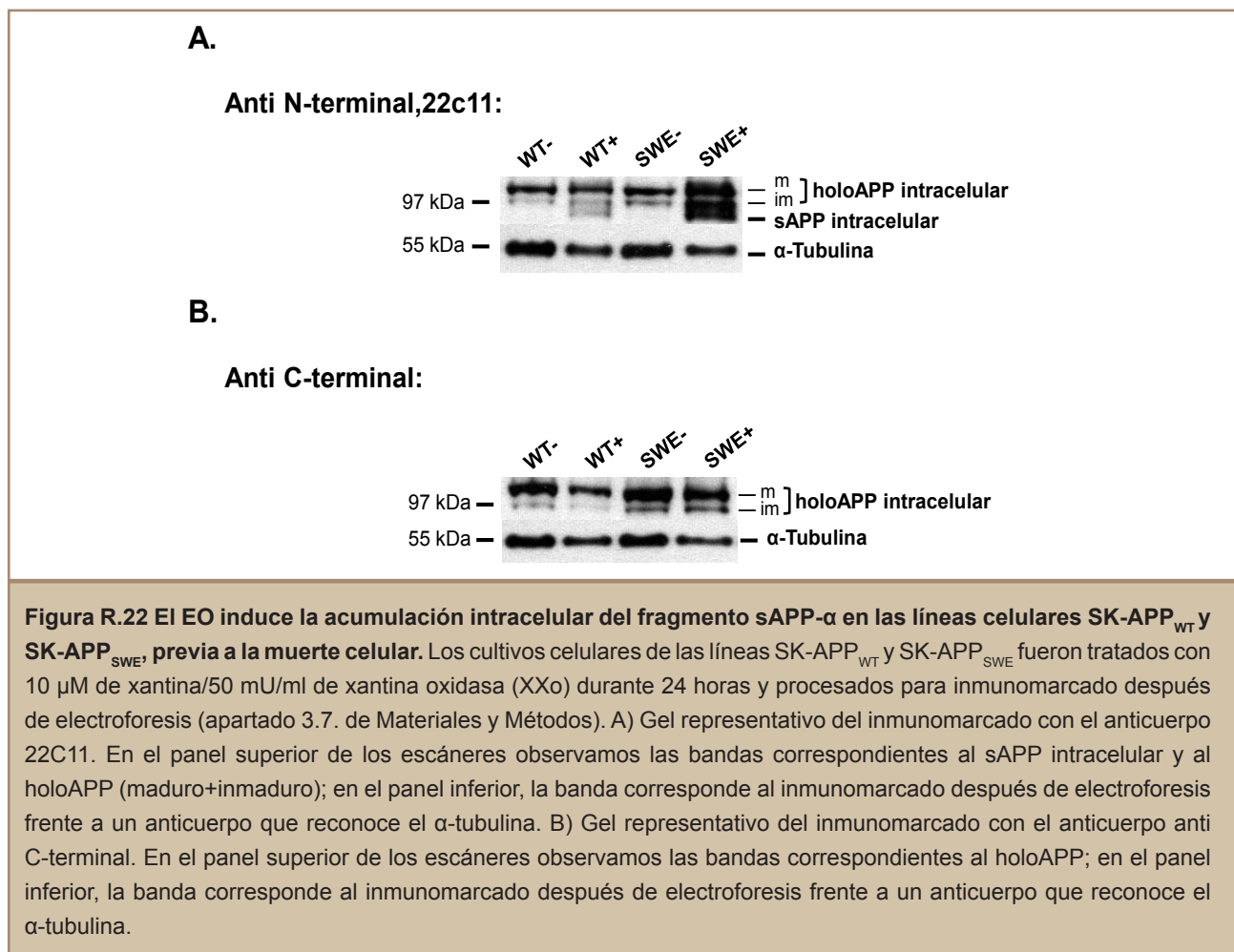
Además, la colocalización entre el anticuerpo 6E10 y el anti C-terminal (señal en amarillo), dada la posición de los epítomos de estos anticuerpos en la proteína APP (esquema R.2), nos sugiere que probablemente sea β -CTF; aunque sAPP- α producido y acumulado en el Golgi, podría estar siendo reconocido. Así, procedimos al inmunomarcaje de estas células utilizando los anticuerpos específicos para A β 40 y A β 42 de dos fuentes diferentes para comparar, pero no se obtuvo un marcate claro en ello.

La acumulación temprana de β -CTF con pequeñas cantidades de péptido A β , se han descrito como característica neuropatológica de pre-placa asociada al amiloide (McAlpine y cols. 2009). Los resultados presentados en este apartado acerca del metabolismo/procesamiento del APP en presencia del EO, nos muestran un modelo celular dinámico de respuesta al EO, donde el procesamiento proteolítico del APP y quizá el catabolismo y el tráfico de sus fragmentos derivados, están siendo modulados por el sistema XXo.

5.3.2. Efecto de la expresión de la mutación “Swedish” y el EO en el metabolismo/ procesamiento del APP

5.3.2.1. Niveles de holoAPP y fragmento APP secretado (sAPP)

Una vez comprobado el efecto del EO sobre el APP en la línea celular parental, SK-N-MC, comenzamos a estudiar la respuesta al EO en el procesamiento/metabolismo del APP por parte de las células que expresan APP mutante (SK-APP_{SWE}) (figura R.22).



Nuestros cultivos celulares fueron expuestos al tratamiento con el sistema XXo durante 24 horas, tras las cuales se realizó el inmunomarcado después de electroforesis detallado en la figura R.22. Para poder identificar correctamente los fragmentos o al holoAPP en el rango de peso molecular analizado, utilizamos dos anticuerpos: el 22C11 que -recordemos- se unirá tanto al holoAPP como al fragmento sAPP (sAPP-α y/o sAPP-β); y el anti C-terminal que se unirá al extremo carboxi- del APP reconociendo únicamente al holoAPP.

El anticuerpo 22C11 mostró una inmunorreactividad en la banda del sAPP intracelular en ambas líneas celulares expuestas al EO, siendo más acusada en la línea celular SK-APP_{SWE} bajo tratamiento del sistema XXo; mientras que con el anticuerpo C-terminal no se detectó alteración en los niveles del holoAPP (maduro + inmaduro) tras el tratamiento. Por tanto, comparando estos dos resultados podemos deducir que, al igual que en la línea SK-N-MC, la banda más inferior corresponde a un aumento de los niveles del sAPP intracelular haciéndose particularmente patente en la línea celular SK-APP_{SWE} en condiciones de EO. Recordamos también, que dado que a 24 horas el sistema XXo incrementaba los niveles de α -CTF, el sAPP podía ser mayoritariamente sAPP- α .

Para comprobar si este efecto se mantenía a tiempos de muerte celular en nuestras líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}, prolongamos la exposición al efecto del tratamiento del sistema XXo hasta las 48 horas (figura R.23).

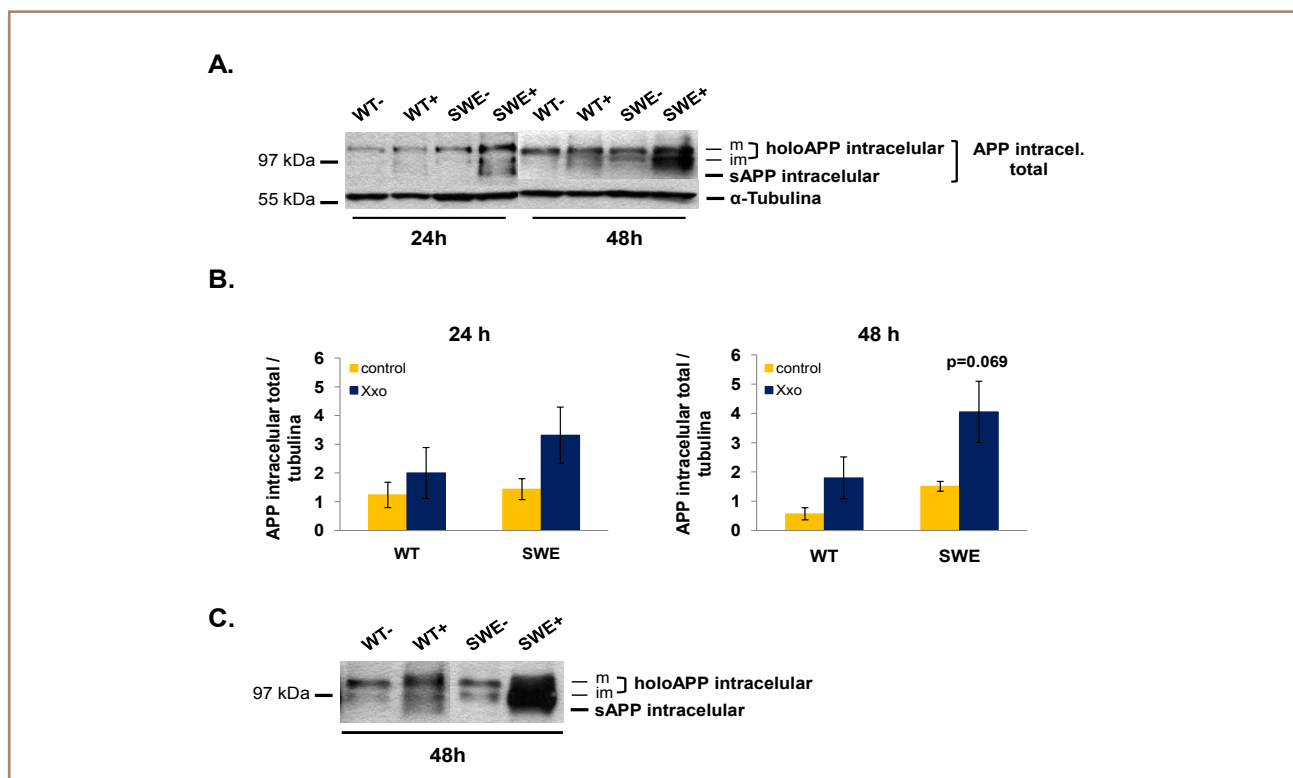
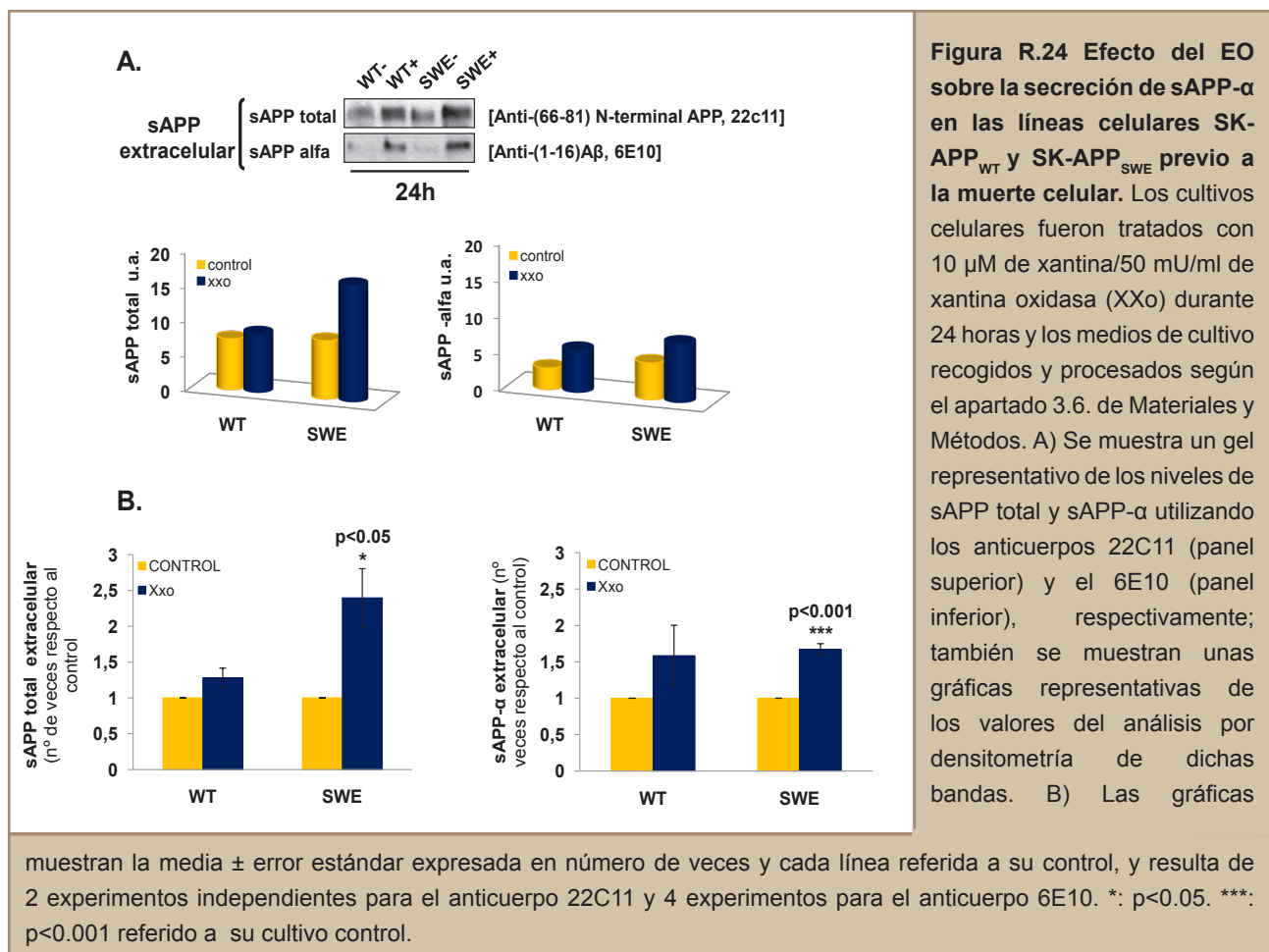


Figura R.23 El EO produce un incremento en el APP celular en la línea celular SK-APP_{SWE} al tiempo de muerte celular. Los cultivos celulares fueron tratados con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 24 y 48 horas y procesados para inmunomarcado después de electroforesis utilizando el anticuerpo 22C11 según el apartado 3.7. de Materiales y Métodos. A) Se muestra un gel representativo donde en el panel superior las bandas corresponde al holoAPP (maduro+inmaduro) y al sAPP- α intracelular y el panel inferior al α -tubulina. B) Cuantificación mediante densitometría de las bandas reactivas correspondientes al APP intracelular total. Dichos valores están normalizados por α -tubulina. La media \pm error estándar resulta de 2 experimentos independientes; resultados similares se obtuvieron en otros 3 experimentos adicionales. C) Inmunomarcado después de electroforesis de las bandas de holoAPP y sAPP intracelular, utilizando el anticuerpo 22C11. Se muestra un gel representativo de mayor resolución.

Como sucediera en la figura R.22, la cinética de tratamiento con el sistema XXo en los cultivos celulares de SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} reveló unos resultados similares. Así, tras 24 horas de exposición al EO, volvemos a comprobar la aparición de la tercera banda correspondiente al sAPP intracelular en ambas líneas, siendo mayoritaria en SK-APP_{SWE}; Sin embargo, a 48 horas mientras que en la línea “Wild type” se observaba el mismo patrón de bandas que a 24 horas (figura R.23A), en la línea SK-APP_{SWE} se observó un incremento casi significativo en el holoAPP intracelular (figura R.23B), no apreciándose la acumulación del sAPP intracelular; sin embargo, el incremento de holoAPP inmaduro fue muy significativo. Estos primeros resultados indicaban una alteración en el metabolismo/procesamiento por la presencia de un APP mutante en células que responden al EO. Alteraciones en el metabolismo del APP, concretamente en el tráfico intracelular, como el que se produce en respuesta al A β (que produce EO), ya ha sido sugerido para dar lugar a un APP celular incrementado (Carlson y cols. 2000).

A continuación, analizamos los niveles del fragmento de APP secretado (sAPP) en el medio de cultivo de las líneas SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} expuestas al sistema XXo durante 24 horas.



Para identificar cada uno de los fragmentos secretados de APP utilizamos dos anticuerpos: el 22C11 que –recordemos- se unirá tanto al fragmento sAPP- α (originado por el procesamiento proteolítico llevado a cabo por el α -secretasa) como al fragmento sAPP- β (originado por el procesamiento proteolítico de β -secretasa) por lo que reconoce al sAPP total; y el 6E10 que reconoce los 16 primeros aminoácidos del A β , por lo que se puede utilizar para monitorizar al fragmento sAPP- α . Como se puede observar en la figura R.24, los niveles del sAPP- α extracelular así como los del sAPP total, incrementaban en ambas líneas expuestas al EO; sin embargo hay que destacar que para la línea SK-APP_{SWE}, los incrementos eran más significativos que en la línea SK-APP_{WT}. Además los niveles de sAPP total eran más altos que los de sAPP- α en la línea SK-APP_{SWE}, estos resultados sugerían un incremento de la actividad β -secretasa la que genera el fragmento sAPP- β en la línea mutante expuesta al EO.

Seguidamente, quisimos estudiar qué ocurría a tiempos de muerte celular por EO con los niveles extracelulares del fragmento que tiene funciones neuroprotectoras (Hooper y cols. 2002), el sAPP- α .

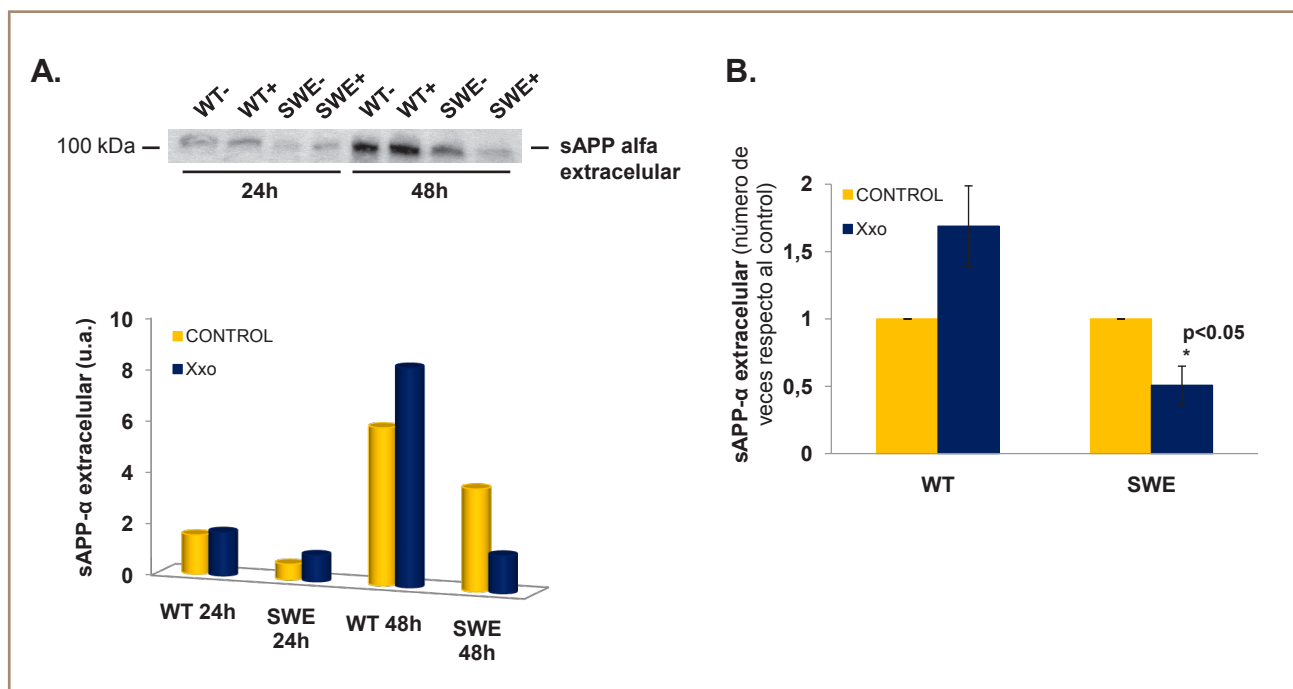


Figura R.25 El EO induce una disminución del sAPP- α extracelular en la línea celular SK-APP_{SWE} al tiempo de muerte celular. Los cultivos celulares fueron tratados con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 24 y 48 horas y los medios de cultivo recogidos y procesados según el apartado 3.6. de Materiales y Métodos. A) Se muestra un gel representativo de los niveles de sAPP- α extracelular utilizando el anticuerpo 6E10; también se muestra la gráfica representativa de los valores del análisis por densitometría de dichas bandas a 24 y 48 horas. B) La gráfica de 48 horas muestra la media \pm error estándar expresada en número de veces y cada línea referida a su control, para 2 experimentos independientes. *: p<0.05 referido a su cultivo control.

Transcurridos los tiempos de exposición al sistema XXo de 24 y 48 horas, procesamos los medios de cultivo para su inmunomarcado después de electroforesis; los datos obtenidos a 24 horas no difieren de los anteriormente mostrados ya que tanto en los cultivos de SK-APP_{WT} como de SK-APP_{SWE} aumenta el fragmento sAPP- α en presencia del EO al comparar con los cultivos controles. Este incremento fue mayor en SK-APP_{SWE} tratada. Por el contrario, al tiempo de 48 horas el patrón de secreción del fragmento sAPP- α se invierte en la línea celular SK-APP_{SWE} reduciéndose bruscamente en presencia del EO; el dato obtenido podría estar en concordancia con la pérdida de detección intracelular del fragmento sAPP- α al tiempo de 48 horas, observado anteriormente en la figura R.23. Sin embargo, en la línea SK-APP_{WT} incluso se favorecía la secreción de sAPP- α a 48 horas post-tratamiento; además esta misma línea, y en ausencia de EO, secretaba mayores niveles de dicho fragmento al comparar con la línea SK-APP_{SWE} no tratada; y el hecho de que el incremento sea menor en la línea SK-APP_{WT}, podría deberse al mayor nivel de secreción de sAPP- α que ya produce esta línea en ausencia de EO, en comparación con SK-APP_{SWE} (figura R.25A). Estos resultados indicaban una posible protección intrínseca de la línea SK-APP_{WT}, produciendo una mayor cantidad de fragmento sAPP- α .

5.3.2.2. Fragmentos derivados del APP: α , β -CTFs

Los resultados anteriores indicaban que en la línea SK-APP_{SWE}, se podía afectar el metabolismo del APP en respuesta al EO, quizás por alteración del procesamiento/catabolismo y/o por los altos niveles de APP celular a 48 horas post-tratamiento. En esta línea nos propusimos cuantificar los niveles de fragmentos C-terminales intracelulares, que como habíamos visto, se incrementaban por EO.

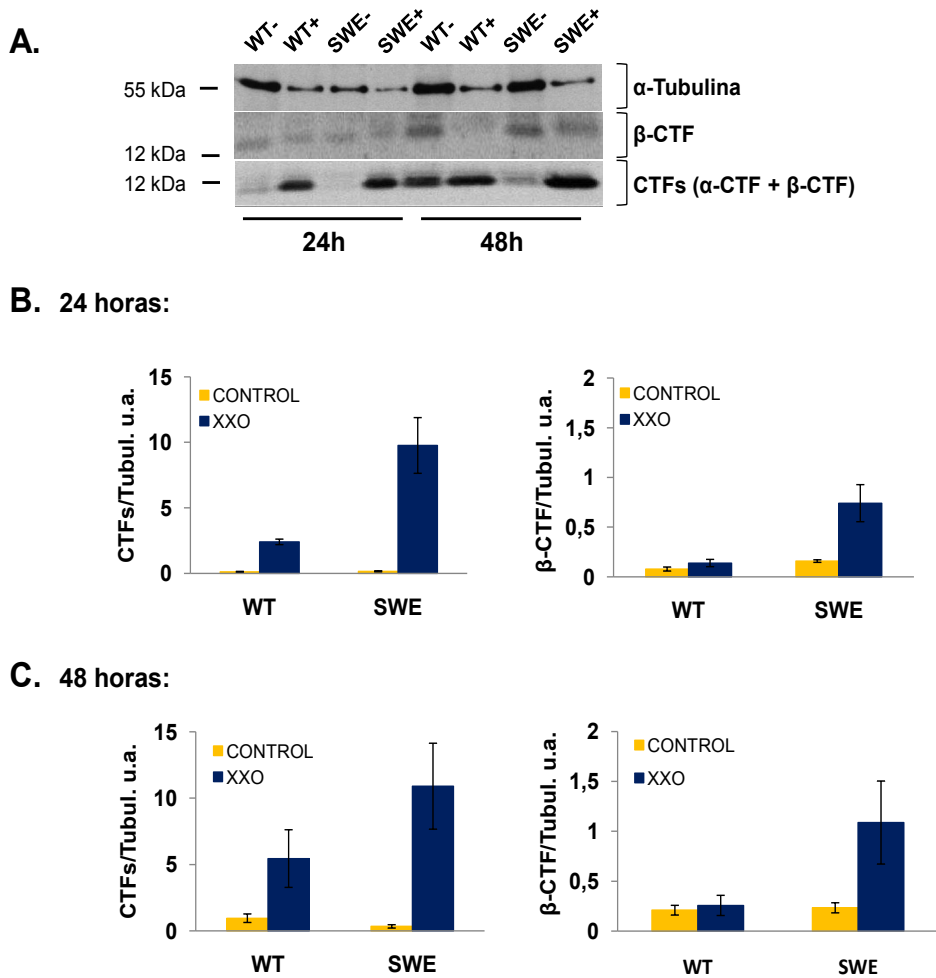


Figura R.26 Incremento de los fragmentos C-terminales α y β en condiciones de EO en las líneas celulares estables SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}. Los cultivos celulares fueron tratados con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 24 y 48 horas y procesados para inmunomarcado después de electroforesis, según el apartado 3.7. de Materiales y Métodos. A) Los fragmentos C-terminales del APP (α y β -CTFs) fueron analizados utilizando el anticuerpo anti C-terminal. La detección específica para el fragmento β -CTF se llevó a cabo con el anticuerpo 6E10. Se muestra un gel representativo en el que las bandas reactivas corresponden a los distintos fragmentos C-terminales; el panel superior corresponde a la banda de α -tubulina. B) Cuantificación mediante densitometría de las bandas reactivas correspondientes a los fragmentos C-terminales, los valores fueron normalizados por α -tubulina. La media \pm error estándar resulta de 2 experimentos independientes. Un total de 3 experimentos independientes fueron realizados, obteniéndose resultados similares.

Tras el tratamiento de los cultivos celulares durante 24 y 48 horas con el sistema XXo, se realizaron inmunomarcados después de electroforesis (figura R.26A) para detectar los fragmentos carboxi terminales del APP: α -CTF (generado por el α -secretasa) y β -CTF (por la β -secretasa). Tanto en el cultivo celular de SK-APP_{WT} como en el de SK-APP_{SWE} se detectó un incremento de los niveles de los fragmentos CTFs con el EO, al igual que habíamos encontrado en la línea SK-

N-MC, después de revelar con el anticuerpo anti C-terminal. Aunque este último anticuerpo -que reconoce tanto el α -CTF como el β -CTF- se revela en una sola banda cuando utilizamos geles de baja resolución, ya habíamos descrito anteriormente, que el sistema XXo a 24 horas, incrementaba mayoritariamente el fragmento α -CTF, lo cual habíamos verificado, por un lado, en geles de mayor resolución con el anticuerpo anti C-terminal detectándose las bandas de α -CTF y β -CTF, y por otro, reincubando esos mismos *blots* con el anticuerpo 6E10, específico sólo para el β -CTF. Este detalle también se puede observar en la figura R.26A. Los fragmentos γ -CTF sólo fueron detectables en condiciones de EO en ambas líneas (datos no mostrados) como ocurriera en la línea parental SK-N-MC. No se han podido cuantificar debido a la dificultad para conseguir una densitometría fiable de este fragmento de bajo peso molecular (6 kDa) ya que estamos en los límites de detección soportados por el propio escáner.

Al observar cada línea por separado a lo largo del curso temporal, en la línea SK-APP_{WT} se producía un incremento mayor por el EO del α -CTF que la línea SK-APP_{SWE}. Al comparar las dos líneas tratadas en cada uno de los tiempos, a 24 horas la diferencia en este incremento entre las líneas, era mayor que el observado a 48 horas.

En lo que respecta a los niveles del fragmento β -CTF, al observar cada línea tratada por separado en el transcurso del tiempo, es ahora en la línea SK-APP_{SWE} donde se produce un mayor incremento de dicho fragmento. Si bien, al comparar las dos líneas tratadas en cuanto a la acumulación del fragmento β -CTF en cada uno de los tiempos, a 48 horas, la diferencia en este incremento entre las dos líneas, era mayor que el observado a 24 horas.

5.3.2.3. Actividades α y β -secretasas

Los resultados anteriores revelaban un balance diferente de las vías α y β secretasas entre ambas líneas, en respuesta al EO. Dado que se ha descrito que el balance de estas vías tiene una relevancia fisiológica (Citron y cols. 1992), nos pareció de gran interés el análisis de las actividades de las secretasas que participan en el procesamiento proteolítico del APP.

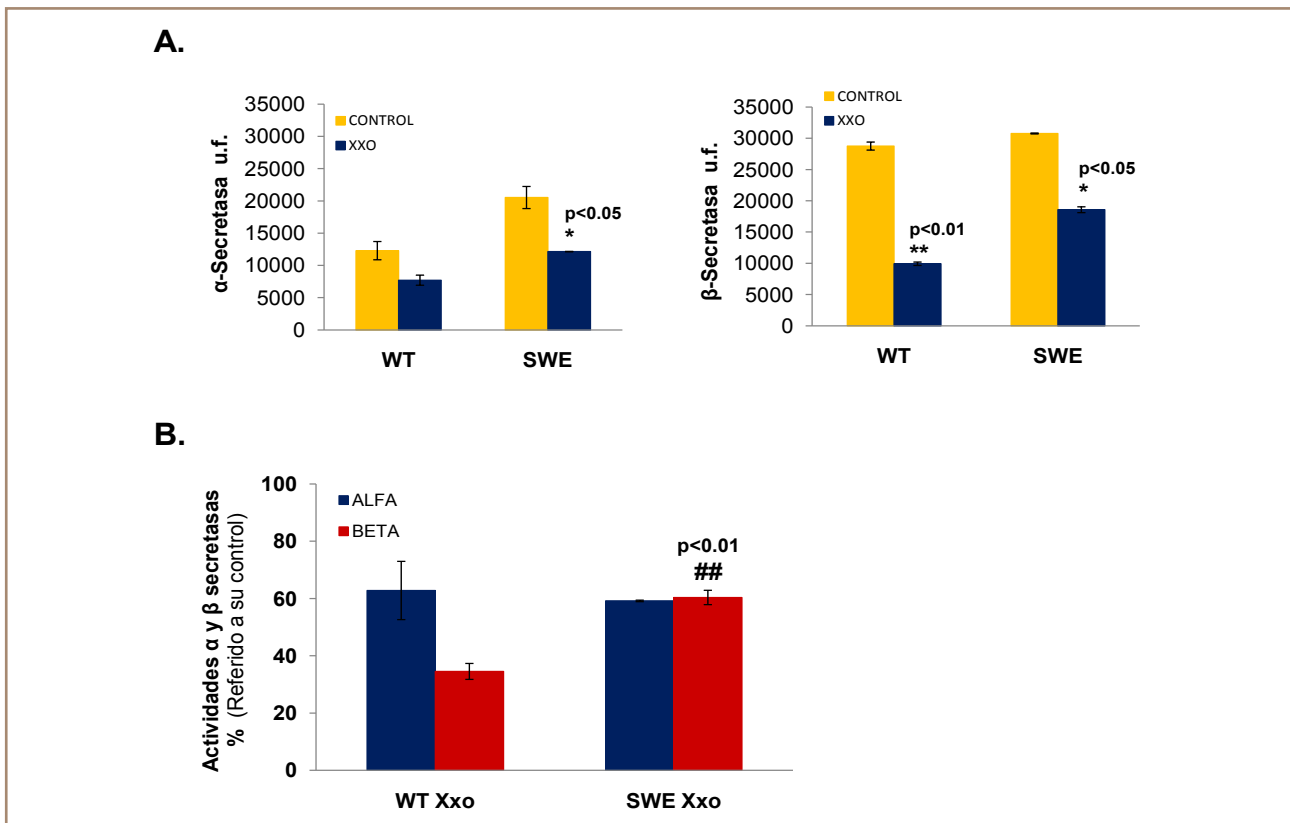


Figura R.27 Efecto del EO sobre las actividades α y β -secretasa en las líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}. En los cultivos celulares tratados con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 24 horas, fueron analizadas las actividades α y β -secretasa mediante ensayo fluorimétrico específico (apartado 3.11. de materiales y Métodos). Los valores fueron expresados en unidades de fluorescencia (A) y en porcentaje, cada línea referida a su control sin tratamiento (B). La media \pm error estándar resulta del duplicado experimental. Un total de tres experimentos independientes fueron realizados, obteniéndose resultados similares. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ referido a su cultivo control. ##: $p < 0.01$ comparando con la línea "Wild type" tratada.

Los cultivos celulares de SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} se trataron con el sistema XXo durante 24 horas, y después se procedió a la recogida de las muestras y a su posterior análisis según el apartado 3.11. de Materiales y Métodos. De los datos de la figura R.27A se desprende que con el tratamiento del sistema XXo, podemos observar un descenso significativo de la actividad α -secretasa sólo en la línea celular SK-APP_{SWE}; del mismo modo la actividad β -secretasa que desciende a 24 horas con XXo en las dos líneas celulares tratadas, lo hace ahora de forma más significativa en la línea celular SK-APP_{WT}. Además, al representar sólo el porcentaje de cada actividad de los cultivos tratados respecto a su control (figura R.27B), podemos concluir que la actividad α -secretasa en la línea "WT" tratada es mucho mayor que la β -secretasa. Esta respuesta sería similar a la que presentaba la línea parental SK-N-MC después de 24 horas de tratamiento con XXo. Sin embargo, en la línea SK-APP_{SWE} expuesta al EO, ese balance α/β secretasas se invierte, debido a un incremento significativo en la actividad β -secretasa.

5.3.2.4. Localización intracelular de los fragmentos derivados del APP: sAPP intracelular y CTFs

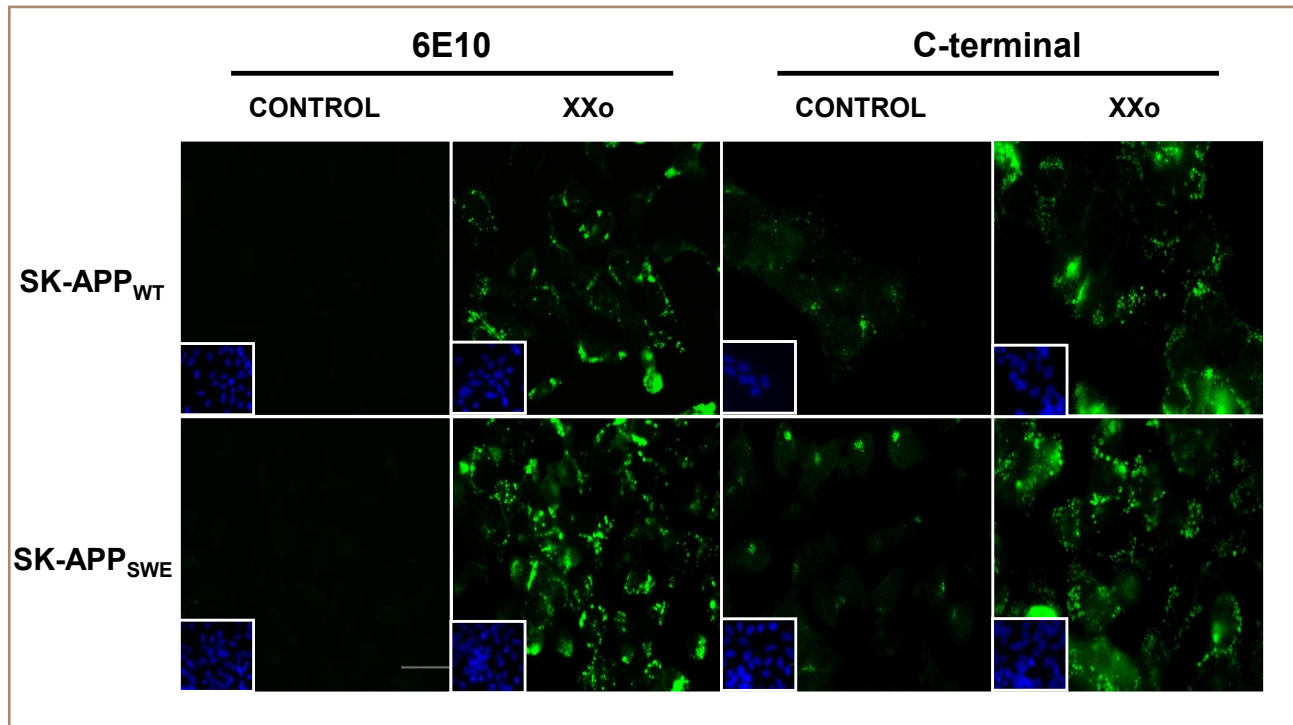
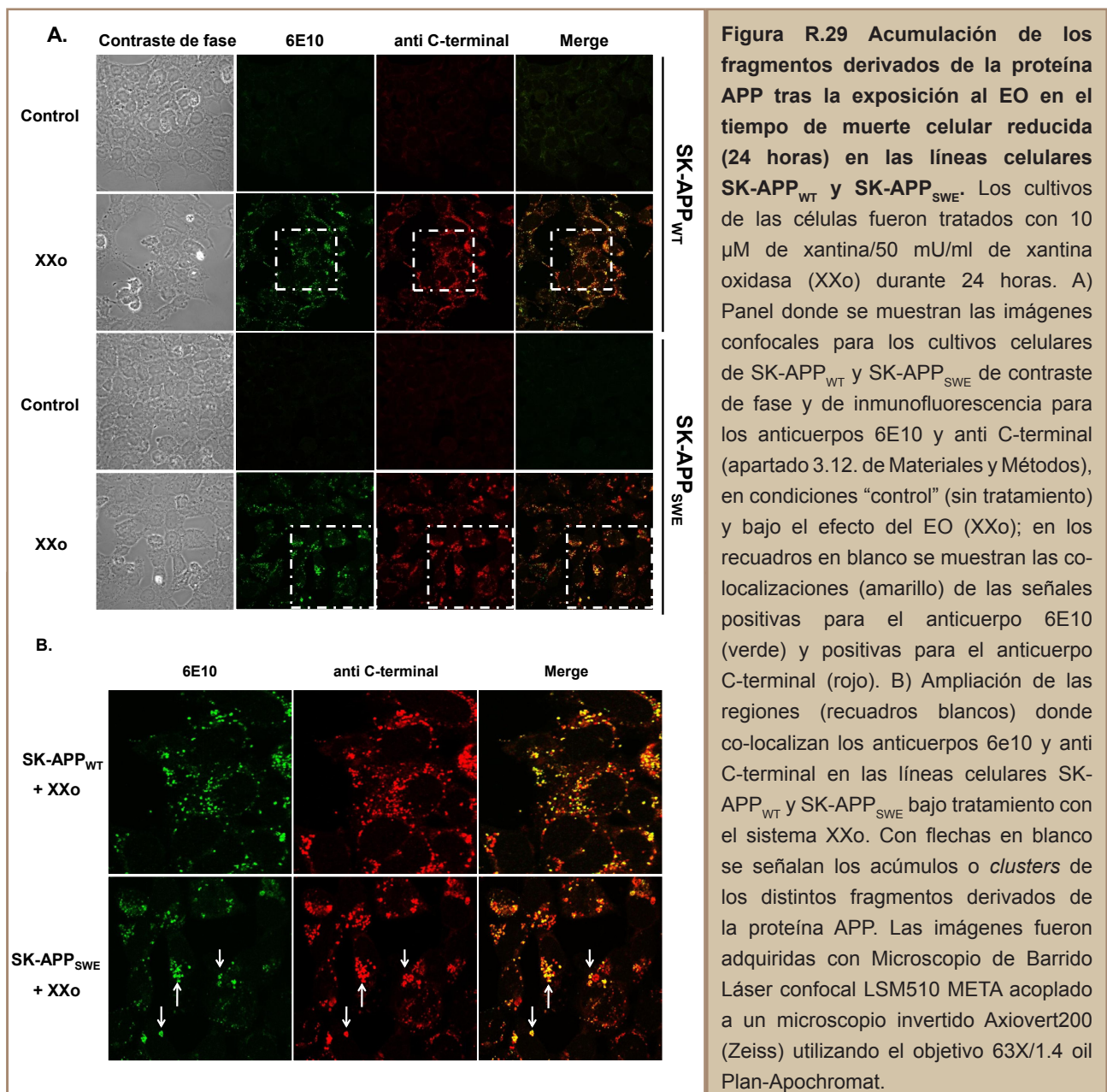


Figura R.28 Detección de los fragmentos del APP (sAPP- α y CTFs) en respuesta al EO. Los cultivos celulares fueron tratados con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 24 horas fueron procesados para inmunofluorescencia con los anticuerpos 6E10 y anti C-terminal, según el apartado 3.12. de Materiales y Métodos. Se muestra un panel representativo de las imágenes de fluorescencia; en el recuadro pequeño se muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color utilizando el objetivo 63X/1.4 oil Plan-Apochromat.

Para verificar el incremento intracelular de fragmentos derivados del APP, realizamos análisis por inmunocitoquímica (apartado 3.12. de Materiales y Métodos) después de cultivar las células SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} en presencia y ausencia de EO. Para el anticuerpo 6E10 y bajo tratamiento de 24 horas con el sistema XXo, la línea celular SK-APP_{SWE} mostró una inmunorreactividad ligeramente superior a la línea celular SK-APP_{WT}, debido -en parte- a la acumulación de sAPP- α intracelular, tal y como mostraban los inmunomarcados después de electroforesis del apartado 4.3.1. de Resultados. No se detectó inmunorreactividad en los cultivos control, por ello y dado que a 24 horas de tratamiento no existen diferencias significativas en los niveles de holoAPP, pudimos deducir que el 6E10 en esta técnica experimental no detectaba el APP entero y que su señal inmunorreactiva era mayoritariamente debida a los fragmentos derivados. De hecho, se ha descrito que el 6E10 no reconoce al APP entero en células fijadas con paraformaldehído (Frackowiak y cols. 2003; Frackowiak y cols. 2004; Wegiel y cols. 2007). Recordemos que este anticuerpo reconoce al holoAPP, sAPP- α , CTF- β y al A β (esquema R.2). En el caso del anticuerpo C-terminal, se encontró

un incremento en la inmunorreactividad, en ambas líneas en presencia de EO a 24 horas, siendo la señal mayor en la línea celular SK-APP_{SWE}; la especificidad del anti C-terminal sería mayoritaria frente a los fragmentos α -, β - y γ -CTF puesto que los análisis de inmunomarcado con dicho anticuerpo mostraron que el holoAPP a 24 horas de tratamiento no presentaba variaciones en sus niveles.

Con el fin de discriminar entre el fragmento N-terminal sAPP- α y los fragmentos C-terminales, quisimos realizar un estudio de co-localización con las líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} en condiciones de EO a los dos tiempos de tratamiento: 24 horas (previo o mínima muerte celular) y a 48 horas (muerte celular).



Una vez transcurrido el tiempo de exposición de 24 horas al EO, los cultivos celulares de SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} fueron recogidos y procesados para la realización de una inmunocitoquímica confocal según el apartado 3.12. de Materiales y Métodos. Para llevar a cabo el experimento utilizamos el anticuerpo 6E10 (verde) para el marcaje del sAPP- α intracelular, β -CTF y A β , y el anti C-terminal (rojo) para el marcaje de los fragmentos C-terminales α y β . Como se puede apreciar en la figura R.29A, en condiciones de “control”, ninguna de las dos líneas reveló inmunomarcaje ni para el 6E10 ni para el C-terminal, a pesar de que –para el anti C-terminal- el inmunomarcado después de electroforesis detecta al holoAPP en las dos líneas celulares (figura R.22). En condiciones de EO, la co-localización del 6E10 y del anti C-terminal fue evidente pero con diferencias, ya que si bien la línea celular SK-APP_{WT} adoptó un patrón punteado en forma de pequeñas vesículas (“*clusters*”) repartidas por todo el citoplasma celular, la línea celular SK-APP_{SWE} adoptó un patrón agregado de esos *clusters* o estructuras vesiculares y localizadas en ciertas regiones del citoplasma muy próximas al núcleo (figura R.29B). La colocalización fue mayor en la línea SK-APP_{SWE} mientras que la línea “WT” se apreciaba tinción positiva para el 6E10 y negativa para el anti C-terminal, lo que correspondería sólo al sAPP- α intracelular en su tráfico normal del Golgi a la membrana plasmática. Las señales positivas en rojo y negativas para el verde corresponderían sólo al fragmento α -CTF. La señal de colocalización (amarillo) correspondería con β -CTF por un lado, pero también, dado que el patrón vesicular podría ser el Golgi (el sitio de actuación de las secretasas para la producción de fragmentos C-terminales y N-terminal sAPP) esta señal también sería sAPP- α acumulado intracelularmente. Además, se puede comprobar en las imágenes de contraste de fase que la muerte celular es todavía mínima a 24 horas de tratamiento.

A la luz de estos resultados quisimos profundizar en este estudio llevando a los cultivos celulares de SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} a tiempos de muerte celular apoptótica (48 horas) en condiciones de EO (figura R.30).

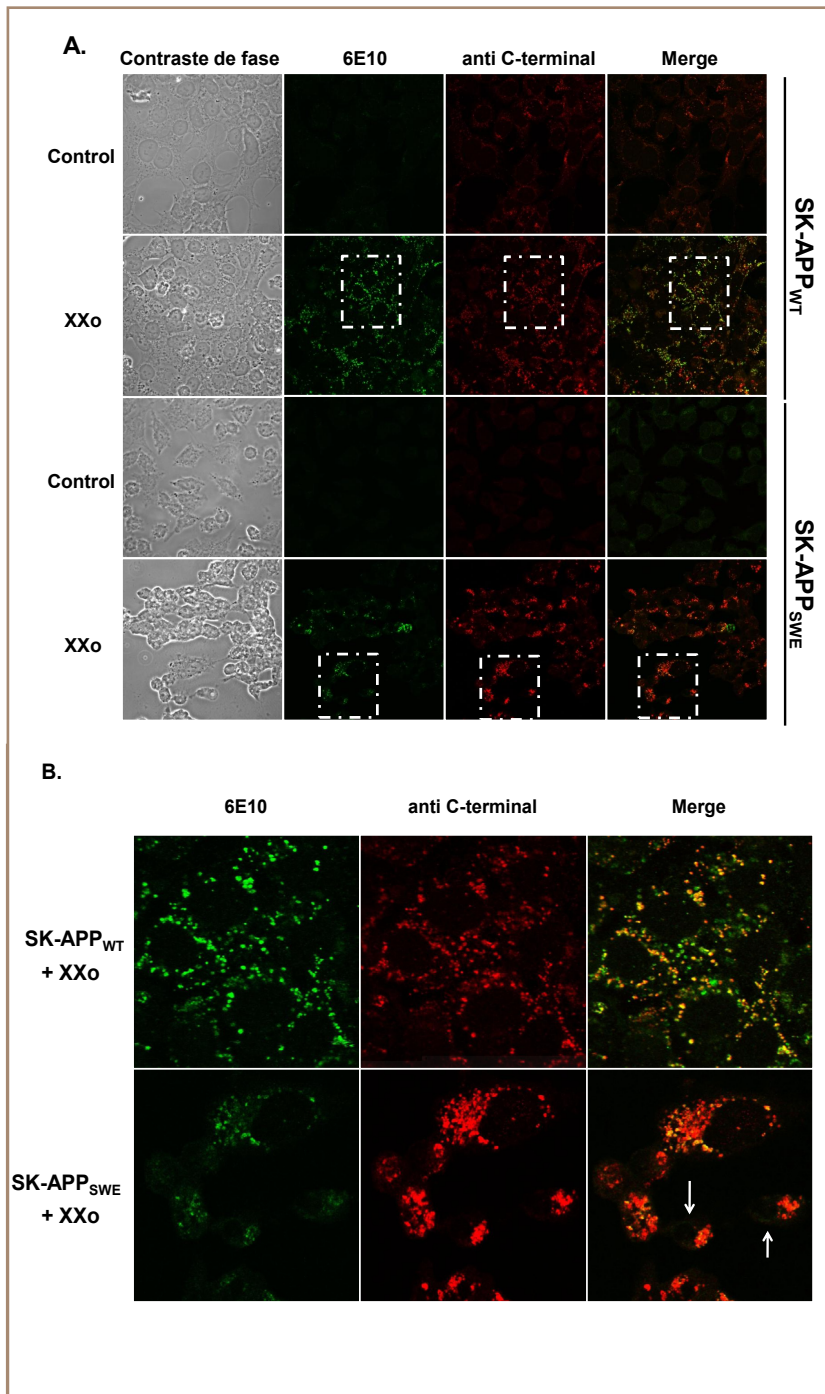


Figura R.30 Aumento en la acumulación de fragmentos C-terminales y pérdida de la señal sAPP- α en la línea SK-APP_{SWE} expuesta al EO hasta el tiempo de muerte celular (48 horas) en comparación con la línea SK-APP_{WT}. Los cultivos de las células fueron tratados con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 48 horas. A) Panel donde se muestran las imágenes confocales para los cultivos celulares de SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} de contraste de fase y de inmunofluorescencia para los anticuerpos 6E10 y anti C-terminal (apartado 3.12. de Materiales y Métodos), en condiciones “control” (sin tratamiento) y bajo el efecto del EO (XXo); en los recuadros en blanco se muestran las co-localizaciones (amarillo) de las señales positivas para el anticuerpo 6E10 (verde) y positivas para el anticuerpo C-terminal (rojo). B) Ampliación de las regiones (recuadros blancos) donde co-localizan los anticuerpos 6e10 y anti-Ct en las líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} bajo tratamiento con el sistema XXo. Con flechas en blanco se señalan los acúmulos o *clusters* de los distintos fragmentos C-terminales derivados de la proteína APP. Las imágenes fueron adquiridas con Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) utilizando el objetivo 63X/1.4 oil Plan-Apochromat.

Al igual que en el ensayo de 24 horas, los cultivos celulares fueron tratados con el sistema XXo durante 48 horas, las células fueron recogidas y procesadas según el apartado 3.12. de Materiales y Métodos. Los cultivos no tratados no mostraron inmunorreactividad significativa, sin embargo en la línea SK-APP_{WT} se aprecia una señal discreta con el anticuerpo anti C-terminal (rojo), lo que podría ser α -CTF y algo de β -CTF. Si observamos las imágenes del contraste de fase podemos ver cómo afecta el EO a la línea celular SK-APP_{SWE}, ya que aparecen en una fase de muerte celular apoptótica avanzada, de acuerdo con la mayor vulnerabilidad de esa línea a la muerte por EO

(apartado 4.2. de Resultados). De las imágenes de los cultivos celulares tratados con el sistema XXo podemos extraer varias conclusiones: en la línea celular SK-APP_{WT} podemos seguir viendo el patrón punteado positivo para el 6E10 (verde) que presentaba a 24 horas post-tratamiento, si bien a este tiempo de 48 horas, se observa claramente zonas de menos colocalización con el anti C-terminal dándonos idea de que dicho punteado corresponda al fragmento sAPP- α . Podemos sugerir que las células SK-APP_{WT} se encuentran en modo “supervivencia” ya que, a pesar del ambiente desfavorable en el que se encuentra, trataría de mantener el metabolismo/procesamiento normal de la proteína APP porque la señal del sAPP- α , se encuentra más localizado en zonas cercanas a la membrana plasmática, siguiendo esta proteína, el tráfico normal Golgi-membrana plasmática. También, de manera parecida a las 24 horas de tratamiento, se mantiene la señal rojo sola, por el anticuerpo anti C-terminal, correspondiente a α -CTF y parte de colocalización (señal amarilla) que como hemos dicho con anterioridad, correspondería al β -CTF y parte de sAPP- α acumulado (¿en el Golgi?). El escenario cambia radicalmente en el caso de la línea celular SK-APP_{SWE} expuesta al EO; el patrón agregado vuelve a aparecer al tiempo de 48 horas, perdiendo con mayor evidencia su distribución por el citoplasma, siendo en este caso el inmunomarcado más fuerte para la señal del anticuerpo C-terminal (rojo). Las células ya están en proceso de muerte a 48 horas, y lo interesante en la línea SK-APP_{SWE} es que parece que afecta a la vía secretora normal, acumulándose todos los fragmentos C-terminal y quizá el holoAPP en el Golgi más proximal, incluso en el RE, siendo estos últimos sitios donde se ha descrito la acumulación del fragmento β -CTF cuando se utilizan inhibidores del metabolismo energético o inhibidores del tráfico de proteínas como la Brefeldin A y la Monensina en la vía secretora (Gabuzda y cols. 1994). También en esta línea celular se puede apreciar muy levemente, un inmunomarcaje sólo de 6E10 -verde- en la zona perinuclear en un patrón difuso característico del RE (flechas blancas, figura R.30B), pudiendo corresponder al A β intracelular. Así pudimos reafirmar el papel neurocitotóxico del fragmento C-terminal β -CTF y su implicación en la muerte neuronal, como sugieren algunos autores (Lee y cols. 2000; Sebastia y cols. 2006; Vazquez y cols. 2009) y en la patogénesis de la EA (Lahiri y cols. 2002).

Diversos estudios han relacionado la vía lisosomal de degradación de las proteínas con los fragmentos C-terminales y la EA, por un lado, porque dichos fragmentos se degradan por la vía lisosomal (Golde y cols. 1992), y por otro que la vía de procesamiento amiloidogénico también ocurre en los endosomas/lisosomas, ya que en estos orgánulos subcelulares se produce el corte proteolítico por la β -secretasa (BACE) (Koh y cols. 2005). Por todo ello, nos pareció muy interesante poder observar, a tiempos de muerte celular por XXo (48 horas), si las acumulaciones anteriormente descritas -sobre todo- para la línea SK-APP_{SWE} y también para la línea SK-APP_{WT} colocalizaban con lisosomas, pudiendo relacionar nuestro modelo celular con lo que diversos autores habían propuesto.

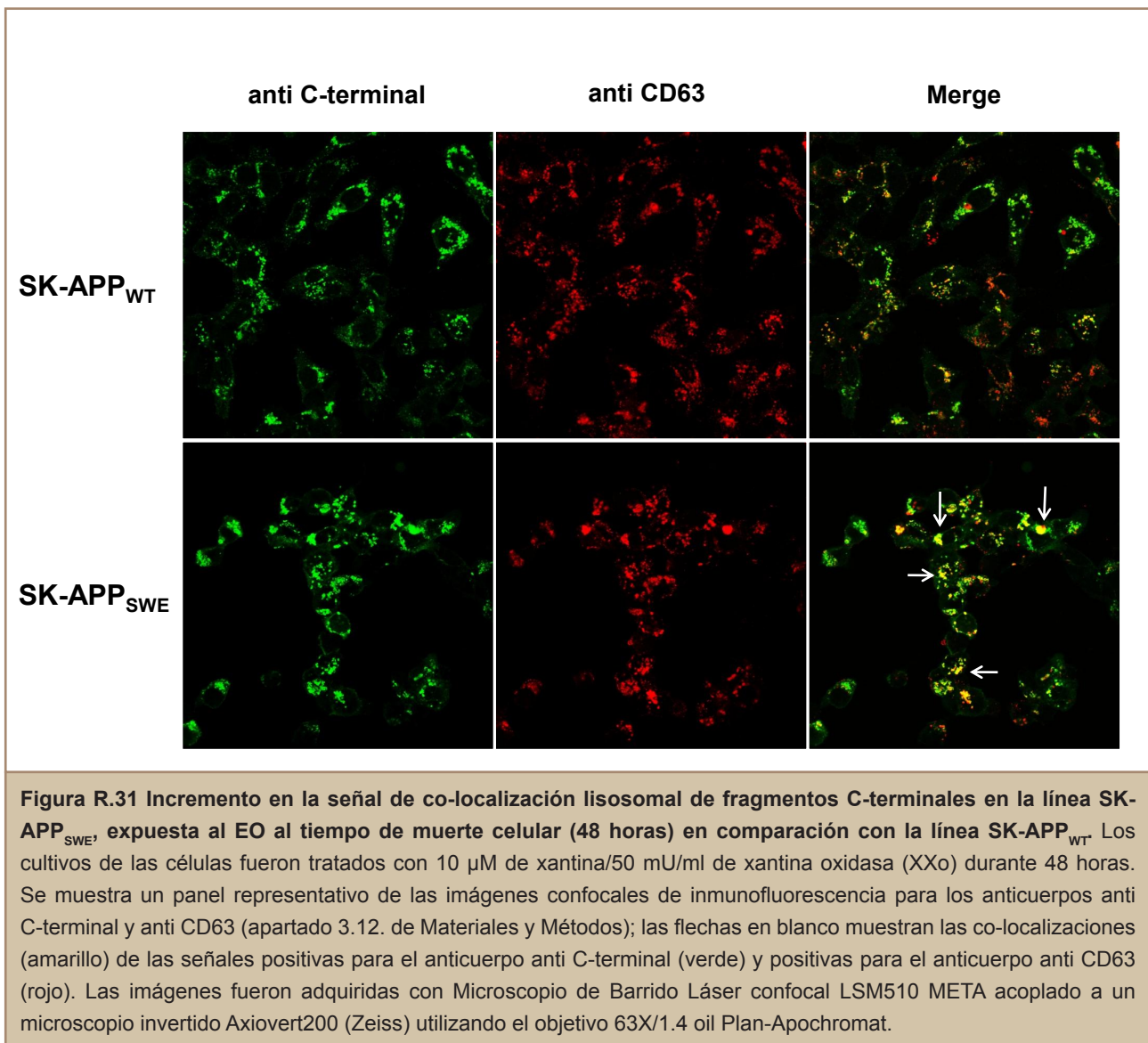


Figura R.31 Incremento en la señal de co-localización lisosomal de fragmentos C-terminales en la línea SK-APP_{SWE} expuesta al EO al tiempo de muerte celular (48 horas) en comparación con la línea SK-APP_{WT}. Los cultivos de las células fueron tratados con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 48 horas. Se muestra un panel representativo de las imágenes confocales de inmunofluorescencia para los anticuerpos anti C-terminal y anti CD63 (apartado 3.12. de Materiales y Métodos); las flechas en blanco muestran las co-localizaciones (amarillo) de las señales positivas para el anticuerpo anti C-terminal (verde) y positivas para el anticuerpo anti CD63 (rojo). Las imágenes fueron adquiridas con Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) utilizando el objetivo 63X/1.4 oil Plan-Apochromat.

Tras la exposición de los cultivos celulares de ambas líneas al sistema XXo durante 48 horas, las muestras fueron procesadas para la realización de una inmunofluorescencia confocal según el apartado 3.12. de Materiales y Métodos. De las imágenes confocales obtenidas pudimos concluir que: primero, corroboramos la acumulación de fragmentos C-terminales tanto en la línea SK-APP_{WT} como en la línea SK-APP_{SWE}, tras la exposición al EO durante 48 horas, volviendo a hacerse más patente en esta última línea celular; y segundo, la existencia de co-localización de los fragmentos C-terminales con vesículas lisosomales (co-localizaciones en amarillo), con mayor robustez en la línea mutante “Swedish”, dándonos idea de que en esta línea puede darse el fenómeno descrito anteriormente.

A la luz de los resultados obtenidos, podemos concluir que las alteraciones detectadas en el metabolismo de la proteína APP en la línea celular mutante y expuesta al EO validaban nuestro modelo celular para el estudio de dicho proceso y para ahondar en los mecanismos patogénicos que pudieran estar implicados en la EA familiar.

5.4. ANÁLISIS GENÓMICO/FUNCIONAL DEL MODELO CELULAR DE EA FAMILIAR

Los estudios realizados hasta ahora en nuestras líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} mostraban que la expresión de APP mutante sensibilizaba a las células en la muerte neuronal por EO; pero además, modificaba el metabolismo/procesamiento, alterando el tráfico y catabolismo de esta proteína. Así, para continuar con la investigación, nos propusimos llevar a cabo un análisis de expresión génica diferencial en las líneas SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}, en ausencia y presencia de EO; para dicho estudio se utilizó la tecnología de microarrays de DNA (Agilent technologies).

5.4.1. Estudio de la expresión génica diferencial mediante microarrays de DNA

Los cultivos celulares de SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} fueron tratados con el sistema Xxo durante 6, 12, 24, y 36 horas, para después ser recogidos y procesados según el apartado 3.15. de Materiales y Métodos. Este procedimiento se llevo a cabo 4 veces, verificándose en cada una de ellas y a modo de control interno de los experimentos, la viabilidad celular y la apoptosis (el fragmento de PARP, p85) en los tiempos de 24, 36 y 48 horas de exposición de los cultivos al EO. Con el modelo celular que presentamos en esta tesis, descrito en los apartados anteriores, a tiempos largos de exposición al EO las células presentaban muerte por apoptosis, siendo esta más significativa en la línea celular SK-APP_{SWE}; por ello, todo lo que ocurra a nivel transcripcional antes de los tiempos de muerte establecidos en el modelo presentado sería de nuestro interés. Con esta premisa y tras la realización del microarray y su posterior análisis, pudimos concluir que:

- Las comparaciones a tiempos 6h y 12h no revelaban un número significativo de genes expresados diferencialmente.
- A tiempo 24h hay 1503 genes que tienen una expresión diferencial significativa ($p < 0,05$) al comparar las líneas tratadas SK-APP_{SWE} respecto a SK-APP_{WT}.
- El análisis de las condiciones 24h, sin la presencia de EO, “Swedish” vs “Wild type”, puso de manifiesto 813 genes diferencialmente expresados ($p < 0,05$).

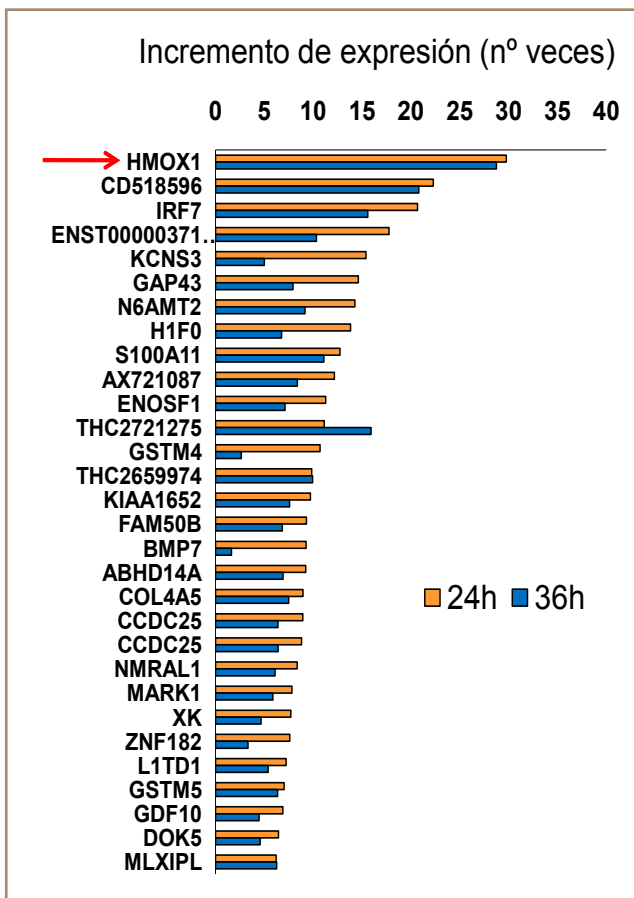


Figura R.32 Cambio de la expresión génica en la línea celular SK-APP_{SWE} en presencia de EO analizado por Microarray de cDNA. Se indica el número de veces que cambia la expresión de los 25 primeros genes que se sobreexpresan a 24 horas post-tratamiento con 10 µM de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) y que mantienen dicha sobreexpresión a 36 horas post-tratamiento, comparando la línea celular SK-APP_{SWE} frente a la línea celular SK-APP_{WT}. La expresión diferencial fue significativa (p < 0,05) para todos los genes del tiempo de 24 horas siendo n=3. La barra de color naranja corresponde al tiempo de 24 horas y la azul, al de 36 horas.

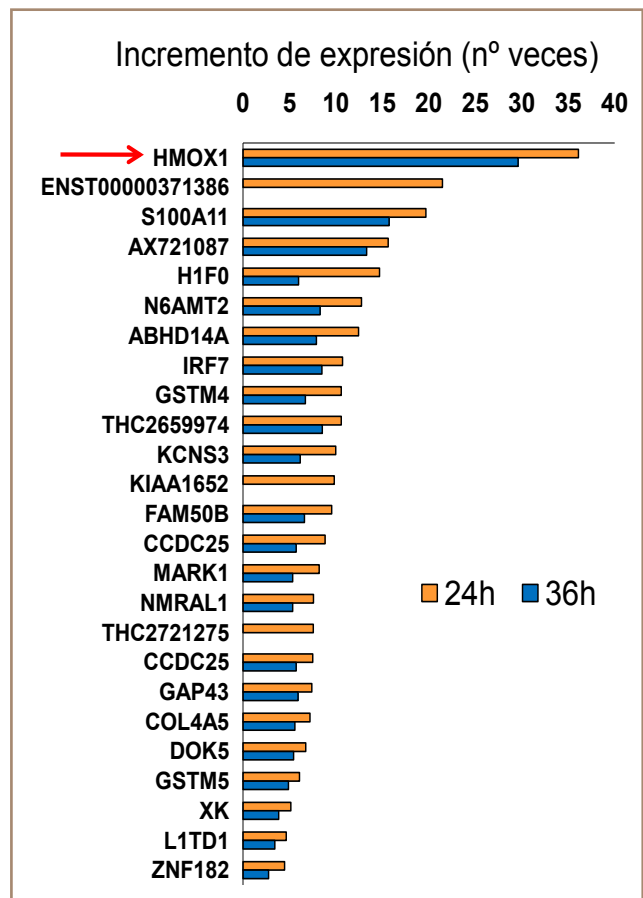


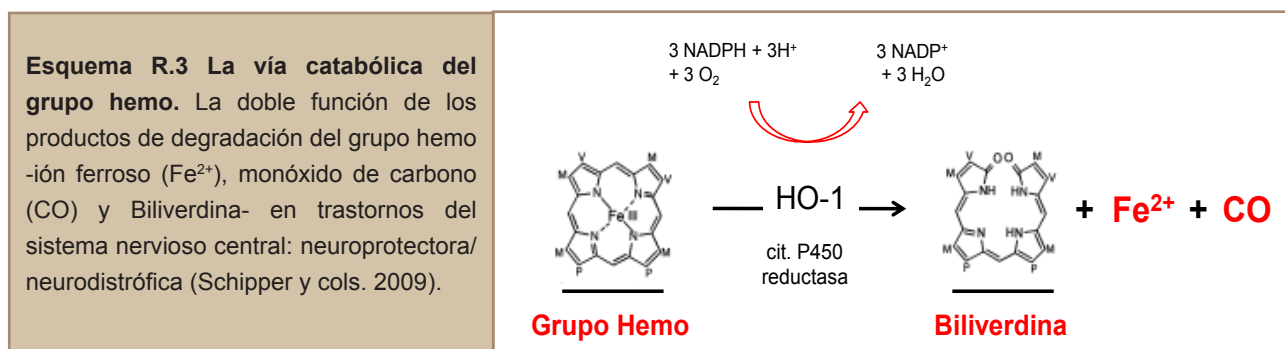
Figura R.33 Cambio de la expresión génica en la línea celular SK-APP_{SWE} en ausencia de EO analizado por Microarray de cDNA. Se indica el número de veces que cambia la expresión de los 25 primeros genes que se sobreexpresan a 24 horas en ausencia del tratamiento con el sistema XXo y que mantienen dicha sobreexpresión a 36 horas sin tratamiento, comparando la línea celular SK-APP_{SWE} frente a la línea celular SK-APP_{WT}. La expresión diferencial fue significativa (p < 0,05) para todos los genes del tiempo de 24 horas siendo n=3. La barra de color naranja corresponde al tiempo de 24 horas y la azul, al de 36 horas.

En las figuras R.32 y R.33 se representan aquellos genes que sobreexpresándose significativamente a 24 horas, mantienen dicha sobreexpresión a 36 horas. Los datos obtenidos fueron reveladores ya que el primer gen que aparecía sobreexpresado significativamente en la línea SK-APP_{SWE} respecto a la SK-APP_{WT} a 24 horas y se mantenía a 36 horas, tanto en presencia del sistema XXo (figura R.32) como en ausencia del tratamiento (figura R.33), fue el de la hemoxigenasa-1 (HO-1). En relación a nuestro modelo celular de neurodegeneración asociado a la EA familiar,

este hallazgo era más que satisfactorio debido a la implicación de este enzima en enfermedades neurodegenerativas (Schipper y cols. 2009).

La HO-1 ha sido reconocida como un sensor dinámico en la respuesta al EO celular; pero las reacciones bioquímicas de este enzima son un arma de doble filo ya que por un lado, al igual que la actividad desarrollada por otros agentes antioxidantes como la oxido nítrico sintasa o la superóxido dismutasa, imparte una férrea defensa antioxidante en algunas enfermedades y por otro, puede servir de amplificador del daño provocado por los ROS. En distintos estudios, la doble cara de este enzima se relaciona particularmente con enfermedades neurodegenerativas (Schipper y cols. 2009).

Brevemente, la degradación del grupo hemo celular es catalizada por una familia de HO. Estas enzimas se encuentran localizadas en el retículo endoplásmico (RE) donde actúan en asociación con la NADPH citocromo P450 reductasa, oxidando al grupo hemo a biliverdina, y produciendo ion ferroso y monóxido de carbono (esquema R.3).



Las células de mamíferos expresan por lo menos dos isoformas de HO, HO-1 (también conocida como *heat-shock protein (HSP) 32* de expresión inducible y HO-2, de expresión constitutiva. La expresión de HO-1 en cerebro normal (sin estrés) es mínima y limitada a neuroglías dispersas y a pequeñas poblaciones de neuronas en el cerebelo (células de Purkinje), tálamo, hipotálamo, tronco del encéfalo, hipocampo y corteza cerebral. La HO-2 está ampliamente distribuida y expresada en las neuronas del cerebro y de la médula espinal (Vincent y cols. 1994; Matz y cols. 1996; Bergeron y cols. 1998; Nakaso y cols. 2000; Baranano y cols. 2001).

En humanos, el gen *Hmox-1* que codifica para este enzima se encuentra localizado en el cromosoma 22 y la inducción de este gen es extremadamente sensible a numerosos estímulos oxidantes y antiinflamatorios incluyendo el grupo hemo, el A β , el peróxido de hidrógeno, hiperoxia, entre otros (Dennery 2000; Schipper y cols. 2000; Loboda y cols. 2008). En células bajo EO, la regulación positiva de HO-1 les confiere una protección acelerando la degradación del grupo hemo hacia los pigmentos biliares, biliverdina y bilirrubina (Baranano y cols. 2001). Sin embargo, en algunos casos, el ion ferroso y el monóxido de carbono generados en dicha degradación, pueden

exacerbar el EO intracelular provocando un daño celular por la generación de ROS en la mitocondria y en otros compartimentos celulares (Ryter y cols. 2000; Desmard y cols. 2007).

Por todo ello, nos pareció de gran interés seleccionar a HO-1 como punto de referencia para futuros trabajos de investigación en los mecanismos de muerte neuronal en relación con la EA.

5.4.2. Análisis de la sobreexpresión de HO-1 en la línea celular SK-APP_{SWE}

Para validar la sobreexpresión de HO-1 nos propusimos caracterizar en mayor profundidad los cambios de la expresión del gen de HO-1, tras la estimulación de nuestras líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} con el sistema XXo a lo largo del tiempo, mediante cuantificación del mRNA de HO-1 con análisis de RT-PCR, y posteriormente por cuantificación de la proteína HO-1 por inmunomarcado después de electroforesis.

5.4.2.1. Análisis de los niveles de mRNA HO-1 mediante ensayos de RT-PCR

Las células SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} cultivadas en ausencia y presencia del sistema XXo durante 24, 36 y 48 horas, fueron procesadas tal y como se describe en el apartado 3.14.1 de Materiales y Métodos por análisis mediante RT-PCR específica para HO-1 (apartado 3.14.3 de Materiales y Métodos). La cuantificación relativa al cultivo de SK-APP_{WT} 24 horas no tratada (figura R.34), mostró la sobreexpresión del mRNA HO-1 en los cultivos de SK-APP_{SWE} tanto tratados como no tratados, así como a todos los tiempos del curso temporal analizado. Además, pudimos observar que en la línea celular SK-APP_{SWE}, la expresión del mRNA de HO-1 fue aumentando progresivamente a lo largo del tiempo, bajo condiciones de EO, sobre todo a partir de 36 horas. Para la línea celular SK-APP_{WT} no se observaron cambios significativos en la expresión de HO-1 ni en los cultivos controles ni en los tratados con el sistema XXo.

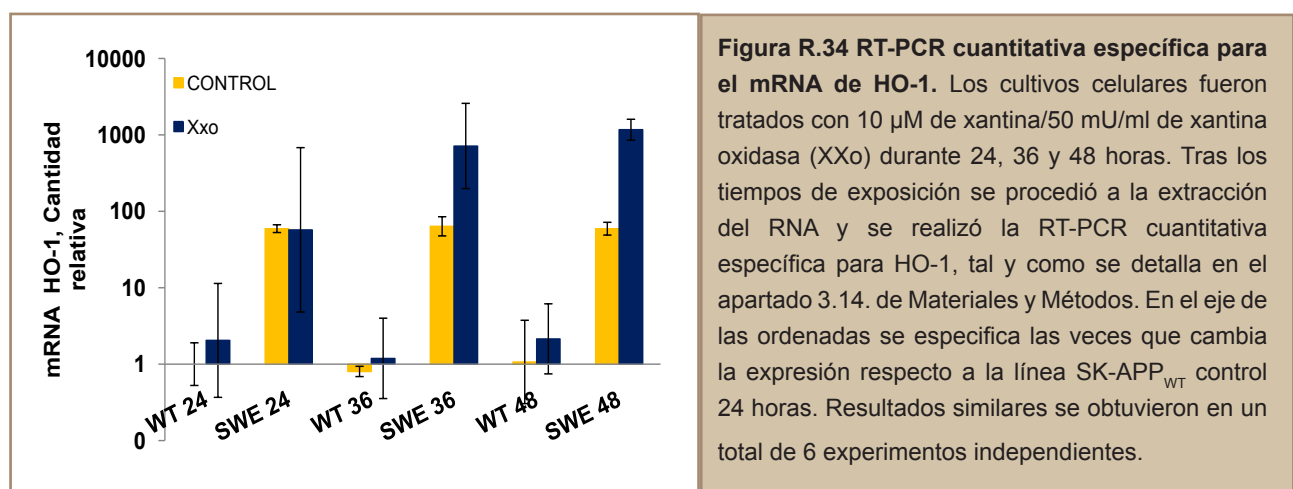
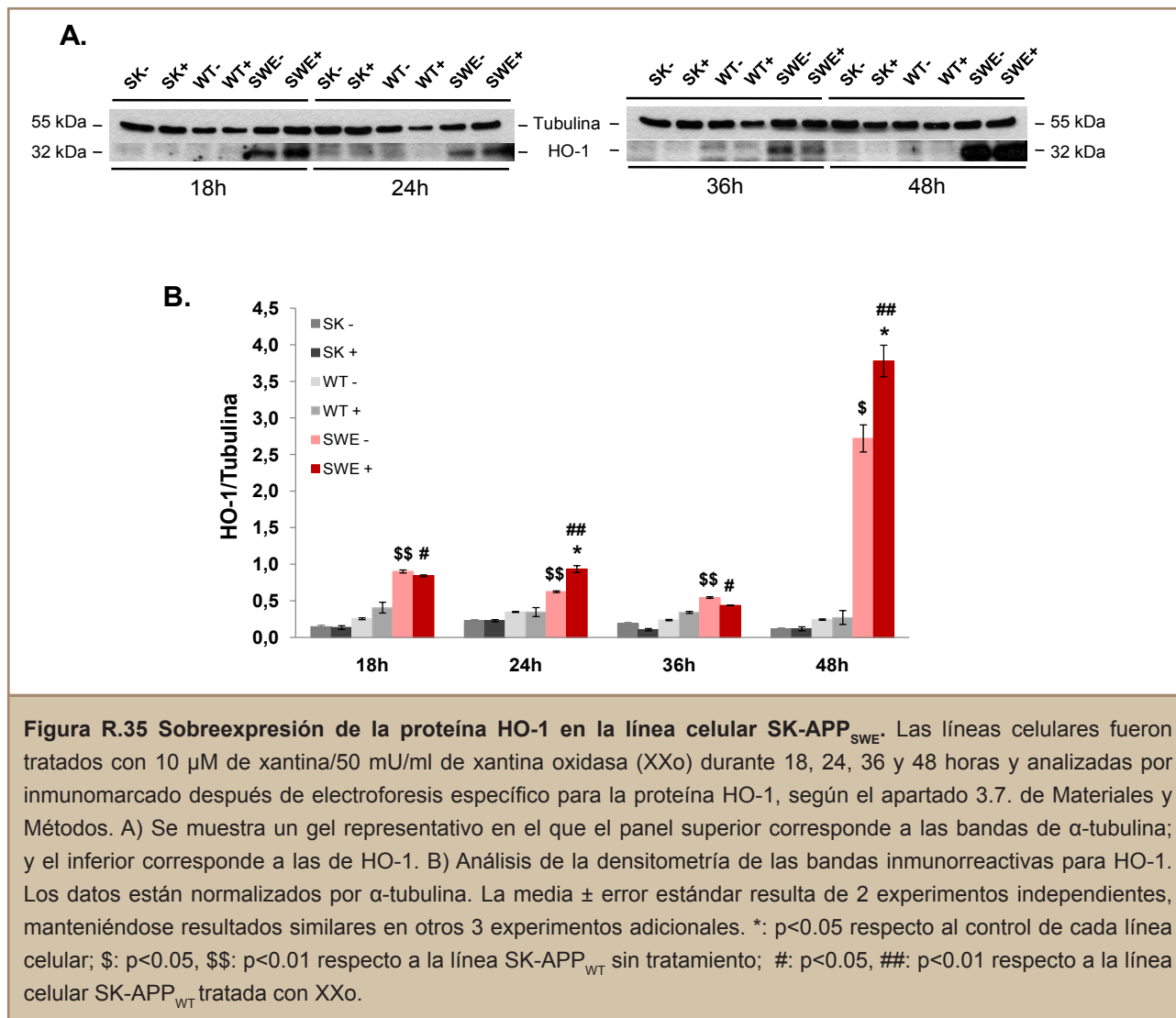


Figura R.34 RT-PCR cuantitativa específica para el mRNA de HO-1. Los cultivos celulares fueron tratados con 10 μ M de xantina/50 mU/ml de xantina oxidasa (XXo) durante 24, 36 y 48 horas. Tras los tiempos de exposición se procedió a la extracción del RNA y se realizó la RT-PCR cuantitativa específica para HO-1, tal y como se detalla en el apartado 3.14. de Materiales y Métodos. En el eje de las ordenadas se especifica las veces que cambia la expresión respecto a la línea SK-APP_{WT} control 24 horas. Resultados similares se obtuvieron en un total de 6 experimentos independientes.

5.4.2.2. Detección y cuantificación de los niveles de la proteína HO-1

Una vez comprobado la sobreexpresión de mRNA HO-1 en la línea SK-APP_{SWE}, quisimos dar un paso más poniendo a punto la detección de la proteína HO-1 por inmunomarcado después de electroforesis. La especificidad del inmunomarcado para HO-1 se pone de manifiesto, utilizando un extracto de microsomas de hígado de ratón (Assay design®) como fuente de esta proteína. Así, se procedió a la cuantificación de dicha proteína en las líneas SK-N-MC, SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} (figura R.35).



Las líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} fueron expuestas al EO durante los tiempos de 18, 24, 36 y 48 horas. Como hasta ahora no se había comprobado los niveles de proteína HO-1 en la línea celular parental, SK-N-MC, esta fue incluida en el estudio. Los datos que se muestran en la figura R.35, nos revelaron unos niveles de proteína HO-1 significativamente superiores para las células SK-APP_{SWE} expuestas o no al EO. Si la línea celular SK-APP_{SWE} se compara con su

control, se puede observar dos picos de aumento del nivel de HO-1, coincidiendo con los tiempos de 24 horas -discreto- y de 48 horas post-tratamiento. Este aumento muy patente al tiempo de 48 horas coincide con el tiempo de incremento de muerte celular en estos cultivos (figura R.8) y con los altos niveles celulares de proteína holoAPP (figura R.23). Como se puede apreciar en la figura R.35, los niveles de HO-1 son similares para las líneas SK-N-MC y SK-APP_{WT}, aunque en la última se vislumbra un ligero aumento.

Los resultados presentados demostraron una sobreexpresión de proteína HO-1 en la línea celular que expresa APP con mutación "Swedish". Además, datos muy preliminares sugieren que la actividad enzimática de la HO-1 se encuentra disminuida en la línea celular SK-APP_{SWE} en comparación con la línea celular SK-APP_{WT} (datos no mostrados).

5.5. ESTUDIO FUNCIONAL DE LA HO-1 EN LA LÍNEA SK-APP_{SWE}

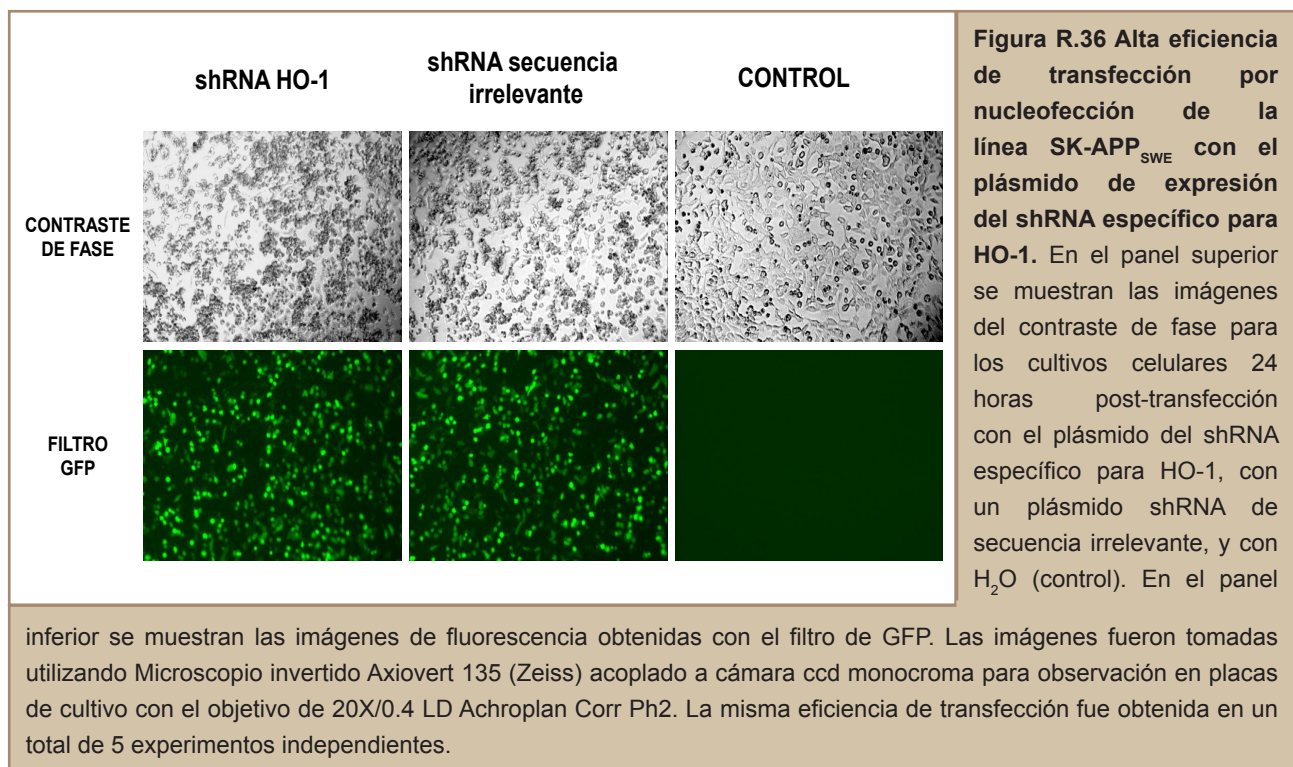
Para continuar con el estudio del modelo celular propuesto en la presente tesis como aproximación para la investigación de la EA familiar, y a la luz de los resultados obtenidos del análisis de la expresión génica diferencial en nuestras líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE}, nos propusimos conocer los efectos que tenía la inhibición de la expresión de HO-1 sobre la viabilidad de la línea celular mutante que expresa proteína con la mutación "Swedish" APP, abriendo así una vía para futuros trabajos de investigación.

Para este objetivo, nos apoyamos en la técnica novedosa de los RNA de interferencia. Esta técnica se utiliza sobre todo para el estudio de una larga lista de cuestiones moleculares en la biología celular (Dahm y cols. 2008). Para aplicar la técnica del RNA de interferencia en nuestro modelo celular, decidimos utilizar plásmidos de expresión de shRNAs (del inglés *short hairpin RNA*) como precursores de los siRNAs (del inglés *small interfering RNA*) que van a silenciar la expresión de genes específicos (Kumar y cols. 2007).

5.5.1. Silenciamiento del gen *HMOX-1* en la línea celular SK-APP_{SWE} mediante la técnica de RNA de interferencia

A pesar de la amplia variedad de modificaciones en los métodos ya desarrollados para la transfección de plásmidos en células de origen neuronal, tales como el fosfato cálcico o la lipofección, no existe gran satisfacción en cuanto a su eficacia de transfección (Goetze y cols. 2004; Goetze y cols. 2007). Por otro lado, en experimentos de silenciamiento de la expresión génica es necesario obtener un gran número de células transfectadas para el análisis bioquímico y cuantitativo de los experimentos.

En la transfección en células de origen neuronal con plásmidos de expresión de shRNA, mediante la técnica de la nucleofección y bajo condiciones óptimas de trabajo, podemos conseguir hasta el 90% en eficiencia (Zeitelhofer y cols. 2009). Por ello, seleccionamos la nucleofección como técnica de transfección. Dicha técnica es una forma especializada de electroporación que combina parámetros eléctricos específicos con los reactivos adecuados para cada tipo de célula, demostrando así su alta eficiencia de transfección combinada con una óptima viabilidad de las células. Previamente, pusimos a punto tres condiciones de extrema importancia para lograr la alta eficiencia: la concentración del plásmido utilizado, el método de purificación por el que se ha obtenido dicho plásmido y el programa adecuado del Nucleofector® (datos no mostrados). Una vez puesto a punto estos tres parámetros, procedimos a la nucleofección de la línea celular SK-APP_{SWE} con un shRNA para HO-1, y siguiendo siempre el protocolo optimizado (apartado 3.16.2. de Materiales y Métodos).



Tras la nucleofección, se podía comprobar la eficiencia de la transfección analizando la señal de GFP, ya que los plásmidos utilizados coexpresan la estructura shRNA junto con esta proteína fluorescente. Al cuantificar células positivas para GFP respecto al total de células para cada campo de observación de contraste de fase (figura R.36) se obtuvo una eficiencia de transfección de aproximadamente un 80%, que fue similar para los dos plásmidos utilizados (shRNA-HO-1 y shRNA-control de secuencia irrelevante). En la misma figura se muestra el cultivo de SK-APP_{SWE} sometido a la nucleofección con la misma mezcla de transfección pero sin DNA.

Como se puede observar, hay una ligera pérdida de viabilidad celular en los cultivos que han incorporado los plásmidos; sin embargo, esa pérdida no afectaba al mantenimiento de las células en cultivo para realizar los análisis correspondientes (hasta 48 horas). Así mismo, en las condiciones óptimas de transfección se seleccionó de los cuatro plásmidos shRNA-HO-1 (A, B, C y D) suministrados por la casa comercial *Superarray*, al plásmido “B” por presentar mejor eficiencia en la transfección (datos no mostrados).

En teoría, el hecho de obtener un gran número de células transfectadas en el cultivo (80%), nos iba a permitir cuantificar de una manera reproducible la disminución de la expresión de la proteína HO-1.

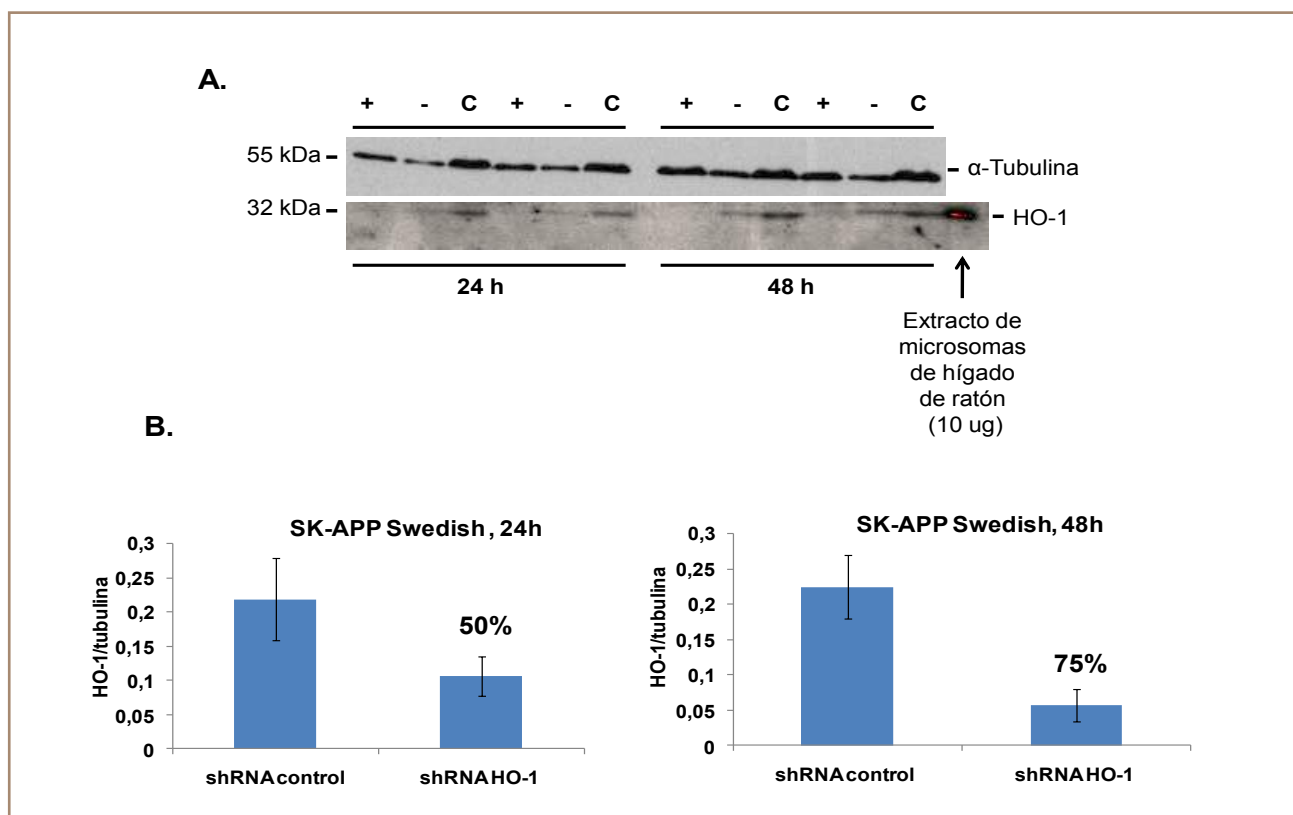
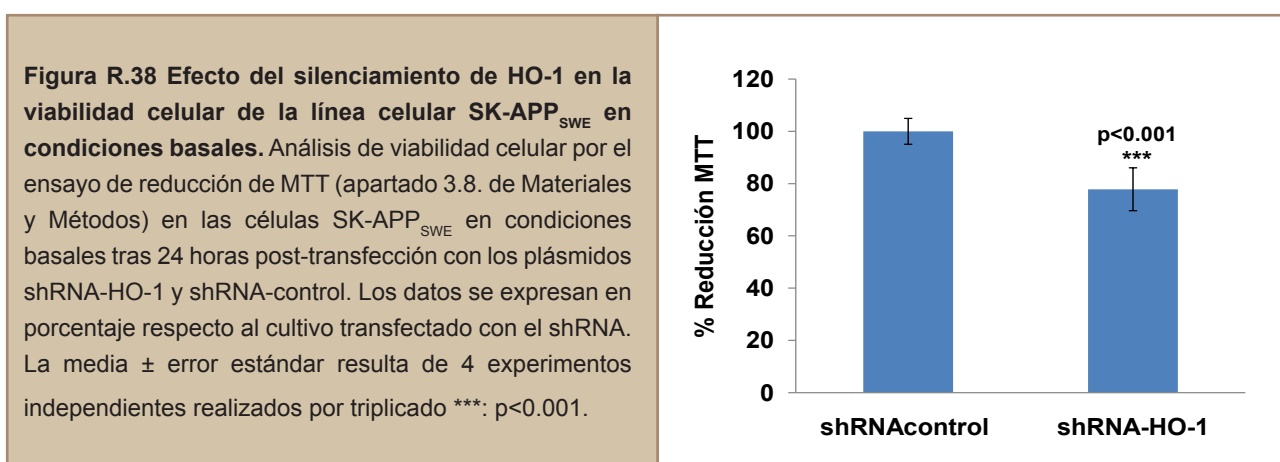


Figura R.37 Eficacia de la transfección del plásmido de expresión shRNA-HO-1 en la línea celular SK-APP_{SWE}. Los cultivos de la línea celular SK-APP_{SWE} fueron transfectados con el plásmido shRNAHO-1 (+) o con el plásmido shRNA irrelevante (-) por nucleofección según el apartado 3.16.2. de Materiales y Métodos y posteriormente procesados para inmunomarcado después de electroforesis de la proteína HO-1 a 24 y 48 horas post-transfección. A) Se muestra un gel representativo en el que el panel inferior, las bandas corresponden a la proteína HO-1 y en el panel superior, las bandas corresponden a la α-tubulina. También se muestra los niveles de proteína HO-1 en un extracto de microsomas de hígado de ratón (Stressgen) utilizado como control positivo del análisis. B) Análisis densitométrico de los niveles de HO-1 normalizados por α-tubulina. La media ± error estándar corresponde a tres experimentos independientes.

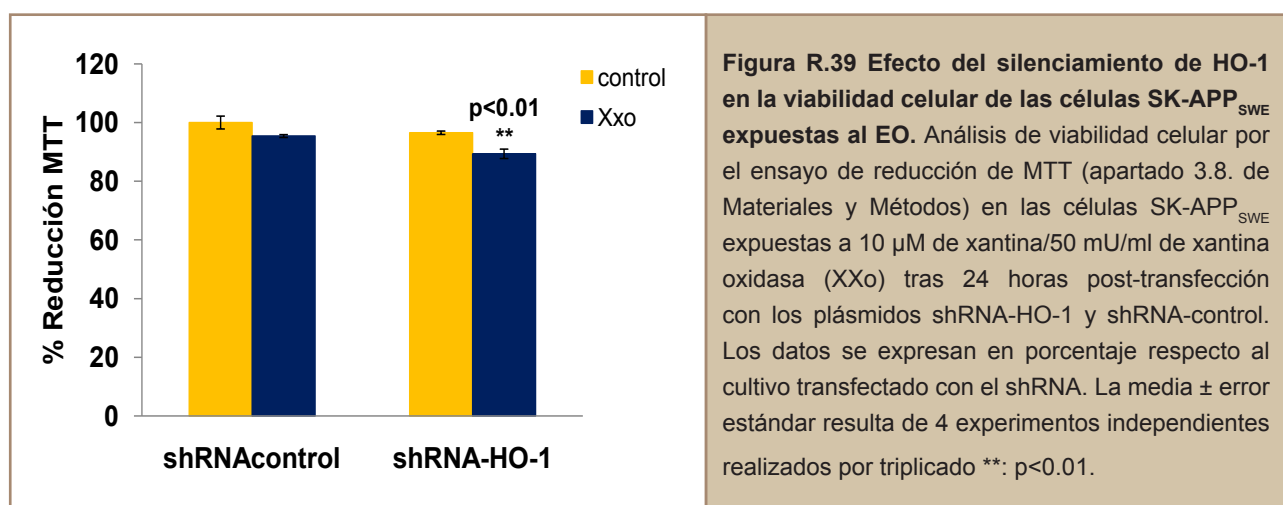
Por este motivo, llevamos a cabo los análisis por inmunomarcado después de electroforesis específico para HO-1 de los cultivos de SK-APP_{SWE} a 24 y 48 horas post-transfección por nucleofección con el shRNA de HO-1. Los resultados de la figura 37 mostraron que la transfección del shRNA para HO-1 producía una disminución del 50% en los niveles de proteína HO-1 ya a 24 horas post-transfección llegando hasta una bajada en la expresión del 75% a las 48 horas post-transfección. Por lo tanto, y a tenor de los resultados obtenidos validamos tanto el shRNA específico HO-1 para inhibir su expresión, así como el método de transfección por nucleofección para nuestra línea celular SK-APP_{SWE}.

5.5.2. Efecto de la inhibición de la expresión de HO-1 sobre la viabilidad celular de la línea SK-APP_{SWE}

Con el fin de abrir la investigación del papel de la sobreexpresión de HO-1 en la línea SK-APP_{SWE} y en relación a la vulnerabilidad de esta línea a la muerte neuronal por EO, nos propusimos caracterizar la viabilidad de los cultivos de esta línea que tienen inhibida la expresión de HO-1, tanto en condiciones basales como después de su exposición al EO.



Las células SK-APP_{SWE} transfectadas con el plásmido shRNA específico de HO-1, fueron analizadas, 24 horas post-transfección, mediante un ensayo de reducción de MTT (apartado 3.8. de Materiales y Métodos). Los datos que se muestran en la figura R.38 nos revelaron una bajada significativa de 25% en la viabilidad de las células y que tienen silenciada la expresión de HO-1 al comprar con la de los cultivos transfectados con el plásmido shRNA-control.



Además, analizamos la viabilidad de la línea SK-APP_{SWE} con la HO-1 silenciada y expuesta al EO. Los resultados que se presentan en la figura R.39 mostraron una pérdida de viabilidad significativa por el tratamiento con XXo durante 24 horas en los cultivos transfectados con el shRNA de HO-1. Sin embargo, los cultivos transfectados con el shRNA control no eran afectados por el tratamiento, obteniéndose un resultado similar al ensayo de viabilidad en un curso temporal de tratamiento con XXo (figura R.8) en el que no se producía pérdida de viabilidad en las células SK-APP_{SWE} a las 24 horas de tratamiento. En este experimento la diferencia entre cultivos no tratados fue más discreta, sin embargo, este resultado no es contradictorio con el de la figura R.38, ya que en dicho experimento se trata de condiciones basales; mientras que en la figura R.39 son condiciones de tratamiento donde se realiza el cambio de medio (tanto a los cultivos tratados como a los no tratados) para igualar el metabolismo de todas las células del pocillo antes de recibir el EO.

Por los datos obtenidos de viabilidad celular en relación con la sobreexpresión de HO-1 en nuestro modelo celular de EAF con la línea SK-APP_{SWE}, y por el incremento de expresión de HO-1 en cerebros de pacientes (Schipper y cols. 1995), sugerimos que la enzima HO-1 podría ser un punto de referencia para profundizar en los mecanismos patológicos de la enfermedad de Alzheimer.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

I. GENERACION Y CARACTERIZACIÓN DEL MODELO NEURONAL DE EXPRESION DE APP WILD TYPE Y MUTANTE

Diferentes mutaciones tanto en el gen del APP como en los genes de las presenilinas 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2) han sido descritas como causantes de la forma familiar de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Goate y cols. 1991; Selkoe 1996; Tanzi y cols. 1996). Estas mutaciones pueden provocar una alteración en el procesamiento del APP incrementando la producción de péptido A β (Haass y cols. 1994) y la acumulación intracelular en las neuronas de fragmentos C-terminales potencialmente neurotóxicos (McPhie y cols. 1997). Además, han sido implicadas en un aumento de la vulnerabilidad de las neuronas a la muerte celular (Guo y cols. 1997; Zhao y cols. 1997; Eckert y cols. 2001a; Eckert y cols. 2001b).

Por otro lado, los trabajos en neuroblastomas humanos transfectados para la expresión estable de la proteína APP mutante son escasos, quizás debido a la dificultad ya descrita para obtener dichas líneas (Fukuchi y cols. 1992). Además, existe una necesidad de generar modelos *in vivo* o *in vitro* en los que se trabaje bajo niveles más fisiológicos de APP que se aproximen a la situación real de los cerebros humanos (Selkoe 2002).

De acuerdo con esto último, y con el fin de obtener un modelo *in vitro* en relación con la EA familiar, nos propusimos generar células a partir del neuroblastoma humano de origen colinérgico SK-N-MC que expresen establemente la proteína humana APP₆₉₅ wild type (SK-APP_{WT}) ó la proteína APP con la mutación "Swedish" (K670N/M671L, SK-APP_{SWE}) (Mullan y cols. 1992). Así mismo, hemos generado una segunda línea mutante de APP que porta dos mutaciones: K670N/M671L+V717I (SK-APP_{SWE/LON}); ambas mutaciones han sido asociadas a la enfermedad de Alzheimer familiar debido a que, por un lado, las mutaciones tipo "London" promueven la eficiencia del corte γ -secretasa (Suzuki y cols. 1994), y por otro las mutaciones tipo "Swedish" contribuyen a la eficiencia del corte β -secretasa (Citron y cols. 1992). De igual manera, diversos ratones transgénicos que sobreexpresan APP humano con ambas mutaciones, "Swedish" y "London", han sido propuestos como modelos animales para el estudio de la EA (Hsia y cols. 1999; Janus y cols. 2000; Shin y cols. 2007; Oikawa y cols. 2009; Hashimoto y cols. 2010). Como línea control, además transfectamos la línea SK-N-MC con el vector vacío (pCDNA3), SK-pC; dicha línea nos sirvió de referencia tanto en la caracterización de las líneas estables de APP como en los estudios posteriores de muerte celular.

Cuando transfectamos la línea SK-N-MC con el c-DNA del APP₆₉₅ wild type, APP₆₉₅ Swedish ó APP₆₉₅ Swedish-London obtuvimos un total de unas 20 colonias resistentes a la selección con el antibiótico, para cada una de las líneas. Posteriormente, se expandió y estableció como línea celular aquellas colonias que mantuvieron la expresión de APP. Finalmente se estableció una línea celular por cada plásmido de expresión con unos niveles de APP similares entre sí. Toda la caracterización de la expresión de APP se ha llevado a cabo tanto a nivel de proteína (inmunomarcado después de electroforesis) como de mRNA (RT-PCR específica). Los análisis de la expresión de la proteína APP, revelaron unos niveles de aproximadamente 1.5-2 veces referido a la línea control SK-pC, comprobando de esta manera que el establecimiento de las líneas no había supuesto una pérdida de expresión de dicha proteína. Posteriores análisis del mRNA de APP vinieron a corroborar los datos obtenidos en la expresión de la proteína APP y que la expresión del vector pCDNA3 vacío, no afectaba a la expresión del APP endógeno ya que la línea SK-pC y la línea parental SK-N-MC presentaban un nivel de expresión similar. Por tanto, hemos generado unos modelos celulares de expresión de la proteína APP humana wild type y mutante (APP_{SWE} ó APP_{SWE/LON}) que probablemente se aproximen más a la realidad *in vivo* en cerebros de pacientes EA.

Aunque la mutación “Swedish” ha sido señalada como una de las que aumentan los niveles, entre 3 y 6 veces de los péptidos A β 40 y A β 42 (Haass y cols. 1994; Suzuki y cols. 1994), la mayoría de los estudios son ratones transgénicos APP_{SWE} en los que se observan un incremento en los niveles de A β 40 y A β 42 solubles (Chishti y cols. 2001; Gau y cols. 2002). Otros datos indican que el efecto de las mutaciones en el APP no es tanto en ganancia neta del A β total, sino que es en la razón A β 40/A β 42 (Kumar-Singh y cols. 2006). Se ha descrito en un modelo *in vitro*, que la sobreexpresión de APP “Swedish” en células (COS-1) da lugar a un A β intracelular que se produce por una vía de procesamiento del APP, distinta a la vía que se produce el A β secretado (Martin y cols. 1995), relacionando la patología con el metabolismo de la proteína APP. Este último aspecto, el metabolismo del APP en relación con su procesamiento, ha sido uno de los objetivos de la investigación a esta tesis, después de definir y caracterizar un modelo celular de aproximación a la patogénesis de la EA familiar: la expresión de APP mutante en presencia de EO. En nuestras líneas SK-APP_{SWE} y SK-APP_{SWE/LON}, hemos detectado niveles muy bajos del péptido A β 40 en los sobrenadantes de los cultivos celulares, pudiendo deberse a la sobreexpresión de la proteína APP mutante casi como la endógena, siendo este hecho, quizá más cercano a una situación *in vivo*.

II. CONSECUENCIAS DEL EO SOBRE LA MUERTE CELULAR EN LAS LÍNEAS SK-APP_{WT} Y SK-APP_{SWE}

El cerebro es el órgano del cuerpo humano que tiene la más alta tasa metabólica, estando expuesto a un aumento gradual de EO a lo largo de la vida. En concreto, cuenta con -aproximadamente- el 20% del oxígeno total basal del cuerpo para su consumo y por lo tanto genera altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Shulman y cols. 2004).

Diversas líneas de investigación han demostrado que el EO no sólo es un evento temprano en la EA sino que juega un papel importante en la iniciación de esta enfermedad a través de la activación de diferentes vías de señalización celular (Su y cols. 2008). Esta participación temprana del EO se ha podido comprobar en modelos celulares, en modelos de ratones transgénicos, así como en fluidos biológicos y cerebros “post-mortem” de pacientes EA en diversos estados de progresión de la enfermedad, en pacientes jóvenes con síndrome de Down, pacientes con deterioro cognitivo leve y en pacientes con otra enfermedad neurodegenerativa como el Parkinson (Nunomura y cols. 2007). Además, sorprendentemente el daño oxidativo no sólo se hace más patente en los casos de EA con menor depósito en péptido A β sino que además dicho daño precede a dicho depósito de A β en una serie de cerebros de pacientes con Síndrome de Down (Nunomura y cols. 2000).

Estudios previos han demostrado que existe un incremento en el EO localizado en el córtex temporal inferior de pacientes EA que portan la mutación “Swedish” (Bogdanovic y cols. 2001). También se ha descrito un incremento de marcadores de EO en cultivos primarios de neuronas corticales de ratones transgénicos APP “Swedish”/PSEN1 “P246L” (Sompol y cols. 2008). Además, en cultivos de líneas celulares (PC12 y neuronas corticales de ratones transgénicos doble mutantes APP/PSEN1) que expresan dicha mutación para el APP tienen un nivel basal elevado de EO y son más vulnerables a este estrés en comparación con los cultivos “wild type” (Eckert y cols. 2001a; Mohammad Abdul y cols. 2006).

A pesar de todos estos hallazgos, los mecanismos responsables que subyacen a la masiva neurodegeneración en la edad temprana de pacientes EA familiar, no están del todo claros. Por este motivo y por todo lo anterior hemos caracterizado los efectos que el EO provoca en nuestras líneas mutantes de APP derivadas del neuroblastoma humano SK-N-MC, SK-APP_{SWE} y SK-APP_{SWE/}

LON’

Algo novedoso en esta investigación ha sido la utilización de un sistema que genera radicales libres como inductor de EO: el sistema Xantina/Xantina oxidasa oxidada. Hasta ahora, el tratamiento de EO más extendido en los distintos estudios es el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como fuente de ROS. Pero es un tratamiento muy agresivo debido a las concentraciones a las que es utilizada, por lo que no permite que los estudios funcionales que se dilaten más allá de

las 6 u 8 horas, debido a la rápida descomposición del H_2O_2 (Eckert y cols. 2003). El motivo de la utilización del sistema XXo es precisamente este: la generación de un EO suave y mantenido en el tiempo, permitiéndonos el estudio a tiempos prolongados de exposición al EO. La optimización de concentraciones y tiempos de tratamiento (hasta 48 horas) ya habían sido previamente realizadas en la línea parental SK-N-MC, definiendo un modelo celular de muerte apoptótica por un sistema que genera radicales libres (Vicente Cenzano 2007; Recuero y cols. 2009).

Los estudios temporales de viabilidad celular en las líneas SK-APP_{SWE} y SK-APP_{SWE/LON} revelaron que el sistema XXo producía una pérdida de la viabilidad. Ahora bien, mientras que en la línea control y en la línea SK-APP_{WT} la muerte neuronal no se hacía patente hasta tiempos tardíos del tratamiento, en las líneas mutantes la muerte celular era mayor y además adelantada en el tiempo ya que a tiempos de 36 horas se podía observar la bajada de la viabilidad. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos en cultivos celulares del feocromocitoma de rata, PC12, que expresan APP_{SWE}, tratados con peróxido de hidrógeno (Zhao y cols. 1997; Eckert y cols. 2003; Marques y cols. 2003), y en cultivos celulares de neuroblastoma SH-SY5Y, que expresan APP_{SWE}, tratados con el metal de transición, Cobre (Zhang y cols. 2006).

Estos hechos estarían de acuerdo con la realidad conocida de que mutaciones en el APP y en la PSEN1 causan una forma más agresiva de EA y provocan que la patología se desarrolle con mayor rapidez (forma temprana, <65 años). Nuestros datos sugieren que las neuronas que portan mutaciones en el APP son mucho más vulnerables al EO en comparación con las células APP_{WT}. En relación a esto último, se ha reportado que en células HEK-293 expresando APP_{WT} o APP mutante (V717G, (Chartier-Harlin y cols. 1991)), el APP_{WT} pero no el mutante, está involucrado en respuestas protectoras contra agentes oxidantes (Cenini y cols. 2009). HEK-APP mutante presentaba altos niveles de marcadores oxidativos en comparación con HEK-APP_{WT}; y por otro lado la actividad de SOD (enzima antioxidante) era más eficiente en HEK-APP_{WT} que en HEK-APP mutante.

Dado que el EO se desarrolla cuando el balance, perfectamente regulado, entre agentes pro-oxidantes y agentes antioxidantes va a favor de los primeros (Harman 2006), quizá nuestros cultivos de SK-APP_{SWE} ó SK-APP_{SWE/LON} pierden resistencia al EO, probablemente debido a que las defensas antioxidantes estén comprometidas, llegando a tener un EO alto. De hecho, en nuestras líneas celulares, en presencia del sistema XXo, se producen los ROS esperados, si bien es sólo en la línea SK-APP_{SWE} donde se hace más patente el incremento de producción de estas especies reactivas. En condiciones basales no encontramos diferencias significativas, quizá porque la detección de los ROS sólo se hizo a un solo tiempo, 3 horas. El interés por el balance entre agentes pro-oxidantes y antioxidantes en nuestros modelos celulares de APP mutante, forma parte de un trabajo de investigación en nuestro laboratorio.

Actualmente, existen diferentes estudios que indican que la apoptosis puede ocurrir y/o contribuir a la progresión de la EA (Mattson y cols. 2006). El EO podría activar la vía apoptótica por diferentes mecanismos que confluirían en un incremento de la permeabilidad de la membrana

mitocondrial y, como consecuencia, una liberación del citocromo-C (Bruckner y cols. 2003; Mattson y cols. 2003; Cutler y cols. 2004; Vicente Cenzano 2007) que activaría el programa de muerte apoptótica dependiente de caspasas. Además, se ha podido comprobar que en cultivos de neuronas primarias de ratones transgénicos APP/PSEN1, el incremento en los niveles de daño oxidativo va acompañado de una alteración del potencial de membrana mitocondrial, produciendo la disfunción mitocondrial en condiciones de EO (Sompol y cols. 2008). Además, cultivos celulares de PC12 que expresan la mutación “Swedish” y cultivos primarios de neuronas APP/PSEN1 mutantes, se muestran más vulnerables a la inducción de la muerte neuronal por apoptosis después de su exposición al EO (Marques y cols. 2003; Mohammad Abdul y cols. 2006).

Así pues, con todos estos precedentes, quisimos cuantificar los niveles de dos marcadores pro-apoptóticos como son la poli-(ADP-ribosa) polimerasa 1 -PARP-1- y la caspasa-3, en las líneas SK-APP_{SWE} y SK-APP_{SWE/LON} expuestas al EO. La primera es sustrato de la segunda y su proteólisis genera un fragmento de 85 kDa, denominado p85 que, además, nos sirve como medida indirecta de la activación de la caspasa-3. Los estudios en curso temporal de los cultivos expuestos a XXo, revelaron que la líneas que expresan APP mutantes -“Swedish” o “Swedish/London”- presentaban unos niveles del fragmento p85 significativamente superiores en comparación con los de la línea “wild type”; este aumento fue confirmado por el incremento del nivel del fragmento de caspasa-3 activa en la línea mutante “Swedish” en condiciones de EO. Finalmente, la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo, confirmó el incremento en el porcentaje de células apoptóticas en los cultivos de las líneas mutantes para el APP, bajo condiciones de EO. Nuestros resultados vienen a estar de acuerdo con lo descrito anteriormente sobre el incremento de la activación de la muerte celular dependiente de caspasas en presencia de APP mutante y en condiciones de EO.

Por tanto, en este punto de la tesis ya pudimos definir a las células del neuroblastoma humano que expresan APP mutante y expuestas al EO durante un rango de tiempo amplio (hasta 48 horas), como un modelo *in vitro* novedoso para el estudio de los mecanismos patogénicos de la EA familiar.

III. CONSECUENCIAS DEL EO SOBRE EL METABOLISMO Y PROCESAMIENTO DEL APP

La causa de la pérdida neuronal en la EA parece estar asociada con el incremento de EO (Moreira y cols. 2005) promovida por la peroxidación lipídica, así como la oxidación en las proteínas y el DNA (Butterfield y cols. 2007), pudiendo ser atenuada mediante antioxidantes (Montiel y cols. 2006). En realidad, la producción de radicales libres ha sido implicada en la progresión de diversas enfermedades neurodegenerativas (Guglielmotto y cols. 2009) y en el proceso de envejecimiento (Yankner y cols. 2008).

Durante el desarrollo de esta tesis existían muy pocos trabajos previos donde se pusiera de manifiesto las consecuencias del EO en el metabolismo/procesamiento del APP, si bien, el tratamiento exógeno con el péptido A β a tiempos cortos (24 horas) como otro inductor de EO, ha sido implicado en estos procesos (Davis-Salinas y cols. 1995; Le y cols. 1995; Yang y cols. 1995; Schmitt y cols. 1997; Moreno-Flores y cols. 1998; Carlson y cols. 2000; Varadarajan y cols. 2000; Butterfield 2002; Henriques y cols. 2009). Por otro lado, una posibilidad es que mutaciones en los genes de la EA familiar (APP y/o PSEN1 y 2), podrían contribuir a la enfermedad alterando dichos procesos (Sherrington y cols. 1995; Levy-Lahad y cols. 1995a), y más concretamente, Martin y colaboradores (Martin y cols. 1995) sugirieron que la propia mutación "Swedish" APP podría alterar el metabolismo de la proteína.

Por todo ello, nos pareció de gran interés investigar el metabolismo/procesamiento del APP en nuestro modelo celular de EA familiar. Dado que en dicho modelo tenemos en cuenta no sólo la expresión de APP mutante sino también el EO -asociado a la edad-, y puesto que desconocíamos el efecto concreto del sistema XXo en el metabolismo/procesamiento del APP, nos centramos primero en dicho estudio utilizando la línea parental, SK-N-MC.

Hemos observado que las células del neuroblastoma humano SK-N-MC expuestas al sistema XXo al tiempo de 24 horas de tratamiento, cuando no se observa ningún efecto significativo del EO sobre los niveles de proteína holoAPP, se produce una acumulación intracelular temprana del fragmento N-terminal del APP, mayoritariamente del sAPP- α , y que debe ser secretado por la vía normal de tráfico/secreción del APP (Gabuzda y cols. 1994). A este mismo tiempo, sAPP- α estaba significativamente incrementado en el medio de cultivo. Después de 24 horas de tratamiento con el sistema XXo, sin embargo, la viabilidad de las células SK-N-MC no estaba afectada. Estos datos sugerían que en estadios tempranos de muerte celular por XXo se favorece la vía de procesamiento α -secretasa (no-amiloidogénica) y la secreción del fragmento sAPP- α , aunque esta última parece estar ya comprometida en parte y se acumula intracelularmente. Estos resultados corroboran los obtenidos por Carlson y cols. (Carlson y cols. 2000) y por Henriques y cols. (Henriques y cols. 2009). Concretamente, en el segundo, han demostrado que en el tratamiento exógenamente con el péptido A β a tiempos de muerte reducida o mínima (24 horas), se produce una retención intracelular del

sAPP (sAPP- α) tanto en líneas no neuronales (COS-7) y como en neuronales (PC12, SH-SY-5Y) y también en cultivos primarios de hipocampo; mientras que la acumulación de sAPP (sAPP- α) se observaba en todos los tipos celulares, el incremento en la secreción de este fragmento se daba en las líneas celulares SH-SY-5Y y COS-7, pero no en cultivos primarios ni en PC12 en los que, incluso, disminuía su secreción. Estos datos demuestran la diferente sensibilidad según el tipo celular en la respuesta ante un estrés en el metabolismo/procesamiento del APP. Sin embargo, hay que destacar que en todos los tipos celulares la retirada del A β del medio de cultivo, revertía la acumulación intracelular de sAPP. Desde un punto de vista de mecanismo celular, se trata de una respuesta fisiológica a nivel de procesamiento/metabolismo de esta proteína, ante los efectos adversos que induce el péptido A β o en nuestro caso, el sistema XXo. Esto nos lleva a pensar en una posible respuesta de supervivencia/rescate de las células al EO (24 horas de exposición a XXo), liberando dicho fragmento. En este sentido se ha descrito que el fragmento sAPP- α tiene efectos tróficos en cultivos neuronales, estimula el crecimiento de las neuritas y regula la sinaptogénesis (Fahrenholz y cols. 2006).

Sin embargo, al tiempo de muerte celular apoptótica (48 horas) por el sistema XXo, se producía un mayor incremento intracelular del sAPP- α , mientras que su secreción al medio de cultivo no fue tan significativa. Hay que destacar que al tiempo de 48 horas, se observaba un ligero incremento en los niveles de la proteína holoAPP (inmaduro). El propio incremento de expresión a su vez podía alterar el metabolismo de la proteína. Además, previamente en el laboratorio (Vicente Cenzano 2007) hemos visto que el mRNA del APP se incrementa a partir de las 36-48 horas de tratamiento con XXo. Varios estudios han visto que también el A β induce la expresión del APP (Le y cols. 1995).

Por todo lo anteriormente expuesto podríamos concluir que ante una exposición temprana al EO (24 horas), las células comenzarían un proceso de activación de la ruta no amiloidogénica que supondría una liberación del fragmento sAPP- α como vía de rescate celular. Pero ante una exposición prolongada en el tiempo al EO (48 horas) provocaría que este sistema de rescate celular fallara, desfavoreciéndose la vía α -secretasa y consecuentemente, la célula entraría en un proceso de muerte celular por apoptosis. Para continuar en esta hipótesis, seguimos caracterizando el metabolismo/procesamiento del APP al tiempo de muerte mínima (24 horas)

La proteína APP es procesada por las α , β y γ -secretasas, generando el péptido A β y diferentes fragmentos C-terminales, α , β y γ -CTFs. Aunque la función precisa de estos CTFs no se conoce, diversos estudios los han implicado en la alteración de corriente de membrana y homeostasis del calcio (Fraser y cols. 1997; Kim y cols. 2000), en la estimulación las vías de las proteínas quinasas activadas por mitógenos, activando la transcripción del factor NF- κ B y elevando la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Chang y cols. 2005). Además, pueden acumularse en el núcleo, uniéndose con Fe65 (Cao y cols. 2001) y CP2, alterando la transcripción (Chang y cols. 2005). La translocación

de los CTFs amiloidogénicos al núcleo ha sido implicado en la muerte neuronal *in vivo* (DeGiorgio y cols. 2002; Xu y cols. 2006; Karuppagounder y cols. 2008).

En las células SK-N-MC, el EO generado por el sistema XXo conduce a un incremento en los niveles del fragmento α -CTF generado en el procesamiento no amiloidogénico del APP, antes de la muerte neuronal producida por dicho estrés. Curiosamente, los niveles del fragmento β -CTF no se ven alterados a 24 horas; estos datos junto con el incremento en los niveles de sAPP- α secretados al medio de cultivo, corroboran nuestra hipótesis de que el procesamiento del APP está desplazado hacia la vía no amiloidogénica al tiempo previo de muerte neuronal de 24 horas. Resultados similares han sido descritos recientemente en células hipocámpales de ratón en las que la respuesta de resistencia al EO se traduce en una alteración en la fluidez de su membrana por una redistribución del colesterol, esfingomielina y proteínas asociadas a la membrana que provocará cambios drásticos en el metabolismo del APP, particularmente hacia la acumulación de fragmento α -CTF y un aumento en la producción del sAPP- α (Clement y cols. 2009; Clement y cols. 2010). En este sentido, previamente en el laboratorio se ha demostrado que el sistema XXo induce la sobreexpresión de genes relacionados al metabolismo del colesterol (Recuero y cols. 2009).

El escenario cambia totalmente al tiempo de 48 horas tras la exposición al EO, pues se reducían los niveles del α -CTF, aumentaban los de β -CTF y aumentaba el APP intracelular, lo que significaría un cambio en el procesamiento/metabolismo del APP hacia la ruta amiloidogénica. Cabe destacar que la acumulación intraneuronal de APP observada en cerebros de pacientes EA y en diversos modelos de ratones transgénicos con un patología similar a la de la EA, pueden ser acontecimientos tempranos que estimulan la disfunción neuronal y la muerte (LaFerla y cols. 1997; Gouras y cols. 2000; Chin y cols. 2007).

Como se ha comentado con anterioridad, el fragmento β -CTF se genera por el corte proteolítico de la β -secretasa o BACE (del inglés *β -site APP cleaving enzyme 1*) en el ectodominio de la proteína APP (Vassar y cols. 1999). Como tal, quisimos ahondar sobre la producción del fragmento β -CTF analizando la actividad del enzima responsable de su producción. Al tiempo previo a la muerte neuronal, 24 horas, la exposición de las células al sistema XXo provocaba una disminución, no abolición, significativa de la actividad de este enzima, reforzando nuestra idea sobre el desplazamiento hacia la vía no amiloidogénica como respuesta de rescate celular frente al EO y estando de acuerdo con que el balance entre las vías α - y β - secretasa tienen una relevancia fisiológica (Citron y cols. 1992; Felsenstein y cols. 1994). Ahora bien, al tiempo de muerte neuronal por el sistema XXo -48 horas- pudimos observar una recuperación en la actividad β -secretasa, que concordaba con la acumulación del fragmento β -CTF. Recientes estudios *in vivo* e *in vitro* han comprobado, de igual manera, que inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial y algunos oxidantes, incrementan los niveles de actividad BACE y los niveles del fragmento β -CTF (Tamagno y cols. 2002; Kao y cols. 2004; Tamagno y cols. 2005; Xiong y cols. 2007) y que existe una correlación significativa entre la actividad de la β -secretasa y los marcadores de oxidación observados en tejidos de cerebros de

pacientes EA (Borghini y cols. 2007). Además, en otros modelos de EO por deficiencia en tiamina, han podido comprobar que este hecho altera el procesamiento en el APP dirigiéndolo hacia la vía amiloidogénica, elevando la β -secretasa, incrementando los niveles de β -CTF y exacerbando la formación de placas de amiloide (Karuppagounder y cols. 2009). Es más, este último grupo de investigación han comprobado que la alteración temprana en el metabolismo del APP conduce a una translocación de los fragmentos amiloidogénicos CTFs al núcleo, para iniciar la muerte neuronal (Karuppagounder y cols. 2008), coincidiendo con nuestra hipótesis de que ante un EO sostenido en el tiempo, la célula abandonaría los mecanismos de supervivencia, invirtiendo el balance entre la α - y la β -secretasa hacia la producción-acumulación del fragmento β -CTF, comenzando el proceso de la muerte neuronal. En este sentido se ha demostrado que el fragmento β -CTF expresado en células o añadido exógenamente produce incluso más neurotoxicidad que el propio péptido A β , sugiriendo además, mecanismos tóxicos diferentes entre ellos puesto que la toxicidad del β -CTF era atenuada por colesterol y no por antioxidantes (Kim y cols. 1996).

Siguiendo en la línea de investigación de la actividad β -secretasa y en relación con el procesamiento amiloidogénico al tiempo de muerte neuronal -48 horas- con el sistema XXo, pudimos observar que previo a dicha muerte, existía una disminución significativa en los niveles secretados para ambas especies de péptidos A β (40 y 42), debido probablemente a la disminución de la actividad β -secretasa a favor de la actividad α -secretasa, descrita con anterioridad. Recientemente se ha descrito la activación de α -secretasa y la disminución de A β 40 secretado por un compuesto lipídico (1,3-capriloil-2-araquinoil glicerol) (Tanabe y cols. 2009). Al tiempo de muerte neuronal por XXo, observamos que se producía una recuperación en la secreción de dichos péptidos, coincidiendo de nuevo con la recuperación de la actividad β -secretasa.

El procesamiento proteolítico del APP y su tráfico están íntimamente relacionados en tanto en cuanto dicho procesamiento puede suceder en diversos orgánulos subcelulares durante su transporte intracelular (da Cruz e Silva y cols. 2003; Small y cols. 2006). La vía α -secretasa está asociada principalmente con el trans-Golgi (TGN), las vesículas del post-TGN y con la membrana plasmática (MP) (Sambamurti y cols. 1992; Kuentzel y cols. 1993; Parvathy y cols. 1999; Jolly-Tornetta y cols. 2000; Khvotchev y cols. 2004); y la vía β -secretasa ocurre principalmente en el Golgi proximal o retículo endoplásmico (RE) (Gabuzda y cols. 1994; Xu y cols. 1997; Xia y cols. 1998; Greenfield y cols. 1999) y los endosomas (Perez y cols. 1999; Vassar y cols. 1999; Huse y cols. 2000; Rebelo y cols. 2007). En esta tesis también realizamos experimentos de inmunocitoquímica de células tratadas con el sistema XXo, en este caso la línea SK-APP₆₉₅ o C2, ya que se había utilizado también para la cuantificación del péptido A β . Previamente, habíamos demostrado que a 24 horas de exposición a XXo, se producía la misma respuesta en el metabolismo/procesamiento del APP que en la línea SK-N-MC. Las imágenes por microscopía confocal de la inmunocitoquímica nos revelaron dos cosas: primero, que al tiempo previo a la muerte neuronal -24 horas de tratamiento de XXo- se acumulan fragmentos APP amino- (sAPP- α) y carboxi-terminales (α -CTF más que β -CTF); y segundo, que estas acumulaciones lo hacían en estructuras vesiculares concentradas por el

citoplasma y cerca de la membrana plasmática que coincidirían con las estructuras subcelulares arriba descritas e implicadas en el procesamiento y por tanto en la producción de sAPP- α y CTFs.

Lo expuesto hasta ahora viene a confirmar una clara implicación del EO en el metabolismo/procesamiento del APP. Por un lado porque ante una exposición relativamente corta al EO va a provocar la puesta en marcha, por parte de las células, de un mecanismo de supervivencia que implicaría la secreción de fragmentos cuyas propiedades neurotróficas y neuroprotectoras han quedado patentadas con anterioridad, utilizando las vías normales de procesamiento y tráfico del APP; y por otro lado, y ante una exposición al EO prolongada en el tiempo, las células comenzarían a colapsarse, haciéndose clara la acumulación de fragmentos, probablemente neurotóxicos, dándonos idea de que los mecanismos normales de metabolismo/procesamiento no están funcionando correctamente, pudiendo ser derivados hacia otras rutas alternativas. Estos fragmentos podrían translocarse al núcleo actuando como factores de transcripción, pudiendo iniciar el proceso de muerte neuronal (Karuppagounder y cols. 2008).

Así, lo que parece razonable deducir en cuanto a mecanismos es que el sistema XXo no inhibe la producción de sAPP- α al contrario, en las primeras etapas de la muerte neuronal inducida por EO se favorece el procesamiento α -secretasa pero a la vez se compromete la principal vía secretora (vesicular) de APP/sAPP. El sAPP originado en el Golgi/retículo endoplásmico (RE) podría estar siendo redireccionado hacia una vía de secreción alternativa y por lo general menos utilizada como es la vía del RE/MP. Esto explicaría por qué, ante la exposición prolongada al sistema XXo (48 horas), podemos seguir observando la secreción de una cantidad de sAPP- α (figura R.17) y sAPP (sAPP- α + sAPP- β).

Alteraciones en el tráfico intracelular se han relacionado con un aumento celular de APP en respuesta a otro inductor de EO, el péptido A β (Carlson y cols. 2000). Por el contrario, otros autores han demostrado que la acumulación de fragmentos proteolíticos del APP no era debido a un aumento de la transcripción de APP (Henriques y cols. 2009). Otros mecanismos propuestos incluye a la interferencia con el transporte mediado por citoesqueleto y proteínas asociadas (Salinero y cols. 1997; Carlson y cols. 2000; Mendoza-Naranjo y cols. 2007). Nuestros resultados podrían ser compatibles con alteraciones en la motilidad de vesículas a lo largo del citoesqueleto o con una inhibición del acoplamiento/fusión de vesícula en la MP, llevando así a la acumulación de sAPP- α intracelular dentro de las estructuras vesiculares antes de llegar a la membrana celular.

Además, inhibidores del metabolismo energético oxidativo y del transporte de proteínas de la vía secretora conducen a una disminución en la secreción de APP y a un incremento en la generación de fragmentos amiloidogénicos, β -CTF (Gabuzda y cols. 1994). Nuestros datos son compatibles con un modelo en que la retención intracelular de sAPP- α puede ser una pronta respuesta celular a la exposición al EO. Esto es de particular relevancia a la patología de EA, al considerar que la secreción de este fragmento, de funciones neuroprotectoras, es afectada en esta enfermedad. De hecho, ha sido descrito que los niveles del fragmento sAPP relacionados con la memoria y el

potencial de regeneración disminuyen en cerebro de EA y en el líquido cerebroespinal (Colciaghi y cols. 2002; Olsson y cols. 2003).

Por otro lado, a parte del tráfico de proteínas, las vías de degradación de proteínas (lisosomal o proteosoma) podrían estar también comprometidas después de la exposición al EO. De hecho, experimentos en nuestro laboratorio han demostrado la acumulación de autofagosomas en SK-N-MC por el sistema XXo (Santana Martínez 2010). Dado que los fragmentos CTFs pueden ser metabolizados en lisosomas (Caporaso y cols. 1992; Golde y cols. 1992), su acumulación podía ser el reflejo de una reducción de la actividad endosomal /lisosomal. Hay que recordar que la vía endosomal/lisosomal está también asociada como otra vía de procesamiento amiloidogénico (corte β -secretasa) y además, es la vía de degradación de BACE (Koh y cols. 2005) la cual podría estar inhibida; estos hechos contribuirían al aumento del fragmento carboxi- amiloidogénico, β -CTF.

El fragmento β -CTF, no es sólo un simple precursor del $A\beta$ neurotóxico ya que de por sí es muy neurotóxico incluso más que el propio péptido y probablemente por mecanismos diferentes, tal y como hemos expuesto más arriba, pudiendo producir daño en las membranas celulares (Kim y cols. 1996). La muerte celular por β -CTF podría ser distinta a la de $A\beta$; de hecho, la acumulación de β -CTF –que ha sido definida como patología pre-placa asociada al amiloide- no sólo se produciría con el EO puesto que en un modelo de ratón triple transgénico asocian dicha patología con inflamación (McAlpine y cols. 2009).

Nuestros resultados muestran un modelo celular dinámico de respuesta al EO, donde el procesamiento proteolítico del APP y quizá el catabolismo y el tráfico de sus fragmentos derivados, están siendo modulados por el sistema XXo. Además, nuestros datos indican que en estadios tempranos de muerte celular inducida por EO, el procesamiento α -secretasa puede ser más dominante. Más estudios sobre los nuevos mecanismos por los cuales la actividad α -secretasa está regulada por el EO podría conducir a un nuevo enfoque terapéutico en el tratamiento de la EA.

IV. ALTERACIONES EN EL METABOLISMO/PROCESAMIENTO DEL APP EN EL MODELO CELULAR DE EA FAMILIAR

Hasta ahora, todo lo descrito anteriormente implicaba de forma directa al EO. A partir de ahora vamos a introducir un nuevo parámetro como es la mutación “Swedish” en la proteína APP en combinación con el EO para aproximarnos a nivel del metabolismo/procesamiento del APP, a la temprana patología de la EA familiar.

Al igual que hicimos con la línea celular SK-N-MC, nuestras líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} fueron expuestas al EO generado por el sistema XXo. En un situación previa o de mínima

muerte celular (24 horas post-tratamiento) encontramos un incremento del sAPP- α intracelular en la línea celular mutante en comparación con la línea “wild type”, y sin aumento significativo del holoAPP. Sin embargo, al tiempo de muerte celular, mientras que sí encontrábamos el mismo patrón de acumulación de sAPP- α intracelular en la línea celular “wild type”, en la línea celular mutante había un incremento casi significativo del holoAPP (inmaduro), que nos permitió realizar una primera valoración sobre el metabolismo/procesamiento del APP, donde se podría concluir que, en presencia de la mutación en la proteína APP, éste se alteraba en su respuesta al EO, haciéndose más patente al tiempo de muerte celular. Al estar en consonancia con lo obtenido anteriormente en la línea celular parental, la teoría de que en la respuesta al EO podría producirse y acumularse el fragmento neuroprotector sAPP- α al medio extracelular, estaría vigente; con la salvedad en este caso de que la existencia de una mutación en el APP, hace que el bloqueo en la secreción del sAPP- α sea más acusado en las líneas portadoras de dicha mutación. Estudios previos han observado que en la línea del neuroblastoma SH-SY-5Y con la mutación “Swedish” en el APP se incrementaban los niveles celulares del holoAPP por el efecto del tratamiento con cobre (agente pro-oxidante inductor de EO) (Zhang y cols. 2006).

Para comprobar esta última afirmación, quisimos determinar los niveles de sAPP secretado al medio por parte de nuestras dos líneas celulares bajo el efecto del EO. El resultado obtenido a tiempos previos de muerte celular arrojan dos informaciones importantes: una, que efectivamente, existe una secreción del fragmento sAPP- α al medio por parte de las dos líneas celulares expuestas al EO como respuesta de supervivencia y puesta en marcha de dicho mecanismo frente al EO recibido; y dos, que en el *pool* total de sAPP total, se observa que los niveles son significativamente más elevados en la línea celular SK-APP_{SWE}, pudiendo ser este fenómeno debido a que en la línea mutante ya se están dando signos de fallos en la maquinaria de supervivencia de la célula, ya que al no ser un sistema estático, estamos viendo por un lado, cómo trata de sobrevivir -utilizando la ruta no amiloidogénica- ante un ambiente hostil como el creado por la XXo, con la secreción del fragmento sAPP- α , y por otro, tienen ya en marcha la ruta amiloidogénica con la secreción también del fragmento sAPP- β , probablemente por activación ya de la β -secretasa (Martin y cols. 1995).

Esto último vino a ser confirmado al analizar los tiempos de muerte celular por EO, ya que mientras que la línea SK-APP_{WT} seguía manteniendo e incrementando la secreción del fragmento sAPP- α , tal vez en su intento de supervivencia celular, la línea SK-APP_{SWE} redujo significativamente los niveles del fragmento neuroprotector, sAPP- α . Estos resultados estaban de acuerdo con lo anteriormente descrito, en el capítulo de muerte neuronal por EO, donde indicábamos que las células APP “wild type” ofrecían una respuesta protectora frente a agentes oxidantes mayor que en las células que portan mutaciones en el APP (Cenini y cols. 2009).

Al igual que sucediera en la línea parental SK-N-MC pudimos observar un aumento en los niveles de los fragmentos α -CTF y β -CTF en las líneas celulares “wild type” y “Swedish” bajo tratamiento con EO; si bien en el caso del fragmento β -CTF, el aumento era mayor para la

línea mutante tratada y sobre todo a tiempos de muerte celular. Las diferentes mutaciones en el APP podrían tener un efecto por si solas sobre el metabolismo del APP, más allá que un mero aumento, a la vez controvertido, en la producción de A β , ya que se ha observado que mutaciones en el APP causantes de la EA familiar por un lado incrementan la acumulación de fragmentos C-terminales potencialmente amiloidogénicos y neurotóxicos (β -CTF) en neuronas pero también de α -CTF (McPhie y cols. 1997; Vingtdoux y cols. 2005), y por otro que podrían estar afectando a las vías catabólicas de degradación de estos fragmentos (De Jonghe y cols. 2001). De hecho, la vía endosomal-lisosomal se relaciona con el corte β -secretasa, al mismo tiempo que puede ser el sitio de degradación de CTFs (Caporaso y cols. 1992; Golde y cols. 1992). Estos resultados indicaban que los fragmentos C-terminales podrían estar implicados en la patogénesis de la EA familiar.

Todo lo anteriormente expuesto nos llevó a pensar que el metabolismo/procesamiento del APP en su respuesta al EO estaba siendo alterado en la línea celular SK-APP_{SWE}. A parte de la alteración de las vías catabólicas de degradación en nuestro modelo celular de EA familiar, también se revelaba la existencia de un desbalance entre la vía α -secretasa y β -secretasa, cuyo equilibrio ha sido descrito tener relevancia fisiológica (Citron y cols. 1992). En tiempos previos a la muerte celular por EO, pudimos observar que la línea celular SK-APP_{WT} estaría favorecida la actividad enzimática α -secretasa. Por el contrario, en la línea celular SK-APP_{SWE} expuesta al EO se observó que la actividad β -secretasa es similar o incluso mayor que la actividad α -secretasa. El desbalance de las actividades α y β -secretasas en la línea SK-APP_{SWE} expuesta al EO, estaban de acuerdo con los datos de los fragmentos sAPP- α y β -CTF. Así pues, de acuerdo con lo anteriormente expuesto y como ya hemos comentado, la acción de agentes oxidantes incrementaban la actividad de la β -secretasa (BACE1) (Tamagno y cols. 2002; Kao y cols. 2004; Tamagno y cols. 2005; Guglielmotto y cols. 2009), nosotros añadimos que además, la presencia de la mutación “Swedish” podría exacerbar los efectos del EO, en cuanto a la actividad de BACE1.

Estudios previos han visto que el efecto de la mutación “Swedish” sobre el metabolismo del APP altera no sólo el nivel sino que también los lugares de producción de sus fragmentos derivados (Martin y cols. 1995).

Los experimentos de inmunocitoquímica realizados en las líneas SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} a 24 y 48 horas con o sin tratamiento con el sistema XXo, arrojaron unos resultados que estaban en línea con lo anteriormente descrito para el efecto del EO y analizado con la misma técnica. A tiempos tempranos de muerte celular (24 horas) la línea “wild type” mostró un patrón de acumulación muy parecido, observándose acúmulos de sAPP- α y CTFs (α -CTF y parte de β -CTF) repartidos por todo el citoplasma en forma –aproximadamente- de pequeñas vesículas, reforzándonos en nuestra teoría de que se sigue dando prioridad en la respuesta celular, a la vía normal de tráfico/procesamiento del APP, con predominio de la vía α -secretasa, ya que estas estructuras coincidirían con vesículas del Golgi, TGN, y del post-TGN cercanas a la MP. En cambio, para la línea celular “Swedish” observamos las acumulaciones de fragmentos derivados en forma de agregados mayores

y con una localización más cercana al núcleo, consolidándonos en la idea de que aunque la vía α -secretasa sigue funcionando, se está viendo comprometida, quizá redireccionándose hacia una vía de secreción alternativa como la del RE/MP. Además, la cantidad de fragmentos derivados del APP acumulados son cualitativamente mayores para esta línea celular en comparación con la línea “wild type”; la presencia de la mutación nos permite especular con la idea de que al ser una proteína defectuosa, ya de por sí su procesamiento/metabolismo sería defectuoso, por lo que recrudecería los efectos del EO en el procesamiento/metabolismo y tráfico del APP, pudiendo ser más explícitas dichas acumulaciones.

Al tiempo de muerte celular con XXo (48 horas), la línea SK-APP_{WT} seguía manteniendo su mecanismo de supervivencia frente al EO, ya que la señal para el sAPP- α localizaba a este fragmento hacia la membrana plasmática, aunque ya daba señales de abandono de esta posible vía ya que también se mantenían las colocalizaciones de los anticuerpos 6E10 y anti C-terminal que probablemente indicaban la presencia del fragmento β -CTF. Esto también nos dio pie a pensar que todo este proceso de desbalance/redireccionamiento entre rutas, estaba más adelantada en el tiempo en la línea celular mutante. En la línea celular mutante, ya en muerte celular apoptótica, sólo se pudieron visualizar fragmentos α - y β -CTFs y quizá algo de A β en zonas perinucleares. Al mismo tiempo se producía la pérdida de señal de 6E10 vesicular tan amplia que sí mantenía la línea SK-APP_{WT}, estando este resultado de acuerdo con la disminución del sAPP- α detectado con las aproximaciones bioquímicas. La visualización sólo de dichos fragmentos CTFs volvería a coincidir con que la línea mutante ha dejado una ruta de supervivencia, activando la ruta amiloidogénica y dirigiéndose hacia la muerte celular. Al igual que comentábamos con anterioridad, también podría estar siendo modificada la vía de degradación endosomal/lisosomal de proteínas por lo que se podría esperar una acumulación de los fragmentos CTFs en dichas vesículas, hecho que coincide con las colocalizaciones observadas con el marcador lisosomal CD63 en la línea SK-APP_{SWE} a 24 horas post-tratamiento con XXo. Dado que esta vía se asocia más con el corte β -secretasa (Koh y cols. 2005), esto último también apoyaría nuestra teoría sobre un abandono de la vía no amiloidogénica y por tanto, del mecanismo de supervivencia celular, a favor de una reorientación hacia la vía amiloidogénica.

Estos resultados en nuestro modelo celular de EA familiar, junto con el hallazgo en placas seniles de cerebros de pacientes EA de APP y sus fragmentos (Lahiri y cols. 2002), sugieren que además del amplio papel asignado al A β , los CTFs pueden jugar un rol clave en la patogénesis de esta enfermedad, con una participación directa en los acontecimientos apoptóticos implicados en la neurodegeneración.

V. ANÁLISIS GENÓMICO/FUNCIONAL DEL MODELO CELULAR DE EA FAMILIAR

Por todo lo expuesto hasta ahora, nos pareció interesante utilizar el modelo celular SK-APP_{SWE} expuesto al EO para ahondar en los mecanismos moleculares de la neurodegeneración asociada a la EA. Para este fin realizamos un análisis genómico del modelo celular como aproximación experimental.

Hemos utilizado la técnica de microarrays de DNA para llevar a cabo un análisis de expresión génica diferencial en las líneas celulares SK-APP_{WT} y SK-APP_{SWE} expuestas o no al EO. De dicho estudio se desprendió que el gen que incrementaba en un mayor número de veces su expresión tanto en presencia como en ausencia de EO y de manera significativa al tiempo de 24 horas, era el gen de la hemoxigenasa 1 (HO-1). Este importante hallazgo fue comprobado y validado mediante RT-PCR específica del mRNA HO-1 y por inmunomarcado después de electroforesis, a nivel de proteína.

La importancia de dicho hallazgo radica en que la proteína HO-1 ha sido co-localizada con placas seniles y ovillos neurofibrilares; además, en hipocampo de cerebros de pacientes, el 86 % de los astrocitos GFA positivos (de inglés *glial fibrillary acidic protein*) presentan inmunorreactividad a HO-1, mientras que la fracción que expresa HO-1 en tejido normal es sólo 6–7 %. Al igual que en la línea SK-APP_{SWE}, la expresión de la proteína HO-1 contrastaba con la nula aparición de bandas tanto en la línea parental SK-N-MC como en la línea SK-APP_{WT}; además, inmunomarcados después de electroforesis de extractos de proteína de hipocampo y corteza temporal de pacientes EA, revelaron fuertes bandas HO-1 que no eran detectables en los extractos de pacientes control (Schipper y cols. 1995). Por otro lado, en cerebros envejecidos sin patología EA, el número de neuronas y neuroglías inmunoreactivas para HO-1 en la corteza cerebral y el hipocampo aumentarán progresivamente con la edad (Hirose y cols. 2003).

Otras implicaciones de la HO-1 han sido a nivel del colesterol y de la proteína tau, relacionadas a su vez con la EA. En relación con el colesterol, diremos que su metabolismo se reconoce como uno de los procesos importantes en el desarrollo neuronal, así como en la neuroplasticidad (Bogdanovic y cols. 2001; Refolo y cols. 2001; Shobab y cols. 2005) donde además, en estudios recientes han comprobado que las condiciones pro-oxidantes en tejidos EA promueven la formación de oxisteroles y otros productos de oxidación derivados del colesterol (Vaya y cols. 2007). De esta manera, en este último estudio, se ha visto que la sobreexpresión de HO-1 en astroglia de rata disminuye las concentraciones intracelulares de colesterol y aumenta los niveles de al menos cuatro especies de oxisteroles. Pero otros estudios *in vivo* ponen de manifiesto la relación existente entre colesterol-HO-1-EA, ya que en una investigación post-mortem en corteza frontal en AD y algunos MCI (deterioro cognitivo leve, del inglés *Mild Cognitive Impairment*), pero no en cognitivo normal, los niveles altos de HO-1 correlacionaban con la disminución de los niveles de colesterol, un incremento de los niveles

de precursores del colesterol y de las concentraciones de oxisterol (Hascalovici y cols. 2009).

Por último, la proteína tau que se encuentra de forma agregada e hiperfosforilada en los ovillos neurofibrilares en el cerebro de pacientes EA. Sabemos que tau es degradado por el sistema Ubiquitin-Proteosoma, UPS (del inglés *ubiquitin proteasome system*) *in vitro* e *in vivo* y su forma ubiquitinada está presente en los ovillos neurofibrilares. Además, diversos estudios han revelado que la actividad "Proteosoma" se reduce en cerebro AD y el péptido A β inhibe el UPS en cultivos celulares (Ciechanover y cols. 2003; Shastry 2003). La expresión de HO-1 favorece la degradación vía proteosoma de tau en células del neuroblastoma M17 (Song y cols. 2009). Sabemos -por lo anteriormente dicho- que existe una sobrerregulación del gen *Hmox-1* en cerebros de pacientes EA (Smith y cols. 1994; Premkumar y cols. 1995; Schipper y cols. 1995), por lo tanto, esto último puede servir para estimular el UPS -que falla- en un intento de limitar la acumulación de agregados tóxicos de tau.

Los efectos de HO-1 (en cerebro) en la homeostasis de esteroides y sobre la degradación proteosomal de tau, pueden representar respuestas de adaptación en EA, pero, al mismo tiempo, podrían estar agravando la patología por deposición de hierro y por el daño mitocondrial, descritas más abajo, que alimentarían la cascada de la neurodegeneración.

El hecho de que el gen *Hmox1* apareciera como el que más incrementaba su expresión en la línea celular SK-APP_{SWE} expuesta al EO originado por el sistema XXo, fue de gran importancia y satisfacción debido a la implicación de ambos factores en la patología de la EA así como en otras enfermedades neurodegenerativas: HO-1 y EO (Schipper y cols. 2009). Este hecho ha sido corroborado mediante diversos trabajos que afirman que la inducción del gen *Hmox1* es extremadamente sensible a diversos estímulos pro-oxidantes e inflamatorios que incluyen al A β , el grupo hemo, dopamina, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), óxido nítrico (NO), productos de lipoperoxidación, entre otros (Dennery 2000; Schipper y cols. 2000; Kinobe y cols. 2006; Loboda y cols. 2008).

Como dijimos con anterioridad, la reacción que cataboliza la HO-1 es un arma de doble filo: por un lado podría impartir una fuerte defensa antioxidante y por otro podría actuar como amplificador del daño producido por radicales libres. Concretamente, en células estresadas, la sobre-regulación de HO-1 puede conferir una protección acelerando la degradación del grupo hemo hacia la producción de pigmentos biliares (Stocker y cols. 1987; Nakagami y cols. 1993; Llesuy y cols. 1994; Dore y cols. 1999; Baranano y cols. 2001). Sin embargo, en algunos casos, el ion hierro y el CO derivado del metabolismo del grupo hemo podrían exacerbar el EO intracelular, promoviendo la generación de ROS en la mitocondria y en otros compartimentos subcelulares (Zhang y cols. 1992; Frankel y cols. 2000; Ryter y cols. 2000; Desmard y cols. 2007).

En la presente tesis se ha podido comprobar que la mutación "Swedish" en presencia de EO aumenta la muerte neuronal por apoptosis. El hecho de que los niveles de HO-1 se encuentren

incrementados en la línea SK-APP_{SWE} sin y bajo tratamiento con XXo y la implicación de la HO-1 en el proceso de EO asociado a la EA, nos llevó a estudiar las implicaciones fisiopatológicas de este hecho en nuestro modelo celular de EA familiar.

Efectivamente, existía un único estudio donde se había comprobado la interacción proteína-proteína entre el APP y HO-1, interacción que se produce en el lumen del RE; y que mutaciones en el APP, concretamente la mutación “Swedish”, produce una inhibición de la actividad de este enzima, al comparar con el APP “wild type”. Además, en cultivos de neuronas corticales de los ratones mutantes APP “Swedish” la neurotoxicidad inducida por EO se encontraba incrementada (Takahashi y cols. 2000), en esas condiciones y al igual que en nuestro modelo celular de EA familiar, se detectaba un incremento en los niveles de proteína HO-1, al comparar con la neuronas del ratón no transgénico. Estos datos sugerían que la interacción APP/HO-1 junto con el EO, podrían contribuir a la muerte neuronal en la EA familiar.

Para poder estudiar los efectos posibles de la HO-1 sobre la viabilidad de la línea celular mutante SK-APP_{SWE} nos propusimos iniciar la inhibición de la expresión del gen de la HO-1 en esta línea celular, utilizando la técnica del RNA de interferencia, y concretamente, mediante plásmidos de expresión de shRNA específico para la HO-1. Los resultados obtenidos revelaron que el incremento del silenciamiento del gen de la HO-1 en SK-APP_{SWE} ya en condiciones basales producía una sensibilización en la pérdida de viabilidad, hecho que se volvió a producir en la exposición de las células SK-APP_{SWE} al sistema XXo, de forma también significativa.

Una explicación plausible y que nos lleva a tener en cuenta a la luz de los resultados obtenidos es que la inhibición de la HO-1 podría ser neurotóxica por la disminución de la formación de bilirrubina -conocido como antioxidante (Stocker y cols. 1987)- y/o por la conducción a un menor eflujo del ion hierro del interior celular. En relación a esto último existen trabajos donde ratones deficientes en HO-1 exhiben una muerte celular en respuesta al estrés que es revertida por quelantes de hierro que bloquean la acumulación de hierro (Ferris y cols. 1999). La implicación de la asociación APP-HO-1 tanto fisiológica como patológica, sería de gran interés en la investigación en relación con la EA.

Esta tesis deja así esta vía de estudio abierta para profundizar en los mecanismos moleculares de la neurodegeneración de la EA. A su vez, esta tesis proporciona evidencias de la relación entre el EO y el procesamiento/metabolismo de la proteína APP en la EA.

VI. HIPÓTESIS SOBRE LOS MECANISMOS PATOGENICOS EN LA EA FAMILIAR

Los datos obtenidos de esta Tesis Doctoral, que relacionan al EO, la muerte neuronal y el procesamiento/metabolismo de la proteína APP, nos animan a proponer una hipótesis- esquematizada en la figura D.1- del posible mecanismo patogénico que explique la rápida progresión de la EA familiar y su temprana pérdida neuronal.

Así, en un cerebro normal expuesto a la acción del EO asociado a la edad se produce un balance entre daño oxidativo y defensas antioxidantes (ej: regulación normal de HO-1). La acción de los ROS puede desencadenar procesos de supervivencia, entre otros, una respuesta celular que regule el procesamiento/ metabolismo del APP. El desplazamiento hacia la vía del procesamiento del APP no amiloidogénico con el incremento del fragmento soluble y neurotrófico sAPP- α y del fragmento intracelular α -CTF, de función menos conocida, ayudarían al restablecimiento del ambiente redox celular. Acontecimientos como estos harían que las condiciones internas de las células volvieran a la normalidad, retrasando los efectos nocivos del EO. Pero cuando el estrés oxidativo persiste, se producirían alteraciones del tráfico de proteínas en su vía normal de secreción (ej: daño oxidativo en membranas vesiculares) y de las vías de degradación (lisosomal y/o proteosoma) que probablemente van asociadas al cambio del procesamiento hacia la vía amiloidogénica y en donde la acumulación del fragmento carboxi terminal β -CTF contribuiría a una vía de muerte celular quizá distinta a la del péptido A β . Esta respuesta celular también se ha descrito en relación con otros factores que a su vez están implicados en la EA y relacionados con EO: el colesterol y la inflamación.

En el cerebro de un paciente de EA familiar, la expresión de proteína APP mutante produciría un EO *per sé* -observado por la sobreexpresión de la proteína HO-1- que le hace tener más activa la respuesta celular, y cuando no hay envejecimiento (con niveles mínimos de EO) existe una respuesta celular normal (o casi) en el metabolismo/procesamiento del APP, lo que daría como resultado una situación de supervivencia neuronal. Sin embargo, esa situación de hiperactividad sumada a la acción del EO -el asociado a la edad- haría que en las neuronas se produzca un desbalance hacia una vía de procesamiento amiloidogénica que conlleva una disminución extracelular del fragmento neurotrófico sAPP- α y un aumento del fragmento neurotóxico y precursor de A β , β -CTF e, incluso, a la acumulación del APP. Profundizar en la localización y biogénesis del β -CTF ayudaría a conocer sus actividades biológicas y por tanto a ahondar en los mecanismos patogénicos de esta enfermedad.

Por otro lado, la interacción entre el APP y HO-1, descrita con anterioridad, en el lumen del RE, junto con la sobreexpresión de HO-1 tanto en nuestro modelo celular de EA familiar como por el EO asociado a la edad, nos hace pensar que este enzima tenga un papel en los mecanismos patogénicos de la EA. De esta manera se puede plantear la hipótesis de que o bien una actividad alterada o

bien un *turnover* alterado de este enzima haga que se comprometan las defensas antioxidantes de las células que, cuando existe un incremento del EO (la edad), conduzca a la desregulación -por exceso de actividad celular- del metabolismo/procesamiento del APP.

Por todo lo expuesto en la presente tesis, nuestro modelo celular de EA familiar constituiría una buena herramienta de trabajo para el estudio de los mecanismos patogénicos implicados en la EA.

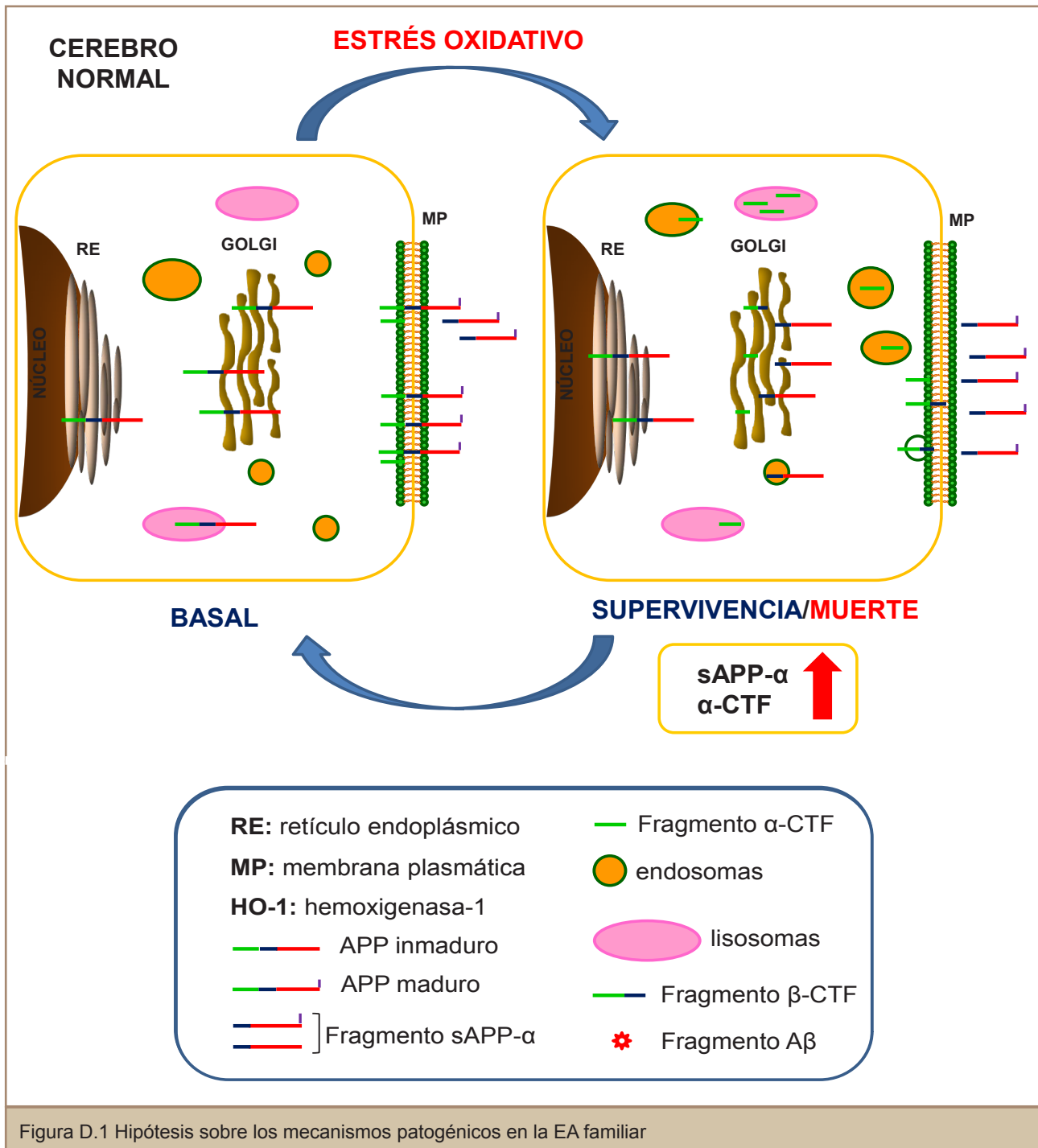


Figura D.1 Hipótesis sobre los mecanismos patogénicos en la EA familiar

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

El trabajo experimental realizado en la presente tesis ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. Hemos generado líneas celulares de origen neuronal que expresan APP – mutantes y normal- cuyos niveles de expresión se acercan a valores fisiológicos, por lo que los resultados obtenidos en esta tesis se podrían aproximar a la realidad que pudiéramos encontrar en cerebros humanos.
2. El estrés oxidativo producido por un sistema generador de radicales libres, provoca, en las líneas mutantes, un adelanto y un incremento en la pérdida de viabilidad neuronal, un aumento de los niveles del fragmento producto de la degradación de PARP, p85 y un aumento del porcentaje de células apoptóticas.
3. El estrés oxidativo leve mantenido en el tiempo regula el metabolismo/procesamiento del APP. A tiempos de muerte celular mínima (24 horas) por estrés oxidativo, en la línea celular parental, SK-N-MC, así como en la línea que expresa APP normal se favorece el procesamiento no amiloidogénico - aumento del fragmento neurotrófico sAPP- α , incremento del fragmento α -CTF así como reducción en la actividad β -secretasa-. Sin embargo, en tiempos de muerte celular apoptótica (48 horas) hay un desbalance hacia la vía de procesamiento amiloidogénico -incremento en los niveles del fragmento β -CTF-. Además, la acumulación intracelular de fragmentos CTFs y sAPP- α nos demuestra que no sólo el procesamiento sino que el catabolismo y tráfico del APP y sus fragmentos están siendo modulados por el estrés oxidativo.
4. El estudio del metabolismo/procesamiento del APP en el modelo celular de enfermedad de Alzheimer familiar nos ha mostrado que la presencia del APP mutante altera la respuesta celular normal al estrés oxidativo. Esta alteración viene determinada por el hecho de que, al tiempo de muerte celular mínima (24 horas), se producía un incremento intracelular del fragmento sAPP- α , un aumento no sólo del fragmento α -CTF sino también del fragmento

β -CTF, así como un desbalance entre las actividades α y β -secretasas. La acumulación del fragmento C-terminal, β -CTF -más acusado en la línea celular mutante bajo el efecto del estrés oxidativo a tiempos de muerte neuronal apoptótica- sugiere un papel patogénico de este, en la enfermedad de Alzheimer.

5. Un estudio genómico/funcional muestra que el gen de la hemoxygenasa-1 (HO-1) es el de mayor sobreexpresión en la línea celular SK-APP_{SWE}, tanto en condiciones de estrés oxidativo como en ausencia del mismo, en comparación con la línea SK-APP_{WT}. Los experimentos de silenciamiento génico sugieren una implicación de este enzima en la supervivencia celular de la línea celular mutante.

CONCLUSIÓN FINAL

A lo largo de esta Tesis hemos puesto de manifiesto que el estrés oxidativo afecta al metabolismo/procesamiento de la proteína APP y que este hecho podría tener relación con la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Porque la expresión de APP mutante sensibiliza a la muerte neuronal inducida por el estrés oxidativo y porque este regula el metabolismo/procesamiento de la proteína, de una manera anómala en el caso del APP mutante, daría lugar a un colapso total de la neurona que la conduciría a la muerte celular por apoptosis, a lo que también contribuiría el desbalance entre las defensas antioxidantes y el daño oxidativo, en el que estaría implicado la HO-1.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. y Yuan, J. (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." *Cell* 87(2): 171.
- Altman, F.P. (1976). "Tetrazolium salts and formazans." *Prog Histochem Cytochem* 9(3): 1-56.
- Alzheimer, A. (1911). "Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters." *Zbl Ges Neurol Psych* 4: 29.
- Alzheimer, A., Forstl, H. y Levy, R. (1991). "On certain peculiar diseases of old age." *Hist Psychiatry* 2(5 Pt 1): 71-101.
- Allsop, D., Landon, M. y Kidd, M. (1983). "The isolation and amino acid composition of senile plaque core protein." *Brain Res* 259(2): 348-52.
- Amaducci, L. y Tesco, G. (1994). "Aging as a major risk for degenerative diseases of the central nervous system." *Curr Opin Neurol* 7(4): 283-6.
- Artiga, M.J., Bullido, M.J., Frank, A., Sastre, I., Recuero, M., Garcia, M.A., Lendon, C.L., Han, S.W., Morris, J.C., Vazquez, J., Goate, A. y Valdivieso, F. (1998b). "Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene." *Hum Mol Genet* 7(12): 1887-92.
- Artiga, M.J., Bullido, M.J., Sastre, I., Recuero, M., Garcia, M.A., Aldudo, J., Vazquez, J. y Valdivieso, F. (1998a). "Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene." *FEBS Lett* 421(2): 105-8.
- Baranano, D.E. y Snyder, S.H. (2001). "Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20): 10996-1002.
- Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C. y Thomas, M. (1983). "Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation." *J Immunol* 130(4): 1910-7.
- Beal, M.F. (1995). "Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases." *Ann Neurol* 38(3): 357-66.

- Behl, C., Widmann, M., Trapp, T. y Holsboer, F.** (1995). "17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death *in vitro*." *Biochem Biophys Res Commun* 216(2): 473-82.
- Bergeron, M., Ferriero, D.M. y Sharp, F.R.** (1998). "Developmental expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: an immunocytochemical study." *Brain Res Dev Brain Res* 105(2): 181-94.
- Berridge, M.V. y Tan, A.S.** (1993). "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction." *Arch Biochem Biophys* 303(2): 474-82.
- Blasko, I., Kemmler, G., Krampfl, W., Jungwirth, S., Wichart, I., Jellinger, K., Tragl, K.H. y Fischer, P.** (2005). "Plasma amyloid beta protein 42 in non-demented persons aged 75 years: effects of concomitant medication and medial temporal lobe atrophy." *Neurobiol Aging* 26(8): 1135-43.
- Blass, J.P. y Gibson, G.E.** (1999). "Cerebrometabolic aspects of delirium in relationship to dementia." *Dement Geriatr Cogn Disord* 10(5): 335-8.
- Blennow, K., de Leon, M.J. y Zetterberg, H.** (2006). "Alzheimer's disease." *Lancet* 368(9533): 387-403.
- Bogdanovic, N., Bretillon, L., Lund, E.G., Diczfalusy, U., Lannfelt, L., Winblad, B., Russell, D.W. y Bjorkhem, I.** (2001). "On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells." *Neurosci Lett* 314(1-2): 45-8.
- Bogdanovic, N., Zilmer, M., Zilmer, K., Rehema, A. y Karelson, E.** (2001). "The Swedish APP670/671 Alzheimer's disease mutation: the first evidence for strikingly increased oxidative injury in the temporal inferior cortex." *Dement Geriatr Cogn Disord* 12(6): 364-70.
- Borghi, R., Patriarca, S., Traverso, N., Piccini, A., Storace, D., Garuti, A., Gabriella, C., Patrizio, O. y Massimo, T.** (2007). "The increased activity of BACE1 correlates with oxidative stress in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 28(7): 1009-14.
- Breteler, M.M.** (2000). "Vascular risk factors for Alzheimer's disease: an epidemiologic perspective." *Neurobiol Aging* 21(2): 153-60.
- Bruckner, S.R., Perry, G. y Estus, S.** (2003). "4-hydroxynonenal contributes to NGF withdrawal-induced neuronal apoptosis." *J Neurochem* 85(4): 999-1005.

- Bullido, M.J., Artiga, M.J., Recuero, M., Sastre, I., Garcia, M.A., Aldudo, J., Lendon, C., Han, S.W., Morris, J.C., Frank, A., Vazquez, J., Goate, A. y Valdivieso, F.** (1998). "A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia." *Nat Genet* 18(1): 69-71.
- Burgos, J.S., Ramirez, C., Sastre, I., Bullido, M.J. y Valdivieso, F.** (2002). "Involvement of apolipoprotein E in the hematogenous route of herpes simplex virus type 1 to the central nervous system." *J Virol* 76(23): 12394-8.
- Butterfield, D.A.** (2002). "Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review." *Free Radic Res* 36(12): 1307-13.
- Butterfield, D.A. y Sultana, R.** (2007). "Redox proteomics identification of oxidatively modified brain proteins in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: insights into the progression of this dementing disorder." *J Alzheimers Dis* 12(1): 61-72.
- Cao, X. y Sudhof, T.C.** (2001). "A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60." *Science* 293(5527): 115-20.
- Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G. y Haass, C.** (2000). "Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase." *J Biol Chem* 275(40): 30849-54.
- Caporaso, G.L., Gandy, S.E., Buxbaum, J.D. y Greengard, P.** (1992). "Chloroquine inhibits intracellular degradation but not secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(6): 2252-6.
- Caporaso, G.L., Takei, K., Gandy, S.E., Matteoli, M., Mundigl, O., Greengard, P. y De Camilli, P.** (1994). "Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein." *J Neurosci* 14(5 Pt 2): 3122-38.
- Carlson, C.D., Czilli, D.L. y Gitter, B.D.** (2000). "Regulation of amyloid precursor protein processing by Abeta in human glioma cells." *Neurobiol Aging* 21(5): 747-56.
- Castano, E.M., Roher, A.E., Esh, C.L., Kokjohn, T.A. y Beach, T.** (2006). "Comparative proteomics of cerebrospinal fluid in neuropathologically-confirmed Alzheimer's disease and non-demented elderly subjects." *Neurol Res* 28(2): 155-63.
- Cathcart, R., Schwiers, E. y Ames, B.N.** (1983). "Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay." *Anal Biochem* 134(1): 111-6.

- Cecchi, C., Fiorillo, C., Sorbi, S., Latorraca, S., Nacmias, B., Bagnoli, S., Nassi, P. y Liguri, G.** (2002). "Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients." *Free Radic Biol Med* 33(10): 1372-9.
- Cenini, G., Maccarinelli, G., Lanni, C., Bonini, S.A., Ferrari-Toninelli, G., Govoni, S., Racchi, M., Butterfield, D.A., Memo, M. y Uberti, D.** (2009). "Wild type but not mutant APP is involved in protective adaptive responses against oxidants." *Amino Acids*.
- Ciechanover, A. y Brundin, P.** (2003). "The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg." *Neuron* 40(2): 427-46.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I. y Selkoe, D.J.** (1992). "Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production." *Nature* 360(6405): 672-4.
- Clark, M.J., Gagnon, J., Williams, A.F. y Barclay, A.N.** (1985). "MRC OX-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain." *Embo J* 4(1): 113-8.
- Clement, A.B., Gamerding, M., Tamboli, I.Y., Lutjohann, D., Walter, J., Greeve, I., Gimpl, G. y Behl, C.** (2009). "Adaptation of neuronal cells to chronic oxidative stress is associated with altered cholesterol and sphingolipid homeostasis and lysosomal function." *J Neurochem* 111(3): 669-82.
- Clement, A.B., Gimpl, G. y Behl, C.** (2010). "Oxidative stress resistance in hippocampal cells is associated with altered membrane fluidity and enhanced nonamyloidogenic cleavage of endogenous amyloid precursor protein." *Free Radic Biol Med*.
- Colciaghi, F., Borroni, B., Pastorino, L., Marcello, E., Zimmermann, M., Cattabeni, F., Padovani, A. y Di Luca, M.** (2002). "[alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients." *Mol Med* 8(2): 67-74.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. y Pericak-Vance, M.A.** (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." *Science* 261(5123): 921-3.
- Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W.A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C. y Mattson, M.P.** (2004). "Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7): 2070-5.

- Chang, K.A. y Suh, Y.H. (2005). "Pathophysiological roles of amyloidogenic carboxy-terminal fragments of the beta-amyloid precursor protein in Alzheimer's disease." *J Pharmacol Sci* 97(4): 461-71.
- Chartier-Harlin, M.C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P., Hardy, J. y et al. (1991). "Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene." *Nature* 353(6347): 844-6.
- Chin, J., Massaro, C.M., Palop, J.J., Thwin, M.T., Yu, G.Q., Bien-Ly, N., Bender, A. y Mucke, L. (2007). "Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease." *J Neurosci* 27(11): 2727-33.
- Chishti, M.A., Yang, D.S., Janus, C., Phinney, A.L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., French, J., Turner, S., Lozza, G., Grilli, M., Kunicki, S., Morissette, C., Paquette, J., Gervais, F., Bergeron, C., Fraser, P.E., Carlson, G.A., George-Hyslop, P.S. y Westaway, D. (2001). "Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695." *J Biol Chem* 276(24): 21562-70.
- da Cruz e Silva, E.F. y da Cruz e Silva, O.A. (2003). "Protein phosphorylation and APP metabolism." *Neurochem Res* 28(10): 1553-61.
- Dahm, R., Zeitelhofer, M., Gotze, B., Kiebler, M.A. y Macchi, P. (2008). "Visualizing mRNA localization and local protein translation in neurons." *Methods Cell Biol* 85: 293-327.
- Dalton, T.P., Shertzer, H.G. y Puga, A. (1999). "Regulation of gene expression by reactive oxygen." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 67-101.
- Darzynkiewicz, Z., Li, X. y Gong, J. (1994). "Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis." *Methods Cell Biol* 41: 15-38.
- Davis-Salinas, J., Saporito-Irwin, S.M., Cotman, C.W. y Van Nostrand, W.E. (1995). "Amyloid beta-protein induces its own production in cultured degenerating cerebrovascular smooth muscle cells." *J Neurochem* 65(2): 931-4.
- Davis, R.E., Miller, S., Herrnstadt, C., Ghosh, S.S., Fahy, E., Shinobu, L.A., Galasko, D., Thal, L.J., Beal, M.F., Howell, N. y Parker, W.D., Jr. (1997). "Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4526-31.

- De Jonghe, C., Esselens, C., Kumar-Singh, S., Craessaerts, K., Serneels, S., Checler, F., Annaert, W., Van Broeckhoven, C. y De Strooper, B. (2001). "Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability." *Hum Mol Genet* 10(16): 1665-71.
- De Strooper, B., Beullens, M., Contreras, B., Levesque, L., Craessaerts, K., Cordell, B., Moechars, D., Bollen, M., Fraser, P., George-Hyslop, P.S. y Van Leuven, F. (1997). "Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins." *J Biol Chem* 272(6): 3590-8.
- DeGiorgio, L.A., DeGiorgio, N., Milner, T.A., Conti, B. y Volpe, B.T. (2000). "Neurotoxic APP C-terminal and beta-amyloid domains colocalize in the nuclei of substantia nigra pars reticulata neurons undergoing delayed degeneration." *Brain Res* 874(2): 137-46.
- DeGiorgio, L.A., Shimizu, Y., Chun, H.S., Cho, B.P., Sugama, S., Joh, T.H. y Volpe, B.T. (2002). "APP knockout attenuates microglial activation and enhances neuron survival in substantia nigra compacta after axotomy." *Glia* 38(2): 174-8.
- Denery, P.A. (2000). "Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury." *Curr Top Cell Regul* 36: 181-99.
- Desmard, M., Boczkowski, J., Poderoso, J. y Motterlini, R. (2007). "Mitochondrial and cellular heme-dependent proteins as targets for the bioactive function of the heme oxygenase/carbon monoxide system." *Antioxid Redox Signal* 9(12): 2139-55.
- Doan, A., Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Slunt, H.H., Ratovitsky, T., Podlisny, M., Selkoe, D.J., Seeger, M., Gandy, S.E., Price, D.L. y Sisodia, S.S. (1996). "Protein topology of presenilin 1." *Neuron* 17(5): 1023-30.
- Dominguez, D., Tournoy, J., Hartmann, D., Huth, T., Cryns, K., Deforce, S., Serneels, L., Camacho, I.E., Marjaux, E., Craessaerts, K., Roebroek, A.J., Schwake, M., D'Hooge, R., Bach, P., Kalinke, U., Moechars, D., Alzheimer, C., Reiss, K., Saftig, P. y De Strooper, B. (2005). "Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice." *J Biol Chem* 280(35): 30797-806.
- Dore, S., Takahashi, M., Ferris, C.D., Zakhary, R., Hester, L.D., Guastella, D. y Snyder, S.H. (1999). "Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5): 2445-50.
- Duriez, P.J. y Shah, G.M. (1997). "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death." *Biochem Cell Biol* 75(4): 337-49.

- Dyrks, T., Weidemann, A., Multhaup, G., Salbaum, J.M., Lemaire, H.G., Kang, J., Muller-Hill, B., Masters, C.L. y Beyreuther, K. (1988). "Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease." *Embo J* 7(4): 949-57.
- Eckert, A., Marques, C.A., Keil, U., Schussel, K. y Muller, W.E. (2003). "Increased apoptotic cell death in sporadic and genetic Alzheimer's disease." *Ann N Y Acad Sci* 1010: 604-9.
- Eckert, A., Schindowski, K., Leutner, S., Luckhaus, C., Touchet, N., Czech, C. y Muller, W.E. (2001b). "Alzheimer's disease-like alterations in peripheral cells from presenilin-1 transgenic mice." *Neurobiol Dis* 8(2): 331-42.
- Eckert, A., Steiner, B., Marques, C., Leutz, S., Romig, H., Haass, C. y Muller, W.E. (2001a). "Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation." *J Neurosci Res* 64(2): 183-92.
- Fahrenholz, F. y Postina, R. (2006). "Alpha-secretase activation--an approach to Alzheimer's disease therapy." *Neurodegener Dis* 3(4-5): 255-61.
- Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N. y van Duijn, C.M. (1997). "Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium." *Jama* 278(16): 1349-56.
- Fatokun, A.A., Stone, T.W. y Smith, R.A. (2007). "Hydrogen peroxide mediates damage by xanthine and xanthine oxidase in cerebellar granule neuronal cultures." *Neurosci Lett* 416(1): 34-8.
- Felsenstein, K.M., Ingalls, K.M., Hunihan, L.W. y Roberts, S.B. (1994). "Reversal of the Swedish familial Alzheimer's disease mutant phenotype in cultured cells treated with phorbol 12,13-dibutyrate." *Neurosci Lett* 174(2): 173-6.
- Ferreiro, E., Resende, R., Costa, R., Oliveira, C.R. y Pereira, C.M. (2006). "An endoplasmic-reticulum-specific apoptotic pathway is involved in prion and amyloid-beta peptides neurotoxicity." *Neurobiol Dis* 23(3): 669-78.
- Ferris, C.D., Jaffrey, S.R., Sawa, A., Takahashi, M., Brady, S.D., Barrow, R.K., Tysoe, S.A., Wolosker, H., Baranano, D.E., Dore, S., Poss, K.D. y Snyder, S.H. (1999). "Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron." *Nat Cell Biol* 1(3): 152-7.
- Finkel, T. y Holbrook, N.J. (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." *Nature* 408(6809): 239-47.

- Fischer, P. y Berner, P.** (1991). "Clinical and epidemiological aspects of dementia in the elderly." *J Neural Transm Suppl* 33: 39-48.
- Floyd, R.A. y Hensley, K.** (2002). "Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases." *Neurobiol Aging* 23(5): 795-807.
- Frackowiak, J., Miller, D.L., Potempska, A., Sukontasup, T. y Mazur-Kolecka, B.** (2003). "Secretion and accumulation of Abeta by brain vascular smooth muscle cells from AbetaPP-Swedish transgenic mice." *J Neuropathol Exp Neurol* 62(6): 685-96.
- Frackowiak, J., Sukontasup, T., Potempska, A. y Mazur-Kolecka, B.** (2004). "Lysosomal deposition of Abeta in cultures of brain vascular smooth muscle cells is enhanced by iron." *Brain Res* 1002(1-2): 67-75.
- Frankel, D., Mehindate, K. y Schipper, H.M.** (2000). "Role of heme oxygenase-1 in the regulation of manganese superoxide dismutase gene expression in oxidatively-challenged astroglia." *J Cell Physiol* 185(1): 80-6.
- Fraser, S.P., Suh, Y.H. y Djamgoz, M.B.** (1997). "Ionic effects of the Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein and its metabolic fragments." *Trends Neurosci* 20(2): 67-72.
- Fratiglioni, L., De Ronchi, D. y Aguero-Torres, H.** (1999). "Worldwide prevalence and incidence of dementia." *Drugs Aging* 15(5): 365-75.
- Fukuchi, K., Kamino, K., Deeb, S.S., Furlong, C.E., Sundstrom, J.A., Smith, A.C. y Martin, G.M.** (1992). "Expression of a carboxy-terminal region of the beta-amyloid precursor protein in a heterogeneous culture of neuroblastoma cells: evidence for altered processing and selective neurotoxicity." *Brain Res Mol Brain Res* 16(1-2): 37-46.
- Gabuzda, D., Busciglio, J., Chen, L.B., Matsudaira, P. y Yankner, B.A.** (1994). "Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative." *J Biol Chem* 269(18): 13623-8.
- Gamaley, I.A. y Klyubin, I.V.** (1999). "Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions." *Int Rev Cytol* 188: 203-55.
- Gau, J.T., Steinhilb, M.L., Kao, T.C., D'Amato, C.J., Gaut, J.R., Frey, K.A. y Turner, R.S.** (2002). "Stable beta-secretase activity and presynaptic cholinergic markers during progressive central nervous system amyloidogenesis in Tg2576 mice." *Am J Pathol* 160(2): 731-8.

- Gibson, G.E. y Huang, H.M. (2005). "Oxidative stress in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 26(5): 575-8.
- Glennner, G.G. y Wong, C.W. (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." *Biochem Biophys Res Commun* 120(3): 885-90.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L. y et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." *Nature* 349(6311): 704-6.
- Goetze, B., Grunewald, B., Baldassa, S. y Kiebler, M. (2004). "Chemically controlled formation of a DNA/calcium phosphate coprecipitate: application for transfection of mature hippocampal neurons." *J Neurobiol* 60(4): 517-25.
- Goetze, B. y Kiebler, M. (2007). "Transfection of hippocampal neurons with plasmid DNA using calcium phosphate coprecipitation. in DNA." *Delivery/Gene Transfer Manual* (eds. Friedmann, T. and Rossi, J.): 405-409.
- Golde, T.E., Estus, S., Usiak, M., Younkin, L.H. y Younkin, S.G. (1990). "Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR." *Neuron* 4(2): 253-67.
- Golde, T.E., Estus, S., Younkin, L.H., Selkoe, D.J. y Younkin, S.G. (1992). "Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives." *Science* 255(5045): 728-30.
- Gouras, G.K., Almeida, C.G. y Takahashi, R.H. (2005). "Intraneuronal Abeta accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 26(9): 1235-44.
- Gouras, G.K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J.P., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Xu, H., Greengard, P. y Relkin, N.R. (2000). "Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain." *Am J Pathol* 156(1): 15-20.
- Graves, A.B., White, E., Koepsell, T.D., Reifler, B.V., van Belle, G., Larson, E.B. y Raskind, M. (1990). "The association between head trauma and Alzheimer's disease." *Am J Epidemiol* 131(3): 491-501.
- Greenfield, J.P., Tsai, J., Gouras, G.K., Hai, B., Thinakaran, G., Checler, F., Sisodia, S.S., Greengard, P. y Xu, H. (1999). "Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2): 742-7.

- Gresch, O., Engel, F.B., Nestic, D., Tran, T.T., England, H.M., Hickman, E.S., Korner, I., Gan, L., Chen, S., Castro-Obregon, S., Hammermann, R., Wolf, J., Muller-Hartmann, H., Nix, M., Siebenkotten, G., Kraus, G. y Lun, K. (2004). "New non-viral method for gene transfer into primary cells." *Methods* 33(2): 151-63.
- Guglielmotto, M., Aragno, M., Autelli, R., Giliberto, L., Novo, E., Colombatto, S., Danni, O., Parola, M., Smith, M.A., Perry, G., Tamagno, E. y Tabaton, M. (2009). "The up-regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: role of oxidative stress and HIF1alpha." *J Neurochem* 108(4): 1045-56.
- Guo, Q., Sopher, B.L., Furukawa, K., Pham, D.G., Robinson, N., Martin, G.M. y Mattson, M.P. (1997). "Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals." *J Neurosci* 17(11): 4212-22.
- Ha, H.C. y Snyder, S.H. (2000). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the nervous system." *Neurobiol Dis* 7(4): 225-39.
- Haass, C., Hung, A.Y., Selkoe, D.J. y Teplow, D.B. (1994). "Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor." *J Biol Chem* 269(26): 17741-8.
- Haass, C., Koo, E.H., Mellon, A., Hung, A.Y. y Selkoe, D.J. (1992). "Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments." *Nature* 357(6378): 500-3.
- Halliwell, B. (1999). "Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)." *Free Radic Res* 31(4): 261-72.
- Hannon, G.J. (2002). "RNA interference." *Nature* 418(6894): 244-51.
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E. y Berg, K. (1989). "Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill." *J Immunol Methods* 119(2): 203-10.
- Hardy, J. (1997). "Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease." *Trends Neurosci* 20(4): 154-9.
- Harlow, E.y.L., D. (1988). "Antibodies. A laboratory manual." Cols Spring Harbor Laboratory Press.
- Harman, D. (1981). "The aging process." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(11): 7124-8.

- Harman, D. (2006). "Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span." *Ann N Y Acad Sci* 1067: 10-21.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K. y Saftig, P. (2002). "The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts." *Hum Mol Genet* 11(21): 2615-24.
- Hascalovici, J.R., Song, W., Vaya, J., Khatib, S., Fuhrman, B., Aviram, M. y Schipper, H.M. (2009). "Impact of heme oxygenase-1 on cholesterol synthesis, cholesterol efflux and oxysterol formation in cultured astroglia." *J Neurochem* 108(1): 72-81.
- Hashimoto, T., Ogino, K., Shin, R.W., Kitamoto, T., Kikuchi, T. y Shimizu, N. (2010). "Age-dependent increase in lysosome-associated membrane protein 1 and early-onset behavioral deficits in APPSL transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Neurosci Lett* 469(2): 273-7.
- Hengartner, M.O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* 407(6805): 770-6.
- Henriques, A.G., Vieira, S.I., Crespo-Lopez, M.E., Guiomar de Oliveira, M.A., da Cruz e Silva, E.F. y da Cruz e Silva, O.A. (2009). "Intracellular sAPP retention in response to Abeta is mapped to cytoskeleton-associated structures." *J Neurosci Res* 87(6): 1449-61.
- Hilbich, C., Monning, U., Grund, C., Masters, C.L. y Beyreuther, K. (1993). "Amyloid-like properties of peptides flanking the epitope of amyloid precursor protein-specific monoclonal antibody 22C11." *J Biol Chem* 268(35): 26571-7.
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R.L., Atwood, C.S., Johnson, A.B., Kress, Y., Vinters, H.V., Tabaton, M., Shimohama, S., Cash, A.D., Siedlak, S.L., Harris, P.L., Jones, P.K., Petersen, R.B., Perry, G. y Smith, M.A. (2001). "Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease." *J Neurosci* 21(9): 3017-23.
- Hirose, W., Ikematsu, K. y Tsuda, R. (2003). "Age-associated increases in heme oxygenase-1 and ferritin immunoreactivity in the autopsied brain." *Leg Med (Tokyo)* 5 Suppl 1: S360-6.
- Hooper, N.M. y Turner, A.J. (2002). "The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease." *Curr Med Chem* 9(11): 1107-19.
- Hsia, A.Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G.Q., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Malenka, R.C., Nicoll, R.A. y Mucke, L. (1999). "Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6): 3228-33.

- Huovila, A.P., Turner, A.J., Pelto-Huikko, M., Karkkainen, I. y Ortiz, R.M.** (2005). "*Shedding light on ADAM metalloproteinases.*" *Trends Biochem Sci* 30(7): 413-22.
- Huse, J.T., Pijak, D.S., Leslie, G.J., Lee, V.M. y Doms, R.W.** (2000). "*Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase.*" *J Biol Chem* 275(43): 33729-37.
- Itzhaki, R.F., Dobson, C.B. y Wozniak, M.A.** (2004). "*Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease.*" *Ann Neurol* 55(2): 299-300; author reply 300-1.
- Itzhaki, R.F., Lin, W.R., Shang, D., Wilcock, G.K., Faragher, B. y Jamieson, G.A.** (1997). "*Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease.*" *Lancet* 349(9047): 241-4.
- Iversen, N., Birkenes, B., Torsdalen, K. y Djurovic, S.** (2005). "*Electroporation by nucleofector is the best nonviral transfection technique in human endothelial and smooth muscle cells.*" *Genet Vaccines Ther* 3(1): 2.
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H.T., Nixon, R.A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P.E., St George-Hyslop, P. y Westaway, D.** (2000). "*A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease.*" *Nature* 408(6815): 979-82.
- Jellinger, K.A.** (2006). "*Alzheimer 100--highlights in the history of Alzheimer research.*" *J Neural Transm* 113(11): 1603-23.
- Johnstone, E.M., Chaney, M.O., Norris, F.H., Pascual, R. y Little, S.P.** (1991). "*Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis.*" *Brain Res Mol Brain Res* 10(4): 299-305.
- Jolly-Tornetta, C. y Wolf, B.A.** (2000). "*Protein kinase C regulation of intracellular and cell surface amyloid precursor protein (APP) cleavage in CHO695 cells.*" *Biochemistry* 39(49): 15282-90.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. y Muller-Hill, B.** (1987). "*The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.*" *Nature* 325(6106): 733-6.
- Kao, S.C., Krichevsky, A.M., Kosik, K.S. y Tsai, L.H.** (2004). "*BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons.*" *J Biol Chem* 279(3): 1942-9.

- Karuppagounder, S.S., Xu, H., Pechman, D., Chen, L.H., DeGiorgio, L.A. y Gibson, G.E.** (2008). "Translocation of amyloid precursor protein C-terminal fragment(s) to the nucleus precedes neuronal death due to thiamine deficiency-induced mild impairment of oxidative metabolism." *Neurochem Res* 33(7): 1365-72.
- Karuppagounder, S.S., Xu, H., Shi, Q., Chen, L.H., Pedrini, S., Pechman, D., Baker, H., Beal, M.F., Gandy, S.E. y Gibson, G.E.** (2009). "Thiamine deficiency induces oxidative stress and exacerbates the plaque pathology in Alzheimer's mouse model." *Neurobiol Aging* 30(10): 1587-600.
- Katayama, T., Imaizumi, K., Honda, A., Yoneda, T., Kudo, T., Takeda, M., Mori, K., Rozmahel, R., Fraser, P., George-Hyslop, P.S. y Tohyama, M.** (2001). "Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations." *J Biol Chem* 276(46): 43446-54.
- Katzman, R.** (1986). "Alzheimer's disease." *N Engl J Med* 314(15): 964-73.
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. y Poirier, G.G.** (1993). "Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis." *Cancer Res* 53(17): 3976-85.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. y Currie, A.R.** (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-57.
- Khvotchev, M. y Sudhof, T.C.** (2004). "Proteolytic processing of amyloid-beta precursor protein by secretases does not require cell surface transport." *J Biol Chem* 279(45): 47101-8.
- Kim, D.H. y Rossi, J.J.** (2007). "Strategies for silencing human disease using RNA interference." *Nat Rev Genet* 8(3): 173-84.
- Kim, H.S., Park, C.H., Cha, S.H., Lee, J.H., Lee, S., Kim, Y., Rah, J.C., Jeong, S.J. y Suh, Y.H.** (2000). "Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity." *FASEB J* 14(11): 1508-17.
- Kim, S.H. y Suh, Y.H.** (1996). "Neurotoxicity of a carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein." *J Neurochem* 67(3): 1172-82.
- Kinobe, R.T., Vlahakis, J.Z., Vreman, H.J., Stevenson, D.K., Brien, J.F., Szarek, W.A. y Nakatsu, K.** (2006). "Selectivity of imidazole-dioxolane compounds for *in vitro* inhibition of microsomal haem oxygenase isoforms." *Br J Pharmacol* 147(3): 307-15.

- Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C.M., Irizarry, M.C. y Hyman, B.T.** (2003). "Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes." *J Cell Sci* 116(Pt 16): 3339-46.
- Koh, Y.H., von Arnim, C.A., Hyman, B.T., Tanzi, R.E. y Tesco, G.** (2005). "BACE is degraded via the lysosomal pathway." *J Biol Chem* 280(37): 32499-504.
- Kuentzel, S.L., Ali, S.M., Altman, R.A., Greenberg, B.D. y Raub, T.J.** (1993). "The Alzheimer beta-amyloid protein precursor/protease nexin-II is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells." *Biochem J* 295 (Pt 2): 367-78.
- Kumar-Singh, S., Theuns, J., Van Broeck, B., Pirici, D., Vennekens, K., Corsmit, E., Cruts, M., Dermaut, B., Wang, R. y Van Broeckhoven, C.** (2006). "Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40." *Hum Mutat* 27(7): 686-95.
- Kumar, L.D. y Clarke, A.R.** (2007). "Gene manipulation through the use of small interfering RNA (siRNA): from in vitro to in vivo applications." *Adv Drug Deliv Rev* 59(2-3): 87-100.
- Laemmli, U.K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- LaFerla, F.M., Troncoso, J.C., Strickland, D.K., Kawas, C.H. y Jay, G.** (1997). "Neuronal cell death in Alzheimer's disease correlates with apoE uptake and intracellular Abeta stabilization." *J Clin Invest* 100(2): 310-20.
- Lahiri, D.K., Kotwal, G.J., Farlow, M.R., Sima, A., Kupsky, W., Sarkar, F.H. y Sambamurti, K.** (2002). "The role of the carboxyl-terminal fragments of amyloid precursor protein in Alzheimer's disease." *Ann N Y Acad Sci* 973: 334-9.
- Lazarov, O., Morfini, G.A., Lee, E.B., Farah, M.H., Szodorai, A., DeBoer, S.R., Koliatsos, V.E., Kins, S., Lee, V.M., Wong, P.C., Price, D.L., Brady, S.T. y Sisodia, S.S.** (2005). "Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: revisited." *J Neurosci* 25(9): 2386-95.
- Le, W., Xie, W.J., Nyormoi, O., Ho, B.K., Smith, R.G. y Appel, S.H.** (1995). "beta-Amyloid1-40 increases expression of beta-amyloid precursor protein in neuronal hybrid cells." *J Neurochem* 65(5): 2373-6.
- Lee, J.P., Chang, K.A., Kim, H.S., Kim, S.S., Jeong, S.J. y Suh, Y.H.** (2000). "APP carboxyl-terminal fragment without or with abeta domain equally induces cytotoxicity in differentiated PC12 cells and cortical neurons." *J Neurosci Res* 60(4): 565-70.

- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K. y et al. (1995a). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." *Science* 269(5226): 973-7.
- Li, X. y Greenwald, I. (1998). "Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for *Caenorhabditis elegans* and human *presenilins*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12): 7109-14.
- Loboda, A., Jazwa, A., Grochot-Przeczek, A., Rutkowski, A.J., Cisowski, J., Agarwal, A., Jozkowicz, A. y Dulak, J. (2008). "Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal* 10(10): 1767-812.
- Liesuy, S.F. y Tomaro, M.L. (1994). "Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage." *Biochim Biophys Acta* 1223(1): 9-14.
- Maasho, K., Marusina, A., Reynolds, N.M., Coligan, J.E. y Borrego, F. (2004). "Efficient gene transfer into the human natural killer cell line, NKL, using the *Amaxa* nucleofection system." *J Immunol Methods* 284(1-2): 133-40.
- Maretzky, T., Schulte, M., Ludwig, A., Rose-John, S., Blobel, C., Hartmann, D., Altevogt, P., Saftig, P. y Reiss, K. (2005). "L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth." *Mol Cell Biol* 25(20): 9040-53.
- Marques, C.A., Keil, U., Bonert, A., Steiner, B., Haass, C., Muller, W.E. y Eckert, A. (2003). "Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway." *J Biol Chem* 278(30): 28294-302.
- Martin, B.L., Schrader-Fischer, G., Busciglio, J., Duke, M., Paganetti, P. y Yankner, B.A. (1995). "Intracellular accumulation of beta-amyloid in cells expressing the Swedish mutant amyloid precursor protein." *J Biol Chem* 270(45): 26727-30.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L. y Beyreuther, K. (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(12): 4245-9.
- Mattson, M.P. (2000). "Apoptosis in neurodegenerative disorders." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(2): 120-9.
- Mattson, M.P. (2002). "Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease." *J Neurovirol* 8(6): 539-50.

- Mattson, M.P.** (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." *Nature* 430(7000): 631-9.
- Mattson, M.P.** (2006). "Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders." *Antioxid Redox Signal* 8(11-12): 1997-2006.
- Mattson, M.P., Chan, S.L. y Duan, W.** (2002). "Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior." *Physiol Rev* 82(3): 637-72.
- Mattson, M.P. y Kroemer, G.** (2003). "Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection." *Trends Mol Med* 9(5): 196-205.
- Mattson, M.P. y Magnus, T.** (2006). "Ageing and neuronal vulnerability." *Nat Rev Neurosci* 7(4): 278-94.
- Matz, P., Turner, C., Weinstein, P.R., Massa, S.M., Panter, S.S. y Sharp, F.R.** (1996). "Heme-oxygenase-1 induction in glia throughout rat brain following experimental subarachnoid hemorrhage." *Brain Res* 713(1-2): 211-22.
- McAlpine, F.E., Lee, J.K., Harms, A.S., Ruhn, K.A., Blurton-Jones, M., Hong, J., Das, P., Golde, T.E., LaFerla, F.M., Oddo, S., Blesch, A. y Tansey, M.G.** (2009). "Inhibition of soluble TNF signaling in a mouse model of Alzheimer's disease prevents pre-plaque amyloid-associated neuropathology." *Neurobiol Dis* 34(1): 163-77.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. y Stadlan, E.M.** (1984). "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease." *Neurology* 34(7): 939-44.
- McPhie, D.L., Lee, R.K., Eckman, C.B., Olstein, D.H., Durham, S.P., Yager, D., Younkin, S.G., Wurtman, R.J. y Neve, R.L.** (1997). "Neuronal expression of beta-amyloid precursor protein Alzheimer mutations causes intracellular accumulation of a C-terminal fragment containing both the amyloid beta and cytoplasmic domains." *J Biol Chem* 272(40): 24743-6.
- Mendoza-Naranjo, A., Gonzalez-Billault, C. y Maccioni, R.B.** (2007). "Abeta1-42 stimulates actin polymerization in hippocampal neurons through Rac1 and Cdc42 Rho GTPases." *J Cell Sci* 120(Pt 2): 279-88.
- Mohammad Abdul, H., Sultana, R., Keller, J.N., St Clair, D.K., Markesbery, W.R. y Butterfield, D.A.** (2006). "Mutations in amyloid precursor protein and presenilin-1 genes increase the basal oxidative stress in murine neuronal cells and lead to increased sensitivity to oxidative stress mediated by amyloid beta-peptide (1-42), HO and kainic acid: implications for Alzheimer's disease." *J Neurochem* 96(5): 1322-35.

- Moller, H.J. y Graeber, M.B.** (1998). "The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 248(3): 111-22.
- Montiel, T., Quiroz-Baez, R., Massieu, L. y Arias, C.** (2006). "Role of oxidative stress on beta-amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: protection by antioxidants." *Exp Neurol* 200(2): 496-508.
- Moreira, P.I., Santos, M.S., Oliveira, C.R., Shenk, J.C., Nunomura, A., Smith, M.A., Zhu, X. y Perry, G.** (2008). "Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7(1): 3-10.
- Moreira, P.I., Siedlak, S.L., Aliev, G., Zhu, X., Cash, A.D., Smith, M.A. y Perry, G.** (2005). "Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer disease." *J Neural Transm* 112(7): 921-32.
- Moreno-Flores, M.T., Salinero, O. y Wandosell, F.** (1998). "BetaA amyloid peptide (25-35) induced APP expression in cultured astrocytes." *J Neurosci Res* 52(6): 661-71.
- Morishima-Kawashima, M. y Ihara, Y.** (2002). "Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau." *J Neurosci Res* 70(3): 392-401.
- Mosmann, T.** (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Mueller, S.G., Weiner, M.W., Thal, L.J., Petersen, R.C., Jack, C.R., Jagust, W., Trojanowski, J.Q., Toga, A.W. y Beckett, L.** (2005). "Ways toward an early diagnosis in Alzheimer's disease: The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI)." *Alzheimers Dement* 1(1): 55-66.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B. y Lannfelt, L.** (1992). "A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid." *Nat Genet* 1(5): 345-7.
- Muñoz de Galdeano, T.** (2007). "Modelos celulares para el estudio de la enfermedad de Alzheimer genética." DEA. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Mutisya, E.M., Bowling, A.C. y Beal, M.F.** (1994). "Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease." *J Neurochem* 63(6): 2179-84.
- Nakagami, T., Toyomura, K., Kinoshita, T. y Morisawa, S.** (1993). "A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin." *Biochim Biophys Acta* 1158(2): 189-93.

- Nakaso, K., Kitayama, M., Mizuta, E., Fukuda, H., Ishii, T., Nakashima, K. y Yamada, K.** (2000). "Co-induction of heme oxygenase-1 and peroxiredoxin I in astrocytes and microglia around hemorrhagic region in the rat brain." *Neurosci Lett* 293(1): 49-52.
- Nathalie, P. y Jean-Noel, O.** (2008). "Processing of amyloid precursor protein and amyloid peptide neurotoxicity." *Curr Alzheimer Res* 5(2): 92-9.
- Nestor, P.J., Scheltens, P. y Hodges, J.R.** (2004). "Advances in the early detection of Alzheimer's disease." *Nat Med* 10 Suppl: S34-41.
- Newton, J.R., Parkinson, D. y Clench, M.R.** (2006). "Strategies for examination of Alzheimer's disease amyloid precursor protein isoforms." *Anal Bioanal Chem*.
- Nordstedt, C., Gandy, S.E., Alafuzoff, I., Caporaso, G.L., Iverfeldt, K., Grebb, J.A., Winblad, B. y Greengard, P.** (1991). "Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in human brain: aging-associated increases in holoprotein and in a proteolytic fragment." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(20): 8910-4.
- Nunomura, A., Castellani, R.J., Zhu, X., Moreira, P.I., Perry, G. y Smith, M.A.** (2006). "Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease." *J Neuropathol Exp Neurol* 65(7): 631-41.
- Nunomura, A., Chiba, S., Lippa, C.F., Cras, P., Kalaria, R.N., Takeda, A., Honda, K., Smith, M.A. y Perry, G.** (2004). "Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of familial Alzheimer's disease." *Neurobiol Dis* 17(1): 108-13.
- Nunomura, A., Moreira, P.I., Lee, H.G., Zhu, X., Castellani, R.J., Smith, M.A. y Perry, G.** (2007). "Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6(6): 411-23.
- Nunomura, A., Perry, G., Pappolla, M.A., Friedland, R.P., Hirai, K., Chiba, S. y Smith, M.A.** (2000). "Neuronal oxidative stress precedes amyloid-beta deposition in Down syndrome." *J Neuropathol Exp Neurol* 59(11): 1011-7.
- Nussbaum, R.L. y Ellis, C.E.** (2003). "Alzheimer's disease and Parkinson's disease." *N Engl J Med* 348(14): 1356-64.
- Oikawa, N., Yamaguchi, H., Ogino, K., Taki, T., Yuyama, K., Yamamoto, N., Shin, R.W., Furukawa, K. y Yanagisawa, K.** (2009). "Gangliosides determine the amyloid pathology of Alzheimer's disease." *Neuroreport* 20(12): 1043-6.

- Olsson, A., Hoglund, K., Sjogren, M., Andreassen, N., Minthon, L., Lannfelt, L., Buerger, K., Moller, H.J., Hampel, H., Davidsson, P. y Blennow, K. (2003). "Measurement of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients." *Exp Neurol* 183(1): 74-80.
- Oltersdorf, T., Ward, P.J., Henriksson, T., Beattie, E.C., Neve, R., Lieberburg, I. y Fritz, L.C. (1990). "The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway." *J Biol Chem* 265(8): 4492-7.
- Onyango, I.G. y Khan, S.M. (2006). "Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and stress signaling in Alzheimer's disease." *Curr Alzheimer Res* 3(4): 339-49.
- Park, H.J., Kim, S.S., Kang, S. y Rhim, H. (2009). "Intracellular Abeta and C99 aggregates induce mitochondria-dependent cell death in human neuroglioma H4 cells through recruitment of the 20S proteasome subunits." *Brain Res* 1273: 1-8.
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A.J. y Hooper, N.M. (1999). "Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells." *Biochemistry* 38(30): 9728-34.
- Perez, R.G., Soriano, S., Hayes, J.D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D.J., Chen, X., Stokin, G.B. y Koo, E.H. (1999). "Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42." *J Biol Chem* 274(27): 18851-6.
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P. y Gauthier, S. (1993). "Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease." *Lancet* 342(8873): 697-9.
- Premkumar, D.R., Smith, M.A., Richey, P.L., Petersen, R.B., Castellani, R., Kutty, R.K., Wiggert, B., Perry, G. y Kalaria, R.N. (1995). "Induction of heme oxygenase-1 mRNA and protein in neocortex and cerebral vessels in Alzheimer's disease." *J Neurochem* 65(3): 1399-402.
- Price, D.L., Tanzi, R.E., Borchelt, D.R. y Sisodia, S.S. (1998). "Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models." *Annu Rev Genet* 32: 461-93.
- Rago, R., Mitchen, J., Cheng, A.L., Oberley, T. y Wilding, G. (1991). "Disruption of cellular energy balance by suramin in intact human prostatic carcinoma cells, a likely antiproliferative mechanism." *Cancer Res* 51(24): 6629-35.
- Ramírez Moreno, C. (2006). "Implicación de la Apolipoproteína E en la infección hematogena y en la transmisión vertical del virus Herpes simplex tipo I en ratón." Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.

- Rebelo, S., Vieira, S.I., Esselmann, H., Wiltfang, J., da Cruz e Silva, E.F. y da Cruz e Silva, O.A. (2007). "Tyr687 dependent APP endocytosis and Abeta production." *J Mol Neurosci* 32(1): 1-8.
- Recuero, M., Serrano, E., Bullido, M.J. y Valdivieso, F. (2004). "Abeta production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP." *FEBS Lett* 570(1-3): 114-8.
- Recuero, M., Vicente, M.C., Martinez-Garcia, A., Ramos, M.C., Carmona-Saez, P., Sastre, I., Aldudo, J., Vilella, E., Frank, A., Bullido, M.J. y Valdivieso, F. (2009). "A free radical-generating system induces the cholesterol biosynthesis pathway: a role in Alzheimer's disease." *Aging Cell* 8(2): 128-39.
- Refolo, L.M., Pappolla, M.A., LaFrancois, J., Malester, B., Schmidt, S.D., Thomas-Bryant, T., Tint, G.S., Wang, R., Mercken, M., Petanceska, S.S. y Duff, K.E. (2001). "A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Neurobiol Dis* 8(5): 890-9.
- Refolo, L.M., Salton, S.R., Anderson, J.P., Mehta, P. y Robakis, N.K. (1989). "Nerve and epidermal growth factors induce the release of the Alzheimer amyloid precursor from PC 12 cell cultures." *Biochem Biophys Res Commun* 164(2): 664-70.
- Repetto, M. (1997). "Toxicología Fundamental."
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S. y Khvorova, A. (2004). "Rational siRNA design for RNA interference." *Nat Biotechnol* 22(3): 326-30.
- Robinson, J.P., Darzynkiewicz, Z., Dean, P.N., Orfao, A., Ravinovitch, P.S., Stewart, C.C., Tanke, H.J. y Weeles, L.L.e. (1997). "Current Protocols in Cytometry. New York."
- Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T. y et al. (1995). "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene." *Nature* 376(6543): 775-8.
- Rohn, T.T., Head, E., Nesse, W.H., Cotman, C.W. y Cribbs, D.H. (2001b). "Activation of caspase-8 in the Alzheimer's disease brain." *Neurobiol Dis* 8(6): 1006-16.
- Rohn, T.T., Head, E., Su, J.H., Anderson, A.J., Bahr, B.A., Cotman, C.W. y Cribbs, D.H. (2001a). "Correlation between caspase activation and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease." *Am J Pathol* 158(1): 189-98.

- Rohn, T.T., Rissman, R.A., Davis, M.C., Kim, Y.E., Cotman, C.W. y Head, E. (2002). "Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain." *Neurobiol Dis* 11(2): 341-54.
- Rosenkranz, A.R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K.M., Chen, W., Knapp, W. y Zlabinger, G.J. (1992). "A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate." *J Immunol Methods* 156(1): 39-45.
- Royall, J.A. y Ischiropoulos, H. (1993). "Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells." *Arch Biochem Biophys* 302(2): 348-55.
- Ryter, S.W. y Tyrrell, R.M. (2000). "The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties." *Free Radic Biol Med* 28(2): 289-309.
- Salinero, O., Moreno-Flores, M.T., Ceballos, M.L. y Wandosell, F. (1997). "beta-Amyloid peptide induced cytoskeletal reorganization in cultured astrocytes." *J Neurosci Res* 47(2): 216-23.
- Sambamurti, K., Shioi, J., Anderson, J.P., Pappolla, M.A. y Robakis, N.K. (1992). "Evidence for intracellular cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor in PC12 cells." *J Neurosci Res* 33(2): 319-29.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). "Expression of Cloned Genes in Cultured Mammalian Cells." *Molecular cloning, A laboratory manual.*, Eds: Ford N., Nolan C., Ferguson M. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 16.32-16.36.
- Santana Martínez, S. (2010). "Efectos de la infección con el virus Herpes simplex de tipo 1 en células neuronales y su relación con la enfermedad de Alzheimer." Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Satoh, T., Numakawa, T., Abiru, Y., Yamagata, T., Ishikawa, Y., Enokido, Y. y Hatanaka, H. (1998). "Production of reactive oxygen species and release of L-glutamate during superoxide anion-induced cell death of cerebellar granule neurons." *J Neurochem* 70(1): 316-24.
- Sayre, L.M., Perry, G. y Smith, M.A. (2008). "Oxidative stress and neurotoxicity." *Chem Res Toxicol* 21(1): 172-88.
- Schaeffer, E.L. y Gattaz, W.F. (2008). "Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A2 enzyme." *Psychopharmacology (Berl)* 198(1): 1-27.

- Schipper, H.M., Cisse, S. y Stopa, E.G.** (1995). "Expression of heme oxygenase-1 in the senescent and Alzheimer-diseased brain." *Ann Neurol* 37(6): 758-68.
- Schipper, H.M., Chertkow, H., Mehindate, K., Frankel, D., Melmed, C. y Bergman, H.** (2000). "Evaluation of heme oxygenase-1 as a systemic biological marker of sporadic AD." *Neurology* 54(6): 1297-304.
- Schipper, H.M., Song, W., Zukor, H., Hascalovici, J.R. y Zeligman, D.** (2009). "Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement." *J Neurochem* 110(2): 469-85.
- Schmitt, T.L., Steiner, E., Trieb, K. y Grubeck-Loebenstein, B.** (1997). "Amyloid beta-protein(25-35) increases cellular APP and inhibits the secretion of APPs in human extraneuronal cells." *Exp Cell Res* 234(2): 336-40.
- Schubert, W., Prior, R., Weidemann, A., Dircksen, H., Multhaup, G., Masters, C.L. y Beyreuther, K.** (1991). "Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites." *Brain Res* 563(1-2): 184-94.
- Schuessel, K., Frey, C., Jourdan, C., Keil, U., Weber, C.C., Muller-Spahn, F., Muller, W.E. y Eckert, A.** (2006). "Aging sensitizes toward ROS formation and lipid peroxidation in PS1M146L transgenic mice." *Free Radic Biol Med* 40(5): 850-62.
- Sebastia, J., Pertusa, M., Vilchez, D., Planas, A.M., Verbeek, R., Rodriguez-Farre, E., Cristofol, R. y Sanfeliu, C.** (2006). "Carboxyl-terminal fragment of amyloid precursor protein and hydrogen peroxide induce neuronal cell death through different pathways." *J Neural Transm* 113(12): 1837-45.
- Selkoe, D.J.** (1996). "Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease." *J Biol Chem* 271(31): 18295-8.
- Selkoe, D.J.** (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." *Physiol Rev* 81(2): 741-66.
- Selkoe, D.J.** (2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure." *Science* 298(5594): 789-91.
- Selkoe, D.J., Bell, D.S., Podlisny, M.B., Price, D.L. y Cork, L.C.** (1987). "Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease." *Science* 235(4791): 873-7.
- Selkoe, D.J. y Wolfe, M.S.** (2007). "Presenilin: running with scissors in the membrane." *Cell* 131(2): 215-21.

- Serrano Carballal, E.** (2003). "Sobre el papel patogénico del péptido beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer." Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Shan, X., Tashiro, H. y Lin, C.L.** (2003). "The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer's disease." *J Neurosci* 23(12): 4913-21.
- Shastry, B.S.** (2003). "Neurodegenerative disorders of protein aggregation." *Neurochem Int* 43(1): 1-7.
- Shearman, M.S., Hawtin, S.R. y Tailor, V.J.** (1995). "The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides." *J Neurochem* 65(1): 218-27.
- Sherrington, R., Rogaeve, E.I., Liang, Y., Rogaeve, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K. y et al.** (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature* 375(6534): 754-60.
- Shigematsu, K., McGeer, P.L. y McGeer, E.G.** (1992). "Localization of amyloid precursor protein in selective postsynaptic densities of rat cortical neurons." *Brain Res* 592(1-2): 353-7.
- Shin, R.W., Ogino, K., Shimabuku, A., Taki, T., Nakashima, H., Ishihara, T. y Kitamoto, T.** (2007). "Amyloid precursor protein cytoplasmic domain with phospho-Thr668 accumulates in Alzheimer's disease and its transgenic models: a role to mediate interaction of Abeta and tau." *Acta Neuropathol* 113(6): 627-36.
- Shobab, L.A., Hsiung, G.Y. y Feldman, H.H.** (2005). "Cholesterol in Alzheimer's disease." *Lancet Neurol* 4(12): 841-52.
- Shulman, R.G., Rothman, D.L., Behar, K.L. y Hyder, F.** (2004). "Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging." *Trends Neurosci* 27(8): 489-95.
- Small, D.H. y Cappai, R.** (2006). "Alois Alzheimer and Alzheimer's disease: a centennial perspective." *J Neurochem* 99(3): 708-10.
- Small, S.A. y Gandy, S.** (2006). "Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis." *Neuron* 52(1): 15-31.
- Smith, M.A., Kutty, R.K., Richey, P.L., Yan, S.D., Stern, D., Chader, G.J., Wiggert, B., Petersen, R.B. y Perry, G.** (1994). "Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease." *Am J Pathol* 145(1): 42-7.

- Smith, M.A., Nunomura, A., Zhu, X., Takeda, A. y Perry, G.** (2000). "Metabolic, metallic, and mitotic sources of oxidative stress in Alzheimer disease." *Antioxid Redox Signal* 2(3): 413-20.
- Smith, M.A., Perry, G., Richey, P.L., Sayre, L.M., Anderson, V.E., Beal, M.F. y Kowall, N.** (1996). "Oxidative damage in Alzheimer's." *Nature* 382(6587): 120-1.
- Smith, M.A., Richey Harris, P.L., Sayre, L.M., Beckman, J.S. y Perry, G.** (1997). "Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease." *J Neurosci* 17(8): 2653-7.
- Smith, M.A., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, A.K. y Perry, G.** (2000). "Oxidative stress in Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* 1502(1): 139-44.
- Sompol, P., Ittarat, W., Tangpong, J., Chen, Y., Doubinskaia, I., Batinic-Haberle, I., Abdul, H.M., Butterfield, D.A. y St Clair, D.K.** (2008). "A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury." *Neuroscience* 153(1): 120-30.
- Song, W., Patel, A., Qureshi, H.Y., Han, D., Schipper, H.M. y Paudel, H.K.** (2009). "The Parkinson disease-associated A30P mutation stabilizes alpha-synuclein against proteasomal degradation triggered by heme oxygenase-1 over-expression in human neuroblastoma cells." *J Neurochem* 110(2): 719-33.
- Stadelmann, C., Deckwerth, T.L., Srinivasan, A., Bancher, C., Bruck, W., Jellinger, K. y Lassmann, H.** (1999). "Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death." *Am J Pathol* 155(5): 1459-66.
- Stadtman, E.R.** (2002). "Importance of individuality in oxidative stress and aging." *Free Radic Biol Med* 33(5): 597-604.
- Stewart, V.C., Sharpe, M.A., Clark, J.B. y Heales, S.J.** (2000). "Astrocyte-derived nitric oxide causes both reversible and irreversible damage to the neuronal mitochondrial respiratory chain." *J Neurochem* 75(2): 694-700.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N. y Ames, B.N.** (1987). "Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance." *Science* 235(4792): 1043-6.
- Stokin, G.B., Lillo, C., Falzone, T.L., Brusch, R.G., Rockenstein, E., Mount, S.L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D.S. y Goldstein, L.S.** (2005). "Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Science* 307(5713): 1282-8.

- Su, B., Wang, X., Nunomura, A., Moreira, P.I., Lee, H.G., Perry, G., Smith, M.A. y Zhu, X. (2008). "Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease." *Curr Alzheimer Res* 5(6): 525-32.
- Su, J.H., Anderson, A.J., Cummings, B.J. y Cotman, C.W. (1994). "Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease." *Neuroreport* 5(18): 2529-33.
- Suzuki, N., Cheung, T.T., Cai, X.D., Odaka, A., Otvos, L., Jr., Eckman, C., Golde, T.E. y Younkin, S.G. (1994). "An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants." *Science* 264(5163): 1336-40.
- Suzuki, T., Araki, Y., Yamamoto, T. y Nakaya, T. (2006). "Trafficking of Alzheimer's disease-related membrane proteins and its participation in disease pathogenesis." *J Biochem* 139(6): 949-55.
- Tahirovic, I., Sofic, E., Sapcanin, A., Gavrankapetanovic, I., Bach-Rojecky, L., Salkovic-Petrisic, M., Lackovic, Z., Hoyer, S. y Riederer, P. (2007). "Brain antioxidant capacity in rat models of betacytotoxic-induced experimental sporadic Alzheimer's disease and diabetes mellitus." *J Neural Transm Suppl*(72): 235-40.
- Takahashi, M., Dore, S., Ferris, C.D., Tomita, T., Sawa, A., Wolosker, H., Borchelt, D.R., Iwatsubo, T., Kim, S.H., Thinakaran, G., Sisodia, S.S. y Snyder, S.H. (2000). "Amyloid precursor proteins inhibit heme oxygenase activity and augment neurotoxicity in Alzheimer's disease." *Neuron* 28(2): 461-73.
- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G. y Iwatsubo, T. (2003). "The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex." *Nature* 422(6930): 438-41.
- Tamagno, E., Bardini, P., Obbili, A., Vitali, A., Borghi, R., Zaccheo, D., Pronzato, M.A., Danni, O., Smith, M.A., Perry, G. y Tabaton, M. (2002). "Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons." *Neurobiol Dis* 10(3): 279-88.
- Tamagno, E., Parola, M., Bardini, P., Piccini, A., Borghi, R., Guglielmotto, M., Santoro, G., Davit, A., Danni, O., Smith, M.A., Perry, G. y Tabaton, M. (2005). "Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways." *J Neurochem* 92(3): 628-36.
- Tanabe, C., Ebina, M., Asai, M., Futai, E., Sasagawa, N., Katano, K., Fukami, H. y Ishiura, S. (2009). "1,3-Capryloyl-2-arachidonoyl glycerol activates alpha-secretase activity and suppresses Abeta40 secretion in A172 cells." *Neurosci Lett* 450(3): 324-6.

- Tanzi, R.E., Kovacs, D.M., Kim, T.W., Moir, R.D., Guenette, S.Y. y Wasco, W.** (1996). "The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease." *Neurobiol Dis* 3(3): 159-68.
- Tanzi, R.E., McClatchey, A.I., Lamperti, E.D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J.F. y Neve, R.L.** (1988). "Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease." *Nature* 331(6156): 528-30.
- Thinakaran, G. y Koo, E.H.** (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." *J Biol Chem* 283(44): 29615-9.
- Thinakaran, G. y Parent, A.T.** (2004). "Identification of the role of presenilins beyond Alzheimer's disease." *Pharmacol Res* 50(4): 411-8.
- Thornton, E., Vink, R., Blumbergs, P.C. y Van Den Heuvel, C.** (2006). "Soluble amyloid precursor protein alpha reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats." *Brain Res* 1094(1): 38-46.
- Turnbull, S., Tabner, B.J., El-Agnaf, O.M., Moore, S., Davies, Y. y Allsop, D.** (2001). "alpha-Synuclein implicated in Parkinson's disease catalyses the formation of hydrogen peroxide in vitro." *Free Radic Biol Med* 30(10): 1163-70.
- Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P. y Abraham, W.C.** (2003). "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory." *Prog Neurobiol* 70(1): 1-32.
- van Oijen, M., Hofman, A., Soares, H.D., Koudstaal, P.J. y Breteler, M.M.** (2006). "Plasma Aβ(1-40) and Aβ(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study." *Lancet Neurol* 5(8): 655-60.
- Varadarajan, S., Yatin, S., Aksenova, M. y Butterfield, D.A.** (2000). "Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity." *J Struct Biol* 130(2-3): 184-208.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiáz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. y Citron, M.** (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." *Science* 286(5440): 735-41.
- Vaya, J. y Schipper, H.M.** (2007). "Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease." *J Neurochem* 102(6): 1727-37.

- Vazquez, M.C., Vargas, L.M., Inestrosa, N.C. y Alvarez, A.R. (2009). "c-Abl modulates AICD dependent cellular responses: transcriptional induction and apoptosis." *J Cell Physiol* 220(1): 136-43.
- Vetrivel, K.S., Zhang, Y.W., Xu, H. y Thinakaran, G. (2006). "Pathological and physiological functions of presenilins." *Mol Neurodegener* 1: 4.
- Vicente Cenzano, M. (2007). "Convergencia de estrés de retículo endoplásmico y de estrés oxidativo como modelo celular de neurodegeneración." Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Vincent, S.R., Das, S. y Maines, M.D. (1994). "Brain heme oxygenase isoenzymes and nitric oxide synthase are co-localized in select neurons." *Neuroscience* 63(1): 223-31.
- Vingtdeux, V., Hamdane, M., Gompel, M., Begard, S., Drobecq, H., Ghestem, A., Grosjean, M.E., Kostanjevecki, V., Grognet, P., Vanmechelen, E., Buee, L., Delacourte, A. y Sergeant, N. (2005). "Phosphorylation of amyloid precursor carboxy-terminal fragments enhances their processing by a gamma-secretase-dependent mechanism." *Neurobiol Dis* 20(2): 625-37.
- Walter, J., Capell, A., Hung, A.Y., Langen, H., Schnolzer, M., Thinakaran, G., Sisodia, S.S., Selkoe, D.J. y Haass, C. (1997). "Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations." *J Biol Chem* 272(3): 1896-903.
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Mazur-Kolecka, B., Imaki, H., Mehta, P.D., Silverman, W.P., Reisberg, B., DeLeon, M., Wisniewski, T., Pirttilla, T., Frey, H., Lehtimaki, T., Kivimaki, T., Visser, F.E., Kamphorst, W., Potempska, A., Bolton, D., Currie, J.R. y Miller, D.L. (2007). "Intraneuronal Aβ immunoreactivity is not a predictor of brain amyloidosis-beta or neurofibrillary degeneration." *Acta Neuropathol* 113(4): 389-402.
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J.M., Masters, C.L. y Beyreuther, K. (1989). "Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein." *Cell* 57(1): 115-26.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. y Currie, A.R. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
- Xia, W., Zhang, J., Ostaszewski, B.L., Kimberly, W.T., Seubert, P., Koo, E.H., Shen, J. y Selkoe, D.J. (1998). "Presenilin 1 regulates the processing of beta-amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid beta-protein in endoplasmic reticulum and Golgi." *Biochemistry* 37(47): 16465-71.

- Xiong, K., Cai, H., Luo, X.G., Struble, R.G., Clough, R.W. y Yan, X.X. (2007). "Mitochondrial respiratory inhibition and oxidative stress elevate beta-secretase (BACE1) proteins and activity in vivo in the rat retina." *Exp Brain Res* 181(3): 435-46.
- Xu, H., Sweeney, D., Wang, R., Thinakaran, G., Lo, A.C., Sisodia, S.S., Greengard, P. y Gandy, S. (1997). "Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3748-52.
- Xu, S., Zhou, M., Yu, S., Cai, Y., Zhang, A., Ueda, K. y Chan, P. (2006). "Oxidative stress induces nuclear translocation of C-terminus of alpha-synuclein in dopaminergic cells." *Biochem Biophys Res Commun* 342(1): 330-5.
- Yang, A.J., Knauer, M., Burdick, D.A. y Glabe, C. (1995). "Intracellular A beta 1-42 aggregates stimulate the accumulation of stable, insoluble amyloidogenic fragments of the amyloid precursor protein in transfected cells." *J Biol Chem* 270(24): 14786-92.
- Yankner, B.A., Lu, T. y Loerch, P. (2008). "The aging brain." *Annu Rev Pathol* 3: 41-66.
- Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H. y Sakaki, Y. (1990). "Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene." *Gene* 87(2): 257-63.
- Yoshikawa, K., Aizawa, T. y Hayashi, Y. (1992). "Degeneration in vitro of post-mitotic neurons overexpressing the Alzheimer amyloid protein precursor." *Nature* 359(6390): 64-7.
- Zeitelhofer, M., Karra, D., Vessey, J.P., Jaskic, E., Macchi, P., Thomas, S., Riefler, J., Kiebler, M. y Dahm, R. (2009). "High-efficiency transfection of short hairpin RNAs-encoding plasmids into primary hippocampal neurons." *J Neurosci Res* 87(1): 289-300.
- Zeitelhofer, M., Vessey, J.P., Xie, Y., Tubing, F., Thomas, S., Kiebler, M. y Dahm, R. (2007). "High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection." *Nat Protoc* 2(7): 1692-704.
- Zhang, J., Mori, A., Chen, Q. y Zhao, B. (2006). "Fermented papaya preparation attenuates beta-amyloid precursor protein: beta-amyloid-mediated copper neurotoxicity in beta-amyloid precursor protein and beta-amyloid precursor protein Swedish mutation overexpressing SH-SY5Y cells." *Neuroscience* 143(1): 63-72.
- Zhang, J. y Piantadosi, C.A. (1992). "Mitochondrial oxidative stress after carbon monoxide hypoxia in the rat brain." *J Clin Invest* 90(4): 1193-9.
- Zhao, B., Chrest, F.J., Horton, W.E., Jr., Sisodia, S.S. y Kusiak, J.W. (1997). "Expression of mutant amyloid precursor proteins induces apoptosis in PC12 cells." *J Neurosci Res* 47(3): 253-63.

