

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA.**



**“EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y
CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE”**

**PRESENTADO POR:
Q.B.P JUAN ANTONIO CASTILLO GONZÁLEZ.**

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
TERMINAL EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA
GENÉTICA**

**ASESOR: DRA. VIVIANA CHANTAL ZOMOSA
SIGNORET.**

MONTERREY, N.L., ENERO 2012.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA.**



**“EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y
CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE”**

**PRESENTADO POR:
Q.B.P JUAN ANTONIO CASTILLO GONZÁLEZ.**

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con orientación terminal en
biología molecular e ingeniería genética**

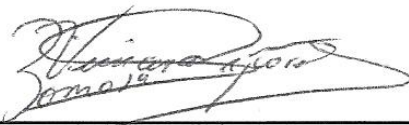
**ASESOR: DRA. VIVIANA CHANTAL ZOMOSA
SIGNORET.**

MONTERREY, N.L.

ENERO, 2012

EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y LA CITOTOXICIDAD DEL
PÉPTIDO BETA AMILOIDE.

Aprobación de la Tesis:



DRA. C. VIVIANA CHANTAL ZOMOSA SIGNORET

Directora de Tesis



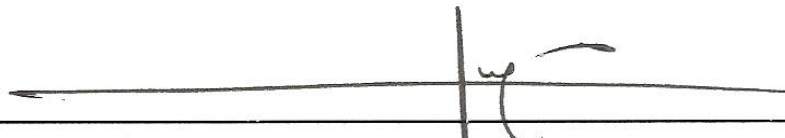
DRA. C. ANA MARÍA GUADALUPE RIVAS ESTILLA

Co-Directora de Tesis



DRA. C. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

Co-Directora de Tesis



Dr. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo fue llevado a cabo en los laboratorios de Terapia Celular, Infectología Molecular y Biología Estructural del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, así como en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Morfología e Histología de la Facultad de Medicina, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, N.L. Bajo la dirección de la Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret y la Co-Dirección de la Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estilla y la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez.

Vo.Bo.

DRA. VIVIANA CHANTAL ZOMOSA SIGNORET.

Director de Tesis.

*Across the bridge of colors born
Of fire water and air
Dressed in crimson amours
In hand are blood wet spears
Reach the entrance heaven's gate
Honored by the brave
See the hall with golden roof
The home All father gave*

*Great Odin we hail him
Come in, enjoy the glorious afterlife, my friend
Here we fill the ranks of Tyr
Battle is our way
Every morning day and night till the winter fiercest come*

***Cattle die
All men are mortal
But word-fame never dies
Nor a noble name
Kinsmen die
All men are mortal
But one thing never dies
The glory of the great dead***

*Enough of tears, enough of wail!
Not to lament in was Valhalla made
The wind as fresh as the air is clear
The greatest of men are here
All einherjer in Odin's court
Fare to fight each day
Select the slain, then leave the battle
Sit after at peace in the hall.*

*Welcome to the hall of death
Great Odin we hail him
Come in, enjoy the glorious afterlife, my friend
Here we fill the ranks of Tyr
Battle is our way
Every morning day and night till the winter fiercest come*

***Cattle die
All men are mortal
But word-fame never dies
Nor a noble name
Kinsmen die
All men are mortal
But one thing never dies
The glory of the great dead***



AGRADECIMIENTOS

Al TODO PADRE por permitirme acabar otra etapa de la vida y darme muchas lecciones a lo largo de estos 2 años y medio. Esperando que todo lo que hice y haga ahora en adelante me permita ser digno de sus bendiciones y sabiduría.

A mi Familia por haberme apoyado incondicionalmente.

A las Dras. Viviana Chantal Zomosa Signoret, Ana María Guadalupe Rivas Estilla y Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez por su apoyo y dirección durante el desarrollo de esta tesis.

A los Dres. Julio Sepúlveda Saavedra, Adolfo Soto Domínguez, María de Jesús Loera Arias y al M.C Viktor J. Romero Díaz del Departamento de Histología por su incondicional apoyo a lo largo del desarrollo de la tesis como así sus invaluable consejos.

A la Dra. Diana Reséndez Pérez por haberme permitido trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Román Vidaltamayo Ramírez por su asesoría en el área de microscopía y cultivo celular.

A la Dra. Dolores Carmen Esquivel Escobedo por haberme apoyado tanto en equipo como en reactivos que fui necesitando a lo largo del desarrollo de la tesis.

A los Dr. Jorge Ángel I. Ascacio Martínez y Dr. Carlos Hernández Luna por haberme apoyado incondicionalmente en lo que respecta al área de purificación y manejo de proteínas.

Al Dr. Gerardo Raymundo Padilla Silva por haberme asesorado en el área de estadística.

A la M.C. Elsa Nancy Garza Treviño por su invaluable apoyo y asesoría durante mi estadía en el laboratorio de la Dra. Herminia, como en el desarrollo del objetivo de cultivo celular, así como el manejo de los resultados obtenidos de esta técnica.

A los M.C Antonio Alí Perez Maya y M.C Alí Francisco Citalán Madrid por su apoyo y amistad durante todo este tiempo.

A mi gran amiga la Dra. Paola Mendoza Espinosa, por sus consejos y palabras de aliento en los momentos de flaqueza.

Al Biol. Salomé Elizondo por su apoyo y amistad.

A mis amigas las Q.B.P Wendy Lilian Zenteno, Silvia Elena Narváez, Martha Sofía Rodríguez Gzz y la Q.F.B Lizbeth Moreno Reyes por sus consejos, amistad y palabras de apoyo.

Al personal de Infectología y Terapia Génica por su apoyo técnico.

Y por último y no por ello menos importantes, a las secretarias Juany Hinojosa, Ariadna López, Lourdes Mendoza, Norma Elena Estrella e Irazema Aguirre, a los Ing. Ammir Breton y Daniel Rodríguez Flores. Por su amistad, consejos, apoyo incondicional y por todos los momentos que pasamos juntos. Pero sobre todo a mis “gordas” consentidas Juany, Ariadna y Lulú.

DEDICATORIA

Al TODO PADRE por haberme permitido continuar con una etapa más de mi vida y por darme el mejor “defecto” del mundo, la terquedad, ese defecto que te hace seguir adelante sin importar las consecuencias.

A mi familia que ha estado siempre a mi lado, apoyándome en todos los sentidos de la palabra y más allá, por que han estado ahí cuando más lo he necesitado sin pedir nada a cambio y quienes me han dado algo de ellos mismo: mi Madre la perseverancia para no rendirme ante la adversidad, mi Padre la fortaleza para seguir adelante y de mi hermano el ingenio y la tenacidad para buscar más allá. Por eso dedico esta obra a ellos, ya que existe algo que nunca se puede romper y eso, son los lazos de sangre que unen a la familia.

***“FAMILIA TE DIRECTIONEM IPSIUS ITINERIS TUI IUVAT
INVENIRE”.***

"La familia te ayuda a encontrar la dirección de tu propio camino".

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPÍTULO.	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN.	1
1.1.- Importancia de la enfermedad de Alzheimer.	1
1.2.-Aspectos bioquímicos del péptido A β .	2
1.3.-Oligomerización de los péptidos A β y la formación de especies tóxicas en la enfermedad del Alzheimer.	6
1.4.- Vías de señalización en la enfermedad de Alzheimer.	10
1.5.-Importancia de iones metálicos en enfermedades neurodegenerativas.	13
1.6.-Cobre.	13
1.7.-Cobre y su papel durante la sinapsis.	14
1.8.-Cambios en la homeostasis y metalobiología del ion cobre en la enfermedad de Alzheimer.	15
1.9.- Papel de los iones Cu ²⁺ en la agregación del A β y en la agregación de péptidos truncados.	21
1.10.- Coordinación del ion Cu ²⁺ y Cu ⁺ en el péptido A β	26
1.11.-Papel de la Metionina 35 en la toxicidad del A β .	29
II.JUSTIFICACIÓN E HIPOTESIS.	34
III. OBJETIVOS.	35
3.1. Objetivo general.	35
3.2. Objetivos específicos.	35

IV. MATERIALES	36
4.1. Material biológico	
4.1.1. Línea celular C-6 Glioblastoma de rata Wistar (<i>Rattus norvegicus albinus</i>).	36
4.2. Material	
4.2.1. Materiales para preparar péptido A β (1-40), A β (1-40) Met35Cys y A β (25-35), así como para el proceso de agregación.	36
4.2.2. Materiales para microscopía de fluorescencia de Tioflavina T (ThT) y de luz polarizada y fluorescencia de Rojo Congo (RC).	36
4.2.3. Materiales para cultivo y recuento celular.	37
4.3. Reactivos.	37
4.3.1. Reactivos de uso general.	37
4.3.2. Reactivos para preparar péptido A β (1-40), A β (1-40) Met35Cys y A β (25-35) así como para su proceso de agregación.	37
4.3.3. Reactivos para microscopía de fluorescencia de ThT y de luz polarizada y fluorescencia de Rojo Congo.	37
4.3.4. Reactivos para cultivo y viabilidad celular.	38
4.3.5. Reactivos para geles de acrilamida.	38
4.4. Equipos.	39
4.4.1. Equipos de uso general.	39
4.4.2. Equipos para preparar péptido A β (1-40) , A β (1-40) Met35Cys y A β (25-35) como para su proceso de agregación.	39
4.4.3. Equipos para microscopía de fluorescencia de ThT y de luz polarizada y fluorescencia de Rojo Congo.	39
4.4.4. Equipos para cultivo y viabilidad celular.	40
4.4.5. Equipos para geles de Tricina-SDS-PAGE.	40
4.5. Software	40

V. MÉTODOS	41
5.1. Preparación de los péptidos Beta amiloide.	41
5.2. Microscopía de birrefringencia de Rojo Congo (RC) mediante luz polarizada.	43
5.3. Microscopía de fluorescencia de Tioflavina T (ThT) y RC (RCF).	44
5.4. Geles de Tricina SDS –PAGE.	45
5.5. Ensayos de viabilidad celular.	47
VI. RESULTADOS	50
6.1. Microscopía de luz polarizada por birefringencia de RC.	53
6.2. Microscopía de fluorescencia de Tioflavina T (ThT) y RC (FCR).	53
6.3. Geles de Tricina-SDS-PAGE.	59
6.4. Citotoxicidad de de los péptidos A β sobre la línea celular C-6 Glioblastoma de rata Wistar (<i>Rattus norvegicus albinus</i>).	62
VII.DISCUSIÓN.	67
VIII.CONCLUSIONES.	72
IX.BIBLIOGRAFÍA.	73
X.ANEXOS	90

RESUMEN

“EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE”

Nombre: Q.B.P Juan Antonio Castillo González.

Institución: Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Localización: Monterrey, Nuevo León.

Fecha de titulación: Enero 2012.

Páginas en el estudio: 109.

Introducción: La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo, que representa un factor desgastante tanto a nivel socioeconómico como financiero, ya que está relacionada con el envejecimiento. Esta afección, se caracteriza por la presencia de placas compuestas de fibras del péptido Beta amiloide (A β) (placas beta amiloides o seniles) en el hipocampo, una estructura en el cerebro que ayuda a codificar los recuerdos, y en otras áreas de la corteza cerebral necesarias para pensar y para la toma de decisiones. Un hecho relevante en la patología de la EA es la capacidad del péptido A β de agregarse desde monómeros con estructuras del tipo “espiral aleatorio” a oligómeros, y finalmente, a fibras amiloides ricas en estructuras del tipo lámina beta que conforman a las placas amiloides, siendo las primeras citotóxicas tanto *in vitro* como *in vivo*. Durante mucho tiempo, se consideraron a las fibras amiloides como las responsables de la patología de la EA, pero actualmente, se ha postulado, que los intermediarios de agregación y/o oligómeros son los efectores de la patología de la EA. Por lo cual, resulta de gran interés en el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento de la EA el proceso de formación de oligómeros del péptido A β , así como el conocer los factores relevantes para esto. Uno de estos factores es el daño oxidativo provocado por el péptido A β que resulta de la oxidación de la Metionina 35; sobre todo la formación del metóxido de Metionina 35 (Met(O) 35) y la reducción de iones metálicos de transición, tales como el ion Cu²⁺, debido a que ambos poseen la capacidad tanto de favorecer como de inhibir la agregación del péptido A β , así como de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) citotóxicas.

Objetivo: Determinar si la relación del aminoácido metionina 35 del péptido A β con los iones de cobre está involucrada en el proceso de agregación y elucidar la estructura funcional de algunos intermediarios.

Material y métodos: Se prepararon los péptidos A β (1-40) silvestre, A β (25-35) y A β (1-40)(Met35Cys), incubándose en presencia y ausencia del ion Cu²⁺ en períodos de 0,12, 24, 48 y 72 horas para observar la presencia de agregados mediante el uso de microscopía de birrefringencia de Rojo Congo, Fluorescencia de ThT y Rojo Congo. Se determinaron los pesos moleculares de los oligómeros por medio del uso de geles de Tricina-SDS-PAGE y se evaluaron sus efectos citotóxicos sobre la línea celular C-6 de Glioblastoma de rata.

Resultados: Analizando los datos obtenidos se observan resultados positivos en lo que respecta a la presencia de fibras amiloides por parte de los diferentes péptidos A β utilizando las técnicas de microscopía. En los geles de Tricina-SDS-PAGE, no se observó ningún tipo de agregado por parte del péptido A β (25-35), mientras que los péptidos A β (1-40) silvestre y mutante en presencia y ausencia de ion Cu²⁺, mostraron monómeros con un peso molecular de 4.5kDa; el péptido A β (1-40) mostró un agregado cuyo peso molecular no se pudo determinar debido a que por su alto peso molecular no pudo migrar al gel. En cultivo celular, se encontró que el A β (1-40) silvestre a 24 horas de incubación y en presencia del ion Cu²⁺ es el que posee un marcado efecto citotóxico sobre las células C-6 de Glioblastoma de rata, mientras que su mutante muestra un incremento en el número de células.

Conclusión: La presencia de la Metionina 35 así como la del ion Cu²⁺, juegan un papel primordial en el proceso de agregación y citotoxicidad del péptido A β .

Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret.
Firma de asesor.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	CONTENIDO	PÁGINA
1	Etapas y manifestaciones de la enfermedad de Alzheimer.	2
2	Acumulación y mecanismo patológico del péptido A β durante la sinapsis. Mecanismo patológico de la proteína Tau, placas amiloides compuestas de fibrillas insolubles de péptido (A β) y ovillos neurofibrilares compuestos de proteína Tau híperfosforilada.	3
3	Procesamiento de la proteína precursora del péptido beta amiloide (APP) para dar paso a la formación de placas amiloides compuestas por fibras del péptido beta amiloide (A β).	5
4	Los oligómeros del péptido A β son la clave neurotóxica de la enfermedad de Alzheimer.	9
5	Vías de señalización en la enfermedad de Alzheimer.	12
6	Modelos de la interacción del ion cúprico en la sinapsis glutamatérgica tanto normal como en la EA.	18
7	Mecanismo propuesto para la formación de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) a partir de dímeros de péptido A β .	19
8	Modelo la metalobiología de la EA.	19
9	Modelos conceptuales del papel del ion Cu ²⁺ en la inducción de la agregación mediada por metales.	23
10	Esquemas de los modelos de agregación de los péptidos mediante la formación de puentes de hidrógeno-láminas β y la presencia o ausencia del ion Cu ²⁺ .	25
11	Modelos propuestos de coordinación del ion Cu ²⁺ en el péptido A β .	27
12	Secuencia del péptido A β (1-42).	28
13	Mecanismo redox de la Met35, así como su posición en el A β .	29
14	Diagrama que muestra los mecanismos propuestos para llevar a cabo la reducción del ion Cu ²⁺ por parte del aminoácido Met35; mecanismos relacionados con la formación de ROS.	31
15	Productos de la peroxidación de lípidos de naturaleza neurotóxica mediada por la Met35.	32
16	Estrategia general de proyecto.	41
17	Controles de la técnica microscopía de birrefringencia de RC por luz polarizada.	50
18	Cinética de agregación de los péptidos A β (25-35), A β (1-40) silvestre y mutante monitoreada en ausencia del ion Cu ²⁺ mediante la técnica de microscopía de birrefringencia de RC por luz polarizada.	51
19	Cinética de agregación de los péptidos A β (25-35), A β (1-40) silvestre y mutante monitoreada en presencia del ion Cu ²⁺ mediante la técnica de microscopía de birrefringencia de RC por luz polarizada.	52
20	Controles para la prueba de la ThT y la FRC.	53
21	Cinéticas de agregación del péptido A β (25-35), A β (1-40)	54

	silvestre y mutante en ausencia y presencia del ion Cu^{2+} monitoreada por la prueba de la ThT y FCR.	
22	Gel de acrilamida de los diferentes péptidos $\text{A}\beta$ a 0 horas, en presencia y ausencia del ion Cu^{2+} .	59
23	Gel de acrilamida de los diferentes péptidos $\text{A}\beta$ agregados a 24 horas, en presencia y ausencia del ion Cu^{2+} .	60
24	Gel de acrilamida de los diferentes péptidos $\text{A}\beta$ agregados a 48 horas, en presencia y ausencia del ion Cu^{2+} .	60
25	Gel de acrilamida de los diferentes péptidos $\text{A}\beta$ agregados a 72 horas, en presencia y ausencia del ion Cu^{2+} .	61
26	Efecto citopático de los diferentes péptidos $\text{A}\beta$ a una concentración de 10 μM en presencia y ausencia del ion Cu^{2+} a una concentración de 20 μM , agregados a 0 y 24 horas sobre la línea celular C-6 de Glioblastoma de rata.	62

LISTA DE TABLAS

TABLA	CONTENIDO	PÁGINA
1	Ensamblados no fibrilares del péptido A β solubles en agua.	8
2	Tabla comparativa de las diferentes técnicas para la cinética de agregación del péptido A β (25-35).	57
3	Tabla comparativa de las diferentes técnicas para la cinética de agregación del péptido A β (1-40) silvestre.	57
4	Tabla comparativa de las diferentes técnicas para la cinética de agregación del péptido A β (1-40) mutante (Met35Cys).	58
5	Diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados sobre la línea celular C-6 de Glioblastoma de rata, usando la prueba <i>t</i> -Student para variables independientes.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados.
µg	Microgramos.
µl	Microlitros.
µm	Micras.
µM	Micromolar.
Å	Amstrongs.
Abs	Absorbancia.
ADDL	Ligando difusible derivados del péptido Aβ.
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica.
AGE	Productos avanzados de glicación.
ALE	Productos avanzados de lipoperoxidación
Apo-Aβ	Asociaciones de péptido Aβ no dependientes de metales.
APP	Proteína Precursora del péptido Beta Amiloide.
Aβ	Péptido Beta amiloide.
Aβ-Met-Ox	Péptido Aβ con metionina oxidada.
BSA	Albúmina Sérica Bovina.
CC	Campo claro.
CHO	Células de ovario de hámster chino (<i>Cricetulus griseus</i>).
CO ₂	Dióxido de carbono.
CSS-1	Chaperonas de la superóxido dismutasa 1.
Ctr	Proteínas de transporte de cobre.
Cu ⁺	Ion cuproso.
Cu ²⁺	Ion cúprico.
DMEM	Medio basal de Eagle modificado de Dulbecco.
DS	Desviación estándar.
EA	Enfermedad del Alzheimer
EPR	Resonancia paramagnética de electrón.
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular.
FBS	Suero Fetal Bovino.
FCR	Flourescencia por Rojo Congo.
GBM	Glioblastoma multiforme.
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno.
HNE	4-hidroxinonenal.
HO.	Radicales hidroxilo.
IDE	Enzima degradadora de insulina.

IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1.
IL-6	Interleucina 6.
JNK	Cinasa N-terminal de c-Jun.
kDa	Kilodaltones.
LCR	Líquido cefalorraquídeo.
LDL	Lipoproteína de baja densidad.
LP	Luz polarizada.
LTP	Potenciación a largo plazo.
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno.
MCI	Deterioro cognitivo leve.
Met(O) 35	Metóxido de metionina.
mg	Miligramo.
MT3	Metalotioneinas.
NaOH	Hidróxido de Sodio.
NFT	Ovillos neurofibrilares
NMDA	Acido-N-metil-D-aspártico.
NMDAr	Receptor del ácido-N-metil-D-aspártico.
NMR	Resonancia Magnética Nuclear.
PIK3	Fosfoinositol 3-cinasa.
PSA	Persulfato de Amonio.
RAGE	Receptor de productos avanzados de glicación.
RC	Rojo Congo.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SEC	Cromatografía de exclusión molecular.
SOD 1	Superóxido dismutasa 1
SPSS	Paquete estadístico para las ciencias sociales.
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina.
ThT	Tioflavina T.
XANES	Absorción de rayos-X cerca del borde de estructura.
XAS	Espectroscopia de Rayos X.



Capítulo I.

INTRODUCCION.

1.1.- IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

La enfermedad de Alzheimer (**EA**) es un desorden neurodegenerativo progresivo que afecta actualmente a 37 millones de personas alrededor del mundo, con un costo global de \$600 billones de dólares (2010) (**1-2**). Representando un factor desgastante tanto a nivel socioeconómico como financiero, ya que está relacionada con el envejecimiento (1 de cada 3 personas que superan los 80 años sufren de la EA) (**3**).

Un ejemplo de esto, es en los Estados Unidos de Norte América, donde la EA es la mayor causa de muerte y su tendencia aumenta, mientras que en México existe un estimado de 600,000 personas que padecen de la enfermedad de Alzheimer (**4-5**). Esta enfermedad empieza de manera lenta, sus síntomas iniciales mas comunes comprenden desde confusión, pérdida de memoria a corto plazo, hasta cambios de humor que suelen pasar desapercibidos. Debido al progreso inevitable de esta enfermedad, los síntomas van empeorando, haciéndose eventualmente evidente la pérdida total de las funciones ejecutivas (**6**).

Esta afección, se caracteriza por la presencia de placas compuestas de péptido Beta amiloide ($A\beta$) (placas beta amiloides o seniles) en el hipocampo, la cual es una zona en el cerebro que ayuda a codificar los recuerdos, y en otras áreas de la corteza cerebral necesarias para pensar y la toma de decisiones. Todavía se desconoce si las placas beta amiloides causan la enfermedad de Alzheimer o si son un subproducto del proceso de la enfermedad, es por esta razón que existen múltiples líneas de investigación acerca de la naturaleza del péptido Beta amiloide (**7,8**).



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.






Etapa de la Enfermedad de Alzheimer.	Síntomas.	Área de daño.
Temprana.	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de memoria leve. • Confusión sobre la localización de lugares familiares. • Pérdida leve del juicio. • Pérdida de iniciativa • Cambios de humor. 	<p style="text-align: center;">Cerebro Sano</p>  <p style="text-align: right;">Corteza Cerebral Hipocampo</p>
Moderada.	<ul style="list-style-type: none"> • Incremento en la pérdida de memoria. • Pérdida de atención. • Agresividad. • Problemas en reconocer a conocidos y familiares. • Dificultad en aprender cosas nuevas • Problemas en el lenguaje, escritura 	<p style="text-align: center;">Enfermedad Alzheimer moderada</p>  <p style="text-align: right;">Disminución Cortical Ventriculos aumentados moderadamente Encogimiento del hipocampo</p>
Severa.	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de peso. • Afecciones cutáneas. • Dificultad en deglutir. • Estado vegetativo. 	<p style="text-align: center;">Enfermedad Alzheimer Severa</p>  <p style="text-align: right;">Disminución Cortical Severa Ventriculos aumentados Severamente Severo encogimiento del hipocampo</p>

Figura.1.- Etapas y manifestaciones de la enfermedad de Alzheimer (6 y 7). (Adaptado de Netter y National Institute of Aging).

1.2.- ASPECTOS BIOQUÍMICOS DEL PÉPTIDO A β .

La presencia de ovillos neurofibrilares intracelulares (**NFT**) y placas amiloides extracelulares (placas seniles) en el cerebro de pacientes, son las características post mortem más comunes de la EA. Los ovillos consisten en proteína Tau hiperfosforilada (**9**), mientras que las placas seniles están compuestas principalmente por fibrillas insolubles formadas por agregados del péptido beta amiloide (**A β**); un producto proteolítico de la proteína precursora del péptido A β (APP) (**10-11**).



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.

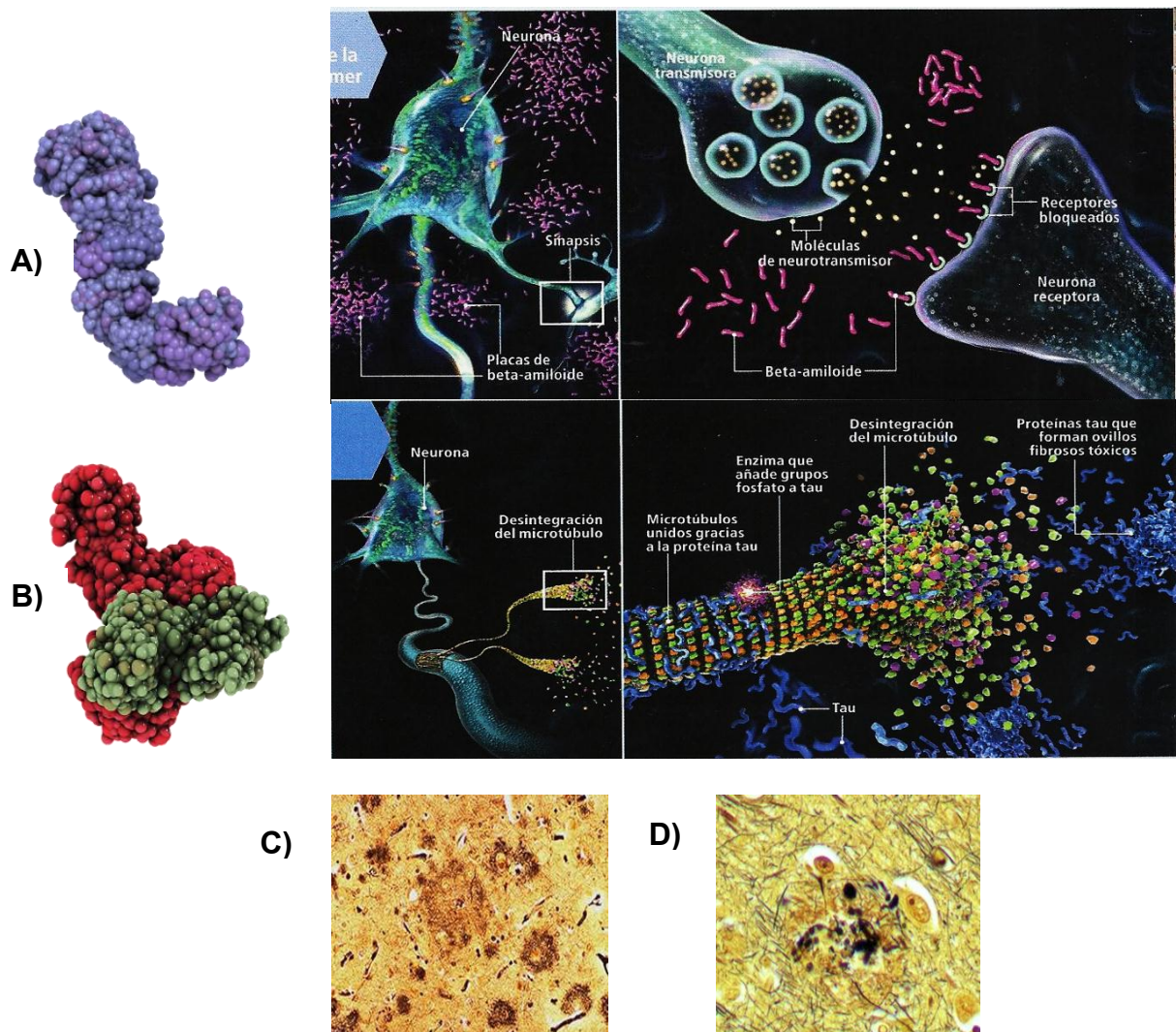


Figura 2.- A).- Acumulación y mecanismo patológico del péptido Aβ durante la sinapsis. **B).-** Mecanismo patológico de la proteína Tau. **C)** Placas amiloides compuestas de fibrillas insolubles de péptido Aβ. **D)** Ovillos neurofibrilares compuestos de proteína Tau hiperfosforilada (14) (Imagen modificada de Stix, 2010).

Esta proteína pertenece a la familia de proteínas conservadas de membrana del tipo 1, expresada extensamente tanto en células neuronales como no neuronales. La función fisiológica de esta proteína aún se mantiene desconocida (12). Se ha sugerido que esta proteína juega un papel importante en la regulación de la supervivencia neuronal, crecimiento de neuronas, plasticidad sináptica y adhesión celular (13). La liberación del péptido Aβ a partir de la proteína APP requiere la



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



acción de 2 aspartil-proteasas llamadas β y γ secretasas que actúan en secuencia, acorde a los procesos regulados de proteólisis intramembranal. La APP es recortada en su dominio extracelular por la β secretasa. El fragmento carboxilo asociado a membrana es procesado por el complejo de la γ secretasa y es entonces cuando el péptido A β es liberado al espacio extracelular (14-18). Por otra parte, el sitio de corte de la γ secretasa es ligeramente variable, dando como resultado péptidos A β cuyos tamaños difieren, abarcando de 38 a 42 aminoácidos, siendo las formas más abundantes los péptidos A β (1-40) y A β (1-42), respectivamente.

El péptido A β (1-40) predomina en fluidos biológicos mientras que el péptido A β (1-42) constituye menos del 10% de las placas seniles (19). Aunque existen múltiples investigaciones que confirman el papel central de los péptidos A β en la patogénesis de la EA, su mecanismo tóxico sigue siendo desconocido. Es sorprendente el hecho de que los péptidos A β son producidos de manera constante a lo largo de la vida, y que estos circulen en fluidos extracelulares, incluyendo líquido cefalorraquídeo (LCR) y plasma sanguíneo (20-22).

Se ha observado, que diferentes factores como la capacidad de auto-asociación del péptido A β juegan un papel relevante en la capacidad tóxica de este péptido (23-25). La formación de placas que contienen fibrillas amiloides maduras, y la agregación del péptido A β son consideradas como las causas más probables de la patogénesis de la EA, acorde a la hipótesis de la cascada amiloide (26-27). Se considera que en los cerebros sanos, el péptido A β está presente como un monómero soluble no tóxico (20).

Sin embargo, esta hipótesis es incapaz de explicar el hecho de que muchas personas, principalmente ancianos, quienes no habían demostrado síntomas ante-mortem de demencia, poseen cantidades sustanciales de placas amiloides en áreas límbicas de sus cerebros, dato que ha sido demostrado mediante exámenes post-mortem (28-30). Mientras que en pacientes con la EA existe poca



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



correlación entre la densidad de las placas, y el grado de deterioro de la función cognitiva. También se ha demostrado en modelos animales, que daños estructurales, así como la pérdida de funciones por parte de las neuronas, son los responsables del deterioro de la memoria y del declive cognitivo precedido por la formación de placas extracelulares. Por lo cual, se puede observar una asociación de las formas del péptido A β solubles con las membranas neuronales, ésta es considerada como la mayor ruta de la neurotoxicidad del péptido A β (31).

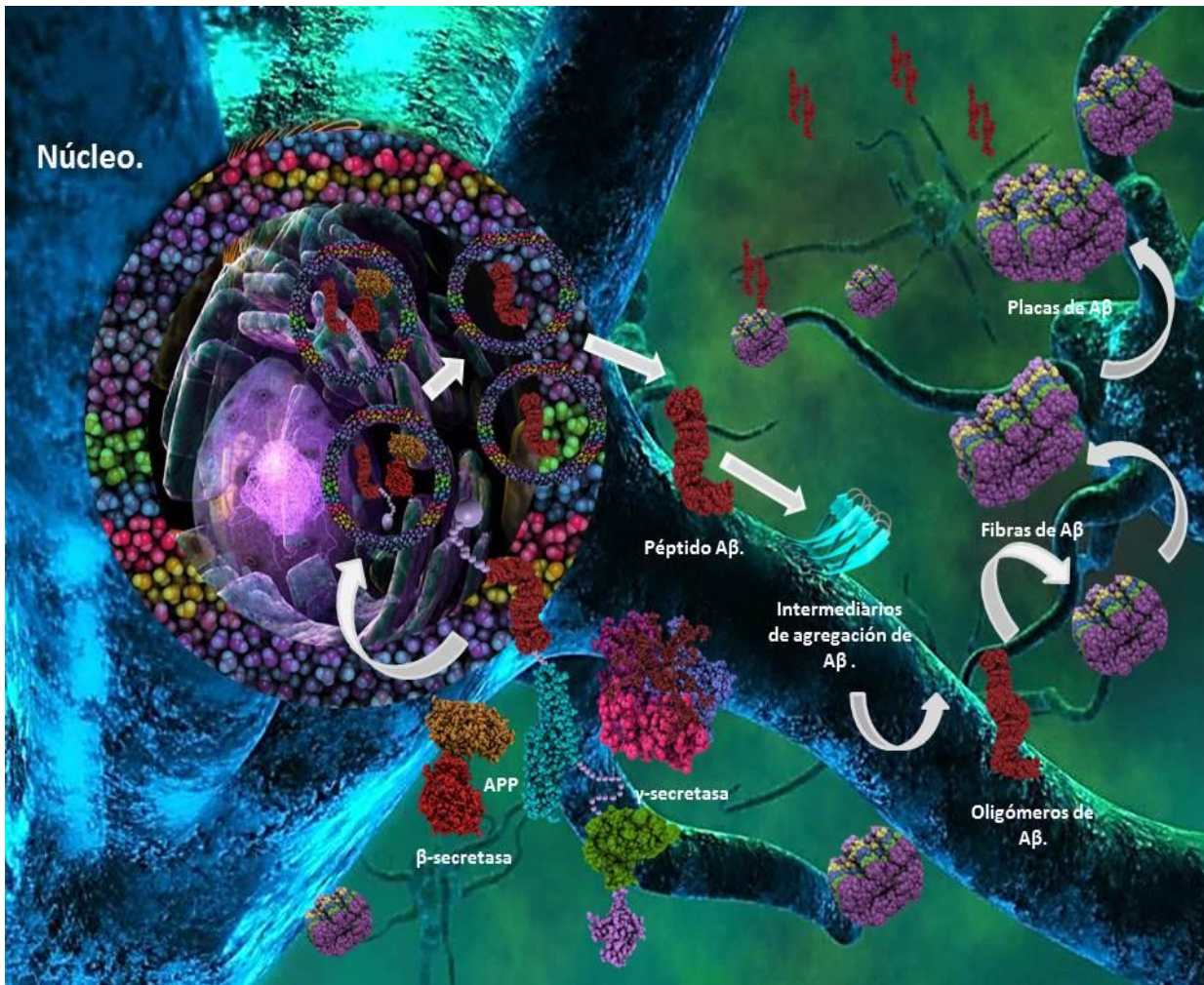


Figura 3.- Procesamiento de la proteína precursora del péptido beta amiloide (APP) para dar paso a la formación de placas amiloides compuestas por fibras del péptido beta amiloide (A β) (32) (Imagen modificada de Sanders, 2011).



1.3.- OLIGOMERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS A β Y LA FORMACIÓN DE ESPECIES TÓXICAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Los amiloides insolubles no son los únicos productos de la agregación del péptido A β . Aparte de las fibrillas, el péptido se convierte fácilmente en diversos estados oligoméricos, siendo estos los candidatos más confiables para inducir los síntomas tempranos de la EA, así como el deterioro de la transmisión neuronal (33-34). Se ha reportado la presencia en cerebros humanos de oligómeros del péptido A β de pesos moleculares bajos que son estables ante el efecto del dodecilsulfato sódico (SDS). Mediante ensayos de Western Blot, se han detectado dímeros y trímeros de péptido A β ; ambos en muestras del núcleo de la placa amiloide y en fracciones solubles provenientes de la corteza cerebral (35-38).

Se ha demostrado la presencia de dímeros de péptido A β en el líquido cefalorraquídeo humano (39-40); así como dímeros y trímeros resistentes a SDS, aislados de cultivos celulares de células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan el gen del APP humano (41-42). Por otra parte, se han detectado por medio de Western Blot, hexámeros, nonámeros y dodecámeros del péptido A β (1-42) en extractos extracelulares enriquecidos, provenientes de cerebros de ratones Tg2676, expresando la proteína APP humana que son solubles y resistentes al SDS; así como especies de 56 kDa que coinciden con el desarrollo de los primeros síntomas de déficit de memoria en estos ratones (43).

Es por esta razón, que se ha buscado determinar la capacidad de las diferentes formas del péptido A β para inducir los diferentes síntomas de la EA, mediante el estudio de su capacidad de inhibir la potenciación a largo plazo (LTP). La LTP es un proceso basado en una intensificación duradera en la transmisión de señales entre dos neuronas, que resulta de la estimulación sincrónica de ambas, y es considerada como uno de los principales mecanismos celulares en que subyace al aprendizaje y la memoria, ya que a nivel celular, estimula la transmisión sináptica



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



(44). La inhibición de este proceso neuronal por parte del péptido es una de las manifestaciones tempranas de esta enfermedad (45-46).

Para lograrlo, se han realizado experimentos, basados en el uso de microinyecciones de fracciones del péptido A β en ventrículos laterales de cerebros de ratas. Observándose la inhibición de la LTP bajo los efectos de oligómeros del péptido, a diferencia de monómeros o fibrillas que son incapaces de llevar a cabo dicha inhibición. Simultáneamente, se han observado los mismos efectos en cultivos de neuronas crecidas en presencia de cantidades subnanomolares de oligómeros naturales de péptido A β .

Aparentemente, el responsable del efecto inhibitorio sobre la LTP es un trímero del péptido A β obtenido por medio del uso de cromatografía de exclusión molecular. Se han reportado también otros tipos de oligómeros del péptido A β , tales como esferoides, péptidos A β unidos por puentes disulfuro, oligómeros pequeños resistentes a SDS obtenidos de cultivos celulares, y dímeros del péptido A β estables a SDS aislados del cerebro. Lo cual sugiere, que los oligómeros son la causa principal de la acción neurotóxica del A β en la EA (47-51).

Siendo sus actividades biológicas y características físicas reportadas en la **Tabla 1**.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Nombre	Características físicas	Actividad biológica.
Protofibrillas.	Ricas en láminas beta, estructuras curvilíneas de 5 a 200nm de longitud. Bajo ciertas circunstancias pueden formar estructuras anulares.	Alteran la capacidad neuronal, bloquean <i>in vitro</i> la LTP, causan pérdida de memoria y fomentan la fosforilación de Tau.
ADDL. (Ligandos difusibles derivados del péptido A β).	Mezcla heterogénea de monómeros de alto peso molecular, los cuales tienden a parecerse a pequeñas protofibrillas.	Bloquean <i>in vitro</i> la LTP, pérdida de la sinapsis y alta tasa de muerte neuronal.
Globulómeros.	Formados en presencia de SDS o ácidos grasos, ricos en láminas beta. Por medio de AFM aparecen como esferas de 1-5 nm y al ser eluidas por SEC presentan un peso molecular de una proteína globular (100 kDa)	Se unen a las neuronas del hipocampo, inhiben la LTP <i>in vitro</i> y bloquean los flujos de P/Q Ca ²⁺ .
Esferoides.	Estructuras esféricas de 3-20 nm de diámetro que co-migran en gradientes de glicerol con tiro globulina (669 kDa). Estructuras similares han sido aisladas de cerebro humano por métodos inmunológicos.	Inducen activación de GSK-3 β y muerte celular en cultivos celulares de neuronas.
Péptidos Aβ unidos por puentes disulfuro.	Dímeros del péptido A β unidos por cisteína que carecen de estructura secundaria significativa y que presentan un comportamiento como verdadero dímero en SEC y ultra centrifugación analítica.	Bloquean la LTP <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , causan pérdida de memoria en comportamientos aprendidos.
Oligómeros pequeños resistentes a SDS derivados de células.	Presentes en medio de células CHO que expresan APP humano y los cuales migran en SDS-PAGE y SEC con pesos moleculares propios de dímeros y trímeros.	Similar al anterior.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Aβ56* (Dodecámeros).	Especie inmunorreactiva de péptido A β aislado de cerebros de ratones transgénicos que expresan APP en la presencia de 0.01% de NP-40	Causa pérdida de la memoria espacial.
Dímeros de Aβ estables a SDS aislados del cerebro.	Aislados de cerebros humanos por medio del uso de la centrifugación de alta velocidad y el uso de buffers. Especies que migran en SDS-PAGE como dímeros, pero al ser eluidos en SEC se presentan como verdaderos dímeros y especies de alto peso molecular.	Bloquea la LTP <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> y causa pérdida de la memoria de comportamientos aprendidos.

Tabla 1.- Ensamblados del péptido A β no fibrilares solubles en agua (51).

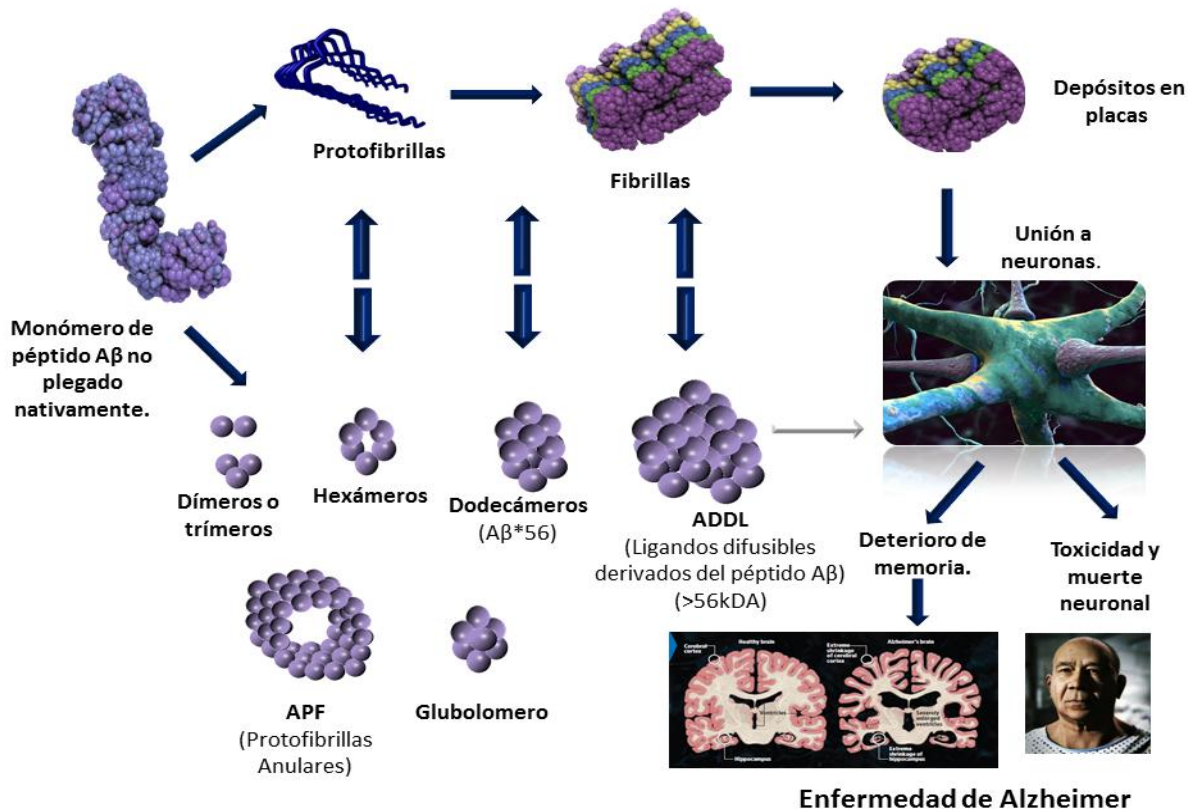


Figura 4.- Los oligómeros del péptido A β son la clave neurotóxica de la enfermedad de Alzheimer (52). (Imagen modificada de Rushworth *et al*, 2011).



1.4.- VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Se ha observado, que en cultivos primarios de neuronas, oligómeros de péptido A β y ligandos difusibles derivados del péptido A β (**ADDL**) (véase **Tabla1**) se unen a las membranas celulares e inducen la muerte celular por medio de la activación de las vías de la apoptosis por medio de caspasas y calpainas (**53-54**). Siendo la caspasa 7 y 8 las que se encuentran en altos niveles en pacientes con la EA, existiendo una estrecha relación entre estas caspasas y el péptido A β (1-42) durante la EA (**54-58**). Aparte, la activación de la caspasa 6 está asociada con las placas amiloides, las NFT y el deterioro cognitivo leve (**MCI**) (**59**).

Por el contrario, las fibras del péptido A β inducen aparentemente una forma de distrofia crónica neuronal así como la muerte neuronal. También se ha asociado la toxicidad del péptido A β a efectos pro-oxidantes, que pueden ser mediados en parte gracias al receptor de productos avanzados de glucosilación (**RAGE**) (**60-61**). Así mismo, se han sugerido otros mecanismos moleculares afectados por el péptido A β que resultan en la inducción de la muerte neuronal tales como:

1. La señalización de la insulina / Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) así como la homeostasis del calcio (**62-63**).
2. La activación aberrante del reinicio del ciclo celular de las neuronas, observado tanto en cultivos neuronales tratados con el péptido A β y en la EA (**64-65**).
3. La unión del péptido A β al receptor limpiador (scavenger) CD36, que inicia su vía de señalización a través de la activación de Lyn, Fynn y p44/42 MAP cinasa (miembros de la familia Src cinasas), llevando a cabo la formación de especies reactivas de oxígeno (**ROS**). Esta vía al ser alterada, evita la formación de ROS, así como la liberación de citocinas inflamatorias. (**66-68**).



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



4. La respuesta inflamatoria de la microglía; ya que existe una relación estrecha entre el péptido A β con la activación de la microglía en la EA y en ratones transgénicos APP. Debido a que las fibras del péptido A β se unen a los receptores limpiadores (scavenger) A y B en la microglía, activando una respuesta inflamatoria que se caracteriza por la liberación de ROS y de citocinas (**66-68**).

5. Siendo la activación de la microglía uno de los mecanismos responsables de la eliminación del péptido A β . Sin embargo, se ha observado que la inhibición de señales provenientes de la microglía a causa del bloqueo de receptores de diversas citocinas, es uno de los posibles mecanismos responsables de la acumulación anormal del péptido A β , provocando con esto la muerte de ratones transgénicos APP. Permitiendo que exista una controversia sobre el mecanismo exacto de la eliminación del péptido A β por parte de la microglía así como su papel en la producción de ROS, y la acumulación del péptido A β (**68-71**).



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.

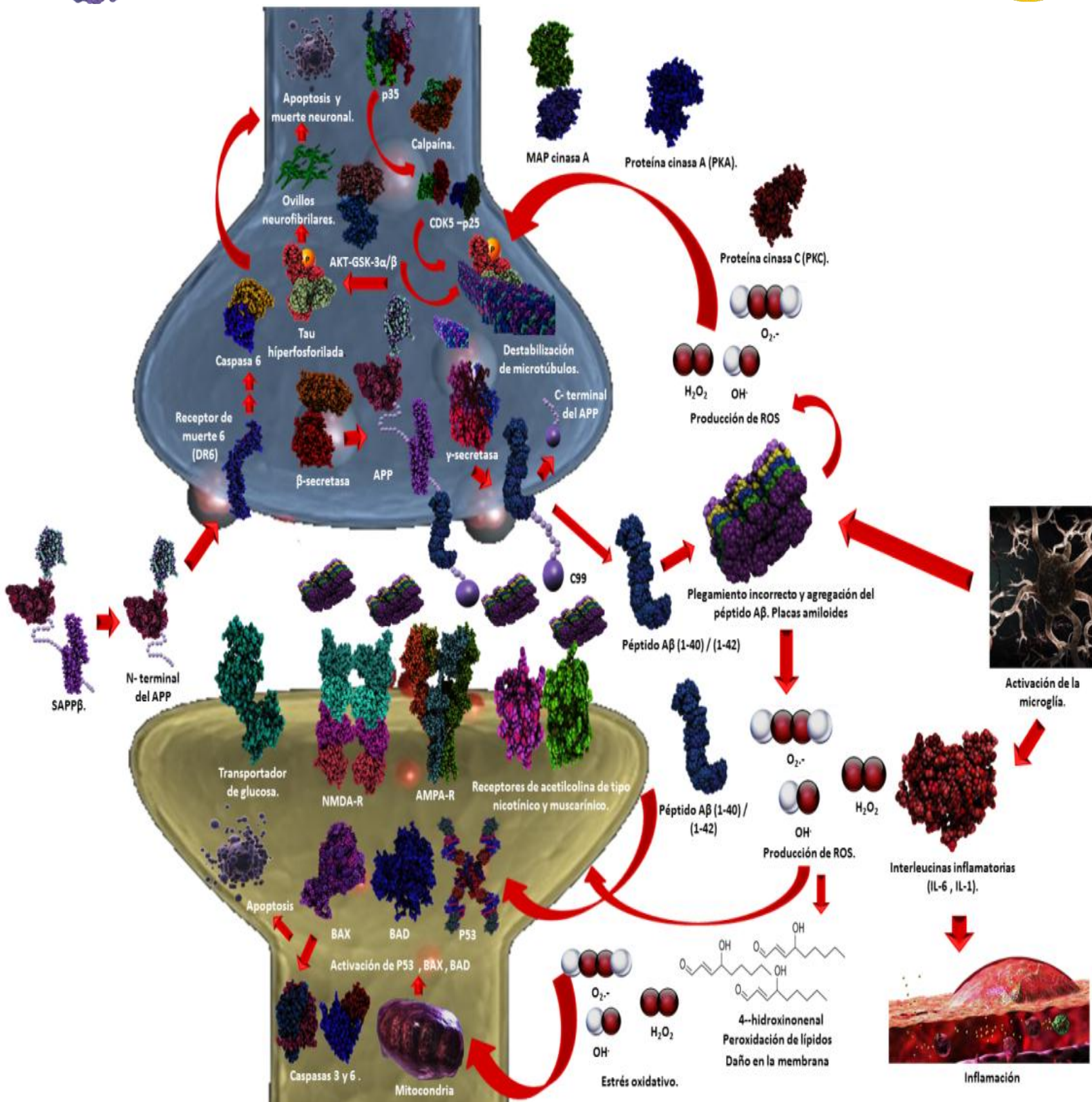


Figura 5.- Vías de señalización en la enfermedad de Alzheimer (72) (Imagen modificada de Cell Signaling, Inc 2009).



1.5.- IMPORTANCIA DE IONES METÁLICOS EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.

Actualmente, se cuenta con evidencia de que los iones de hierro, cobre y zinc presentes en el cerebro están involucrados en interacciones con los componentes proteicos de diferentes enfermedades neurodegenerativas. Dicho hallazgo, no es solamente debido a la exposición de altas concentraciones (efectos tóxicos) sino a una falla en los mecanismos de la homeostasis de estos metales (73). Participan en múltiples funciones biológicas, por lo que sus deficiencias pueden resultar fatales. En general, estos iones se unen a ligandos, y se encuentran más unidos a este tipo de moléculas que en su forma libre la mayoría del tiempo (74-75).

1.6.- COBRE.

Posee la característica de ser un metal redox activo que es predominantemente usado por organismos que se encuentran en medios ricos en oxígeno, estando presente tanto en su forma oxidada Cu^{2+} o reducida Cu^+ (76). A causa de estos cambios en su estado redox, es capaz de coordinarse con un amplio rango de ligandos que incluyen el oxígeno del grupo carboxilato, nitrógeno del grupo imidazol, al grupo tiolato de la cisteína, grupos tioéster de la metionina y participar en interacciones de cationes (77-78).

Simultáneamente, este metal es capaz de unirse a grupos amidas de estructuras proteicas (ej. priones) (79), y cadenas laterales de diferentes proteínas (80). Por otra parte, muchas enzimas aprovechan los cambios de los estados de oxidación del cobre (como en el caso en que está presente el oxígeno) para llevar a cabo reacciones redox que son necesarias para un amplio rango de transformaciones de importancia biológica. Debido a que la forma libre del cobre resulta potencialmente dañina, su absorción, distribución y excreción es controlada por una variedad de proteínas (81). El transporte de este metal a través de las membranas biológicas es llevado a cabo predominantemente por transportadores



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



de cobre como Ctr 1 para la importación de cobre y ATP7a (Menkes) o ATP7b (Wilson) para su exportación. Una vez dentro de la célula, proteínas chaperonas citosólicas lo llevan a moléculas específicas (ej. chaperonas de la superóxido dismutasa 1, CSS-1, responsable del transporte del cobre hacia la enzima superóxido dismutasa 1, SOD 1) (81).

1.7.-COBRE Y SU PAPEL DURANTE LA SINAPSIS.

Recientemente, se ha reportado la presencia de especies iónicas de este metal en la sinapsis a concentraciones micromolares. Bajo este microambiente, neuritas post-sinápticas tipo ácido-N-metil-D-aspartico (**NMDA**) liberan este ion una vez activados sus receptores que se encuentran en las neuronas del hipocampo resultando en el tráfico de ATP7a y un flujo de cobre libre a una concentración de aproximadamente 15 μM en la hendidura sináptica (**Figura 6.A**). Actualmente, es el único microambiente conocido en donde el cobre se encuentra en un estado libre. Al mismo tiempo, cantidades catalíticas de cobre pueden cumplir un papel de aceptores de electrones, con lo cual promueven reacciones del óxido nítrico con grupos tioles (73).

La potencial liberación de este metal puede funcionar como un interruptor molecular para controlar la S-nitrosilación extracelular de los receptores NMDA, lo cual comprende un mecanismo post-traducciona crucial para la modulación de las funciones de estos receptores (82). Este ion cumple la función de proteger a las neuronas primarias del hipocampo de la muerte por excitotoxicidad (daño celular producido por la actividad prolongada de los receptores glutamatérgicos) mediada por NMDA, siendo este efecto dependiente de la producción endógena del óxido nítrico en neuronas del hipocampo (83).

Observándose, que la expresión de la proteína ATP7b aumenta durante la sinaptogénesis, facilitando el transporte del ion cobre hacia dentro del cerebro mediante el uso de células endoteliales que conforman a la barrera



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



hematoencefálica (84-86). Mientras que la proteína Ctr1 encargada en su absorción, se localiza en las neuronas, aún se desconoce el mecanismo exacto de la reabsorción del ion cobre liberado durante la sinapsis, por lo que se ha propuesto que es a través del uso de un mecanismo dependiente de energía mitocondrial (87). Este hecho es relevante a causa de que en pacientes ancianos con la EA, se ha observado que la falta de energía proveniente de este orgánulo, favorece el aumento de ion cobre libre (73).

1.8.- CAMBIOS EN LA HOMEOSTASIS Y METALOBIOLOGÍA DEL ION COBRE EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Se ha observado, que alteraciones en la homeostasis de los niveles del ion cobre en el cerebro juegan un papel importante en la patogénesis de diferentes desórdenes neurodegenerativos, entre los que se incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, y las encefalopatías espongiformes (priones) (88-90). Ejemplo de esto, son los altos niveles del ion cobre tanto en líquido cefalorraquídeo, como en el suero de pacientes con la EA, a comparación de pacientes controles de la misma edad (91-92a). Este incremento de los niveles de cobre sérico, se ha correlacionado con altos niveles de peróxidos lipídicos en el suero de pacientes con la EA (92 b), gracias a la capacidad del ion cobre de oxidar lipoproteínas de baja densidad (LDL) por medio del uso de la homocisteína (93); lo cual es un factor de riesgo para desarrollar la EA (94).

Ya en el cerebro, se ha podido asociar al ion cobre a las placas seniles, quienes incrementan de manera abrumadora la concentración usual de cobre de 79 μM en un neuropilo (región comprendida entre varios cuerpos celulares o somas de neuronas de la sustancia gris del encéfalo y la médula espinal), a 390 μM dentro de estas placas (95). Debido a este incremento anormal de ion cobre en las placas seniles, éstas acumulan todo el ion cobre disponible, dejando a los tejidos neuronales con carencias de este metal. Esta distribución anormal del ion cobre puede tener involucrado un componente lipídico, ya que experimentos con conejos



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



con dietas altas de cobre y colesterol, mostraron un alza en la formación de placas seniles mediada por la agregación del péptido $A\beta$ y promovieron eventos oxidativos en el cerebro (96). Este hecho es avalado por las observaciones en donde el ion cobre, en combinación de dietas ricas en grasas, aumenta el riesgo de sufrir la EA (97).

Por otra parte, existe una clara relación entre la actividad redox del ion cobre y ROS, como el OH y el $OH\cdot$ los cuales son las especies de ROS más comunes en la naturaleza y son generadas por reacciones del tipo Fenton-Heiss entre un metal de transición reducido y H_2O_2 . Siendo la producción de ROS, bajo condiciones de estrés oxidativo, un evento de suma importancia en la EA (98). Para este proceso, se requiere la transferencia sincronizada de dos electrones de los iones metálicos unidos al péptido, en donde dicha reacción no es favorecida por el estado monomérico del péptido.

Existe evidencia reciente en donde se sugiere que los iones cobre se mantienen unidos al péptido, incluso en fibras amiloides maduras, y que la falta de actividad de agregados de orden superior es debida posiblemente a que los iones metálicos son removidos de manera estérica de cualquier molécula disponible de O_2 (99). Lo que ha hecho que se sugieran dos modelos de interacción del ion cúprico tanto en la sinapsis glutamatérgica normal como en la sinapsis glutamatérgica durante la EA (**Figura 6.B**). En el primero, el péptido $A\beta$ es liberado de manera constitutiva en la hendidura sináptica llevando a cabo su actividad neuronal, para posteriormente ser degradado por proteasas extracelulares tales como la neprilisina y la enzima degradadora de insulina (**IDE**). A pesar del incremento de la concentración del ion durante la estimulación neuronal, su concentración es controlada por una variedad de vías, entre las cuales, se incluyen mecanismos de recaptura dependientes de energía, así como por metalotioneinas (**ej. MT3**) provenientes de astrocitos cercanos. Mientras el segundo modelo, muestra que gracias al descenso de la energía mitocondrial, se provoca que los niveles de iones metálicos vayan en incremento con respecto al tiempo, permitiendo que el



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



ion cúprico reaccione con el péptido A β liberado en la hendidura sináptica para formar oligómeros solubles y que precipiten como amiloides. Durante esta patología, la actividad de MT3 se ve reducida drásticamente, permitiendo que las interacciones entre el péptido A β - metal realicen acciones que promuevan la activación mediada por glutamato de los receptores de NMDA dando paso al incremento de iones cúpricos libres (73). Estos iones son capaces de inducir un ciclo que promueve una homeostasis alterada promovida por el ion Cu²⁺. Por el contrario, cuando el ion Cu²⁺ se encuentra en baja concentración, el ion se condensa con el péptido A β en balsas lipídicas ricas en colesterol, promoviendo la formación de complejos redox activos de A β - Cu²⁺, que llevan a cabo la oxidación del colesterol y la generación de H₂O₂.

Durante este proceso, se crean una variedad de compuestos carbonilo (a partir de la peroxidación de lípidos) que causan daño tanto al DNA como a proteínas. Simultáneamente, productos avanzados de glucosilación y de peroxidación de lípidos (**AGE y ALE**), interactúan con el receptor RAGE, activando a varias vías de señalización de citocinas proinflamatorias como la interleucina-6 (**IL-6**). Desarrollando con esto, un ambiente idóneo para que el péptido A β forme oligómeros unidos por puentes de tirosina, estables a SDS, y resistentes a proteólisis, capaces de agregarse en oligómeros de mayor orden en presencia del ion Cu²⁺ (100-102). Sin embargo, se ha reportado que diversos ligandos de Cu²⁺ solubles en lípidos, reducen los niveles extracelulares de péptido A β cuando forma complejos con el Cu²⁺, debido a la activación de la fosforilación dependiente de cobre, de la Fosfoinositol 3-cinasa (**PIK3**).

Los complejos de cobre-ligando son los responsables en activar a PIK3, que activa posteriormente a Akt, la cual controla la activación de MAP cinasas (**MAPKs**), como lo son la cinasa regulada por señal extracelular (**ERK**) y la cinasa N-terminal de c-Jun (**JNK**). Esta última regula la activación de metal proteasas, responsables de inducir la degradación del péptido A β . Aún se desconoce el mecanismo exacto



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



de este ciclo, pero se cree que es por medio de la regulación de receptores de tirosincinasas (103).

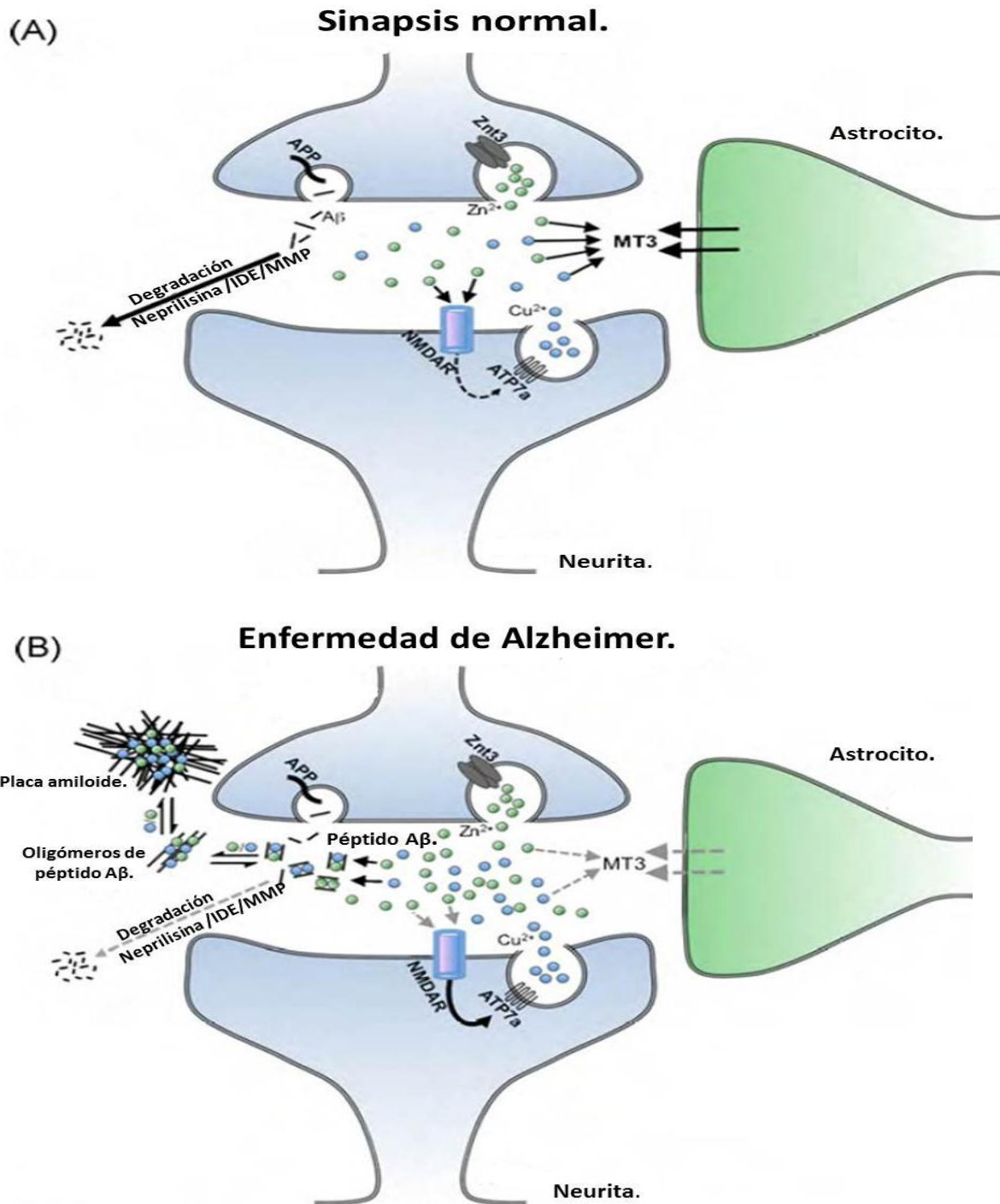


Figura 6.- Modelos de la interacción del ion cúprico en la sinapsis glutamatérgica tanto normal (A) como en la EA (B) (73) (Imagen modificada de Duce *et al*, 2010).



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.

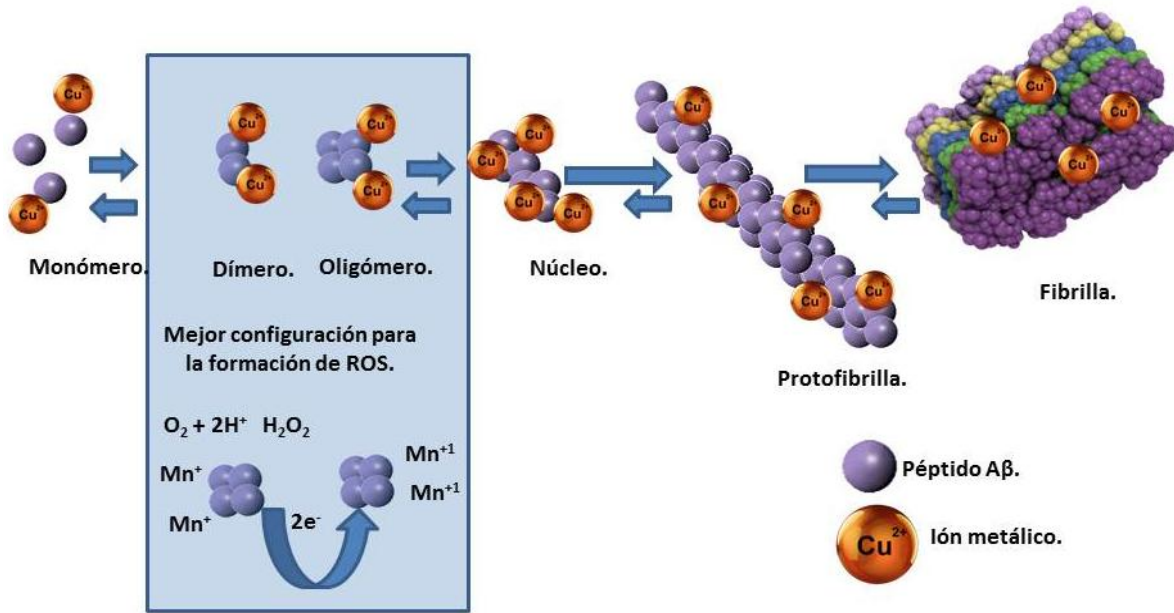
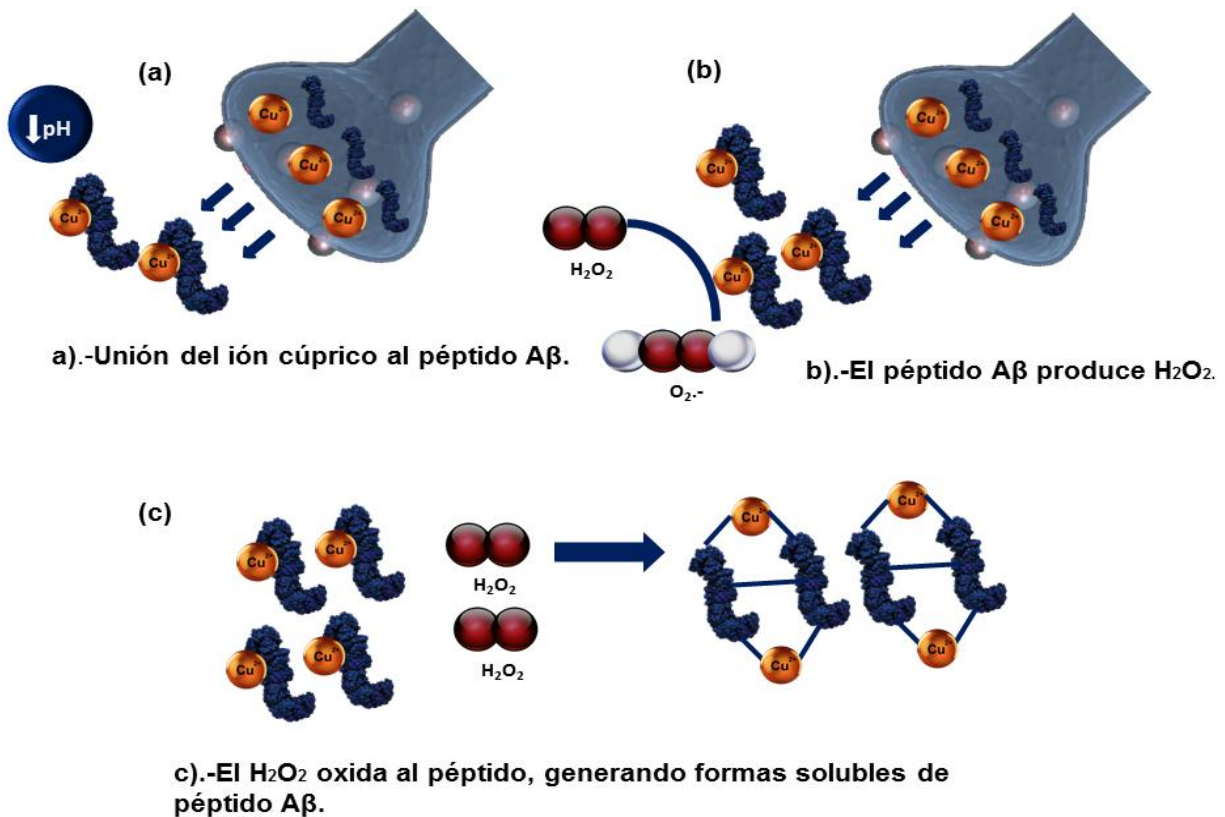
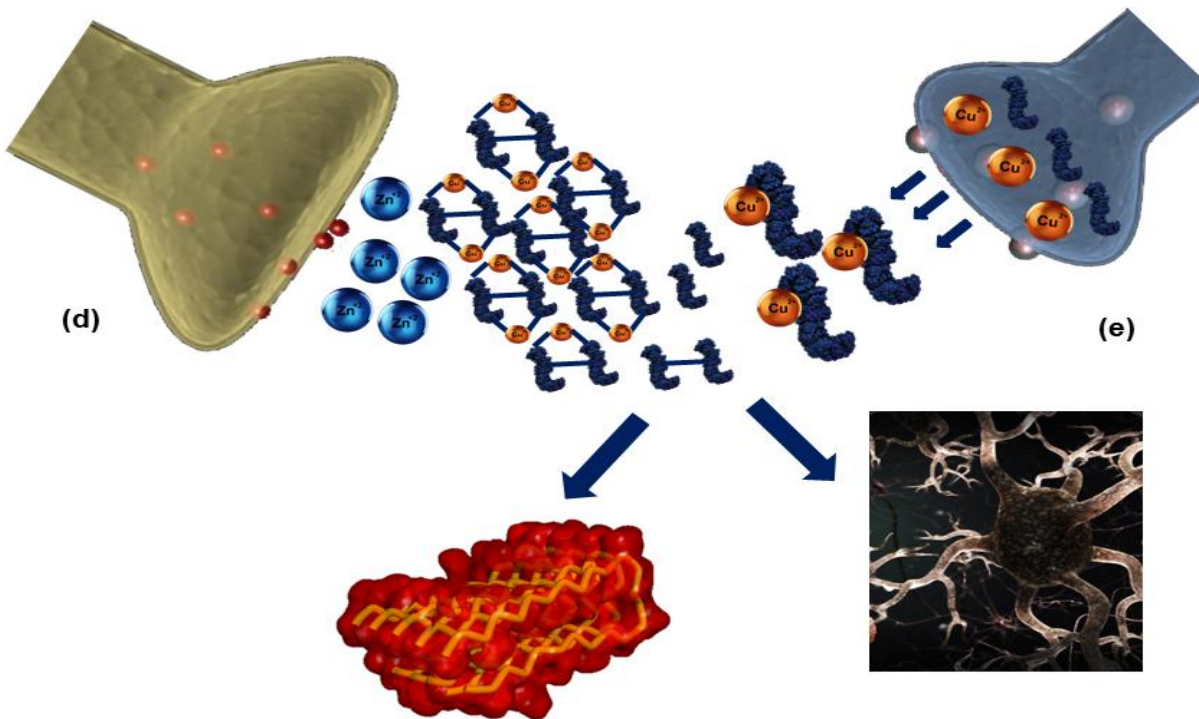


Figura 7.- Mecanismo propuesto para la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en el cual se sugiere que la mejor conformación para la formación de ROS es durante el proceso de reducción de un ion metálico, así como la formación de oligómeros a partir de dímeros de péptido A β (99). (Imagen modificada de Tabner *et al*, 2010).

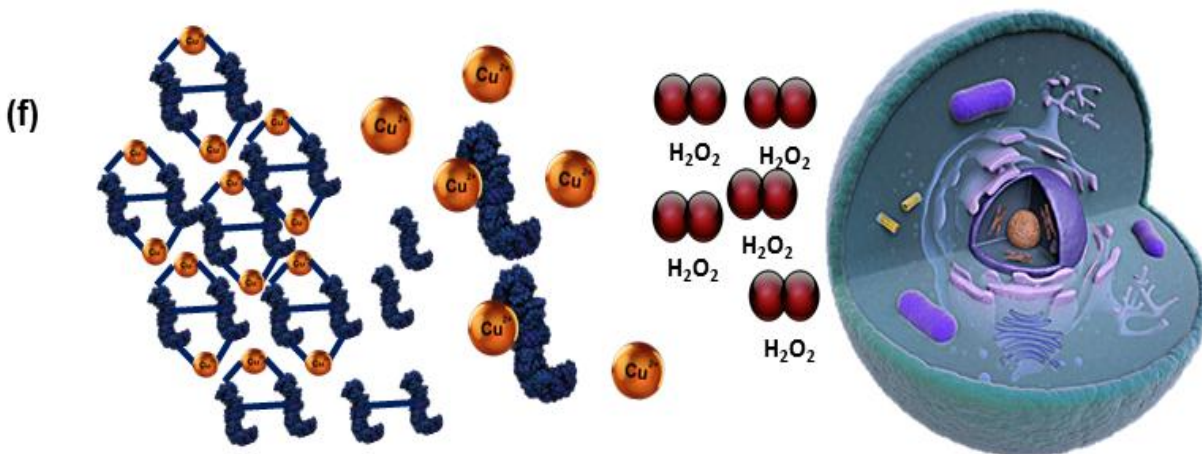




EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



d).-El péptido A β es precipitado por zinc sináptico en placas amiloides.
e).-Activación de la microglía por péptido desnaturalizado.



f).- El H₂O₂ permea la célula.

Figura 8.-Modelo la metalbiología de la EA (104). (Imagen modificada de Gaggelli *et al*, 2006).



1.9.- PAPEL DE LOS IONES Cu^{2+} EN LA AGREGACIÓN DEL PEPTIDO $\text{A}\beta$ Y EN LA AGREGACIÓN DE PÉPTIDOS TRUNCADOS.

Se ha observado que en ausencia de iones metálicos, el péptido $\text{A}\beta$ se agrega a partir de monómeros que poseen estructuras del tipo aleatorio (random coil) hacia la forma más común de fibrilla amiloide con una alta cantidad de estructuras del tipo lámina beta (**105**). En experimentos in vitro, el ion Cu^{2+} es capaz de afectar el comportamiento de agregación del péptido $\text{A}\beta$. Este fenómeno mediado por metales puede ser dividido en 2 categorías:

1).- El ion metálico sólo se une al péptido $\text{A}\beta$, y da paso a un complejo en el cual el péptido $\text{A}\beta$ posee una conformación diferente.

2).-El ion metálico induce una reacción y cambia la conformación del péptido $\text{A}\beta$.

Esta última, parece ser particularmente importante, debido a la capacidad del ion cobre de catalizar la formación de dímeros vía puentes de ditirosina (**106-107**), así como de poseer tanto la capacidad de favorecer como de inhibir el proceso de agregación del péptido dependiendo de las condiciones, tales como el pH (**108-110**). Es por esta razón, que ha surgido un consenso emergente en el cual el ion cobre puede acelerar la agregación del péptido $\text{A}\beta$ formando depósitos amorfos (**111-112**). Sin embargo, en ciertos casos en donde existe la presencia de fibras del péptido $\text{A}\beta$ formadas por los complejos péptido $\text{A}\beta$ - Cu^{2+} , no es claro si el cobre promueve la agregación o no (**113**). Por ello, esta controversia ha dado paso a la suposición de que el ion cobre produce agregados del péptido $\text{A}\beta$ amorfos y por otra parte, el ion Cu^{2+} evita (pero no inhibe) la formación de fibras de láminas beta de péptido $\text{A}\beta$ (**114**).

También se ha demostrado de manera experimental, que los complejos Cu^{2+} -péptido $\text{A}\beta$ se presentan en forma monomérica, teniendo prioridad la formación de este complejo (Cu^{2+} -péptido $\text{A}\beta$) a comparación del proceso de agregación hacia



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



fibras amiloides por parte del péptido A β . Dicho fenómeno fue deducido a partir de cromatografía de exclusión molecular y espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (**NMR**) con gradiente de campo pulsado (**115-117**). Pero a pesar de la existencia de monómeros de complejos Cu²⁺-A β , aún no se ha demostrado la existencia de dímeros de los complejos Cu²⁺-A β , aún incluso cuando el ion metálico se encontraba en un estado subestiquiométrico a comparación del péptido A β . Sin embargo, el adicionar de manera subestiquiométrica iones metálicos permite la formación de complejos Metal-A β así como de asociaciones de péptido A β no dependientes de metales (**apo-A β**) (**115**).

Demostrando que el ion Cu²⁺ no posee una fuerte tendencia a formar complejos Cu²⁺-A β con puentes metálicos estables, indicando que los agregados inducidos por este metal incluyen un cambio conformacional (**Fig.9B**) y que la formación de un puente metálico es menos posible (**Fig.9A**). Aunque los puentes metálicos podrían ser importantes en un estado de transición (ej. un intermediario) durante el proceso de agregación (**114**).

Sin embargo, el conocimiento acerca del efecto en la formación o la estructura de los intermediarios de agregación es escaso. Por ejemplo, Teplow y colaboradores han mostrado evidencia de un intermediario de agregación con una estructura parcial de α -hélice en la vía de agregación de la mayoría de los péptidos A β no estructurados a fibrillas β amiloides (**118**).



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.

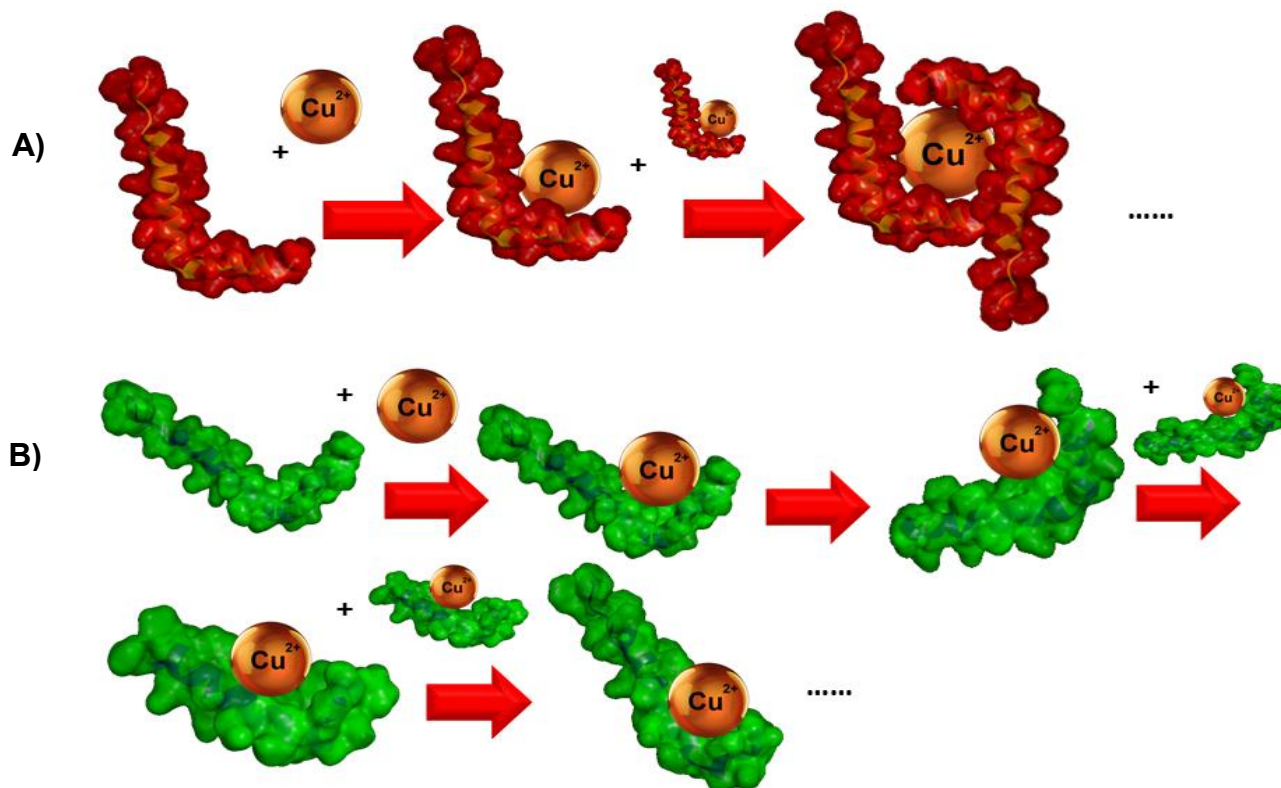


Figura 9.- Modelos conceptuales del papel del ion Cu^{2+} en la inducción de la agregación mediada por metales. **A)** Inducida por la unión de iones metálicos. **B)** Agregación por cambios de conformación (114) (Imagen modificada de Faller, 2009).

A causa de la dificultad que representa la obtención de los detalles en las vías de la formación de intermediarios de agregación inducidos por iones metálicos, así como sus estructuras, se han llevado a cabo estudios con péptidos más cortos (y por lo tanto más simples) como modelos de agregación del péptido $\text{A}\beta$ (119-121). Ya que al carecer de una gran parte de su dominio N-terminal, C-terminal o ambos, se coordinan de maneras diferentes con el ion Cu^{2+} . Pero debido a la carencia de cualquiera de sus dominios, los resultados obtenidos con estos péptidos truncados no pueden ser traslapados y/o comparados con los resultados obtenidos en el péptido $\text{A}\beta$ completo (114). A pesar de sus limitaciones, los péptidos truncados pueden proporcionar datos interesantes en los mecanismos de agregación de los complejos metal-péptido (114). Ejemplo de esto, son los datos obtenidos a partir de los efectos del ion Cu^{2+} sobre la agregación de los péptidos



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



A β (13-21) y su mutante K16A, así como del péptido A β -Ac (13-21) y su respectiva mutante H14, Observándose, tanto efectos promotores como inhibitorios en la agregación de estos péptidos A β con 0.5 equivalentes del ion Cu²⁺ (114).

Por otro lado, se ha investigado el mecanismo mediante el cual el ion Cu²⁺ afecta la agregación de los péptidos truncados A β (11-23), A β (11-28) y A β (14-23). Observándose, que el ion Cu²⁺ al estar en un estado estequiométrico acelera la agregación del péptido A β (14-23) por medio de la formación de puentes del ion Cu²⁺ (Figura 10.B), pero reduciendo la agregación del péptido A β (11-28) por medio de la formación de complejos estequiométricos de cobre-A β (11-28), compuestos de un solo péptido A β (Figura 10.C). Estos hallazgos hacen suponer que el ion Cu²⁺ promueve la agregación por medio de la unión de los péptidos por sus extremos, sin afectar a la formación de los puentes de hidrógeno dentro de las láminas beta (Figura10.B) (114).

Pero, cuando el ion Cu²⁺ se une exclusivamente a un solo péptido A β , los péptidos A β que rodean al ion Cu²⁺ interrumpen la formación de puentes de hidrógeno y por ende, la formación de agregados del péptido A β (Figura 10.A y 10.C). En lo que concierne a la agregación de los complejos cobre-péptido A β , estos resultados pueden explicar cómo el ion promueve la agregación y cómo iones Cu²⁺ libres pueden inhibir la agregación.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.

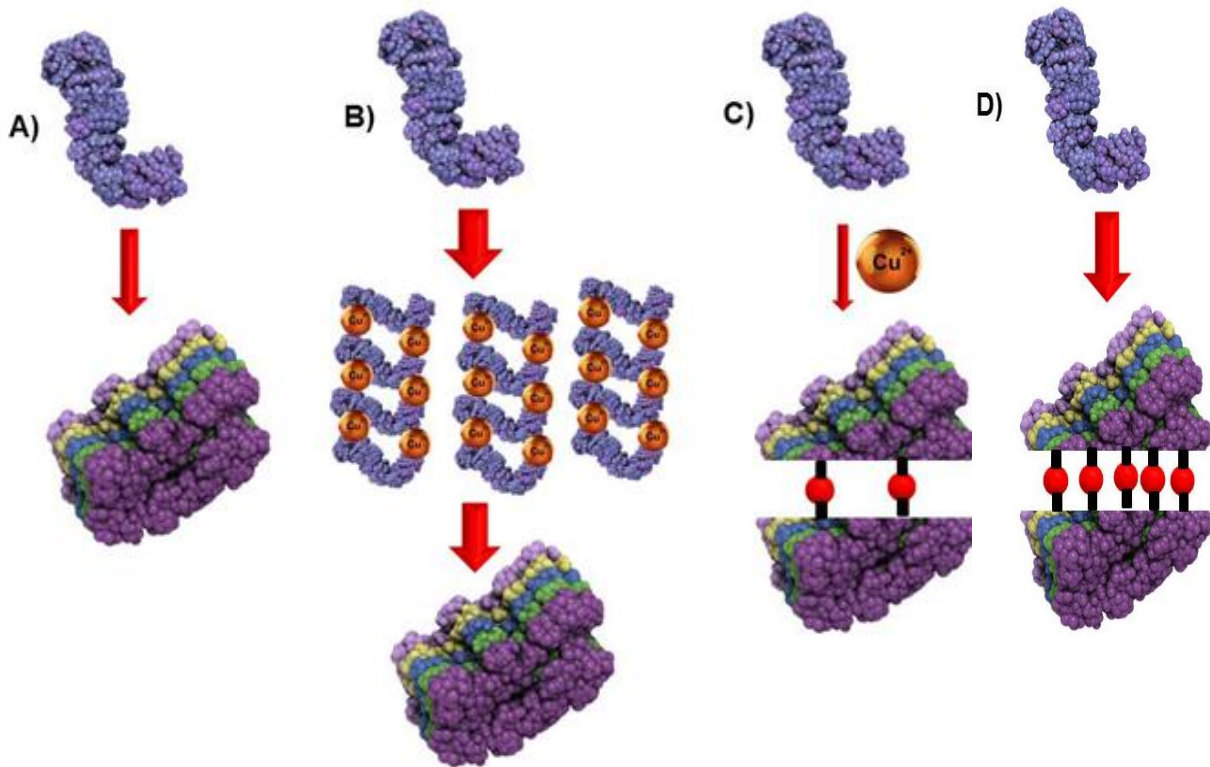


Figura 10.- Esquemas de los modelos de agregación de los péptidos mediante la formación de puentes de hidrógeno-láminas β y la presencia o ausencia del ion Cu^{2+} **A)** En la ausencia del ion Cu^{2+} los péptidos forman fibrillas del tipo β amiloide. **B)** El ion Cu^{2+} se une al péptido $\text{A}\beta$ (y promueve la formación de fibrillas por la formación de puentes de ion Cu^{2+} en los extremos C-terminal y N-terminal de los diferentes péptidos $\text{A}\beta$ **C)** El ion Cu^{2+} se une al péptido $\text{A}\beta$ como un complejo monomérico e inhibe la agregación mediante la reducción de puentes de hidrógeno en las láminas β en las fibrillas a comparación de las **D)** Fibrillas sin ion Cu^{2+} **(114) (Imagen modificada de Faller, 2009).**

De todas maneras, aún no se cuenta con un modelo que indique que los iones Cu^{2+} favorecen la agregación del péptido $\text{A}\beta$. Con esto se hace notar, que el ion Cu^{2+} es incapaz de formar uniones estables entre péptidos $\text{A}\beta$; pero también hay que tomar en cuenta los reportes que sugieren que el ion Cu^{2+} fomenta la agregación del péptido $\text{A}\beta$. Estos datos contrastantes pueden ser explicados de la siguiente manera **(114)**:

1).- El ion cobre no promueve la agregación fibrilar, solamente promueve agregados no fibrilares.



2).- Puede que el ion cobre, lleve a cabo la agregación fibrilar por medio de diferentes mecanismos (122).

Otro factor a considerar del efecto del ion Cu^{2+} sobre el péptido $\text{A}\beta$, es la relación equimolar que existe entre ambos; ya que, en concentraciones sub equimolares del ion Cu^{2+} con respecto al péptido $\text{A}\beta$, hace que el péptido forme agregados similares a amiloides, resistentes a SDS de alto peso molecular (123). Mientras que en una relación supra-equimolar se generan oligómeros solubles de péptido $\text{A}\beta$ citotóxicos; de hecho, el ion Cu^{2+} acelera el proceso de agregación potenciado bajo condiciones ácidas leves similares a las que se encuentran en cerebros de pacientes ancianos y en pacientes que sufren de la EA (124-125).

1.10.-COORDINACIÓN DEL ION Cu^{2+} Y Cu^+ EN EL PÉPTIDO $\text{A}\beta$.

Actualmente, existen 2 modelos emergentes del sitio de coordinación del ion Cu^{2+} en el péptido $\text{A}\beta$. En el primer modelo, el ion Cu^{2+} es coordinado por medio del uso de tres residuos de histidina (**His6, His13, His14**) y el grupo carboxilato del residuo del ácido Aspártico 1 (**Asp1**). En el segundo modelo, el residuo Asp1 está involucrado por vía del extremo NH_2 y el grupo RCOO^- , mientras que los otros 2 residuos puede ser cualquiera de los 3 residuos de histidina.

Dicho modelo, cuenta con 2 estudios de espectroscopia de Rayos X (**XAS**) que son contradictorios, el primero involucra a los 3 residuos de histidina con el ácido aspártico y/o glutámico. Mientras que el segundo sugiere sólo el uso de dos residuos de Histidina (126). Un estudio realizado mediante resonancia paramagnética del electrón avanzado (**EPR avanzado**) con péptidos marcados, muestra evidencia a favor del segundo modelo, en el cual la His6 se coordina con el ion Cu^{2+} por medio de su nitrógeno épsilon (127) que se encuentra en el anillo del grupo imidazol, como el tercer ligando ante un equilibrio entre la His13 y la His14 (128). Pero aún con estos estudios, hay que tomar en cuenta que la coordinación del ion Cu^{2+} al péptido $\text{A}\beta$ es muy dinámica (129).



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Entre los modelos propuestos de coordinación del ion Cu^{2+} en el péptido $\text{A}\beta$, se encuentran los mostrados en la **Figura 11** **A)** Modelo concordante con la evidencia de que el residuo Tyr10 no es el donador del ligando de oxígeno en el complejo $\text{A}\beta$ - Cu^{2+} . **B)** Modelo en donde el oxígeno axial es marcado como W1, los 2 átomos solventes adicionales de oxígeno (O_{sol}) que posiblemente pertenezcan al grupo carboxilato de los aminoácidos del extremo N-terminal como Asp1, el cual puede participar en las uniones de hidrógeno con el átomo axial de agua W1 para la estabilización del sitio de unión al ion cobre. **C y D)** Modelos de las esferas de coordinación del ion Cu^{2+} al péptido $\text{A}\beta$: {Extremo N-terminal, His6, His13 o His14, Asp1-COO-} (panel izquierdo) y {₃ His, Asp1-COO-} (126,129).

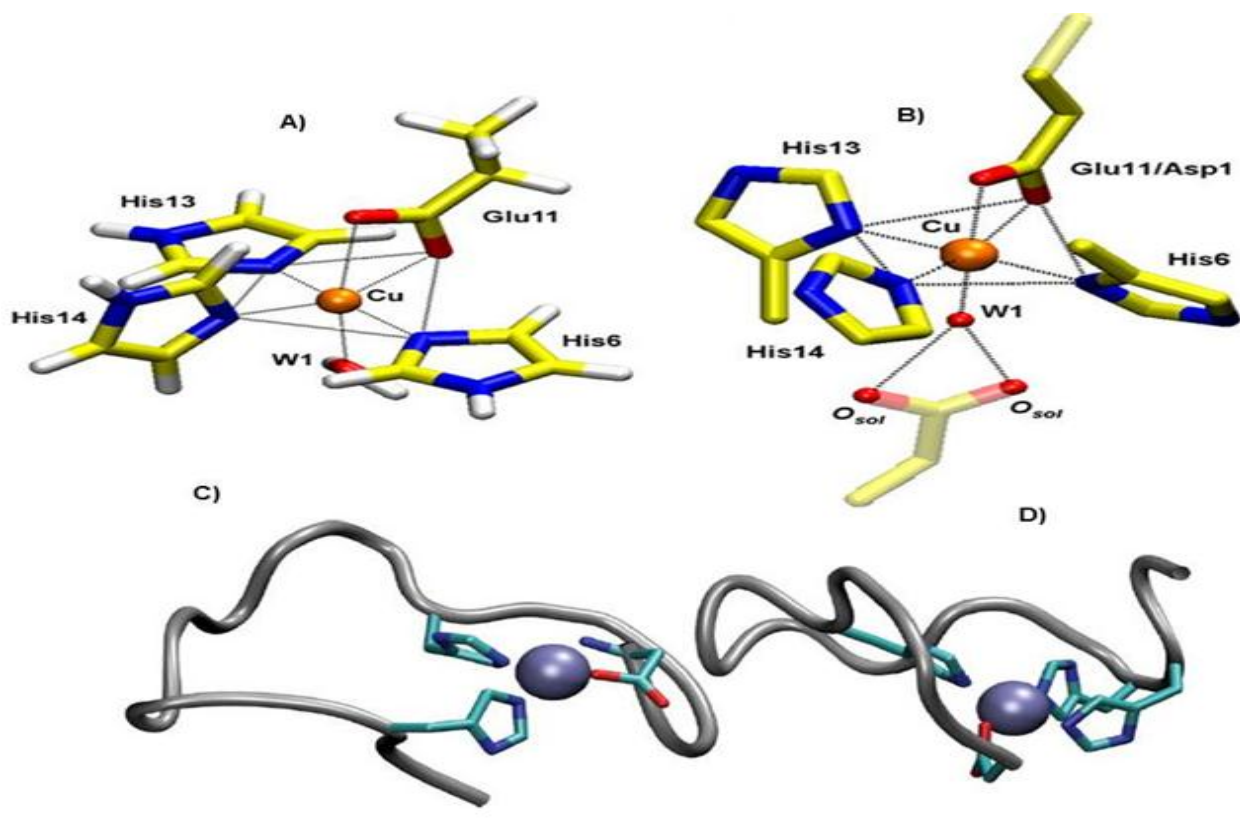


Figura 11.- Modelos propuestos de coordinación del ion Cu^{2+} en el péptido $\text{A}\beta$ (126,129). (Imagen modificada de Hureau *et al*, 2009 y Streltsov *et al* 2008).



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.

A diferencia del Cu^{2+} , el ion Cu^+ cuenta con un consenso general con respecto al modelo de coordinación de este ion en el péptido $\text{A}\beta$. Este consiste en que dos iones Cu^+ se coordinan en una geometría casi lineal, esto acorde a datos obtenidos por medio de estudios XAS, en donde los residuos adyacentes His13 e His14 están unidos al Cu^+ por vía del nitrógeno delta (**127, 130,131**).

Dicha geometría ha sido obtenida tanto en péptidos $\text{A}\beta$ truncados como con péptidos completos. A la par, el papel de la His6 ha sido descartado en los péptidos truncados debido la vibración de $\text{C}=\text{O}$ de CO del complejo péptido $\text{A}\beta\text{-Cu}^+$ (**132**), confirmada por la comparación del marcaje por absorción de rayos-X cerca del borde de estructura (**XANES**).



Figura 12.- Secuencia del péptido $\text{A}\beta$ (1-42). Los aminoácidos en círculos azules son los responsables de la coordinación del péptido $\text{A}\beta\text{-Cu}^{2+}$. Los aminoácidos en recuadro rojo son los responsables de la coordinación $\text{A}\beta\text{-Cu}^+$ (**129**). (Imagen modificada de Hureau *et al* 2009).



1.11.-PAPEL DE LA METIONINA 35 EN LA TOXICIDAD DEL Aβ.

Existen datos contradictorios con respecto al papel de la Metionina 35 (Met35) en la neurotoxicidad del Aβ. Este aminoácido se encuentra en la porción del extremo carbonilo del péptido Aβ dentro del dominio putativo transmembranal, y su cadena lateral es la más susceptible a oxidación (133-134). Ha habido diversas investigaciones acerca del papel de la Met35 en la neurotoxicidad del péptido Aβ que sugieren que es de suma importancia en la química redox del péptido (135). El sulfuro que contiene la metionina puede potencialmente donar electrones del ion metálico reducido, e iniciar el ciclo de química redox que se muestra a continuación.

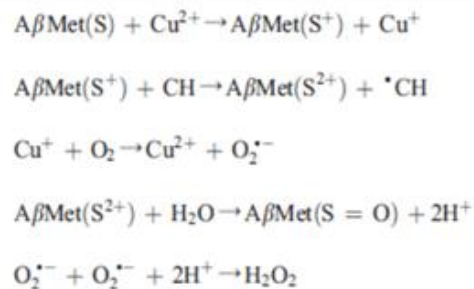
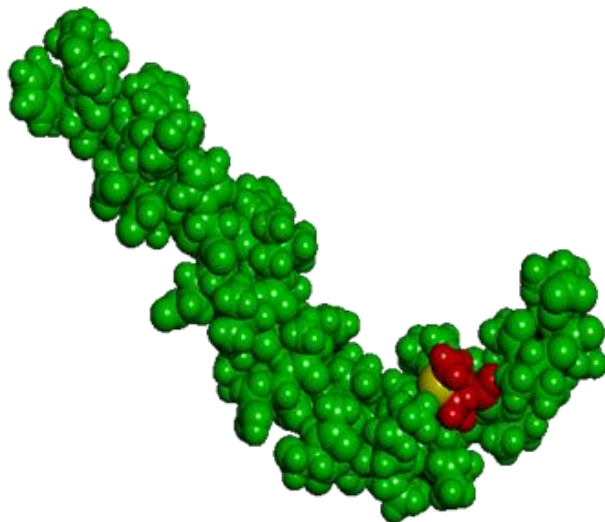


Figura 13.- Mecanismo redox de la Met35, así como su posición en el Aβ (de color rojo la Met35 y de amarillo su átomo de sulfuro) (98). (Adaptado de Smith *et al*, 2007).

La sustitución de la Met35 por Valina incrementa la toxicidad comparada con el péptido silvestre (135), mientras que un residuo que no sea isoleucina o cisteína la disminuye (136). El péptido con la metionina oxidada (Aβ-Met-Ox) no muestra toxicidad después de 24 horas (137), mientras que incubaciones prolongadas de



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



A β -Met-Ox ejercen toxicidad similar al silvestre (**138**). Estos resultados apoyan el hecho de que la formación de ROS mediada por el péptido A β es iniciada por el residuo de Met35. Para que esto se lleve a cabo, la Met35 debe de encontrarse a una distancia de ~ 1.9 Å de los átomos aceptores, para que se realice la transferencia de electrones (**139**).

Esto es posible gracias al plegamiento del extremo carboxilo hacia el extremo amino, o por medio del mecanismo de formación de fibras, el cual es producto de la unión del ion cobre al extremo amino de un péptido A β unido a la Met35 que se encuentra en el extremo carboxilo de otro péptido A β . Bajo estas condiciones, el ion Cu²⁺ puede llevar a cabo la radicalización de la Met35 así como la formación de radicales de carbono (formados probablemente a partir de residuos de glicina del mismo péptido) que pueden subsecuentemente participar en las reacciones de peroxidación de los lípidos (**140**). Esto es consistente con los niveles elevados postmortem de 4-hidroxinonal (**HNE**) en los cerebros con la EA (**141**). Este compuesto se ha utilizado como indicador de daño oxidativo en la EA, así como la acroleína y el 4-oxo-trans-2-hexanal, los cuales comparten con el 4-hidroxinonal, una naturaleza neurotóxica (**142**).

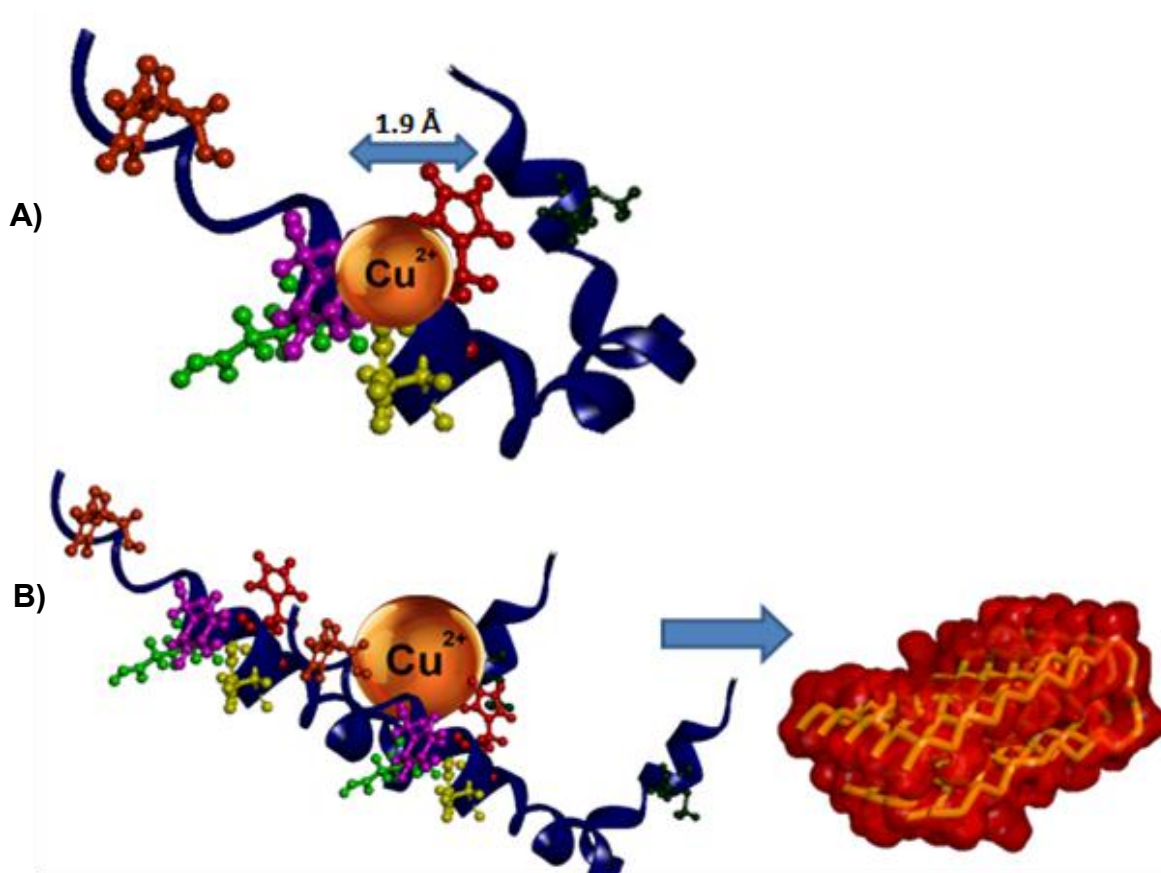


Figura 14.- Diagrama que muestra los mecanismos propuestos para llevar cabo la reducción del ion Cu^{2+} , por parte del aminoácido Met35, para llevar cabo la formación de ROS. **A)** Manteniendo distancia de 1.9 Å entre el sitio de unión del ion Cu^{2+} y la Met35 **B)** Por medio de la unión del sitio de coordinación de Cu^{2+} de un péptido a la Met35 de otro péptido adyacente para llevar a cabo la formación de fibrillas manteniendo una distancia de 1.9 Å' (140) (Imagen modificada de Page *et al* ,1999).

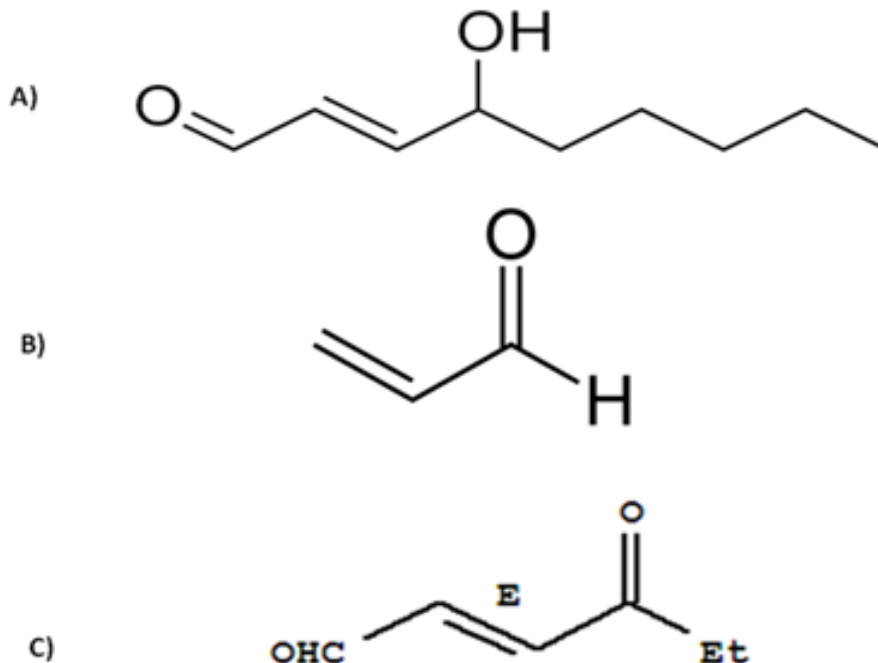


Figura 15.- Productos de la peroxidación de lípidos, mediada por Met35, los cuales poseen una naturaleza neurotóxica: **A)** 4-hidroxinonenal (**HNE**), **B)** acroleína, **C)** 4-oxo-trans-2-hexanal. (143). (Imagen adaptada de Lovell MA *et al*, 1997).

Un mecanismo alternativo para el proceso de generación de HNE, está basado en la inserción del péptido completo del A β a la membrana vía su extremo carbonilo hidrófobo, donde el radical sulfuranil aporta un protón de un enlace insaturado en la membrana de fosfolípidos, generando un radical de carbón en el lípido. Entonces, éste puede reaccionar con el oxígeno molecular (**O**) formando un radical peroxil libre (**HO**), el cual inicia una cascada de eventos que amplifican el radical libre del péptido A β original. Los productos de la peroxidación de los lípidos, como el HNE surgen de la ruptura sistemática de lípidos subsecuentemente al ataque de radicales libres (135,143-144).

El estado oxidado del péptido también puede afectar a la agregación, como en el caso de A β -Met-Ox que tiene un lento rango de fibrilación, presuntamente por interrumpir el cambio de pequeños oligómeros solubles a grandes oligómeros



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



insolubles. Al detener la oligomerización a dímeros, el péptido A β es capaz de ser eliminado del cerebro antes de que sus efectos tóxicos se vean potenciados (**145**).

A pesar de que el A β -Met-Ox es más soluble que el péptido A β silvestre, es incapaz de insertarse en las membranas, y formar poros en ellas, y de todas maneras sigue siendo neurotóxico, indicando que la inserción en la membrana no es un prerrequisito de la toxicidad del péptido A β (**138**). Existe la evidencia que tanto la Gly29 como la Ala30 pueden encontrarse relativamente cerca de los sitios de unión al ion Cu²⁺ y por ello, están relacionados con la toxicidad atribuida a la unión del péptido A β con el metal (**146**).



Capítulo II.

JUSTIFICACIÓN.

Estudios espectroscópicos recientes han mostrado un papel del aminoácido Metionina 35 del péptido beta amiloide A β (1-40) como agente reductor relacionado con la patología de la Enfermedad de Alzheimer. Se ha sugerido que en su estado oxidado, el aminoácido Metionina 35 es capaz de llevar a cabo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), mecanismo relacionado con la enfermedad.

De igual forma, en este estado, es capaz de formar oligómeros del péptido, aumentando así la toxicidad de éste, por lo tanto, es importante estudiar el papel de la Met35 en el proceso de reducción del Cu²⁺, así como en el proceso de agregación del péptido beta amiloide. Los diferentes intermediarios que se producen durante el proceso de agregación del péptido en presencia de Cu²⁺ pueden ser propuestos como blanco para el diseño de fármacos, ya que se ha sugerido que son los intermediarios de agregación y no la placa amiloide los que están relacionados con la patología de la enfermedad.

HIPÓTESIS.

La formación del complejo del péptido A β (1-40) con iones de cobre mediado por el aminoácido Met35 es uno de los posibles mecanismos de agregación y neurotoxicidad del péptido A β (1-40).



Capítulo III.

OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Determinar si la relación del aminoácido metionina 35 del péptido A β con los iones de cobre está involucrada en el proceso de agregación y elucidar la estructura funcional de algunos intermediarios.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar si los intermediarios de agregación del péptido A β (25-35), A β (1-40) silvestre y A β mutante (1-40) (Met35Cys) en presencia y ausencia del ion cobre, presentan formas amiloides o fibrilares por medio de microscopía de fluorescencia usando ensayos de Tioflavina T (ThT) y Rojo Congo (RC).
2. Determinar los pesos moleculares por medio de geles de acrilamida de los péptidos anteriores en presencia y ausencia del ion cobre.
3. Determinar la citotoxicidad de los péptidos anteriores en un modelo celular de C-6 de Glioblastoma de rata Wistar (*Rattus norvegicus albinus*).



IV. MATERIALES.

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

4.1.1. Línea celular C-6 Glioblastoma de rata Wistar (*Rattus norvegicus albinus*).

Línea celular desarrollada por Benda *et al* en el año de 1968, al exponer a crías de rata Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) a N, N'-nitroso-metilurea, dicha línea celular muestra una morfología similar a glioblastoma multiforme (**GBM**) cuando se inyecta en el cerebro de ratas recién nacidas (**147**). Estas células se cultivan en medio DMEM Advance con 2% de suero fetal bovino, 1% de glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de antibióticos-antimicóticos (100x Penicilina, Estreptomycin-Anfotericina B). Incubándolas a una atmósfera de 5% de CO₂.

4.2. MATERIAL.

4.2.1.- Materiales para preparar péptido A β (1-40), A β (1-40) Met35Cys y A β (25-35) como para el proceso de agregación.

- Microtubos de 0.2 ml. Marca Ambion (Grand Island, NY, USA).
- Microtubos de 1.5 ml. Marca Sorenson (Salt Lake City, UT, USA).

4.2.2.- Materiales para microscopía de fluorescencia de Tioflavina T (ThT) y de luz polarizada y fluorescencia de Rojo Congo (RC).

- Laminillas pre-cargas con Poli-Lys. Marca Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).
- Toallas Kimwipes^R EX – L. Marca Kimberly Clark (Ecatepec, EdoMex, México).



4.2.3.- Materiales para cultivo y recuento celular.

- Pipetas Pasteur. Marca Corning (Corning, NY, USA).
- Cajas de cultivo de 100 X20mm. Marca Corning (Corning, NY, USA).
- Placas de 96 pozos. Marca Falcon (Waltham, MA, USA).
- Cámara Neubauer. Marca Baxter Scientific Products (Deerfield, IL, USA).

4.3.- REACTIVOS.

4.3.1.- Reactivos de uso general

- Etanol 95%. Marca Jalmek (San Nicolás de los Garza, NL, México).
- Metanol 95%. Marca CTR (Mty, NL, México).
- Isopropanol 95%. Marca Jalmek (San Nicolás de los Garza, NL, México).
- SDS. Marca Omnipur (Whitehouse Station, New Jersey, USA).

4.3.2.- Reactivos para preparar péptido A β (1-40), A β (1-40) Met35Cys y A β (25-35) así como para su proceso de agregación.

- Hidróxido de Sodio. Marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Glicina. Marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Sulfato de Cobre Pentahidratado. Marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Péptido A β (1-40).
Marca Genscript (Piscataway, NJ, USA)
Marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Péptido A β (1-40) Met35Cys. Marca Genscript (Piscataway, NJ, USA).
- Péptido A β (25-35). Marca Genscript (Piscataway, NJ, USA).

4.3.3.- Reactivos para microscopía de fluorescencia de ThT y de luz polarizada y fluorescencia de Rojo Congo.

- Tioflavina T (ThT). Marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Rojo Congo (RC). Marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).



4.3.4.- Reactivos para cultivo y viabilidad celular.

Todos los reactivos de la marca Invitrogen-Gibco.(Grand Island, NY, USA).

- Aminoácidos no esenciales (10mM 100X).
- Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advances DMEM).
- L- Glutamina (200 mM 100X).
- Suero Fetal Bovino (FBS).
- Tripsina-EDTA (0.25%).
- Solución de antibiótico-penicilina-estreptomomicina.(100UI/ml de penicilina G de sodio y 100 µg/ml de sulfato de estreptomomicina).
- Azul de Alamar.
- Azul de Tripano.

4.3.5.- Reactivos para geles de acrilamida.

- Acrilamida Marca Invitrogen (Grand Island, NY, USA).
- N-N metilen-Bis acrilamida Marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- TEMED Marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- PSA Marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder Marca Thermo (Waltham, MA, USA).
- Tris-Base Marca US-Biological (Swampscott, MA, USA).
- Tricina Marca BioRad (Nobel Drive Hercules, CA ,USA).
- Beta Mercaptoetanol Marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Azul de Coomassie R-250 Marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).



4.4 .- EQUIPOS.

4.4.1.- Equipos de uso general

- Espectrofotómetro NanoDrop. Marca Thermo Scientific. Modelo Nanodrop 2000 (Waltham, MA, USA).
- Orbit Shaker Lab Line (San Diego, CA, USA).
- Agitador Orbital GyroTwister. Marca Labnet (Woodbridge, NJ, USA).
- Microbalanza Marca Adventurer Pro Ohaus AV412 (Parsippany, NJ, USA).
- Microbalanza Marca Sartorius. Modelo BP1105 (Weender Landstrasse, Goettingen, Alemania).

4.4.2.- Equipos para preparar péptido A β (1-40) , A β (1-40) Met35Cys y A β (25-35) así como para su proceso de agregación.

- Campana de Flujo Laminar. LabConco. Purifier Class II Safety. (Kansas City, MO, USA).
- Microcentrífuga. Marca Eppendorf. Modelo 5415C. (Barkhausenweg, Hamburgo, Alemania).
- Thermomixer Compact. Marca Eppendorf. (Barkhausenweg, Hamburgo, Alemania).
- Baño Sonicador. Marca Sonicor. (Wallingford, CT, USA).

4.4.3.- Equipos para microscopía de flourescencia de ThT y de luz polarizada y flourescencia de Rojo Congo.

- Microscopio de flourescencia 1000 Marca Leica. (Wetzlar, Alemania).
- Microscopio de campo claro Marca Nikon 50i. (Melville, NY, USA).
- Fotomicroscopio Fomi- III Marca Carl Zeiss. (Standort, Göttingen, Alemania).



4.4.4.- Equipos para cultivo y viabilidad celular.

- Campana de Flujo Laminar con filtros HEPA . Clase II Typo A2 Marca NU AIRE Modelo NU-425-400. (Plymouth, MN,USA).
- Incubadora con fuente de CO₂ Marca NUAIRE. Modelo UN-4750. (Plymouth, MN,USA).
- Microscopio Invertido. Marca Olympus. Modelo CKX41. (Miami, FL, USA).
- Lector de Placas BioTek. Modelo ELX800. (Winooski, VT, USA).

4.4.5.- Equipos para geles de Tricina-SDS-PAGE.

- Mini Protean Tetra Pack Marca BioRad. Marca BioRad. (Nobel Drive Hercules, CA ,USA).

4.5.- Software.

- En el diseño de gráficos y mutaciones de los péptidos se usaron los programas Discovery Studio Visualizer (Accelrys, USA) Versión 3.0, QuteMol v 0.4.1 (148).
- Para los gráficos generales se utilizó el programa PaintNet Versión 3.5.10.
- Para realizar los gráficos de viabilidad celular se utilizó el programa Sigma Plot Versión 11 (Systat Software Inc. USA).
- El análisis estadístico se utilizó el programa SPSS Versión 15.0 (I.B.M).
- El análisis de imágenes obtenidas por microscopía fue analizada por medio del software NIS Elements. BR 2.30.
- Para la cuantificación de proteína total con el espectrofotómetro NanoDrop fue el NanoDrop 2000/2000c ver 1.4.1 de Thermo Fisher Scientific.



Capítulo V.

MÉTODOS.

Para llevar a cabo los objetivos planteados en el presente proyecto de tesis, se realizó la siguiente estrategia general (**Figura. 16**).

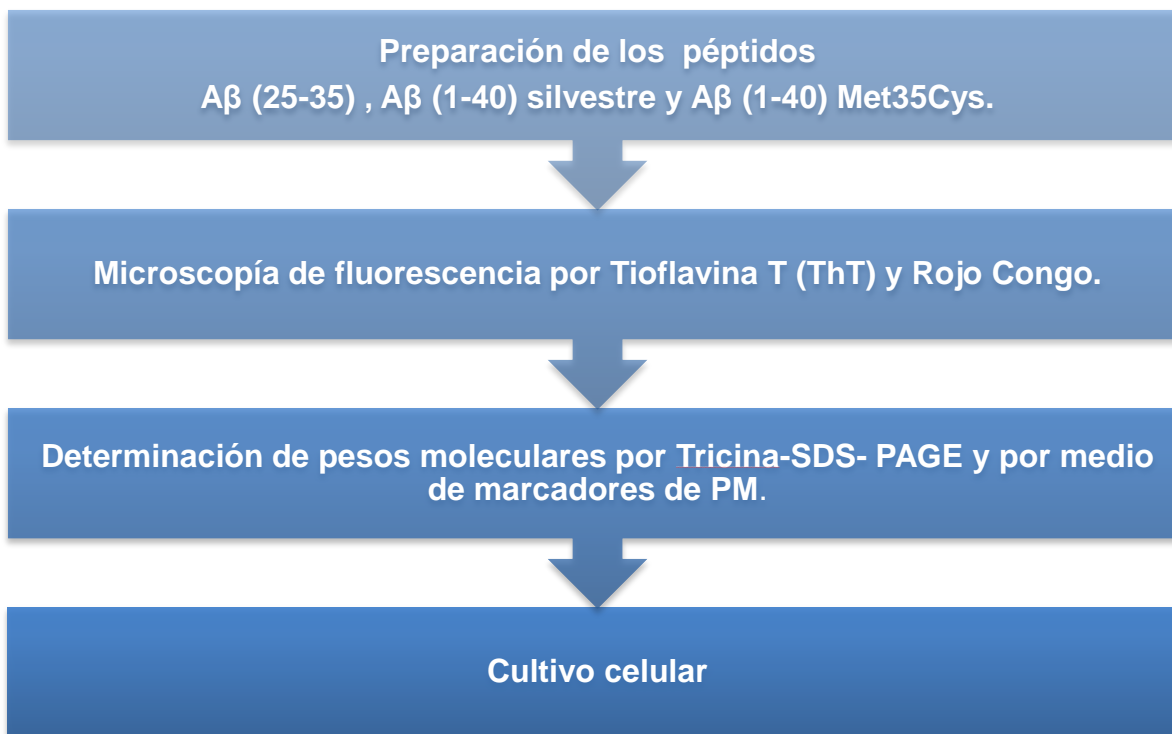


Figura 16.- Estrategia general de proyecto.

5.1. Preparación de los péptidos A β .

Para la preparación de los diferentes péptidos se llevó a cabo el protocolo desarrollado por la Dra. Liliana Quintanar y su equipo del CINVESTAV Unidad Zacatenco México D.F, con algunas modificaciones:

1.-Se pesó 1.0 mg de péptido A β en un tubo Eppendorf y se disolvió suavemente (mezclando con pipeta sin hacer espuma, evitar el vortex), en 200 μ l de NaOH 2.0 mM.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Observaciones: Este procedimiento se realizó cuando se tuvo un lote de péptido liofilizado de más de 1.0 mg, pero cuando se utilizó un liofilizado con la cantidad exacta, se disolvió en los 200 μ l de NaOH 2.0 mM.

2.-Se disgregaron los péptidos en baño sonicador en un período de 10-20 min. En caso de que existan partículas insolubles, se centrifuga a 14,000 rpm / 10 min y se pasa el sobrenadante a un tubo de Eppendorf de 1.5 ml nuevo.

3.-Se diluyó poco a poco el sobrenadante con agua MiliQ estéril mezclando suavemente con pipeta. (Diluirlo de manera brusca favorece a la agregación del péptido en la solución final) y en caso de formarse partículas insolubles, se sónico de nuevo la solución por 10 minutos. Si las partículas formadas no se disolvían, se centrifugó de nuevo la solución.

4.-Se cuantificó la cantidad total de proteína por medio del uso de espectrofotómetro NanoDrop, utilizando como blanco la solución de NaOH 2 mM-agua MiliQ.

5.-Se congelaron los péptidos a -20°C en alícuotas de 50 μ l.

Observaciones: Se procuró usar todo el volumen de la alícuota, ya que el proceso de congelamiento-descongelamiento favorece a la agregación del péptido.

Método alterno:

Cuando se utilizó un lote de péptido de 0.1 mg se preparó mediante el uso de una jeringa para insulina de 100 unidades (se puede utilizar una jeringa Hamilton de 10 o 100 μ l) inyectando la solución de NaOH₂ mM- agua MiliQ al vial con péptido liofilizado, para mezclarlo, y teniendo mucho cuidado de no formar espuma. Posteriormente, se sónico por 20 min, haciendo alícuotas de 50 μ l; y se congeló a -20°C .



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Posteriormente, se diluyeron los péptidos a una concentración de 20 μM , incubándolos a 37,000 rpm / 37°C en el equipo Thermomixer Eppendorf en periodos de 0,12, 24, 48 y 72 horas. Para el caso de los péptidos A β en presencia del ion Cu^{2+} , se preparó una solución stock acorde a lo que menciona Ali *et al*; la cual estuvo formada por 6 mM de Glicina por cada 1 mM de CuSO_4 pentahidratado disueltos en agua MiliQ estéril a una concentración final de 20 mM.

Posteriormente, se diluyó a una concentración de 20 μM y se incubaron las muestras durante 0,12, 24, 48 y 72 horas.

5.2 Microscopía de birrefringencia de Rojo Congo (RC) mediante luz polarizada.

Una vez incubados los péptidos A β a 0,12, 24, 48 y 72 horas en ausencia y presencia de ion Cu^{2+} se realizó el siguiente protocolo modificado de House *et al*.

A los tubos con péptido A β agregado a una concentración de 20 μM se les agregó 1 μL de RC 0.5 % (disuelto en agua MiliQ) y se mezcló muy bien.

Ya mezclados, se cargaron 10 μL de cada solución en zonas marcadas de laminillas pre cargadas de Poli-Lys Fisher Scientific.

Se fijaron por medio de calor, esto se hizo colocando las laminillas en una plancha a una temperatura de aproximadamente 60°C.

Se observaron en un Foto microscopio Fomi III, con un filtro de luz polarizada.

Esta técnica está basada en la birrefringencia del colorante Rojo Congo, la cual por medio de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas que interactúan con las fibras amiloides, que poseen un color verde manzana o amarillento característico al ser observadas bajo luz polarizada (151).



5.3.-Microscopía de fluorescencia por Tioflavina T (ThT) y Rojo Congo (FRC).

Una vez incubados los péptidos A β a 0, 12, 24, 48 y 72 horas a una concentración definida en ausencia y presencia de ion Cu²⁺ (a una concentración de 20 μ M tanto péptido como el ion) se realizó el siguiente protocolo modificado de Cribbs *et al.*

Se cargaron 5 μ L de cada solución en zonas marcadas de laminillas pre-cargadas de Poli-Lys Fisher Scientific. Se fijaron las muestras por medio de calor, esto se hace colocando las laminillas en una plancha o una incubadora a una temperatura de aproximadamente 37°C.

Una vez fijadas, se sumergieron en una solución de Tioflavina T (**ThT**) disuelta en buffer de NaOH-Glicina pH 8.5 a una concentración de 500 μ M por unos segundos.

Se lavaron 2 veces en etanol al 50% por unos pocos segundos.

Se retiró el exceso de alcohol de las laminillas.

Se observaron al microscopio de fluorescencia Leica 1000 con el filtro A.

Observación: Cuando se observaron estructuras del tipo “espinas de pino” se lavaron las laminillas de nuevo con etanol al 50%.

Para el caso de fluorescencia de RC se realizó el mismo procedimiento que se utiliza para la prueba de luz polarizada de RC, con la excepción de que se utilizó un microscopio de fluorescencia Leica 1000 con el filtro I3.

Para estas pruebas (**ThT y RC**), se utilizaron controles que consistían en un corte histológico de riñón con y sin amiloidosis (enfermedad similar a la EA) así como albúmina a una concentración final de 20 μ M y agua MilliQ en presencia y



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



ausencia del ion Cu^{2+} a una concentración de 20 μM . El uso de estos controles era con el fin de determinar si el ion Cu^{2+} era capaz de proporcionar falsos positivos; mientras que el uso de la albúmina como control está basado en reportes de que esta proteína es capaz de formar fibras amiloides (153). Los cortes histológicos se utilizaron para determinar si las modificaciones realizadas sobre la técnica original afectaban la sensibilidad de la prueba para detectar dichas fibras.

5.4.-Geles de Tricina-SDS-PAGE.

Para llevar a cabo los geles de tricina SDS-PAGE se realizó lo siguiente acorde a lo reportado por Schagger, H., y Von Jagow.

Por medio del equipo SAVANT se secaron las muestras de péptido incubado de 0 a 72 horas en presencia y ausencia del ion Cu^{2+} alrededor de 30 minutos a una hora.

Se prepararon geles de acrilamida compuestos por un gel separador del 16% y un gel concentrador de 4% a partir de un stock de acrilamida-bis acrilamida de 99.5% T y 3%C utilizando buffer Roztoky 3x (3M Tris HCl, 0.3% SDS, pH 8.45) Paralelamente, se prepararon los buffer de cátodo (100 mM Tris, 100 mM Tricina, 0.1 % SDS, pH 8.25) como de ánodo (100 mM Tris-HCl, pH 8.9).

Al finalizar de polimerizar el gel, se procedió a agregar 40 μL de buffer de lisis 3x (6% Mercaptoetanol, 12% SDS, 150 mM Tris-HCl, 60% glicerol) a los tubos con muestras de péptido para diluir las muestras en este buffer. A continuación, se desnaturalizaron las muestras a 95°C por 5 minutos en un termobloque.

Se llenó la cámara interior con buffer de cátodo (100 mM Tris, 100 mM Tricina, 0.1 % SDS, pH 8.25) y el tanque (acorde al número de geles) con buffer de ánodo (100 mM Tris-HCl, pH 8.9), y se cargaron 20 μL de solución de los péptidos con buffer de carga 3x en los pocillos, llevando a cabo la electroforesis del gel a 30



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Voltios hasta que las muestras pasaron del gel concentrador, para posteriormente correr el gel a 120 Voltios hasta un centímetro arriba del borde del gel.

Ya una vez concluida la electroforesis, se tiñó el gel con la técnica de Azul de Coomassie acorde a Simpson.

Se colocaron los geles en un recipiente de plástico para microondas, cubriéndolos con 100 ml de solución A (0.0005 % de CBR-250).

Se calentó el recipiente a la máxima capacidad del equipo de microondas hasta la evaporación de la solución A (aproximadamente 2 minutos).

Se dejó enfriar por 5 minutos a temperatura ambiente con agitación constante.

Se eliminó la solución A, y se lavó con agua MiliQ.

Se agregó la solución B (0.00005 % de CBR-250) y se calentó la solución a la máxima potencia del microondas por 80 segundos.

Se desechó la solución B y se lavó con agua MiliQ.

Se agregó la solución C (0.00002 % de CBR-250) y se calentó la solución a la máxima potencia del microondas por 80 segundos.

Se desechó la solución C y se lavó con agua MiliQ.

Para llevar a cabo la destinción del gel, se colocaron los geles en la solución D (10% Ácido acético glacial) calentando a la máxima potencia del microondas por 80 segundos.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Se colocó una pieza de Kimwipe para absorber el exceso de colorante. Los geles se dejaron enfriar por 5 minutos, observándose bandas con 5 ng de proteína total después de hacer este procedimiento por triplicado.

5.5.-Ensayos de viabilidad celular.

Para llevar a cabo el ensayo de viabilidad celular se procedió a lo siguiente:

Se sembraron células C-6 de Glioblastoma de rata en placas de 100 mm con 10 ml de medio de cultivo DMEM Advanced con 2% de suero fetal bovino, 1% de glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de antibióticos-antimicóticos a una dilución 1:10 (1 ml de suspensión celular por cada 9 ml de medio DMEM).

Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se les retiró todo el medio de cultivo y se les aplicó un volumen de tripsina a la monocapa de células y se incubaron a 37°C en una incubadora con fuente de CO₂ por 5 minutos.

Una vez pasados los 5 minutos, se neutralizó la tripsina aplicando dos volúmenes de medio DMEM por cada uno de tripsina (1:2). Pasando esta solución a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó a 1,000 rpm por 5 minutos.

Ya una vez acabada la centrifugación, se retiró el medio con tripsina, y se homogenizó el botón de células que quedaron en el fondo del tubo con medio DMEM nuevo con la misma composición del medio DMEM que se utilizó para su cultivo.

Ya homogenizados, se tomó una alícuota de 4 µL de células en medio DMEM y se mezclaron con 16 µL de azul de tripano, realizando una dilución de 1:5. Hecha esta dilución, se colocó 10 µL de suspensión celular con colorante en la cámara de Neubauer.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Utilizando el objetivo de 10X en el microscopio, se contó el número de células vivas (las cuales son birrefringentes mientras que las muertas muestran un color azulado) en las cuatro cuadrículas de 4 x 4 de la cámara, registrando el número de células.

Se cuantifico el número de células en el cuadrante central de 5x5 registrando el número de células.

Se realizó el cálculo del total de células empleando la siguiente operación:

Número de células / ml = (Promedio de las 4 cuadrículas 4 x 4) por (Factor de dilución =5) por (10,000). (El número promedio de las cuadrículas 4 x 4 debe ser similar al cálculo realizado con el total de células en la cuadrícula central de 5 x5).

Se multiplicó el número de células/ml por el volumen en el cual se resuspendieron y disgregaron las células del cultivo para obtener la cantidad total de células producidas.

Tomando en cuenta el total de células contabilizadas y el volumen total, se colocó el volumen correspondiente a 15,000 células / 200 µL por pozo en una placa de 96 pozos. Hecho esto, se incubaron las células en una incubadora de CO₂ a 37° C por 24 horas.

Una vez pasadas las 24 horas, se diluyeron los agregados de los péptidos stock concentrados en presencia y ausencia del ion Cu²⁺ a 0 y 24 horas de incubación, así como los controles (albúmina, CuSO₄.Glicina) en medio DMEM a una concentración final de [10 µM], y los controles de NaOH 2mM (en una relación de 1:8) en un volumen total de 200 µL.

Al mismo tiempo, ya fijadas las células a la placa de 96 pozos, se les retiró todo el medio DMEM de los pocillos utilizando una micropipeta multicanal para



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



posteriormente agregar las soluciones de péptidos y de controles diluidos en DMEM, por triplicado.

Se incubaron las células con medio DMEM con tratamientos y controles en una incubadora de CO₂ a 37° C por 24 horas.

Ya pasadas las 24 horas de exposición, a las células se les retiró el medio DMEM, y se les agregó a cada pozo 100 µL del colorante Azul de Alamar a una dilución 1:10 en DMEM fresco incubando en una incubadora de CO₂ a 37° C por una hora y media.

Una vez transcurrida la hora y media se leyó la placa en un espectrofotómetro de microplacas a longitudes de onda de $\lambda = 570\text{nm}$ y de $\lambda = 600\text{ nm}$.

Para determinar el número total de células vivas, se restó el valor obtenido de $Abs_{600} - Abs_{570}$ del blanco (DMEM en ausencia de células y tratamientos) para posteriormente restar este valor a los valores obtenidos de la misma operación.

Ya obtenidos los valores netos, se dividió el valor de los tratamientos y de los controles entre el valor del control negativo (células incubadas sólo en presencia de medio DMEM), y se multiplicó por 100%. Se realizó un promedio de los valores de los tratamientos, así como de su desviación estándar (DS) para posteriormente usar estos datos para obtener el gráfico de viabilidad celular.



Capítulo VI.

RESULTADOS.

6.1.-Microscopía de birefringencia de Rojo Congo (RC) por luz polarizada.

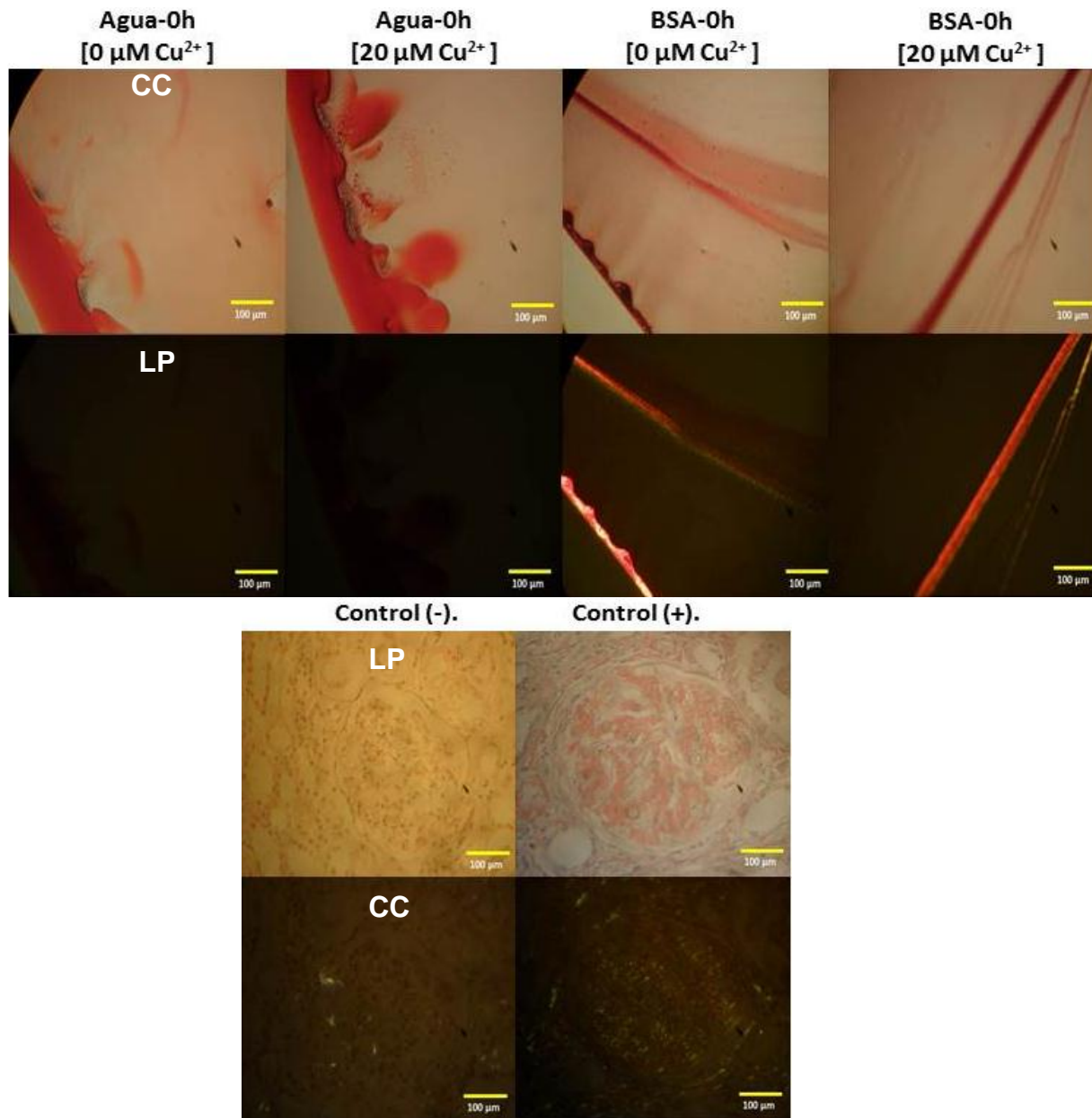


Figura 17.- Controles de la técnica microscopía de birrefringencia de RC por luz polarizada. **CC** = Campo claro , **LP**= Luz polarizada. **BSA** =Albúmina serica bovina. **Escala = 100 μm**. Tanto a 0 como 72 horas no se observaron señales positivas en los controles negativos de esta técnica.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.

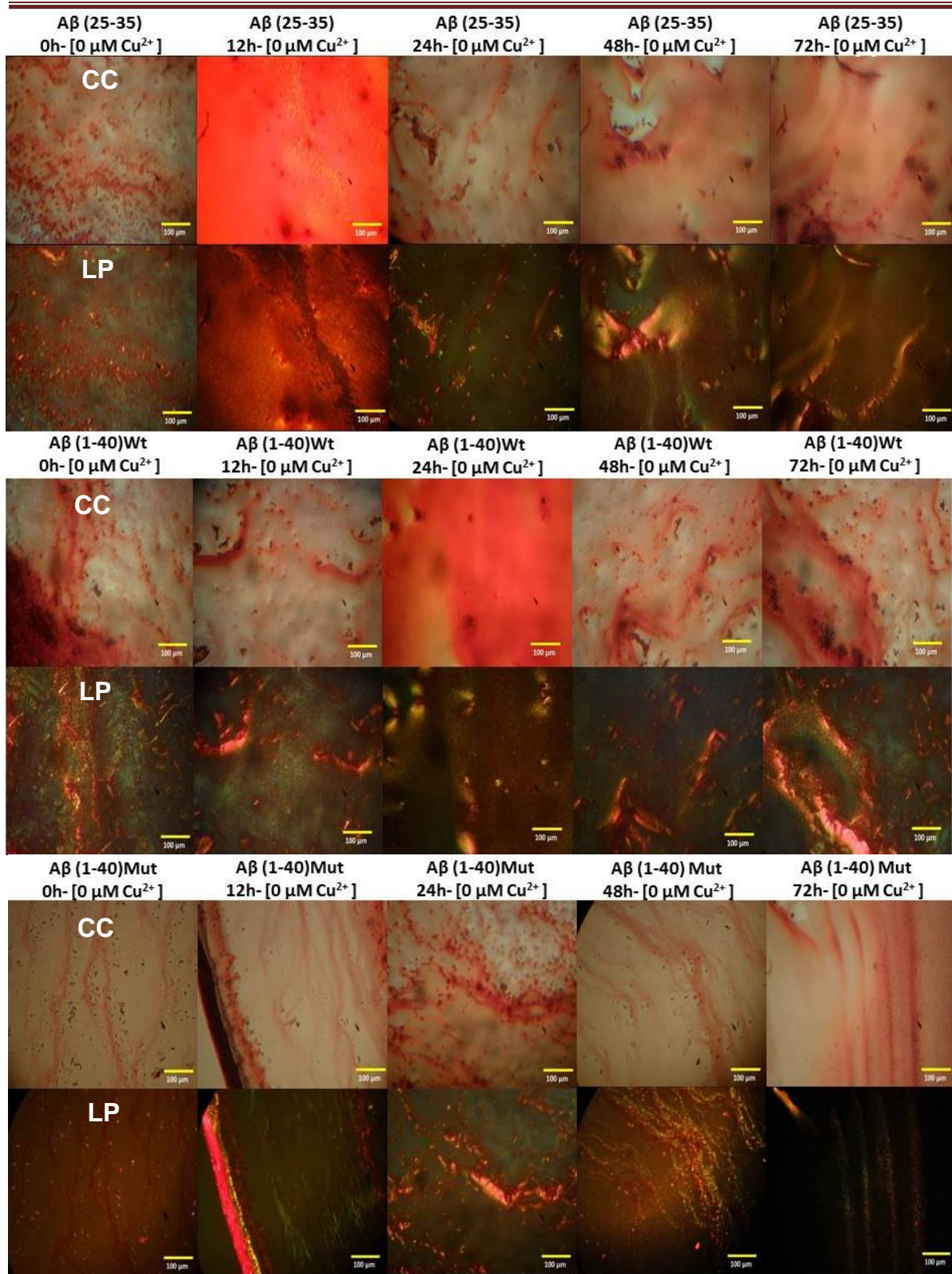


Figura 18.- Cinética de agregación de los péptidos Aβ (25-35), Aβ (1-40) silvestre y mutante a una concentración de 20μM de cada péptido en ausencia del ion Cu²⁺ a una concentración de 20 μM monitoreada por la prueba de microscopía de birrefringencia de RC por luz polarizada. **CC** = Campo claro, **LP**= Luz polarizada. **Escala = 100 μm.**



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.

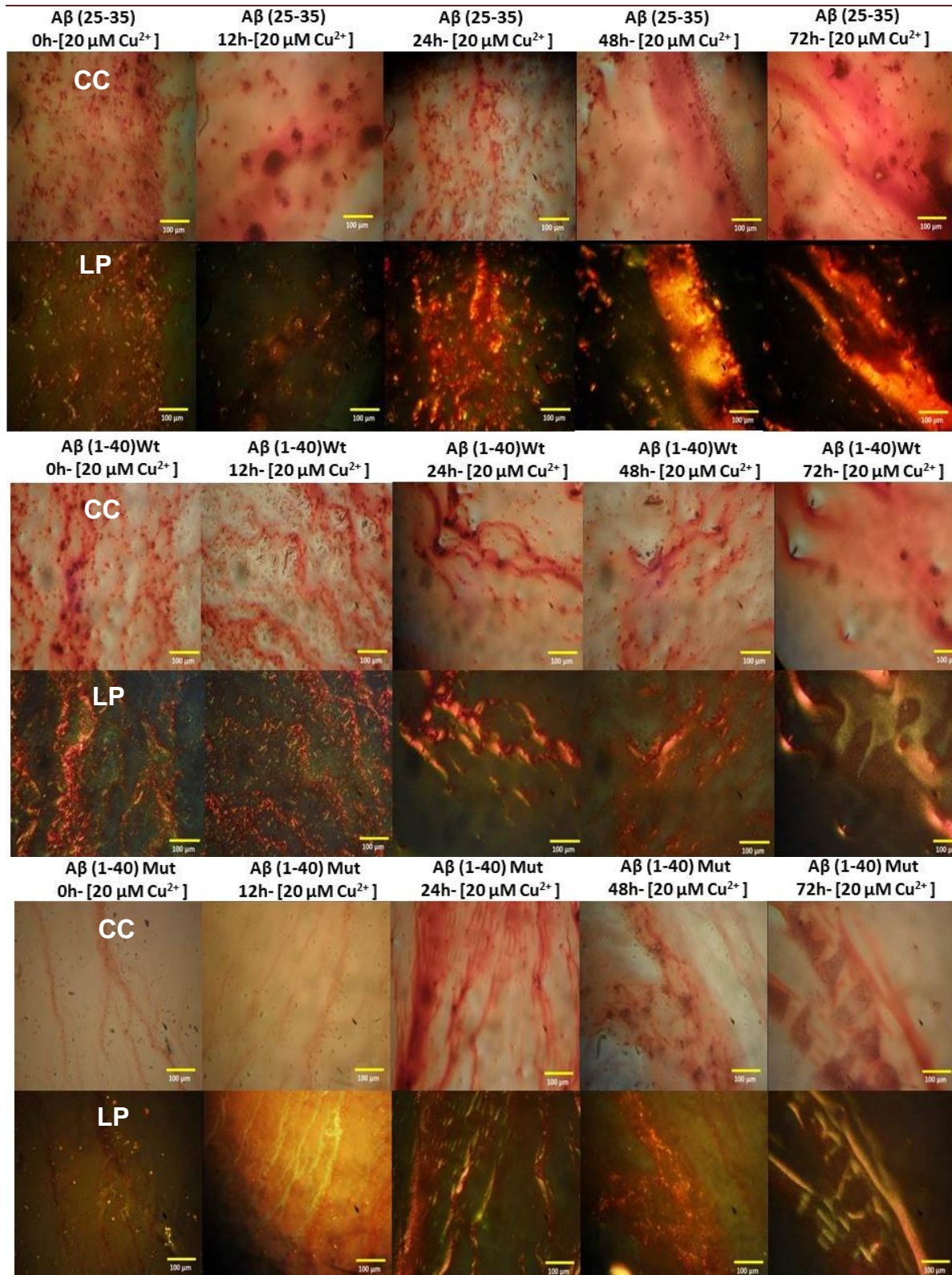


Figura 19.- Cinética de agregación de los péptidos Aβ (25-35), Aβ (1-40) silvestre y mutante a una concentración de 20μM de cada péptido en presencia del ion Cu²⁺ a una concentración de 20 μM monitoreada por la prueba de microscopía de birrefringencia de RC por luz polarizada. **CC** = Campo claro, **LP**= Luz polarizada. **Escala = 100 μm.**



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



6.2.- Microscopía de fluorescencia de TioflavinaT (ThT) y Rojo Congo (FRC).

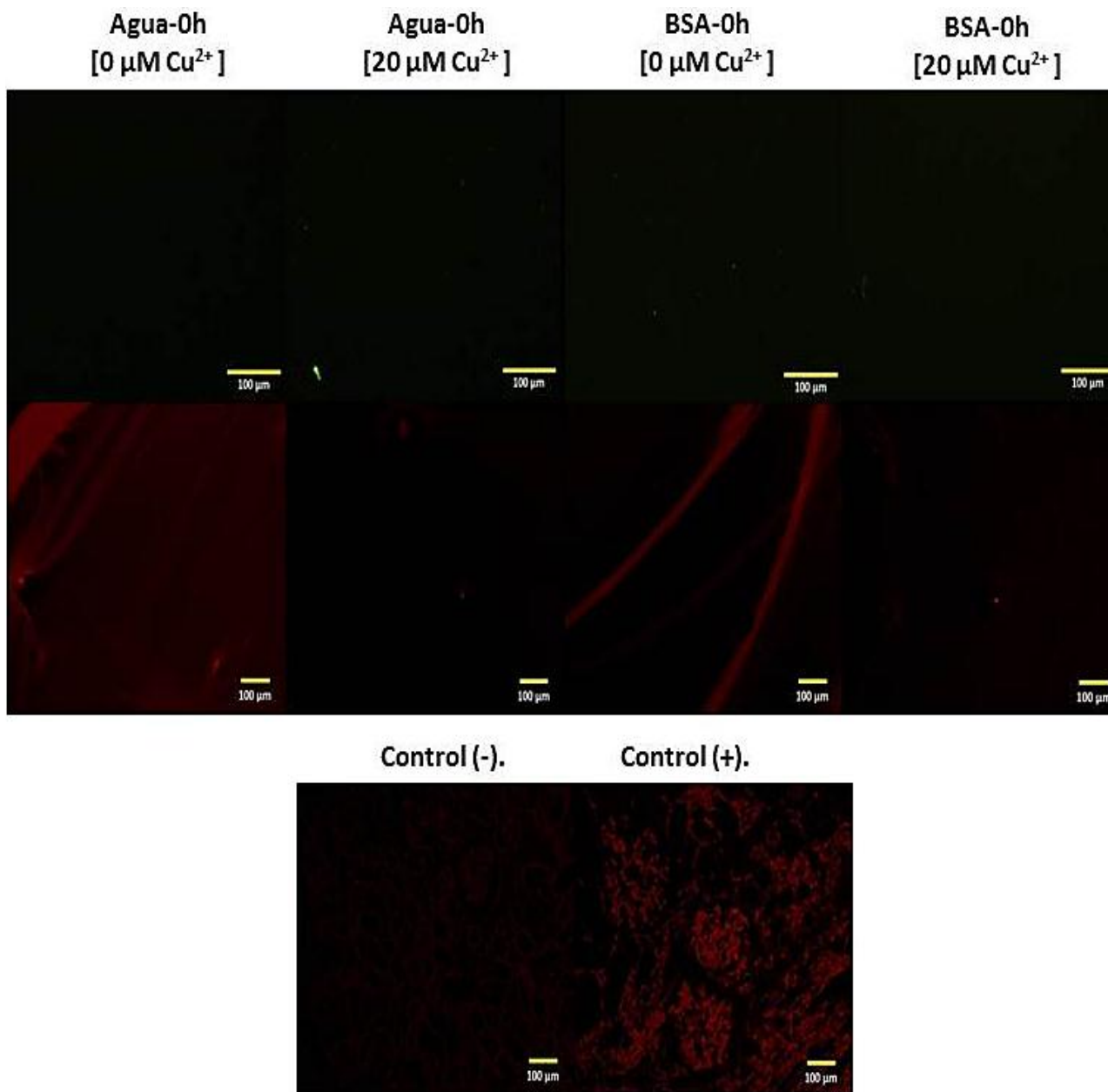
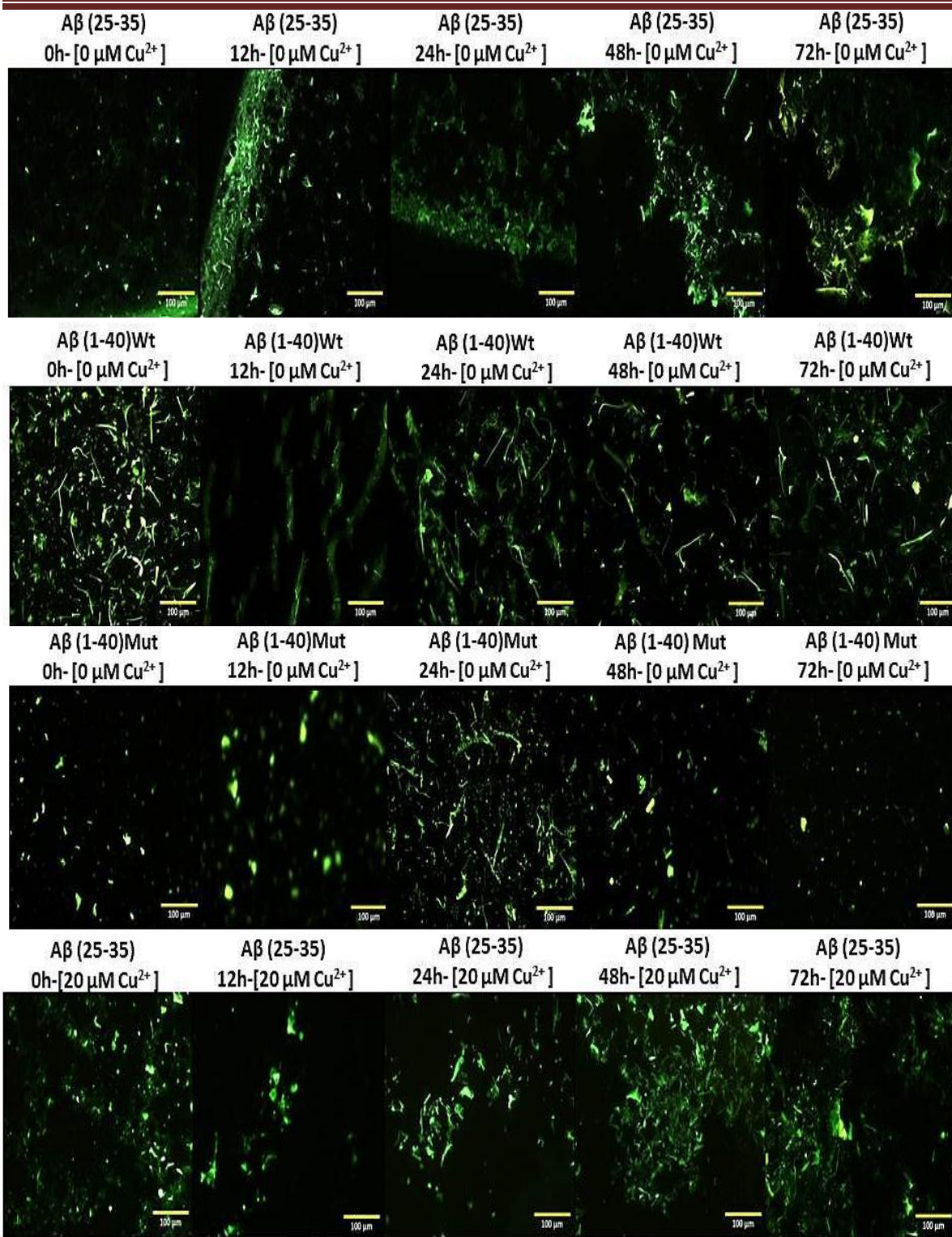


Figura 20. Controles para la prueba de la ThT y la FRC. **BSA** =Albúmina sérica bovina a una concentración de 20 μM . Tanto a 0 como a 72 horas no se observaron señales positivas en los controles negativos de esta técnica. **Escala = 100 μm**

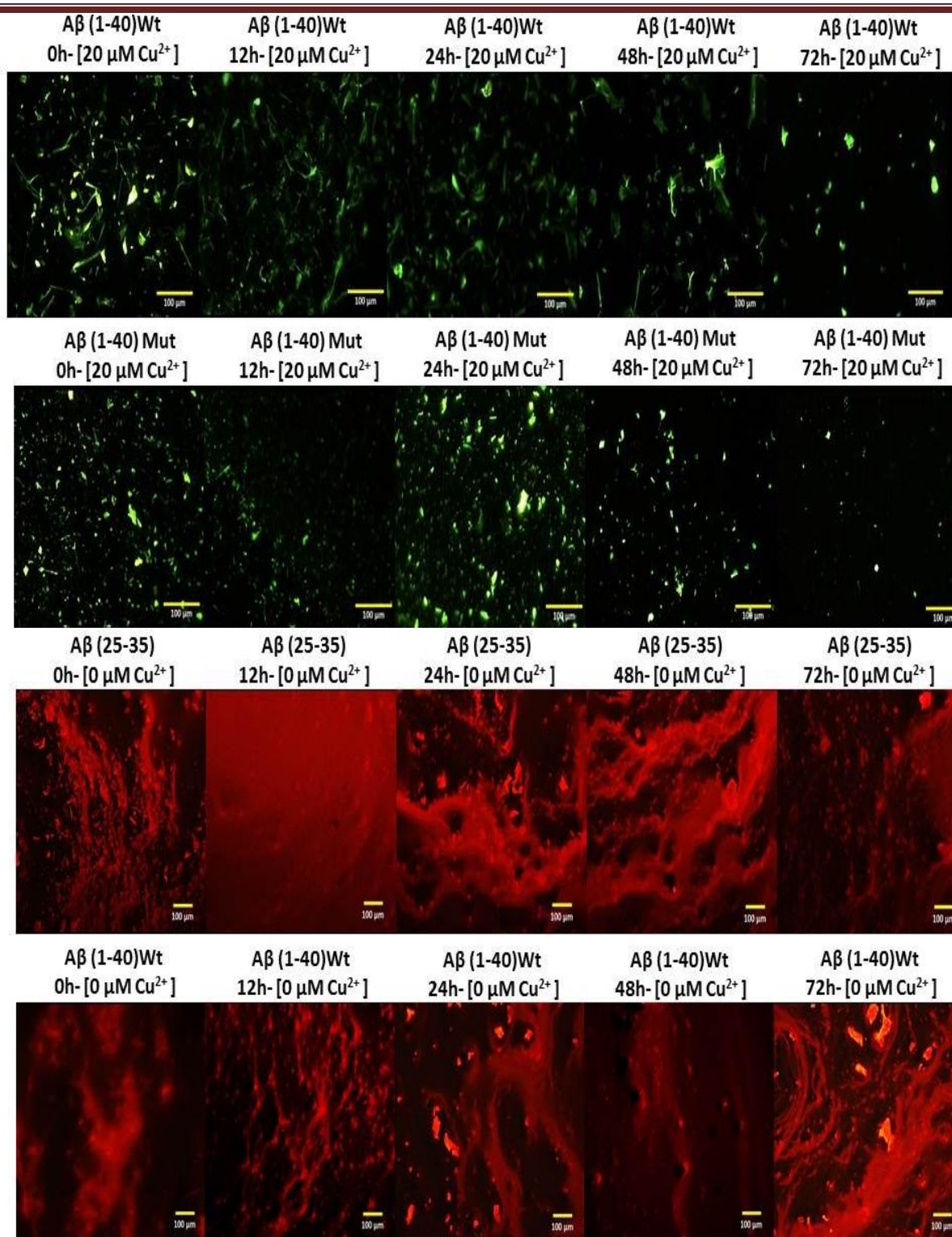


EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.





EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.





EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.

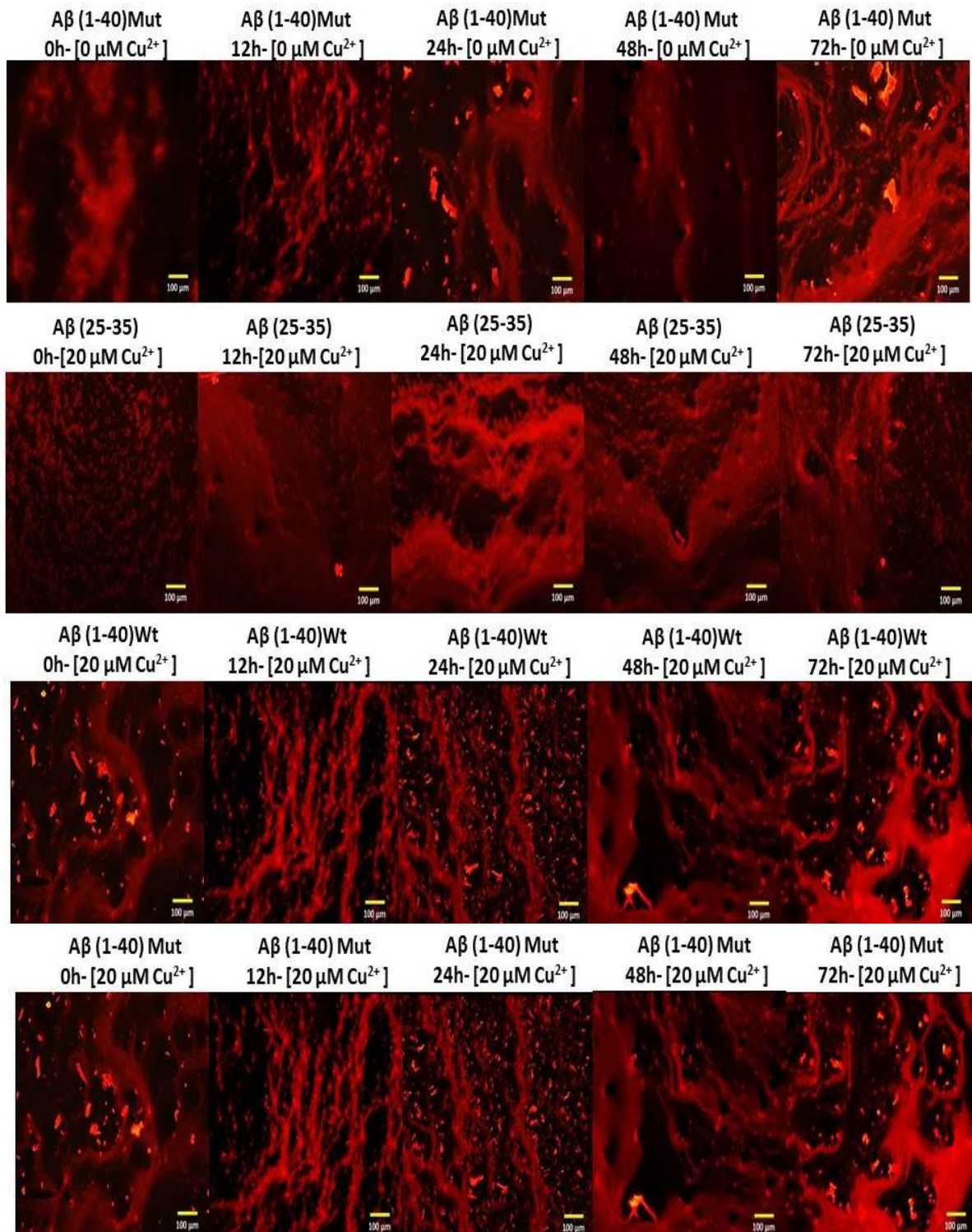


Figura 21.-Cinéticas de agregación del péptido Aβ (25-35), Aβ (1-40) silvestre y mutante a una concentración de 20μM de cada péptido en ausencia y presencia del ion Cu²⁺ a una concentración de 20 μM monitoreadas por la prueba de la ThT y FCR. **Escala = 100 μm**



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



El análisis de las fotografías, permitió construir las siguientes tablas, en las que se resumen los resultados encontrados.

	Ausencia del ion Cu^{2+} .			Presencia del ion Cu^{2+} .		
Tiempo (horas)	Fluorescencia de Tioflavina T	Birrefringencia de Rojo Congo	Fluorescencia de Rojo Congo	Fluorescencia de Tioflavina T	Birrefringencia de Rojo Congo	Fluorescencia de Rojo Congo
0	+	+	+	+	+	+
12	+	-	-	+	+	-
24	+	+	+	+	+	+
48	+	+	+	+	+	+
72	+	+	+	+	+	+

Tabla 2 .- Tabla comparativa de las diferentes técnicas de microscopía para la cinética de agregación del péptido $\text{A}\beta(25-35)$.

	Ausencia del ion Cu^{2+} .			Presencia del ion Cu^{2+} .		
Tiempo (horas)	Fluorescencia de Tioflavina T	Birrefringencia de Rojo Congo	Fluorescencia de Rojo Congo	Fluorescencia de Tioflavina T	Birrefringencia de Rojo Congo	Fluorescencia de Rojo Congo
0	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+
48	+	+	+	+	+	+
72	+	+	+	-	+	+

Tabla 3 .- Tabla comparativa de las diferentes técnicas de microscopía para la cinética de agregación del péptido $\text{A}\beta(1-40)$ silvestre.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Tiempo (horas)	Ausencia del ion Cu^{2+} .			Presencia del ion Cu^{2+} .		
	Fluorescencia de Tioflavina T	Birrefringencia de Rojo Congo	Fluorescencia de Rojo Congo	Fluorescencia de Tioflavina T	Birrefringencia de Rojo Congo	Fluorescencia de Rojo Congo
0	+	-	+	+	-	+
12	+	-	+	+	-	+
24	+	+	+	+	+	+
48	+	+	+	+	+	+
72	+	+	+	+	+	+

Tabla 4- Tabla comparativa de las diferentes técnicas de microscopía para la cinética de agregación del péptido A β (1-40) (Met35Cys).

Una vez comparados los datos de la microscopía por luz polarizada, Fluorescencia de Tioflavina T y Fluorescencia de Rojo Congo, utilizadas para demostrar la presencia o ausencia de láminas betas (una característica primordial de las fibras amiloides). Se puede mencionar, que el péptido A β (25-35) en ausencia de ion Cu^{2+} a 0 24 48 y 72 horas de incubación, así como en presencia del ion Cu^{2+} , durante todos los períodos, y el péptido A β (1-40) silvestre tanto en ausencia como en presencia del ion Cu^{2+} en todos los períodos, y finalmente, el péptido A β (1-40) mutante a 24, 48 y 72 horas de incubación, mostraron resultados positivos a la presencia de fibras amiloides, utilizando la birrefringencia de Rojo Congo bajo luz polarizada. La presencia de dichas láminas beta se puede demostrar en primera instancia por el color verde manzana o dorado de las muestras observadas utilizando la birrefringencia del Rojo Congo bajo luz polarizada. Lamentablemente, existen reportes que mencionan, que en ciertas ocasiones, esta prueba puede arrojar falsos negativos.

Por lo cual, se utilizaron tanto las técnicas de fluorescencia de Rojo Congo como de Tioflavina T, para corroborar los resultados obtenidos de la técnica anterior.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Observándose en la prueba de RCF, resultados positivos en el péptido A β (25-35) en ausencia y presencia del ion Cu²⁺ a 0, 24,48 y 72 horas de incubación, en el péptido A β (1-40) silvestre y mutante en ausencia y presencia del ion Cu²⁺, al igual que el péptido A β (25-35) en ausencia y presencia del ion Cu²⁺ en todos los periodos, así como el A β (1-40) mutante y el A β (1-40) silvestre en ausencia del ion Cu²⁺. Mientras que el A β (1-40) silvestre en presencia del ion Cu²⁺ a 0,12, 24, y 48 horas de incubación, mostró resultados positivos a la presencia de fibras amiloides usando tanto la prueba de ThT y RCF.

6.3. Geles de Tricina-SDS-PAGE.

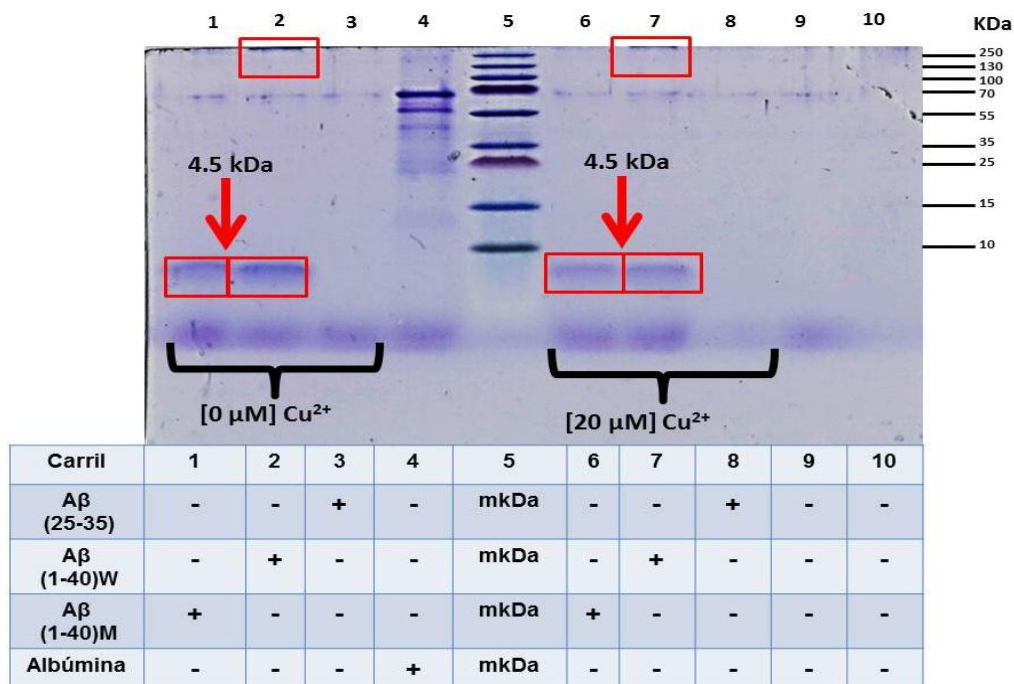


Figura 22- Gel de acrilamida compuesto de un gel separador al 16% y un gel concentrador de 4% de los diferentes péptidos A β agregados a 0 horas en presencia y ausencia del ion Cu²⁺ [20 μ M], usando como control albúmina sérica bovina ambos a una concentración de 1 μ g de proteína total. Marcador de peso molecular Protein Ladder Marca Thermo (mkDa). (+) Presencia, (-) Ausencia.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.

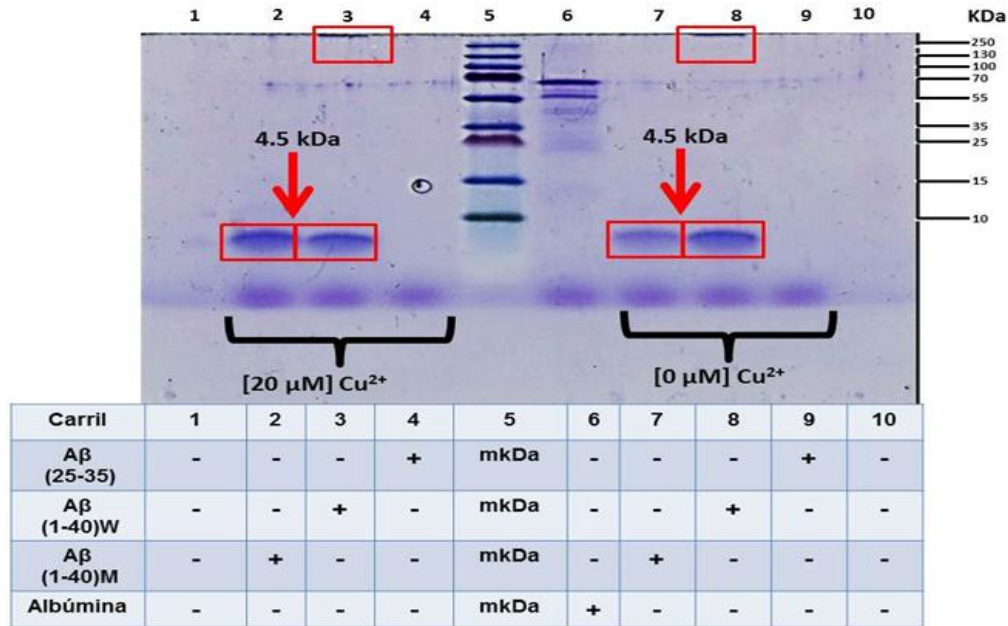


Figura 23- Gel de acrilamida compuesto de un gel separador al 16% y un gel concentrador de 4% de los diferentes péptidos Aβ agregados a 24 horas en presencia y ausencia del ion Cu^{2+} [20 μM], usando como control albúmina sérica bovina ambos a una concentración de 1 μg de proteína total. Marcador de peso molecular Protein Ladder Marca Thermo (mkDa). (+) Presencia, (-) Ausencia.

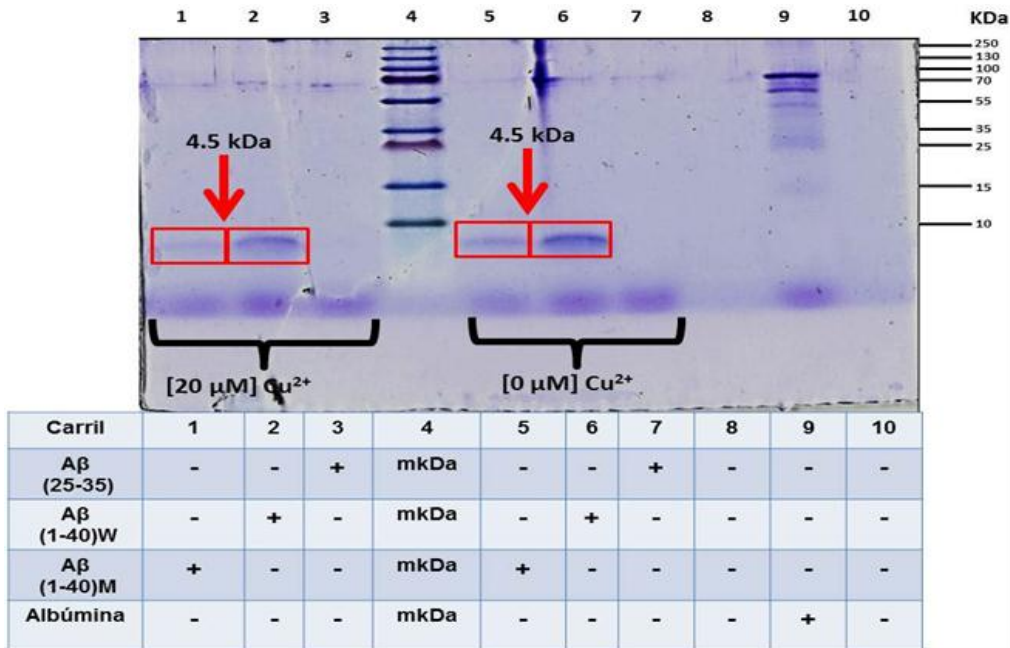


Figura 24- Gel de acrilamida compuesto de un gel separador al 16% y un gel concentrador de 4% de los diferentes péptidos Aβ agregados a 48 horas en presencia y ausencia del ion Cu^{2+} [20 μM], usando como control albúmina sérica bovina ambos a una concentración de 1 μg de proteína total. Marcador de peso molecular Protein Ladder Marca Thermo (mkDa). (+) Presencia, (-) Ausencia.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.

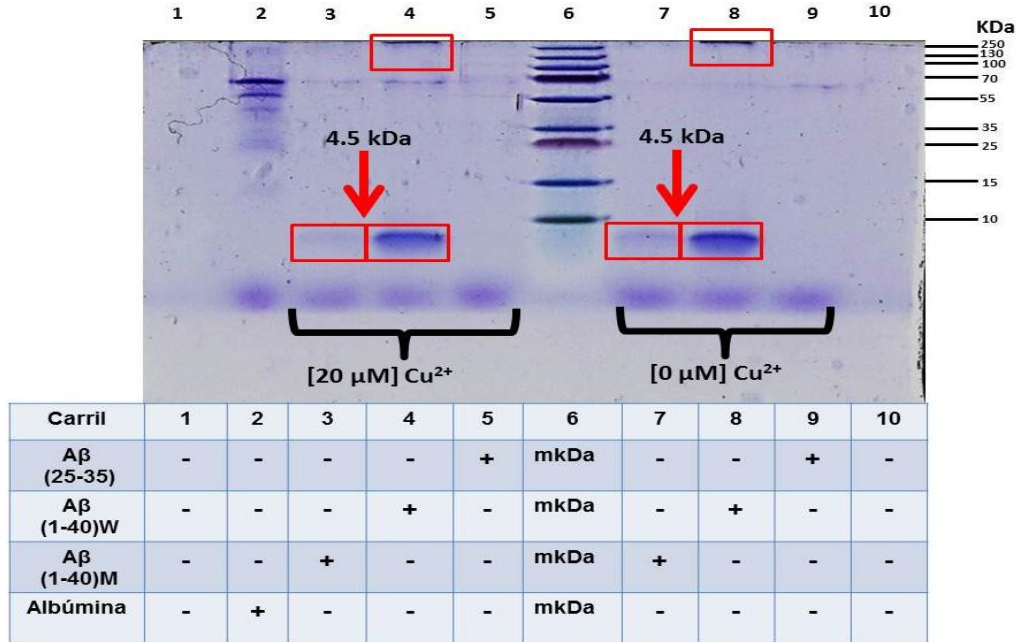


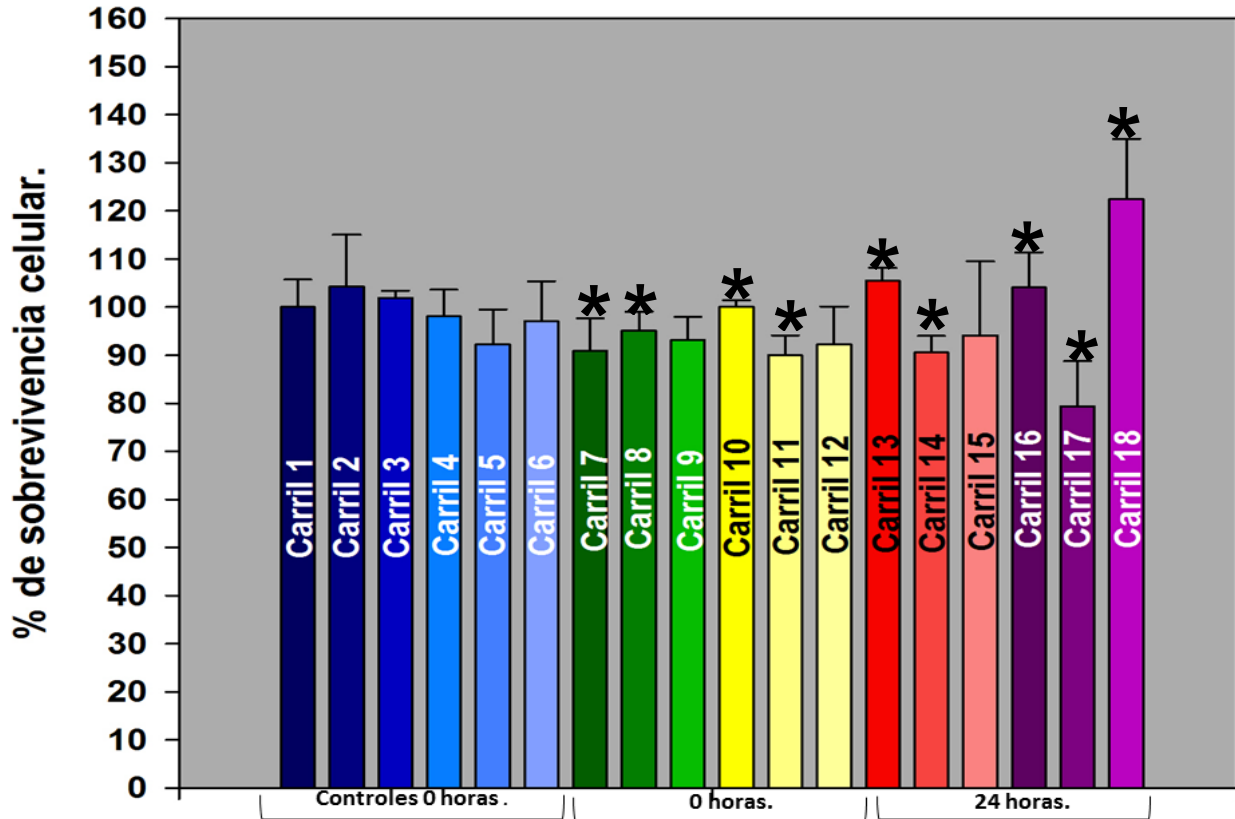
Figura 25- Gel de acrilamida compuesto de un gel separador al 16% y un gel concentrador de 4% de los diferentes péptidos Aβ agregados a 72 horas en presencia y ausencia del ion Cu²⁺ [20 μM], usando como control albúmina sérica bovina ambos a una concentración de 1μg de proteína total. Marcador de peso molecular Protein Ladder Marca Thermo (mkDa). (+) Presencia, (-) Ausencia.

Al comparar los diferentes geles a las distintas horas, y calculando sus respectivos pesos moleculares, se observó, que el péptido Aβ (25-35) no mostró ningún tipo de señal, posiblemente debido a su pequeño tamaño molecular, pero los péptidos Aβ (1-40) silvestre y la mutante (Met35Cys), mostraron monómeros de 4.5 kDa en todos los periodos, en presencia y ausencia del ion Cu²⁺. Siendo el péptido Aβ (1-40) silvestre, el único que tuvo agregados en la parte superior del gel separador a 0, 24 y 72 horas de incubación en presencia y ausencia del ion Cu²⁺.



6.4. Citotoxicidad de los péptidos Aβ sobre la línea celular C-6 de Glioblastoma de rata Wistar (*Rattus norvegicus albinus*).

Efecto de los péptidos Aβ (25-35), Aβ (1-40) silvestre y Aβ (1-40)Mut (Met35Cys) en presencia y ausencia del ión cúprico (Cu²⁺) agregados 0 y 24 horas sobre células C-6 Glioblastoma de rata Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) a 24 horas de incubación.



Cu ²⁺ [20 μM]	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Albúmina [10 μM]	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaOH Aβ (25-35)	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
NaOH Aβ (1-40) silvestre	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
NaOH Aβ (1-40) Mutante	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Aβ (25-35) [10 μM]	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Aβ (1-40) Silvestre [10 μM]	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Aβ (1-40) Mutante [10 μM]	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Carril	Tratamiento
1	Células C-6 sin tratamiento.
2	Albúmina sérica bovina [10 μ M].
3	CuSO ₄ -Glicina [20 μ M].
4	Buffer de NaOH (1:8) del péptido A β (25-35).
5	Buffer de NaOH (1:8) del péptido A β (1-40) silvestre.
6	Buffer de NaOH (1:8) del péptido A β (1-40) mutante.
7	Péptido A β (25-35). [10 μ M]. 0 horas de incubación.
8	Péptido A β (1-40) silvestre. [10 μ M]. 0 horas de incubación.
9	Péptido A β (1-40) mutante. [10 μ M]. 0 horas de incubación.
10	Péptido A β (25-35) [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 0 horas de incubación.
11	Péptido A β (1-40) silvestre [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 0 horas de incubación.
12	Péptido A β (1-40) mutante [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 0 horas de incubación.
13	Péptido A β (25-35). [10 μ M]. 24 horas de incubación.
14	Péptido A β (1-40) silvestre [10 μ M]. 24 horas de incubación.
15	Péptido A β (1-40) mutante [10 μ M]. 24 horas de incubación.
16	Péptido A β (25-35) [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación.
17	Péptido A β (1-40) silvestre [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación.
18	Péptido A β (1-40) mutante. [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación.

Figura 26. Efecto citopático sobre la línea celular C-6 de Glioblastoma de rata de los diferentes péptidos A β a una concentración de 10 μ M, en presencia y ausencia del ion Cu²⁺ (CuSO₄-Glicina) a una concentración de 20 μ M, agregados a 0 y 24 horas. (+) Presencia, (-) Ausencia. * Diferencia significativa usando la prueba *t*-Student para muestras independientes. Barras de desviación estándar marcadas en negro.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Tratamiento	Con diferencia significativa con el tratamiento de : ($p \leq 0.050$ y con un intervalo de confianza del 95% utilizando la prueba de <i>t</i>-Student para variables independientes)
Células C-6 Glioblastoma sin tratamiento.	Péptido A β (1-40) silvestre [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 0 horas de incubación, Péptido A β (1-40) silvestre [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación, Péptido A β (1-40) mutante [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación.
CuSO₄-Glicina [20 μM].	Péptido A β (1-40) silvestre [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación.
Albúmina [10 μM].	Péptido A β (1-40) silvestre [10 μ M]. 0 horas de incubación, Péptido A β (1-40) silvestre [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 0 horas de incubación. Péptido A β (1-40) silvestre [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación, Péptido A β (1-40) silvestre [10 μ M]. 24 horas de incubación, Péptido A β (1-40) mutante [10 μ M]. 0 horas de incubación. Péptido A β (1-40) mutante [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación.
Buffer de NaOH (1:8) del péptido Aβ (25-35).	Péptido A β (1-40) silvestre [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación, Péptido A β (1-40) mutante [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación.
Buffer de NaOH (1:8) del péptido Aβ (1-40) silvestre.	Péptido A β (25-35) [10 μ M]. 24 horas de incubación, Péptido A β (1-40) mutante [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación.
Buffer de NaOH (1:8) del péptido Aβ (1-40) mutante.	Péptido A β (1-40) mutante [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación.
Péptido Aβ (1-40) silvestre. [10 μM]. 0 horas de incubación.	Péptido A β (25-35) [10 μ M]. 24 horas de incubación, Péptido A β (1-40) mutante [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación.
Péptido Aβ (1-40) silvestre. [10 μM]- CuSO₄-Glicina [20 μM]. 0 horas de incubación.	Péptido A β (25-35) [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 0 horas de incubación, Péptido A β (25-35) [10 μ M]. 24 horas de incubación, Péptido A β (25-35) [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación, Péptido A β (1-40) mutante [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación.
Péptido Aβ (1-40) silvestre. [10 μM]. 24 horas de incubación.	Péptido A β (25-35) [10 μ M]. 24 horas de incubación, Péptido A β (1-40) mutante [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 24 horas de incubación, Péptido A β (25-35) [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 0 horas de incubación.
Péptido Aβ (1-40) silvestre.	Péptido A β (25-35) [10 μ M]- CuSO ₄ -Glicina [20 μ M]. 0 horas de incubación, Péptido A β (25-35) [10 μ M]. 24 horas de incubación,



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



[10 µM]- CuSO₄-Glicina [20 µM]. 24 horas de incubación.	Péptido Aβ (25-35) [10 µM]- CuSO ₄ -Glicina [20 µM]. 24 horas de incubación, Péptido Aβ (1-40) mutante [10 µM]- CuSO ₄ -Glicina [20 µM]. 24 horas de incubación.
Péptido Aβ (25-35). [10 µM]. 0 horas de incubación.	Péptido Aβ (25-35) [10 µM]. 24 horas de incubación, Péptido Aβ (1-40) mutante [10 µM]- CuSO ₄ -Glicina [20 µM]. 24 horas de incubación.
Péptido Aβ (25-35). [10 µM]- CuSO₄- Glicia [20 µM]. 0 horas de incubación.	Péptido Aβ (25-35) [10 µM]. 24 horas de incubación, Péptido Aβ (1-40) mutante [10 µM]- CuSO ₄ -Glicina [20 µM]. 24 horas de incubación.
Péptido Aβ (25-35). [10 µM]. 24 horas de incubación	Péptido Aβ (1-40) mutante [10 µM]. 0 horas de incubación, Péptido Aβ (1-40) mutante [10 µM]- CuSO ₄ -Glicina [20 µM]. 24 horas de incubación.
Péptido Aβ (1-40) mutante. [10 µM]. 0 horas de incubación.	Péptido Aβ (1-40) mutante [10 µM]- CuSO ₄ -Glicina [20 µM]. 24 horas de incubación.
Péptido Aβ (1-40) mutante. [10 µM]- CuSO₄-Glicina [20 µM]. 0 horas de incubación	Péptido Aβ (1-40) mutante [10 µM]- CuSO ₄ -Glicina [20 µM]. 24 horas de incubación.

Tabla 5.-Diferencias significativas entre los diferentes tratamientos aplicados sobre la línea celular C-6 de Glioblastoma de rata, usando la prueba *t*-Student para variables independientes.

Tras analizar el gráfico y los resultados obtenidos a través de la prueba *t*-Student para variables independientes, se puede observar que los tratamientos usados como controles, no mostraron diferencias significativas entre ellos, sugiriendo que no existe diferencia en la sobrevivencia celular entre controles. Pero se observa



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



que entre los mismos péptidos A β , existen diferencias significativas, tanto en presencia y ausencia del ion Cu²⁺, como en los períodos de 0 y 24 horas de incubación. Observándose que el péptido A β (25-35) disminuye significativamente su efecto citotóxico conforme avanza el tiempo de incubación, tanto en presencia como ausencia del ion Cu²⁺. En contraste, el péptido A β (1-40) silvestre posee diferencias significativas entre este péptido y los péptidos A β (25-35) y A β (1-40) mutante, observándose que este péptido a un período de 24 horas de incubación en presencia del ion Cu²⁺ posee el efecto citotóxico más marcado con un porcentaje de sobrevivencia del 79% (alrededor de 11,850 células por pozo). Mientras que el péptido A β (1-40) mutante a 24 horas de incubación en presencia del ion Cu²⁺ mostró un incremento en el número de células, diferenciándose de los péptidos A β (1-40) silvestre y A β (25-35) en presencia y ausencia del ion Cu²⁺, mostrando valores mayores del 100% (15,000 células por pozo), indicando que el número de células alcanzó a 18,300 células por pozo aproximadamente, sugiriendo con esto, que el péptido en vez de resultar citotóxico para las células, favoreció la proliferación celular.



Capítulo VII.

DISCUSIÓN.

Un hecho relevante en la patología de la EA, es la capacidad del péptido A β de agregarse desde monómeros con estructuras del tipo “espiral aleatorio” a oligómeros, y finalmente, a fibras amiloides ricas en estructuras del tipo lámina beta que conforman placas amiloides, siendo las primeras, citotóxicas tanto a nivel in vitro como in vivo. Durante mucho tiempo, se consideraron a las fibras amiloides como las responsables de la patología de la EA. Pero actualmente, se ha postulado, que los intermediarios de agregación y/o oligómeros son los efectores de la patología de la EA. Por lo cual, resulta de gran interés en el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento de la EA el proceso de formación de oligómeros del péptido A β así como cuáles son los factores relevantes para esto.

Uno de estos factores, es el daño oxidativo provocado por el péptido A β , fruto de la oxidación de la Metionina 35, sobre todo la formación del metóxido de Metionina 35 (**Met(O) 35**) y la reducción de iones metálicos de transición, tales como el ion Cu²⁺. Debido a que ambos poseen la capacidad tanto de favorecer como de inhibir la agregación del péptido A β , así como de la formación de ROS citotóxicas. Por este motivo, se investigó acerca del efecto de la metionina (mediante el uso de un péptido A β mutante carente de ésta), así como del ion Cu²⁺, con lo cual se obtuvieron diferentes resultados.

Mediante el uso de la microscopía por birrefringencia de Rojo Congo bajo luz polarizada, fluorescencia de Tht y Rojo Congo, se contempló que los péptidos A β (a excepción de algunas muestras a determinados tiempos) mostraron resultados positivos a la presencia de fibras amiloides, tanto en presencia como en ausencia del ion Cu²⁺. Estos datos concuerdan con lo sugerido por Bitán *et al* (**156**) y Smith *et al* (**98**); ambos grupos proponen dos posibles vías en la formación de fibras amiloides, en la primera, la agregación del péptido A β se ve favorecida por la



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



oxidación de la metionina 35, mientras que la segunda considera necesaria la reducción del ion Cu^{2+} (proceso dependiente de la oxidación de la metionina 35) para el proceso de agregación del péptido $\text{A}\beta$ mediante el plegamiento de los extremos NH_2 y COOH del péptido $\text{A}\beta$, favoreciendo así la formación de fibras amiloides.

Pero hay que considerar que muchos autores, incluyendo los anteriores, mencionan que ambos fenómenos también pueden inhibir la agregación del péptido $\text{A}\beta$ a fibras amiloides, mediante diferentes mecanismos, tales como la rápida formación de complejos de monómeros de péptido $\text{A}\beta$ -ion Cu^{2+} , provocando la carencia de péptido $\text{A}\beta$ disponible para la formación de material amiloide (rico en láminas betas) (125). Otro es el aumento de la polaridad de la metionina 35 debido a su proceso de oxidación (157), causando un descenso en la hidrofobicidad del extremo C-terminal, e induciendo un aumento en la solubilidad del péptido $\text{A}\beta$, haciendo que el péptido sea incapaz de agregarse por medio de interacciones hidrofóbicas. Aunque Smith *et al* (125) han observado tanto material amiloide como de agregados amorfos en muestras de péptido $\text{A}\beta$ agregado en presencia del ion Cu^{2+} , sugiriendo también que bajo condiciones donde la concentración del ion es muy pequeña, se fomenta la agregación del péptido $\text{A}\beta$, mediante el uso de este ion como núcleo de agregación. Otra explicación es que los péptidos inicien su agregación desde un estado amorfo y cuyo proceso de agregación hacia material amiloide sea demasiado lento como para observarse *in vitro* (125).

En lo que concierne a los datos obtenidos a través del uso de la técnica Tricina SDS-PAGE, no se observó la presencia de agregados del péptido $\text{A}\beta(1-40)(\text{Met}35\text{Cys})$, tanto en presencia como en ausencia del ion Cu^{2+} , observándose solamente monómeros durante todos los períodos de incubación. Por el contrario, el péptido $\text{A}\beta(1-40)$ mostró tanto monómeros con un peso molecular de 4.5 kDA tanto en presencia como en ausencia del ion Cu^{2+} , como agregados que se observan en la parte superior del gel separador, en los cuales no fue posible



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



determinar su peso molecular exacto debido a que no pudieron ingresar al gel. Mientras que el péptido A β (25-35), a causa de su pequeño tamaño (solamente de 10 aminoácidos) no pudo ser detectado en el gel.

Al interpretar dichos datos, se puede mencionar, que la agregación de los péptidos A β se vio tanto favorecida (en el caso del agregado del péptido A β silvestre, localizado en la parte superior del gel separador), como inhibida (en el caso de la presencia de monómeros tanto en el péptido A β silvestre como en el péptido A β mutante). Lo cual concuerda con lo mencionado por Faller (114) y Smith *et al.* (125) en donde plantean la inhibición del proceso de agregación del péptido, mediante la formación de agregados amorfos, así como la rápida formación de complejos monoméricos de péptido A β -ion Cu²⁺, evitando así la formación de novo de fibras amiloides; así como la extensión de fibras amiloides pre formadas y la coexistencia de material amiloide en forma de agregados amorfos (125).

Otro posible mecanismo que pudo desempeñar un papel en la inhibición de la agregación del péptido A β es el mencionado por Barnham *et al* (158), el cual sugiere que la inhibición puede ser mediante 2 maneras, la formación de material amorfo producto de la agregación inducida por la reducción de iones metálicos, así como la inhibición de formación de fibras amiloides por medio de la oxidación de la metionina 35, y no por la reducción del ion Cu²⁺. Por otro lado, Klug *et al* (159), exponen dos mecanismos relacionados con la reducción del ion Cu²⁺, en uno de ellos se favorece la rápida agregación del péptido A β a fibras amiloides y a oligómeros inestables y difíciles de detectar mediante la técnica de SDS-PAGE. Por otro lado, el otro mecanismo propone que el péptido A β , se agrega lentamente en forma de agregados amorfos estables y observables, usando SDS-PAGE. Reportando también un agregado con un peso molecular de 97.4 kDA, que puede corresponder al agregado del péptido A β (1-40) silvestre, visto en la parte superior del gel separador e incubado en presencia y ausencia del ion Cu²⁺.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Entre tanto, los resultados obtenidos del péptido A β (1-40) (Met35Cys), coinciden con lo reportado por Maiti *et al* (**160**), cuyo grupo observó mediante el uso de péptidos A β mutantes carentes de metionina y la técnica de entrecruzamiento fotoinducido (**PICUP**) junto con SDS-PAGE, una mezcla rica de monómeros y trímeros en geles correspondientes al péptido A β mutantes. Coincidiendo estos resultados con los obtenidos bajo las mismas técnicas, pero utilizando el A β (1-40) silvestre. Otra explicación la ofrece Butterfield *et al* (**161**), en donde propone a la sustitución de la metionina 35 por cisteína en el péptido A β como la responsable de la disminución de la toxicidad causada por éste. Mencionando que tanto la toxicidad como la agregación del péptido dependen de la oxidación de la metionina, y por ende, esta mutación puede afectar a ambos procesos.

En lo correspondiente al efecto citotóxico de los péptidos A β sobre la línea celular C-6 de glioblastoma de rata, y tras realizar un análisis estadístico utilizando la prueba de *t*-Student para variables independientes, se encontró que el péptido A β (1-40) silvestre incubado 24 horas en presencia del ion Cu²⁺, posee el efecto citopático más marcado a comparación de los demás péptidos. Estos hallazgos coincidiendo con lo propuesto por varios autores, incluyendo a Barhnham *et al*, Smith *et al*, y Butterfield *et al* (**158, 125,161**), que sugieren que esto es debido a la producción de ROS, sobre todo H₂O₂, por medio de reacciones del tipo Fenton-Weiss entre la metionina 35 y el ion Cu²⁺. Acorde a Butterfield *et al* (**161**), esto sucede mediante la transferencia de electrones, producidos durante la oxidación de la metionina 35 para llevar a cabo la formación del radical sulfhidrilo, y de manera simultánea, el ion Cu²⁺ es reducido a Cu⁺ dando paso a la reacciones para la producción de H₂O₂, el cual interactúa con las membranas lipídicas provocando su peroxidación y dando paso a la formación de HNE y otros agentes con capacidad neurotóxica.

Con respecto, al péptido A β (25-35), tanto en presencia como en ausencia del ion Cu²⁺, y a pesar de estar reportado que simula los efectos del péptido A β (1-42) (el péptido A β más neurotóxico entre los diferentes péptidos A β), fue incapaz de



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



inducir el mismo efecto citopático. Estos resultados concuerdan con diferentes experimentos reportados por Butterfield *et al*, Huang *et al* y Clementi *et al* (161-163), en donde han hecho notar que el péptido A β (25-35) es incapaz de formar H₂O₂, así como de reducir el ion Cu²⁺, y que su mecanismo levemente citotóxico depende más de la inserción del péptido a las neuronas (indiferente al estado redox metionina 35) así como del uso de las vías apoptóticas.

Mientras que en el péptido A β (1-40) mutante, la substitución de la metionina 35 por cisteína, afectó su capacidad citotóxica acorde a lo reportado Butterfiel *et al* (161), cuyo grupo de investigación desarrolló un modelo de *C.elegans* observando que dicha mutación contribuye a una marcada disminución del estrés oxidativo provocado por el péptido A β ; debido a la falta de electrones del grupo sulfuro de la metionina 35 que son necesarios para la reducción del O₂ a H₂O₂, proporcionados por el ion Cu²⁺.

Al englobar todos los resultados obtenidos, se puede aseverar que se percibió tanto la inducción como la inhibición de la agregación del péptido A β , hacia fibras amiloides. Esto debido posiblemente a los mecanismos anteriormente expuestos, por lo cual, nuestros resultados concuerdan con muchas de las teorías acerca de los fenómenos de la reducción del ion Cu²⁺, como la oxidación de la metionina 35 y su papel en la agregación del péptido. Aportando así más evidencias en la explicación del efecto de estos fenómenos sobre el proceso de agregación y toxicidad del péptido A β .

Siendo interesante, tratar de corroborar estos resultados con técnicas mucho más avanzadas como dicroísmo circular, para poder determinar de manera precisa la estructura secundaria de los agregados de los diferentes péptidos A β ; de microscopía de fuerza atómica, para poder observar más detalladamente la morfología de los agregados; así como el uso de Western Blot y de espectrometría de masas, para precisar de manera más exacta el peso molecular de los agregados del péptido A β .



CAPITULO VII.

CONCLUSIONES.

Acorde a la literatura consultada y a los resultados obtenidos, se puede concluir que la presencia de la metionina en la posición 35, así como la presencia del ion Cu^{2+} , juegan un papel primordial en la agregación del péptido $\text{A}\beta$ así como en su efecto citopático.

Los resultados observados en este proyecto aportan evidencia a favor tanto de la vertiente que asegura que la presencia de la metionina 35, el proceso de oxidación de ésta y la reducción ion Cu^{2+} , inhiben el proceso de agregación del péptido hacia fibras amiloides péptido $\text{A}\beta$; como de la vertiente que declara que ambos procesos son necesarios para el proceso de formación de fibras amiloides del péptido $\text{A}\beta$.



CAPITULO IX.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Mount C, Downton C. **Alzheimer disease: progress or profit?** *Nat Med.* 2006 Jul; 12(7):780-4. PubMed PMID: 16829947
2. Wimo and M. Prince, **World Alzheimer Report 2010.**The Global Economic Impact of Dementia, 2010, *Alzheimer's Disease International.*
3. Citron M. **Alzheimer's disease: strategies for disease modification.** *Nat Rev Drug Discov.* 2010 May; 9(5):387-98. Review. PubMed PMID: 20431570.
4. Alzheimer's Association. 2009. **Alzheimer's disease facts and figures.** *Alzheimers Dement.* 2009 May; 5(3):234-70. PubMed PMID: 19426951.
5. Camacho Servín Fernando, **El mal de Alzheimer, problema creciente de salud pública en el país.** Periódico La Jornada. Sábado 28 de agosto de 2010, p. 38 (<http://www.jornada.unam.mx/2010/08/28/sociedad/038n2soc>)
6. Netter, FH, **Netter Ilustraciones médicas: Sistema Nervioso: Trastornos neurológicos y neuromusculares Tomo 1.2** 8 Edición Editorial Masson Página 145
7. Rózga M, Bal W. **The Cu (II)/Abeta/human serum albumin model of control mechanism for copper-related amyloid neurotoxicity.** *Chem Res Toxicol.* 2010 Feb 15; 23(2):298-308. PubMed PMID: 19950960.
8. National Institute of Ageing, **Alzheimer's Disease Fact Sheet 2010.** (http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/factsheet_sp.htm).
9. Wang Y, Martinez-Vicente M, Krüger U, Kaushik S, Wong E, Mandelkow EM, Cuervo AM, Mandelkow E. **Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing.** *Hum Mol Genet.* 2009 Nov 1;18(21):4153-70. Epub 2009 Aug 4. PubMed PMID: 19654187; PubMed Central PMCID: PMC2758146.
10. Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. **Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders.** *Nat Rev Neurosci.* 2007 Sep;8(9):663-72. Review. PubMed PMID: 17684513.
11. Selkoe DJ. **Alzheimer's disease is a synaptic failure.** *Science.* 2002 Oct 25; 298(5594):789-91. Review. PubMed PMID: 12399581
12. Wang Z, Wang B, Yang L, Guo Q, Aithmitti N, Songyang Z, Zheng H. **Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis.** *J Neurosci.* 2009 Sep 2;29(35):10788-801. PubMed PMID: 19726636; PubMed Central PMCID: PMC2757256.



13. Koo EH. **The beta-amyloid precursor protein (APP) and Alzheimer's disease: does the tail wag the dog?** *Traffic*. 2002; 3:763-770.
14. Stix Gary. **Alzheimer's: Forestalling the Darkness with New Approaches** *Scientific american*, June 2010.
15. Gandy S, Petanceska S. **Regulation of Alzheimer beta-amyloid precursor trafficking and metabolism.** *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jul 26;1502(1):44-52. Review. PubMed PMID: 10899430.
16. Selkoe DJ. **Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.** *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):741-66. Review. PubMed PMID: 11274343.
17. Weihofen A, Martoglio B. **Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides.** *Trends Cell Biol*. 2003 Feb;13(2):71-8. Review. PubMed PMID: 12559757.
18. Thinakaran G, Koo EH. **Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function.** *J Biol Chem*. 2008 Oct 31; 283(44):29615-9. Epub 2008 Jul 23. Review. PubMed PMID: 18650430; PubMed Central PMCID: PMC2573065.
19. Golde TE, Eckman CB, Younkin SG. **Biochemical detection of Abeta isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease.** *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jul 26; 1502(1):172-87. Review. PubMed PMID: 10899442.
20. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al. **Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism.** *Nature*. 1992 Sep 24;359(6393):322-5. PubMed PMID: 1383826.
21. Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, et al. **Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids.** *Nature*. 1992 Sep 24;359(6393):325-7. PubMed PMID: 1406936.
22. Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al. **Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing.** *Science*. 1992 Oct 2;258(5079):126-9. PubMed PMID: 1439760.
23. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. **The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease.** *Biochemistry*. 1993 May 11; 32(18):4693-7. PubMed PMID: 8490014.
24. Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB. **Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003



- Jan 7;100(1):330-5. Epub 2002 Dec 27. PubMed PMID: 12506200; PubMed Central PMCID: PMC140968.
25. Findeis MA. **The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease.** *Pharmacol Ther.* 2007 Nov;116(2):266-86. Epub 2007 Jul 17. Review. PubMed PMID: 17716740.
26. Estus S, Tucker HM, van Rooyen C, Wright S, Brigham EF, Wogulis M, Rydel RE. **Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction.** *J Neurosci.* 1997 Oct 15;17(20):7736-45. PubMed PMID: 9315895.
27. Hardy JA, Higgins GA. **Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis.** *Science.* 1992 Apr 10;256(5054):184-5. Review. PubMed PMID: 1566067.
28. Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, Renbing X, Peck A. **Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques.** *Ann Neurol.* 1988 Feb;23(2):138-44. PubMed PMID: 2897823.
29. Arriagada PV, Marzloff K, Hyman BT. **Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease.** *Neurology.* 1992 Sep;42(9):1681-8. PubMed PMID: 1307688.
30. Lue LF, Brachova L, Civin WH, Rogers J. **Inflammation, A beta deposition, and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration.** *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996 Oct;55(10):1083-8. PubMed PMID: 8858005.
31. Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, Martone R, Morrison JH, Pangalos MN, Reinhart PH, Bloom FE. **Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 28;103(13):5161-6. Epub 2006 Mar 20. PubMed PMID: 16549764; PubMed Central PMCID: PMC1405622.
32. Sanders L, **Memories Can't Wait Researchers rethink the role of amyloid in causing Alzheimer's.** *Science News.* March 12th, 2011; Vol.179#6. (http://www.sciencenews.org/view/feature/id/70236/title/Memories_can%E2%80%99t_wait)
33. Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. **Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis.** *Science.* 2003 Apr 18;300(5618):486-9. PubMed PMID: 12702875.



34. Pimplikar SW. **Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Jun;41(6):1261-8. Epub 2008 Dec 30. Review. PubMed PMID: 19124085; PubMed Central PMCID: PMC2680505.
35. Roher AE, Chaney MO, Kuo YM, Webster SD, Stine WB, Haverkamp LJ, Woods AS, Cotter RJ, Tuohy JM, Krafft GA, Bonnell BS, Emmerling MR. **Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease.** *J Biol Chem.* 1996 Aug 23;271(34):20631-5. PubMed PMID: 8702810.
36. Enya M, Morishima-Kawashima M, Yoshimura M, Shinkai Y, Kusui K, Khan K, Games D, Schenk D, Sugihara S, Yamaguchi H, Ihara Y. **Appearance of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid beta-protein (Abeta) dimer in the cortex during aging.** *Am J Pathol.* 1999 Jan;154(1):271-9. PubMed PMID: 9916941; PubMed Central PMCID: PMC1853431.
37. Roher AE, Palmer KC, Yurewicz EC, Ball MJ, Greenberg BD. **Morphological and biochemical analyses of amyloid plaque core proteins purified from Alzheimer disease brain tissue.** *J Neurochem.* 1993 Nov;61(5):1916-26. PubMed PMID: 8229002.
38. McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL. **Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease.** *Ann Neurol.* 1999 Dec;46(6):860-6. PubMed PMID: 10589538.
39. Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, Schenk DB. **Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid.** *J Neurochem.* 1993 Nov;61(5):1965-8. PubMed PMID: 8229004.
40. Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, Selkoe DJ. **The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain.** *Biochemistry.* 2000 Sep 5;39(35):10831-9. PubMed PMID: 10978169.
41. Podlisny MB, Ostaszewski BL, Squazzo SL, Koo EH, Rydel RE, Teplow DB, Selkoe DJ. **Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture.** *J Biol Chem.* 1995 Apr 21;270(16):9564-70. PubMed PMID: 7721886.
42. Xia W, Zhang J, Kholodenko D, Citron M, Podlisny MB, Teplow DB, Haass C, Seubert P, Koo EH, Selkoe DJ. **Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins.** *J Biol Chem.* 1997 Mar 21;272(12):7977-82. PubMed PMID: 9065468.



43. Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. **A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory.** *Nature*. 2006 Mar 16;440(7082):352-7. PubMed PMID: 16541076.
44. Cooke SF, Bliss TV. **Plasticity in the human central nervous system.** *Brain*. 2006 Jul;129(Pt 7):1659-73. Epub 2006 May 3. Review. PubMed PMID: 16672292.
45. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. **Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis.** *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:649-711. Review. PubMed PMID: 10845078.
46. Selkoe DJ. **Alzheimer's disease is a synaptic failure.** *Science*. 2002 Oct 25;298(5594):789-91. Review. PubMed PMID: 12399581.
47. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. **Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo.** *Nature*. 2002 Apr 4;416(6880):535-9. PubMed PMID: 11932745.
48. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Rowan MJ, Selkoe DJ. **Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition.** *Biochem Soc Trans*. 2002 Aug;30(4):552-7. Review. PubMed PMID: 12196135.
49. Wang Q, Walsh DM, Rowan MJ, Selkoe DJ, Anwyl R. **Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5.** *J Neurosci*. 2004 Mar 31; 24(13):3370-8. PubMed PMID: 15056716
50. Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ. **Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers.** *J Physiol*. 2006 Apr 15;572(Pt 2):477-92. Epub 2006 Feb 9. PubMed PMID: 16469784; PubMed Central PMCID: PMC1779683.
51. Shankar GM, Walsh DM. **Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and Abeta.** *Mol Neurodegener*. 2009 Nov 23;4:48. PubMed PMID: 19930651; PubMed Central PMCID: PMC278853.
52. Rushworth JV, Hooper NM. **Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid- β Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes.** *Int J Alzheimers Dis*. 2010 Dec 27;2011:603052. PubMed PMID: 21234417; PubMed Central PMCID: PMC3014710.
53. Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J. **Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human**



- cortical neurons.** *J Neurosci.* 2006 May 31;26(22):6011-8. PubMed PMID: 16738244.
54. Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW. **Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 1;90(17):7951-5. PubMed PMID: 8367446; PubMed Central PMCID: PMC47265.
55. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. **Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta.** *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):98-103. PubMed PMID: 10638761
56. Troy CM, Rabacchi SA, Friedman WJ, Frappier TF, Brown K, Shelanski ML. **Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid.** *J Neurosci.* 2000 Feb 15;20(4):1386-92. PubMed PMID: 10662829
57. Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. **Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain.** *Nature.* 2000 May 18;405(6784):360-4. PubMed PMID: 10830966
58. Matsui T, Ramasamy K, Ingelsson M, Fukumoto H, Conrad C, Frosch MP, Irizarry MC, Yuan J, Hyman BT. **Coordinated expression of caspase 8, 3 and 7 mRNA in temporal cortex of Alzheimer disease: relationship to formic acid extractable abeta42 levels.** *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006 May;65(5):508-15. PubMed PMID: 16772874
59. Albrecht S, Bourdeau M, Bennett D, Mufson EJ, Bhattacharjee M, LeBlanc AC. **Activation of caspase-6 in aging and mild cognitive impairment.** *Am J Pathol.* 2007 Apr;170(4):1200-9. PubMed PMID: 17392160; PubMed Central PMCID: PMC1829454.
60. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. **Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity.** *Cell.* 1994 Jun 17;77(6):817-27. PubMed PMID: 8004671.
61. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM. **RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease.** *Nature.* 1996 Aug 22;382(6593):685-91. PubMed PMID: 8751438
62. Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW, Dillin A. **Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity.** *Science.* 2006 Sep 15;313(5793):1604-10. Epub 2006 Aug 10. PubMed PMID: 16902091.
63. Isaacs AM, Senn DB, Yuan M, Shine JP, Yankner BA. **Acceleration of amyloid beta-peptide aggregation by physiological concentrations of calcium.** *J Biol Chem.* 2006 Sep 22;281(38):27916-23. Epub 2006 Jul 26. PubMed PMID: 16870617; PubMed Central PMCID: PMC1595535.



64. Kruman II, Wersto RP, Cardozo-Pelaez F, Smilenov L, Chan SL, Chrest FJ, Emokpae R Jr, Gorospe M, Mattson MP. **Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage.** *Neuron.* 2004 Feb 19;41(4):549-61. PubMed PMID: 14980204.
65. Yang Y, Mufson EJ, Herrup K. **Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease.** *J Neurosci.* 2003 Apr 1;23(7):2557-63. PubMed PMID: 12684440.
66. El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. **Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils.** *Nature.* 1996 Aug 22;382(6593):716-9. PubMed PMID: 8751442.
67. Coraci IS, Husemann J, Berman JW, Hulette C, Dufour JH, Campanella GK, Luster AD, Silverstein SC, El-Khoury JB. **CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils.** *Am J Pathol.* 2002 Jan;160(1):101-12. PubMed PMID: 11786404; PubMed Central PMCID: PMC1867121.
68. Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, Terada K, Geula C, Luster AD, Freeman MW. **A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid.** *J Biol Chem.* 2002 Dec 6;277(49):47373-9. Epub 2002 Sep 17. PubMed PMID: 12239221.
69. Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR. **Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor.** *Neuron.* 1996 Sep;17(3):553-65. PubMed PMID: 8816718.
70. El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD. **Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease.** *Nat Med.* 2007 Apr;13(4):432-8. Epub 2007 Mar 11. PubMed PMID: 17351623.
71. Wyss-Coray T, Mucke L. **Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword.** *Neuron.* 2002 Aug 1;35(3):419-32. Review. PubMed PMID: 12165466.
72. Cell Signaling Technology .**Amyloid Plaque and Neurofibrillary Tangle Formation in Alzheimer's Disease.** Created July 2009 revised November 2010(http://www.cellsignal.com/reference/pathway/alzheimers_disease.html#describe)
73. Duce JA, Bush AI. **Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics.** *Prog Neurobiol.* 2010 Sep;92(1):1-18. Epub 2010 May 2. Review. PubMed PMID: 20444428.
74. Guengerich FP. **Thematic series: metals in biology.** *J Biol Chem.* 2009 Jan 9;284(2):709. Epub 2008 Aug 29. PubMed PMID: 18757360.



75. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV. **Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase.** *Science*. 1999 Apr 30;284(5415):805-8. PubMed PMID: 10221913.
76. Ridge PG, Zhang Y, Gladyshev VN. **Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen.** *PLoS One*. 2008 Jan 2;3(1):e1378. PubMed PMID: 18167539; PubMed Central PMCID: PMC2147054.
77. Bertini, I., 2007. **Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity.** University Science Books, Sausalito, CA.
78. Franz KJ. **Copper shares a piece of the pi.** *Nat Chem Biol*. 2008 Feb;4(2):85-6. PubMed PMID: 18202673.
79. Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE, Dyson HJ. **Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2042-7. PubMed PMID: 10051591; PubMed Central PMCID: PMC26733.
80. Hart PJ, Nersissian AM, Herrmann RG, Nalbandyan RM, Valentine JS, Eisenberg D. **A missing link in cupredoxins: crystal structure of cucumber stellacyanin at 1.6 Å resolution.** *Protein Sci*. 1996 Nov;5(11):2175-83. PubMed PMID: 8931136; PubMed Central PMCID: PMC2143285.
81. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. **Trace elements in human physiology and pathology. Copper.** *Biomed Pharmacother*. 2003 Nov;57(9):386-98. Review. PubMed PMID: 14652164.
82. Schlieff ML, Craig AM, Gitlin JD. **NMDA receptor activation mediates copper homeostasis in hippocampal neurons.** *J Neurosci*. 2005 Jan 5;25(1):239-46. PubMed PMID: 15634787.
83. Schlieff ML, West T, Craig AM, Holtzman DM, Gitlin JD. **Role of the Menkes copper-transporting ATPase in NMDA receptor-mediated neuronal toxicity.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 3;103(40):14919-24. Epub 2006 Sep 26. PubMed PMID: 17003121; PubMed Central PMCID: PMC1578502.
84. El Meskini R, Crabtree KL, Cline LB, Mains RE, Eipper BA, Ronnett GV. **ATP7A (Menkes protein) functions in axonal targeting and synaptogenesis.** *Mol Cell Neurosci*. 2007 Mar;34(3):409-21. Epub 2007 Jan 9. PubMed PMID: 17215139; PubMed Central PMCID: PMC1876716.
85. Niciu MJ, Ma XM, El Meskini R, Pachter JS, Mains RE, Eipper BA. **Altered ATP7A expression and other compensatory responses in a murine**



- model of Menkes disease.** *Neurobiol Dis.* 2007 Sep;27(3):278-91. Epub 2007 May 23. PubMed PMID: 17588765; PubMed Central PMCID: PMC2040029.
86. Qian Y, Tiffany-Castiglioni E, Welsh J, Harris ED. **Copper efflux from murine microvascular cells requires expression of the menkes disease Cu-ATPase.** *J Nutr.* 1998 Aug;128(8):1276-82. PubMed PMID: 9687544.
87. Giese A, Buchholz M, Herms J, Kretzschmar HA. **Mouse brain synaptosomes accumulate copper-67 efficiently by two distinct processes independent of cellular prion protein.** *J Mol Neurosci.* 2005;27(3):347-54. PubMed PMID: 16280605.
88. Brown DR, Kozlowski H. **Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases.** *Dalton Trans.* 2004 Jul 7;(13):1907-17. Epub 2004 May 11. Review. PubMed PMID: 15252577.
89. Mercer JF. **The molecular basis of copper-transport diseases.** *Trends Mol Med.* 2001 Feb;7(2):64-9. Review. PubMed PMID: 11286757.
90. Tórsdóttir G, Kristinsson J, Sveinbjörnsdóttir S, Snaedal J, Jóhannesson T. **Copper, ceruloplasmin, superoxide dismutase and iron parameters in Parkinson's disease.** *Pharmacol Toxicol.* 1999 Nov;85(5):239-43. PubMed PMID: 10608487.
91. Basun H, Forsell LG, Wetterberg L, Winblad B. **Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal aging and Alzheimer's disease.** *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1991;3(4):231-58. Review. PubMed PMID: 1772577.
92. Squitti R, Lupoi D, Pasqualetti P, Dal Forno G, Vernieri F, Chiovenda P, Rossi L, Cortesi M, Cassetta E, Rossini PM. **Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease.** *Neurology.* 2002 Oct 22;59(8):1153-61. PubMed PMID: 12391342.b).-Squitti R, Rossini PM, Cassetta E, Moffa F, Pasqualetti P, Cortesi M, Colloca A, Rossi L, Finazzi-Agró A. **d-penicillamine reduces serum oxidative stress in Alzheimer's disease patients.** *Eur J Clin Invest.* 2002 Jan;32(1):51-9. PubMed PMID: 11851727.
93. Nakano E, Williamson MP, Williams NH, Powers HJ. **Copper-mediated LDL oxidation by homocysteine and related compounds depends largely on copper ligation.** *Biochim Biophys Acta.* 2004 Jan 20;1688(1):33-42. PubMed PMID: 14732479.
94. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. **Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease.** *N Engl J Med.* 2002 Feb 14;346(7):476-83. PubMed PMID: 11844848.



95. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. **Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques.** *J Neurol Sci.* 1998 Jun 11;158(1):47-52. PubMed PMID: 9667777.
96. Sparks DL, Schreurs BG. **Trace amounts of copper in water induce beta-amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 16;100(19):11065-9. Epub 2003 Aug 14. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 30;100(20):11816. PubMed PMID: 12920183; PubMed Central PMCID: PMC196927.
97. Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Schneider JA, Wilson RS, Scherr PA. **Dietary copper and high saturated and trans fat intakes associated with cognitive decline.** *Arch Neurol.* 2006 Aug;63(8):1085-8. PubMed PMID: 16908733.
98. Smith DG, Cappai R, Barnham KJ. **The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide.** *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1768(8):1976-90. Epub 2007 Feb 9. Review. PubMed PMID: 17433250.
99. Tabner BJ, Mayes J, Allsop D. **Hypothesis: soluble a β oligomers in association with redox-active metal ions are the optimal generators of reactive oxygen species in Alzheimer's disease.** *Int J Alzheimers Dis.* 2010 Nov 14;2011:546380. PubMed PMID: 21188175; PubMed Central PMCID: PMC3003964.
100. Valko M, Morris H, Cronin MT. **Metals, toxicity and oxidative stress.** *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161-208. Review. PubMed PMID: 15892631.
101. Hung YH, Bush AI, Cherny RA. **Copper in the brain and Alzheimer's disease.** *J Biol Inorg Chem.* 2010 Jan;15(1):61-76. Epub 2009 Oct 28. Review. PubMed PMID: 19862561.
102. Sayre LM, Smith MA, Perry G. **Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease.** *Curr Med Chem.* 2001 Jun;8(7):721-38. Review. PubMed PMID: 11375746.
103. Lin CJ, Huang HC, Jiang ZF. **Cu(II) interaction with amyloid-beta peptide: a review of neuroactive mechanisms in AD brains.** *Brain Res Bull.* 2010 Jul 30;82(5-6):235-42. Epub 2010 Jun 17. Review. PubMed PMID: 20598459.
104. Gaggelli E, Kozlowski H, Valensin D, Valensin G. **Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis).** *Chem Rev.* 2006 Jun;106(6):1995-2044. Review. PubMed PMID: 16771441.



105. Necula M, Kaye R, Milton S, Glabe CG. **Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct.** *J Biol Chem.* 2007 Apr 6;282(14):10311-24. Epub 2007 Feb 6. PubMed PMID: 17284452.
106. Barnham KJ, Cappai R, Beyreuther K, Masters CL, Hill AF. **Delineating common molecular mechanisms in Alzheimer's and prion diseases.** *Trends Biochem Sci.* 2006 Aug;31(8):465-72. Epub 2006 Jul 3. Review. PubMed PMID: 16820299.
107. Murakami K, Irie K, Ohgashi H, Hara H, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T. **Formation and stabilization model of the 42-mer Abeta radical: implications for the long-lasting oxidative stress in Alzheimer's disease.** *J Am Chem Soc.* 2005 Nov 2;127(43):15168-74. PubMed PMID: 16248658.
108. Raman B, Ban T, Yamaguchi K, Sakai M, Kawai T, Naiki H, Goto Y. **Metal ion-dependent effects of clioquinol on the fibril growth of an amyloid {beta} peptide.** *J Biol Chem.* 2005 Apr 22;280(16):16157-62. Epub 2005 Feb 16. PubMed PMID: 15718230.
109. Atwood CS, Moir RD, Huang X, Scarpa RC, Bacarra NM, Romano DM, Hartshorn MA, Tanzi RE, Bush AI. **Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis.** *J Biol Chem.* 1998 May 22;273(21):12817-26. PubMed PMID: 9582309.
110. Zou J, Kajita K, Sugimoto N. **Cu (2+) Inhibits the Aggregation of Amyloid beta- Peptide(1-42) in vitro.** *Angew Chem Int Ed Engl.* 2001 Jun 18;40(12):2274-2277. PubMed PMID: 11433492
111. House E, Collingwood J, Khan A, Korchazkina O, Berthon G, Exley C. **Aluminium, iron, zinc and copper influence the in vitro formation of amyloid fibrils of Abeta42 in a manner which may have consequences for metal chelation therapy in Alzheimer's disease.** *J Alzheimers Dis.* 2004 Jun;6(3):291-301. PubMed PMID: 15201484.
112. Ha C, Ryu J, Park CB. **Metal ions differentially influence the aggregation and deposition of Alzheimer's beta-amyloid on a solid template.** *Biochemistry.* 2007 May 22;46(20):6118-25. Epub 2007 Apr 25. PubMed PMID: 17455909.
113. Karr JW, Kaupp LJ, Szalai VA. **Amyloid-beta binds Cu2+ in a mononuclear metal ion binding site.** *J Am Chem Soc.* 2004 Oct 20;126(41):13534-8. PubMed PMID: 15479110.
114. Faller P. **Copper and zinc binding to amyloid-beta: coordination, dynamics, aggregation, reactivity and metal-ion transfer.**



- Chembiochem.* 2009 Dec 14;10(18):2837-45. Review. PubMed PMID: 19877000.
115. Talmard C, Guilloreau L, Coppel Y, Mazarguil H, Faller P. **Amyloid-beta peptide forms monomeric complexes with Cu(II) and Zn(II) prior to aggregation.** *Chembiochem.* 2007 Jan 22;8(2):163-5. PubMed PMID: 17195250.
116. Curtain CC, Ali F, Volitakis I, Cherny RA, Norton RS, Beyreuther K, Barrow CJ, Masters CL, Bush AI, Barnham KJ. **Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits.** *J Biol Chem.* 2001 Jun 8;276(23):20466-73. Epub 2001 Mar 27. PubMed PMID: 11274207.
117. Danielsson J, Pierattelli R, Banci L, Gräslund A. **High-resolution NMR studies of the zinc-binding site of the Alzheimer's amyloid beta-peptide.** *FEBS J.* 2007 Jan;274(1):46-59. PubMed PMID: 17222176.
118. Fezoui Y, Teplow DB. **Kinetic studies of amyloid beta-protein fibril assembly. Differential effects of alpha-helix stabilization.** *J Biol Chem.* 2002 Oct 4;277(40):36948-54. Epub 2002 Jul 30. PubMed PMID: 12149256.
119. Dong J, Canfield JM, Mehta AK, Shokes JE, Tian B, Childers WS, Simmons JA, Mao Z, Scott RA, Warncke K, Lynn DG. **Engineering metal ion coordination to regulate amyloid fibril assembly and toxicity.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Aug 14;104(33):13313-8. Epub 2007 Aug 8. PubMed PMID: 17686982; PubMed Central PMCID: PMC1948904.
120. Dong J, Shokes JE, Scott RA, Lynn DG. **Modulating amyloid self-assembly and fibril morphology with Zn(II).** *J Am Chem Soc.* 2006 Mar 22;128(11):3540-2. PubMed PMID: 16536526.
121. Pradines V, Jurca Stroia , Faller P. **Amyloid fibrils: modulation of formation and structure by copper(II).** *New J. Chem.,* 2008, 32, 1189-1194.
122. Tycko R. **Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR.** *Q Rev Biophys.* 2006 Feb;39(1):1-55. Epub 2006 Jun 13. Review. PubMed PMID: 16772049.
123. Atwood CS, Perry G, Zeng H, Kato Y, Jones WD, Ling KQ, Huang X, Moir RD, Wang D, Sayre LM, Smith MA, Chen SG, Bush AI. **Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid-beta.** *Biochemistry.* 2004 Jan 20;43(2):560-8. PubMed PMID: 14717612.
124. Huang X, Atwood CS, Moir RD, Hartshorn MA, Tanzi RE, Bush AI. **Trace metal contamination initiates the apparent auto-aggregation, amyloidosis, and oligomerization of Alzheimer's A β peptides.** *J Biol*



- Inorg Chem.* 2004 Dec;9(8):954-60. Epub 2004 Nov 3. PubMed PMID: 15578276.
125. Smith DP, Ciccotosto GD, Tew DJ, Fodero-Tavoletti MT, Johanssen T, Masters CL, Barnham KJ, Cappai R. **Concentration dependent Cu²⁺ induced aggregation and dityrosine formation of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide.** *Biochemistry.* 2007 Mar 13;46(10):2881-91. Epub 2007 Feb 13. PubMed PMID: 17297919.
126. Streltsov VA, Titmuss SJ, Epa VC, Barnham KJ, Masters CL, Varghese JN. **The structure of the amyloid-beta peptide high-affinity copper II binding site in Alzheimer disease.** *Biophys J.* 2008 Oct;95(7):3447-56. Epub 2008 Jul 3. PubMed PMID: 18599641; PubMed Central PMCID: PMC2547438.
127. Markley JL, Bax A, Arata Y, Hilbers CW, Kaptein R, Sykes BD, Wright PE, Wüthrich K. **Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids.** *J Mol Biol.* 1998 Jul 31;280(5):933-52. PubMed PMID: 9671561.
128. Drew SC, Noble CJ, Masters CL, Hanson GR, Barnham KJ. **Pleomorphic copper coordination by Alzheimer's disease amyloid-beta peptide.** *J Am Chem Soc.* 2009 Jan 28;131(3):1195-207. PubMed PMID: 19119811.
129. Hureau C, Faller P. **Abeta-mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease.** *Biochimie.* 2009 Oct;91(10):1212-7. Epub 2009 Mar 28. Review. PubMed PMID: 19332103.
130. Himes RA, Park GY, Siluvai GS, Blackburn NJ, Karlin KD. **Structural studies of copper(I) complexes of amyloid-beta peptide fragments: formation of two-coordinate bis(histidine) complexes.** *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008;47(47):9084-7. PubMed PMID: 18932185; PubMed Central PMCID: PMC2662329.
131. Shearer J, Szalai VA. **The amyloid-beta peptide of Alzheimer's disease binds Cu(I) in a linear bis-his coordination environment: insight into a possible neuroprotective mechanism for the amyloid-beta peptide.** *J Am Chem Soc.* 2008 Dec 31;130(52):17826-35. PubMed PMID: 19035781; PubMed Central PMCID: PMC2935688.
132. Streltsov VA, Varghese JN. **Substrate mediated reduction of copper-amyloid-beta complex in Alzheimer's disease.** *Chem Commun (Camb).* 2008 Jul 21;(27):3169-71. Epub 2008 May 14. PubMed PMID: 18594731.



133. Vogt W. **Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal.** *Free Radic Biol Med.* 1995 Jan;18(1):93-105. Review. PubMed PMID: 7896176.
134. V. Kadlcik, C. Sicard-Roselli, T.A. Mattioli, M. Kodicek, C. Houee-Levin, **One-electron oxidation of beta-amyloid peptide: sequence modulation of reactivity,** *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 881–891.
135. Butterfield DA. **Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review.** *Free Radic Res.* 2002 Dec;36(12):1307-13. Review. PubMed PMID: 12607822.
136. Ciccotosto GD, Tew D, Curtain CC, Smith D, Carrington D, Masters CL, Bush AI, Cherny RA, Cappai R, Barnham KJ. **Enhanced toxicity and cellular binding of a modified amyloid beta peptide with a methionine to valine substitution.** *J Biol Chem.* 2004 Oct 8;279(41):42528-34. Epub 2004 Jul 28. PubMed PMID: 15292164.
137. Varadarajan S, Yatin S, Kanski J, Jahanshahi F, Butterfield DA. **Methionine residue 35 is important in amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress.** *Brain Res Bull.* 1999 Sep 15;50(2):133-41. PubMed PMID: 10535332.
138. Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA. **Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1--42) and A beta(25--35).** *J Am Chem Soc.* 2001 Jun 20;123(24):5625-31. PubMed PMID: 11403592.
139. Barnham KJ, Ciccotosto GD, Tickler AK, Ali FE, Smith DG, Williamson NA, Lam YH, Carrington D, Tew D, Kocak G, Volitakis I, Separovic F, Barrow CJ, Wade JD, Masters CL, Cherny RA, Curtain CC, Bush AI, Cappai R. **Neurotoxic, redox-competent Alzheimer's beta-amyloid is released from lipid membrane by methionine oxidation.** *J Biol Chem.* 2003 Oct 31;278(44):42959-65. Epub 2003 Aug 18. PubMed PMID: 12925530.
140. Page CC, Moser CC, Chen X, Dutton PL. **Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction.** *Nature.* 1999 Nov 4;402(6757):47-52. PubMed PMID: 10573417.
141. Rauk A, Armstrong D.A, Fairlie D.P. **Is oxidative damage mediated by amyloid beta and prion peptide mediated by hydrogen atom transfer from glycine alpha-carbon to methionine sulfur within beta-sheets?** *J. Am.Chem. Soc.* 122 (2000) 9761–9767.
142. Lovell MA, Ehmann WD, Mattson MP, Markesbery WR. **Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging.* 1997 Sep-Oct;18(5):457-61. PubMed PMID: 9390770.



143. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. **Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.** *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128. Review. PubMed PMID: 1937131.
144. Spiteller G. **Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products,** *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) 362–387.
145. Palmblad M, Westlind-Danielsson A, Bergquist J. **Oxidation of methionine 35 attenuates formation of amyloid beta -peptide 1-40 oligomers.** *J Biol Chem.* 2002 May 31;277(22):19506-10. Epub 2002 Mar 23. PubMed PMID: 11912198.
146. Gehman JD, O'Brien CC, Shabanpoor F, Wade JD, Separovic F. **Metal effects on the membrane interactions of amyloid-beta peptides.** *Eur Biophys J.* 2008 Mar; 37 (3):333-44. Epub 2008 Jan 25. PubMed PMID: 18219465.
147. Grobden B, De Deyn PP, Slegers H. **Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion.** *Cell Tissue Res.* 2002 Dec; 3 10(3):257-70. Epub 2002 Nov 6. Review. PubMed PMID: 12457224.
148. Tarini M, Cignoni P, Montani C. **Ambient occlusion and edge cueing to enhance real time molecular visualization.** *IEEE Trans Vis Comput Graph.* 2006 Sep-Oct; 12(5):1237-44. PubMed PMID: 17080857
149. Ali F, Separovic F, Barrow J, Yao S, Barnham K **Copper and Zinc Mediated Oligomerisation of A β Peptides.** *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* .2006 Volume: 12, Issue: 2, Pages: 153-164
150. House E, Mold M, Collingwood J, Baldwin A, Goodwin S, Exley C. **Copper abolishes the beta-sheet secondary structure of preformed amyloid fibrils of amyloid-beta (42).** *J Alzheimers Dis.* 2009;18(4):811-7. PubMed PMID: 19749401; PubMed Central PMCID: PMC2857508.
151. Khurana R, Uversky VN, Nielsen L, Fink AL. **Is Congo red an amyloid-specific dye?** *J Biol Chem.* 2001 Jun 22; 276(25):22715-21. Epub 2001 Feb 28. PubMed PMID: 11410601.
152. Cribbs DH, Azizeh BY, Cotman CW, LaFerla FM. **Fibril formation and neurotoxicity by a herpes simplex virus glycoprotein B fragment with homology to the Alzheimer's A beta peptide.** *Biochemistry.* 2000 May 23; 39(20):5988-94. PubMed PMID: 10821670.
153. Bouma B, Kroon-Batenburg LM, Wu YP, Brünjes B, Posthuma G, Kranenburg O, de Groot PG, Voest EE, Gebbink MF. **Glycation induces**



- formation of amyloid cross-beta structure in albumin. *J Biol Chem.* 2003 Oct 24; 278(43):41810-9. Epub 2003 Aug 8. PubMed PMID: 12909637
154. Schagger H. **Tricine-SDS-PAGE.** *Nat Protoc.* 2006; 1(1):16-22. PubMed PMID: 17406207.
155. Simpson RJ. **Rapid coomassie blue staining of protein gels.** *Cold Spring Harb Protoc.* 2010 Apr; 2010 (4):pdb.prot5413. PubMed PMID: 20360367.
156. Bitan G, Tarus B, Vollers SS, Lashuel HA, Condrón MM, Straub JE, Teplow DB. **A molecular switch in amyloid assembly: Met35 and amyloid beta-protein oligomerization.** *J Am Chem Soc.* 2003 Dec 17;125(50):15359-65. PubMed PMID: 14664580.
157. Hou L, Kang I, Marchant RE, Zagorski MG. **Methionine 35 oxidation reduces fibril assembly of the amyloid abeta-(1-42) peptide of Alzheimer's disease.** *J Biol Chem.* 2002 Oct 25;277(43):40173-6. Epub 2002 Aug 26. PubMed PMID: 12198111.
158. Barnham KJ, Ciccotosto GD, Tickler AK, Ali FE, Smith DG, Williamson NA, Lam YH, Carrington D, Tew D, Kocak G, Volitakis I, Separovic F, Barrow CJ, Wade JD, Masters CL, Cherny RA, Curtain CC, Bush AI, Cappai R. **Neurotoxic, redox-competent Alzheimer's beta-amyloid is released from lipid membrane by methionine oxidation.** *J Biol Chem.* 2003 Oct 31;278(44):42959-65. Epub 2003 Aug 18. PubMed PMID: 12925530.
159. Klug GM, Losic D, Subasinghe SS, Aguilar MI, Martin LL, Small DH. **Beta-amyloid protein oligomers induced by metal ions and acid pH are distinct from those generated by slow spontaneous ageing at neutral pH.** *Eur J Biochem.* 2003 Nov;270(21):4282-93. PubMed PMID: 14622293.
160. Maiti P, Lomakin A, Benedek GB, Bitan G. **Despite its role in assembly, methionine 35 is not necessary for amyloid beta-protein toxicity.** *J Neurochem.* 2010 Jun;113(5):1252-62. Epub 2010 Mar 20. PubMed PMID: 20345758; PubMed Central PMCID: PMC2908238.
161. Butterfield DA, Galvan V, Lange MB, Tang H, Sowell RA, Spilman P, Fombonne J, Gorostiza O, Zhang J, Sultana R, Bredesen DE. **In vivo oxidative stress in brain of Alzheimer disease transgenic mice: Requirement for methionine 35 in amyloid beta-peptide of APP.** *Free Radic Biol Med.* 2010 Jan 1;48(1):136-44. Epub 2009 Oct 23. PubMed PMID: 19854267; PubMed Central PMCID: PMC2818480.
162. Huang X, Cuajungco MP, Atwood CS, Hartshorn MA, Tyndall JD, Hanson GR, Stokes KC, Leopold M, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Saunders AJ, Lim J, Moir RD, Glabe C, Bowden EF, Masters CL, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI. **Cu(II) potentiation of Alzheimer's beta-amyloid neurotoxicity.**



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J Biol Chem.* 1999 Dec 24; 274(52):37111-6. PubMed PMID: 10601271.

163. Clementi ME, Marini S, Coletta M, Orsini F, Giardina B, Misiti F. **Abeta(31-35) and Abeta(25-35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: Role of the redox state of methionine-35.** *FEBS Lett.* 2005 May 23;579(13):2913-8. PubMed PMID: 15890345.



Capítulo X.

ANEXOS.

10.1.- Reactivos para la preparación del péptido A β , así como su proceso de incubación en presencia del ion Cu²⁺.

- **NaOH 2Mm:** Disolver 4 gramos de pastillas de NaOH en 100 ml de agua MiliQ.
- **Solución de CuSO₄Glicina (ion Cu²⁺):** Disolver 12 mg de CuSO₄ pentahidratado y 21.42 mg de glicina, en 50 ml agua de MiliQ, filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

10.2.- Reactivos para microscopía de Fluorescencia de Tioflavina (ThT), así como Fluorescencia de y Birrefringencia de Rojo Congo (RC).

- **ThT 500 μ M:** Disolver 0.016 gramos de ThT en polvo, en 50 ml de Buffer de NaOH-Glicina pH 8.5, filtrar y almacenar en un frasco ámbar en oscuridad, a temperatura ambiente durante un mes, pasado el mes desechar la solución y preparar nueva.
Precaución: Usar guantes en su elaboración, ya que el reactivo es irritante.
- **Rojo Congo 0.5 %:** Disolver 0.5 gramos de Rojo Congo en polvo, en agua 100 ml MiliQ, filtrar y almacenar en oscuridad a temperatura ambiente.
Precaución: Utilizar siempre guantes, a causa de que se sospecha que el Rojo Congo, es un posible agente teratógeno.
- **Buffer de NaOH-Glicina pH 8.5:** Disolver 0.375 gramos de glicina en 70 ml de agua MiliQ y adicionar NaOH concentrado, hasta alcanzar el pH deseado, aforando a 100 ml.



10.3.-Reactivos para geles de Tricina-SDS-PAGE.

- **Buffer Roztoky 3xGB (3M Tris HCL 0.3% SDS pH 8.45):** 18.16 gramos de Tris, 10 ml de HCL 5N (86.2 ml de HCL al 37% + 113.8 ml de agua MiliQ) o 4.31 ml de HCL 37%, 0.75 ml de SDS 20%, aforar a 50 ml de agua MiliQ.
- **Buffer de cátodo: (100mM Tris, 100mM Tricina ,0.1% SDS, pH 8.25):** 12.11 gramos de Tris, 17.92 gramos de Tricina, 5 ml de 20% SDS o 1 gramo de SDS, aforar a un litro en agua MiliQ.
- **Buffer de ánodo: (100mM Tris-HCL pH 8.9):** 12.11 gramos de Tris, disolver en 700 ml de agua MiliQ, ajustar el pH con HCL concentrado y aforar a un litro.
- **AB.-Mezcla de acrilamida y Bis acrilamida (48% acrilamida, 1.5 % Bis acrilamida 99.5T 3C):** 24 gramos de acrilamida, 0.75 gramos de Bis acrilamida, agregar 50 ml de agua MiliQ. **Precaución: Usar estrictamente máscara y guantes durante su preparación, ya que ambos reactivos son sumamente tóxicos.**
- **Buffer de lisis y/o muestra 3x (6% Mercaptoetanol, 12% SDS 150Mm Tris-HCL, 60% glicerol):** 3 ml de 0.5M Tris-HCL pH 7, 0.6 ml de Mercaptoetanol ,1.2 gramos de SDS, agregar 10 ml de agua MiliQ, para posteriormente agregar 5 mg de Azul de Coomassie R).
- **10X Tris-HCL (0.5 M pH 7):** Disolver 61 gramos de Trizma en 800 ml de agua MiliQ, ajustar el pH con HCL concentrado y aforar a 1 litro.
- **Todas las soluciones se almacenan a temperatura ambiente.**

10.4.- Preparación de geles de Tricina-SDS-PAGE.

- **Gel concentrador al 4% (5 ml).-** 1.2 ml de 3xGB, 0.4 ml de AB, 3.3 ml de agua MiliQ, 40 µl de PSA 50% (fresco) y 4 µl de TEMED.
- **Gel separador al 10% (10ml).-** 3.3 ml de 3xGB, 2 ml de AB, 3.64 ml de agua MiliQ, 1 ml de glicerol, 50 µl de PSA 50% (fresco) y 10 µl de TEMED.



EL PAPEL DEL COBRE EN LA AGREGACIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.



- **Gel separador al 16% (10ml).**- 3.3 ml de 3xGB, 3.3 ml de AB, 2.36 ml de agua MiliQ, 1 ml de glicerol, 50 μ l de PSA 50% (fresco) y 10 μ l de TEMED.

10.5.- Reactivos para la tinción rápida de Coomassie.

- **Solución A:** Disolver 0.5 gramos de CBR-250 en 250 ml de isopropanol, 100 ml de ácido acético glacial y 650 ml de agua MiliQ.
- **Solución B:** Disolver 0.05 gramos de CBR-250 en 100 ml de isopropanol, 100 ml de ácido acético glacial y 800 ml de agua MiliQ.
- **Solución C:** Disolver 0.02 gramos de CBR-250 en 100 ml de ácido acético glacial y 900 ml de agua MiliQ.
- **Solución D:** Mezclar 100 ml de 100 ml de ácido acético glacial en 900 ml de agua MiliQ.
- **Precaución:** Usar guantes, ya que el ácido acético glacial, es sumamente irritante.
- **Almacenar en oscuridad y en frascos ámbar.**