



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**EFFECTO DEL STRESS METABÓLICO SOBRE LA  
SUSCEPTIBILIDAD CELULAR FRENTE A LA FORMACIÓN  
DE CANALES IÓNICOS Y EFECTOS CITOTÓXICOS  
GENERADOS POR LOS PÉPTIDOS AMILOIDES**

**CLAUDIA ALEJANDRA PACHECO JENKINS**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales.

**PROFESOR GUÍA: DAVID MEARS**

**SANTIAGO – CHILE  
2009**



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**EFFECTO DEL STRESS METABÓLICO SOBRE LA  
SUSCEPTIBILIDAD CELULAR FRENTE A LA FORMACIÓN  
DE CANALES IÓNICOS Y EFECTOS CITOTÓXICOS  
GENERADOS POR LOS PÉPTIDOS AMILOIDES**

**CLAUDIA ALEJANDRA PACHECO JENKINS**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales.

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: DAVID MEARS	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: JOSÉ LUIS ARIAS	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: GUSTAVO FARÍAS	.....	.....

**SANTIAGO – CHILE  
2009**

## **AGRADECIMIENTOS.**

La realización de esta memoria significó la superación de numerosos desafíos, poniendo a prueba mi carácter en cada paso y decisión a tomar. Sin embargo, cada obstáculo parecía venir acompañado de crecimiento, el aporte particular e indispensable de cada persona que me prestó su apoyo y por supuesto, de una solución. Es así como agradezco a David Mears por su permanente optimismo y apoyo, humildad, inteligentes ideas y alentadoras palabras. A Illani Atwater agradezco su interés, sus comentarios y acertadas preguntas. A Paola Llanos agradezco su permanente disposición por responder a mis preguntas y por sus importantes comentarios. A Christian Arriagada agradezco el haberme enseñado muchas de las técnicas necesarias para la realización de mi investigación y por sus asertivas propuestas. A Juan Carlos y Juan Carlos Jr. agradezco su alegría, simpatía, respeto y su disposición por ayudar siempre que lo necesitara. Mi gratitud hacia Pedro Martínez es infinita. Pedro fue quien estuvo en los momentos más difíciles, dedicó horas de su valioso tiempo en la coordinación de los experimentos finales, a ofrecerme sus valiosísimas ideas y experiencias y lo más importante, sin su ayuda no hubiera tenido la energía para perseverar hasta el final.

A mis padres, Enrique y Pamela, les agradeceré eternamente el haber estado presentes en cada paso, apoyarme cada vez que lo necesité y haberme otorgado las mejores bases para triunfar en mi vida. A mi hermano Felipe le agradezco su confianza y momentos de risotadas. De mi hijo Gabriel admiro su alegría, honestidad y espontaneidad. Gabriel representa el cambio radical que mi vida parecía necesitar. Por último, agradezco a Pablo Silva, mi prometido, por la forma casi milagrosa en que apareció en mi vida. Por su apoyo incondicional y desinteresado en literalmente cada aspecto de mi vida estaré eternamente agradecida. A nadie he conocido cuya inteligencia para vivir se asemeje.

## ÍNDICE.

<b>RESUMEN.</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>5</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.</b>	<b>7</b>
1. Plegamiento anómalo de las proteínas	9
2. Oligómeros versus fibras y depósitos amiloides	12
3. Efectos citotóxicos de los péptidos amiloides	12
4. Formación de canales iónicos en la membrana	14
5. Composición de las membranas artificiales y su interacción con los péptidos amiloides	15
6. Distribución de los fosfolípidos en membranas celulares y las "flipasas"	16
7. Mecanismo común de toxicidad, pero distintas predisposiciones celulares	17
<b>OBJETIVOS.</b>	<b>19</b>
1. Hipótesis	19
2. Objetivo general	19
3. Objetivos específicos	19
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>20</b>
1. Líneas celulares y péptidos amiloides	20
2. Medición de los niveles de luminiscencia	20
3. Cuantificación de la viabilidad celular	22
4. Protocolo para la determinación de la concentración de calcio intracelular	23
5. Análisis de resultados	25
<b>RESULTADOS.</b>	<b>26</b>
1. La reducción en las concentraciones de glucosa en astrocitos expuestos a los péptidos amiloides favorecen la respuesta de ingreso de $\text{Ca}^{2+}$ hacia el citoplasma	26

2.	Efecto del ácido 3 bromopirúvico como bloqueador de la producción de ATP y como incrementador de la muerte celular en la línea MIN 6	29
3.	Efecto de 3 BrPA y la depleción de glucosa sobre el contenido de ATP celular	30
4.	Evaluación de la viabilidad en células tratadas con 3 BrPA y en un medio RMPI libre de glucosa	32
5.	Observación de los cambios en la liberación de ATP citoplasmático en células expuestas a 50 $\mu$ M de 3 BrPA y concentraciones libres y altas de glucosa por un periodo de 6 h	34
6.	Evaluación de la viabilidad celular en MIN 6 tratadas con 3 BrPA y concentraciones libres y altas en glucosa expuestas a los péptidos amiloides	35
<b>DISCUSIÓN.</b>		<b>37</b>
1.	Diferencias entre la depleción de glucosa y el bloqueador metabólico 3 BrPA	37
2.	Mecanismos de defensa celulares frente al <i>stress</i> metabólico	39
3.	La esquivada determinación de la composición de la membrana	42
4.	La problemática de la dilución de los péptidos amiloides y la obtención de oligómeros solubles	43
<b>CONCLUSIONES.</b>		<b>46</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>		<b>47</b>

## RESUMEN.

Las enfermedades causadas por los péptidos amiloides son numerosas y heterogéneas, afectan a una gran cantidad de órganos y son de importancia tanto para el hombre como los animales. A pesar de que una característica común que engloba este tipo de enfermedades radica en la observación macroscópica extracelular de placas amiloides, numerosos estudios han demostrado que el principal mecanismo de daño celular corresponde a la actividad citotóxica de los péptidos amiloides solubles más que a los depósitos insolubles de placas amiloides extracelulares. En la actualidad, la teoría más aceptada que explica este mecanismo de toxicidad corresponde a la formación de canales permeables a cationes generados por los péptidos amiloides solubles en las membranas de células susceptibles, produciéndose elevaciones masivas de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Sin embargo, los factores que determinan la susceptibilidad celular individual para este proceso no han sido completamente identificados. Este trabajo se basó en la hipótesis de que el *stress* metabólico incrementa la susceptibilidad celular frente a la toxicidad de los péptidos amiloides al alterar la composición fosfolipídica de la membrana. Con esta finalidad, células neuronales y endocrinas fueron sometidas a un *stress* metabólico determinado por la disminución en las concentraciones de glucosa en su medio de cultivo o por la aplicación de un bloqueador de la glicólisis (ácido 3 bromopirúvico), siendo evaluados posteriormente los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la viabilidad celular.

Los resultados obtenidos en astrocitos indicaron que aquellas células cultivadas en ausencia de glucosa son significativamente más susceptibles al efecto tóxico de los péptidos amiloides. Se observaron aumentos considerables en la  $[Ca^{2+}]_i$  pocos segundos después de la aplicación de amilina humana soluble, péptido de origen beta pancreático. No se observaron cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  en células cultivadas con glucosa. Estas observaciones sugieren la presencia de una interacción péptido-membrana. No se observaron disminuciones en la producción de ATP para células cultivadas en ausencia de glucosa.

Los resultados obtenidos en las células beta pancreáticas demostraron que las células más susceptibles al efecto de los péptidos eran aquellas cultivadas en presencia del ácido 3 bromopirúvico, pero no aquellas cultivadas en ausencia de glucosa, determinado por un aumento en la mortalidad celular cuando las células en presencia del bloqueador metabólico

fueron expuestas al péptido  $\beta$  amiloide, de origen neuronal. Se logró comprobar una disminución en la producción de ATP en células cultivadas en ausencia de glucosa versus aquellas cultivadas con altas concentraciones de glucosa. No se observó una asociación entre esta disminución en la producción de ATP con el aumento de la susceptibilidad a los péptidos amiloides.

En conjunto, las observaciones permitieron concluir que el *stress* metabólico es efectivamente un importante factor que incrementa la susceptibilidad celular frente a los péptidos amiloides. No se observó que este efecto se debiera a una disminución en la producción de ATP, factor que induciría una falla en la actividad de las enzimas estabilizadoras de la membrana celular. Nosotros sugerimos que la activación de la cascada de la apoptosis explicaría de mejor manera los cambios en la composición de la membrana celular que la disminución de las concentraciones de ATP. Existen mecanismos celulares que regulan eficientemente la producción de energía y son muy sensibles frente a cambios en el estatus energético celular (sistema AMPK sensor de energía). Cuando el déficit de energía es muy prolongado y el sistema ya no es capaz de compensar las pérdidas, se activa la apoptosis, siendo unos de sus primeros efectos la alteración de la composición de la membrana celular. Esto sería en última instancia lo que incrementaría la susceptibilidad frente a los péptidos amiloides.

Para futuras investigaciones, se sugiere profundizar en los mecanismos metabólicos específicos que afectarían la susceptibilidad celular frente a los péptidos amiloides, como también determinar los cambios específicos que se producen a nivel de las membranas celulares cuando las células se ven enfrentadas a desafíos metabólicos.

## SUMMARY.

Amyloid peptides are responsible for a large and heterogeneous number of diseases that affect numerous organs in humans and animals. Although a common characteristic of these diseases is the observation of macroscopic extracellular amyloid plaques, many studies have shown that cellular the damage is due to soluble amyloid peptides rather than to insoluble extracellular amyloid plaques. The leading theory for the mechanism of amyloid-induced cytotoxicity is that that soluble amyloid peptides form cation-permeable channels in the membranes of susceptible cells, leading to a unregulated increase in the intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). However, the factors that determine the susceptibility of individual cells to this process have not been fully identified. This work was based on the hypothesis that metabolic stress increases the susceptibility of cells to amyloid cytotoxicity by changing the membrane phospholipid composition. To this end, neuronal and endocrine cells were exposed to metabolic stress by diminishing the amount of glucose in the media or by adding a glycolytic inhibitor (3 bromopyruvic acid), and the effects of amyloid peptides on  $[Ca^{2+}]_i$  and cell viability were determined.

In the absence of glucose, astrocytes were significantly more vulnerable to the cytotoxic effect of amyloid peptides than cells cultivated with physiological glucose concentrations. Considerable  $[Ca^{2+}]_i$  rises were detected within a few seconds of the application of soluble human amylin (a peptide secreted by pancreatic  $\beta$ -cells), but no modification of this parameter was observed in cells cultivated with glucose. These observations suggest the presence of a membrane-peptide interaction. This effect could not be attributed to a reduced intracellular ATP content.

On the other hand, an increased susceptibility was detected in pancreatic  $\beta$ -cell lines exposed to 3 bromopyruvic acid, but not for glucose-depleted cells. The later was manifested as an increased cellular mortality when cells cultured with the glycolytic inhibitor were exposed to amyloid  $\beta$  peptide (secreted by neurons). Glucose-depleted cells did not increase their mortality when they were exposed to amyloid  $\beta$  peptide. A lower ATP production was measured in glucose-depleted cells compared to those cultured with high glucose levels, but no association between diminished ATP production and an increased susceptibility to the cytotoxic effects of amyloid peptides could be found.

Taken together, the data demonstrate that metabolic stress is an important factor that effectively increases cellular susceptibility to amyloid peptide damage. This effect does not appear to be attributable to a decrease in ATP production, which would in turn inactivate the enzymes that stabilize the membrane composition. We suggest that the activation of apoptosis rather than diminished ATP production would be more likely to induce changes in the composition of the outer leaflet of the membrane. The cellular AMPK regulator system is an extremely sensitive and efficient series of downstream kinases events which detects minimal energy status changes (ATP:ADP ratio), maintaining cellular ATP levels within very constant and narrow ranges. If the metabolic stress persists and thus the ATP production is lowered for a long period of time, the system would no longer support cellular ATP production, activating the apoptosis cascade. One of the first steps after the activation of apoptosis is a modification of the membrane composition, which would in turn make the cells vulnerable to the cytotoxic effects of the amyloid peptides.

The results of this work motivate future studies to determine the specific metabolic mechanisms that affect the cellular vulnerability to amyloid peptides and to quantify specific changes in membrane composition in cells exposed to metabolic threats.

## INTRODUCCIÓN.

Los péptidos amiloides son fragmentos de proteínas que están involucrados en una gran cantidad de enfermedades, tales como la enfermedad de Creutzfeld-Jacob, el mal de Alzheimer y la Diabetes Mellitus tipo 2. Los mecanismos mediante los cuales estos péptidos generan daño celular son muy variados, describiéndose daños en la membrana celular, formación de especies reactivas de oxígeno y *stress* oxidativo, alteración en la transmisión de señales y alteraciones de la función mitocondrial, entre otros (Mattson, 2004).

Se ha postulado que un importante mecanismo de citotoxicidad se produce debido a la interacción y posterior incorporación de estos péptidos en las membranas celulares. De esta forma se generarían canales iónicos, los cuales serían permeables a cationes como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos canales no regulables permitirían la entrada masiva de cationes al interior de la célula, alterando la homeostasis iónica con la consecuente muerte celular (Kawahara y Kuroda, 2000). Así, Kawahara *et al.* (2000), en células neuronales hipotalámicas (GnRH), observaron una importante variabilidad en la respuesta celular frente a los amiloides en cuanto al ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma, postulándose que las células tendrían distintas susceptibilidades al ser expuestas a estos péptidos.

A pesar de los numerosos estudios llevados a cabo, aún no se han podido esclarecer exactamente los mecanismos biofísicos que favorecerían la incorporación de los péptidos amiloides en las membranas celulares. Por otra parte, estudios realizados en membranas artificiales han demostrado que los péptidos amiloides poseen una afinidad mucho mayor por fosfolípidos de tipo ácido o aniónicos que por fosfolípidos neutros (Alarcón *et al.*, 2006). En este contexto, aplicado ahora a membranas biológicas, se ha descrito que las membranas celulares poseen asimetrías en la composición fosfolipídica de ambas monocapas, encontrándose en la monocapa externa una mayor cantidad de fosfolípidos neutros y en la monocapa interna una mayor cantidad de fosfolípidos ácidos. La responsable de mantener esta asimetría es una enzima denominada “flipasa”, la cual requiere de energía o ATP para ejercer su función (Pomorski *et al.*, 2004).

Esto último permitió postular que las grandes diferencias en la susceptibilidad celular ante los efectos de los péptidos amiloides observadas por Kawahara *et al.* (2000), pudieran

explicarse por la presencia de células sometidas a *stress* metabólico o bajas cantidades de energía, lo que disminuiría la capacidad de la enzima flipasa para mantener la asimetría de membrana, exponiéndose fosfolípidos ácidos en la monocapa externa y facilitando de esta manera la incorporación de los péptidos amiloides.

En esta memoria de título, se estudió el efecto de la disminución en el aporte de energía celular como un factor que modifica la composición de las membranas y se evaluó su asociación con el efecto citotóxico de los amiloides. Se utilizaron, como modelo celular, astrocitos y células  $\beta$  pancreáticas clonales que han sido sometidas a *stress* metabólico, basado en el supuesto de que células sometidas a este tipo de *stress* serían más susceptibles a los péptidos amiloides.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Los péptidos amiloides juegan un papel central en las enfermedades denominadas amiloidosis, comprendidas por depósitos extracelulares de proteínas fibrilares que se ubican en una gran variedad de tejidos. El término “amiloides” fue acuñado por el patólogo alemán Rudolf Virchow a mediados del siglo XIX, quien supuso que estos depósitos estaban compuestos por sustancias del tipo del almidón o celulosa, puesto que reaccionaban con el yodo. Hoy en día, se sabe que la estructura fundamental de este tipo de agregados es eminentemente proteica, mientras que los hidratos de carbono y otros compuestos no fibrilares se encuentran asociados a estos depósitos (Picken, 2001; Cháñez-Cárdenas *et al.*, 2002).

Las características generales comunes a todas las amiloidosis y que permiten su diagnóstico se describen a continuación:

1. Aspecto blanquecino y homogéneo, se tiñen con eosina.
2. Se tiñen con Rojo Congo en medio alcalino y muestran birrefringencia verde manzana al ser observados en el microscopio de luz polarizada.
3. Poseen estructura fibrilar cuando se observan con microscopio electrónico.
4. Muestran un patrón de difracción de rayos X de tipo hebra  $\beta$ -plegado.
5. Son afines a los colorantes Tioflavín T y Tioflavín S, con los que forman complejos fluorescentes (Picken, 2001; Cháñez-Cárdenas *et al.*, 2002; Alvarez-Ruiz *et al.*, 2005).

En la actualidad, se han descrito una gran cantidad de enfermedades producidas por este tipo de depósitos (Tabla 1). Las amiloidosis son enfermedades muy heterogéneas pues afectan a una gran cantidad de órganos, pueden ser localizadas o sistémicas, presentan sintomatologías muy diversas y las proteínas que originan los agregados fibrilares son de estructuras y orígenes celulares diferentes (Cháñez-Cárdenas *et al.*, 2002; Hull *et al.*, 2004). Sin embargo, todas estas patologías se derivan de una aberración conformacional producto de un plegamiento anormal de las proteínas, y se propone que las características comunes a todas ellas confluyan en un mecanismo común por el cual los amiloides contribuyan a la patogénesis de la enfermedad produciendo toxicidad y muerte celular (Hull *et al.*, 2004).

ENFERMEDAD O SÍNDROME	PRECURSOR	DISTRIBUCIÓN
Enf. de Alzheimer: esporádica, familiar o de inicio temprano <sup>1</sup> .	Proteína precursora A $\beta$	Localizada
Encefalopatías espongiformes: Kurú, Encefalopatía Espongiforme Bovina (síndrome de las vacas locas), <i>Scrapie</i> (ovejas) y Síndrome de Creutzfeldt-Jacob (humanos).	Proteína Prion (PrP)	Localizada
Amiloidosis AL primaria y asociada a mieloma.	Cadena ligera de Igs	Sistémica Localizada
Amiloidosis AH primaria o asociada a mieloma.	Cadena pesada de Igs	Sistémica Localizada
Amiloidosis familiar senil sistémica <sup>2</sup> .	Transtiretina	Sistémica ¿Localizada?
Amiloidosis AA.	Apoproteína AA sérica	Sistémica
Amiloidosis AH debida a hemodiálisis crónica.	Microglobulina $\beta_2$	Sistémica ¿Localizada?
Polineuropatía familiar amiloidótica, tipo IV y Amiloidosis Hereditaria Renal.	Apolipoproteína AI	Sistémica Localizada
Amiloidosis Familiar <sup>3</sup> .	Gelsolina	Sistémica
Amiloidosis Sistémica Hereditaria.	Variantes de Lisozima	Sistémica
Amiloidosis Familiar.	Cadena $\alpha$ del Fibrinógeno	Sistémica
Amiloidosis Sistémica Hereditaria <sup>4</sup> .	Cistatina C	Sistémica
Tumor de células C de la tiroides.	(Pro) Calcitonina	Localizada
Insulinomas de los Islotes de Langerhans (Diabetes Mellitus Tipo II).	Polipéptido Insular Amiloide	Localizada
Amiloidosis en aurículas.	Factor natriurético atrial	Localizada
Prolactinomas de la glándula pituitaria asociados a envejecimiento.	Prolactina	Localizada
Amiloidosis iatrogénica.	Insulina	Localizada

(<sup>1</sup>) Prototipo holandés. (<sup>2</sup>) Prototipos portugués, japonés y sueco. (<sup>3</sup>) Prototipo finlandés.

(<sup>4</sup>) Prototipo islandés.

**Tabla 1. Enfermedades del plegamiento anómalo de las proteínas** (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2002).

## 1. Plegamiento anómalo de las proteínas:

Las proteínas que poseen enlaces covalentes en condiciones fisiológicas, adquieren una estructura tridimensional característica bastante estable, la que determina su función específica en el organismo. Esta conformación se conoce como el estado nativo de las proteínas, cuyas características fundamentales radican en que su estructura es más estable y su plegamiento espontáneo, es decir, su energía libre es menor que la del estado no nativo o desnaturalizado. Esto permite que la constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) entre el estado desnaturalizado y el estado nativo, favorezca el estado plegado de las proteínas. La presencia de conformaciones no nativas, producidas por fenómenos como mutaciones y condiciones desnaturalizantes, pueden favorecer la agregación y posterior formación de fibras amiloides, producto de alteraciones en el control cinético y termodinámico del plegamiento de las proteínas (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2002).

Se describen a continuación diferentes mecanismos mediante los cuales una proteína puede adquirir un estado anormal de plegamiento y agregación (Lyubchenko *et al.*, 2006):

1. La proteína puede poseer una propensión intrínseca a adquirir conformaciones patológicas, que pueden hacerse evidentes en edades avanzadas o en concentraciones permanentemente elevadas. Como ejemplo podemos mencionar el caso del polipéptido insular amiloide (IAPP) o amilina, que es secretado junto con la insulina en los islotes de Langerhans. En pacientes con Diabetes Mellitus de tipo 2, la capacidad secretora alterada de las células  $\beta$  pancreáticas produce una acumulación excesiva de IAPP a nivel intracelular (Hull *et al.*, 2004). Es normal encontrar cierto grado de proteínas en estado no nativo, pues la transición del estado desnaturalizado o no nativo hacia el estado plegado o nativo y viceversa, son eventos probabilísticos. Sin embargo, al aumentar en exceso la cantidad de proteína presente en las células, se incrementa a su vez el riesgo de que aumente el estado no plegado.
2. Una mutación que produzca el reemplazo de sólo un aminoácido en la proteína, puede aumentar la probabilidad de que ésta adquiriera un plegamiento anormal. Esto se observa frecuentemente en amiloidosis hereditarias o familiares, en las cuales la enfermedad se presenta a edades más tempranas. Un ejemplo de esto ocurre en la

enfermedad de Alzheimer, donde la presentación esporádica de la enfermedad suele evidenciarse a edades avanzadas, mientras que la hereditaria lo hace a más temprana edad.

3. La digestión proteolítica del precursor de la proteína puede generar un fragmento amiloidogénico. Ésta es una anomalía que juega un rol fundamental en la disfunción y muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer, donde se han descrito mutaciones en los genes que codifican para las enzimas encargadas de procesar la proteína precursora del A $\beta$ P (péptido  $\beta$  amiloide). Estas enzimas se conocen como secretasas, siendo específicamente la actividad de la  $\gamma$ -secretasa la que se ve alterada por las mutaciones (Mattson, 2004).
4. Interacciones o interacciones alteradas con algunos factores endógenos (por ejemplo con chaperonas, otras proteínas, entre otros) que puedan aumentar la probabilidad de que una proteína adquiera un plegamiento anormal. Las células poseen mecanismos de “control de calidad” postraduccionales de las proteínas, siendo las chaperonas las encargadas de plegar o replegar a las proteínas recién sintetizadas, mientras que las proteasas degradan aquellas proteínas que no se han plegado correctamente. Una falla en este mecanismo de control puede producir un aumento de proteínas mal plegadas (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2002).
5. Exposición a toxinas internas o externas que induzcan cambios conformacionales en una proteína y faciliten su plegamiento anómalo y agregación. También se han estudiado los efectos del entorno fisiológico, y se sabe que el pH ácido puede favorecer la generación de plegamientos anómalos. Para el caso del IAPP, se han observado alteraciones en la formación de fibras amiloides producto de modificaciones en el pH o concentraciones de calcio intracelular, sugiriéndose que el ambiente normal dentro de los gránulos de secreción mantiene al IAPP en estado soluble y no fibrilar (Hull *et al.*, 2004).
6. Una disfunción del sistema de defensa antioxidante puede llevar a la producción excesiva de radicales libres, que pueden inducir la modificación oxidativa de una proteína.
7. Modificaciones postraduccionales alteradas (fosforilaciones, glicosilaciones, deamidaciones, entre otras) producto de un stress del retículo endoplásmico puede

alterar estos procesos, causando la acumulación de proteínas en conformación no nativa.

8. El funcionamiento alterado del proteasoma u otros sistemas proteolíticos pueden resultar en una acumulación exagerada de las concentraciones locales de la proteína patógena.

Los mecanismos anteriormente mencionados pueden alterar el plegamiento de las proteínas individualmente o de manera conjunta. Sin embargo, independientemente del mecanismo asociado, una característica común para las amiloidosis considera la formación irreversible de láminas antiparalelas  $\beta$ -plegadas para cada unidad proteica (Kourie y Shorthouse, 2000). Por ejemplo, la PrP<sup>c</sup>, isoforma celular normal de la proteína priónica, posee principalmente  $\alpha$ -hélices (40-42%) y poca cantidad de estructuras  $\beta$ -plegadas (3%), pero la estructura patógena (PrP<sup>sc</sup>) está compuesta principalmente por estructuras  $\beta$ -plegadas (43-45%) y una menor proporción de  $\alpha$ -hélices (30%). Esta estructura determinaría la patogenicidad de la proteína, dando paso a un nuevo concepto de agente infeccioso en el cuál la proteína priónica patológica sería la directa responsable de la signología observada en las Enfermedades Espongiformes Transmisibles (Encefalopatía Espongiforme Bovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, insomnio familiar fatal, scrapie, entre otras) (Prusiner *et al.*, 1998; Rymer y Good, 2000). Lo mismo ocurre para la IAPP o amilina humana, donde los residuos desde el 20 al 29 son fundamentales para la formación de estas estructuras. La IAPP de ratas y ratones, por su parte, contiene prolinas en esta región aminoacídica, lo que impide la formación de estructuras  $\beta$ -plegadas. Esta característica impide que la proteína genere depósitos amiloides y más aún, se sabe que la IAPP proveniente de estas especies no es tóxica (Hull *et al.*, 2004). Estas características son comunes para las amiloidosis independientemente de la secuencia y estructura original de las proteínas y permiten la observación del patrón de difracción de rayos X anteriormente mencionado.

Luego de adquirir el plegamiento anormal, las proteínas en estado soluble comienzan un proceso de polimerización, generando agregados solubles u oligómeros solubles. Estos serían precursores de las subprotofibrillas, las cuales se ensamblan en protofibrillas, luego en fibrillas y por último en los depósitos amiloides. Los estados fibrilares son insolubles, siendo los depósitos amiloides resistentes a proteasas y extremadamente insolubles, característica que dificultó por muchos años conocer la composición de los agregados luego

de que fueran descritos por primera vez. El proceso de polimerización en un principio sería lento, pero luego de formadas las fibrillas, estas representarían el núcleo requerido para facilitar y acelerar el proceso de agregación (Weissman *et al.*, 2002; Hull *et al.*, 2004).

## **2. Oligómeros versus fibras y depósitos amiloides:**

Es razonable considerar a los depósitos o placas amiloides como agentes causales de la citotoxicidad observada en la patogenia de las amiloidosis. Sin embargo, un nutrido grupo de investigaciones ha permitido postular que estos depósitos amiloides no son los principales responsables de la patología de este tipo de enfermedades, sino que lo serían las estructuras precursoras de estos agregados. Se ha observado, por ejemplo, que existe una correlación muy débil entre la gravedad de los síntomas en pacientes con enfermedad de Alzheimer y las placas amiloides depositadas en las neuronas y más aún, se ha detectado la aparición de síntomas previo a la observación de estos depósitos (Cleary *et al.*, 2005). Esto podría deberse a la acción patológica de estructuras prefibrilares en el proceso de polimerización, las que corresponderían en particular a los oligómeros solubles, los cuales serían los principales responsables de las propiedades citotóxicas y de la muerte celular (Arispe *et al.*, 1994a; Cháñez-Cárdenas *et al.*, 2002; Hull *et al.*, 2004; Cleary *et al.*, 2005; Demuro *et al.*, 2005; Glabe, 2006). Los amiloides poseen propiedades estructurales comunes determinadas por su capacidad de polimerizar y por el hecho de que, independientemente del origen de la proteína, los oligómeros representarían la estructura patogénica primaria (Kayed *et al.*, 2003; Glabe, 2006).

## **3. Efectos citotóxicos de los péptidos amiloides:**

Los péptidos o fragmentos de proteínas precursoras que dan origen a los péptidos amiloides cumplen con diversas funciones fisiológicas en el organismo. Es así como al polipéptido insular amiloide (IAPP) se le han descrito funciones en la regulación del metabolismo de la glucosa, inhibición de la secreción de glucagón, como también efectos a nivel cerebral, regulando la ingesta de alimentos y peso corporal (Hull *et al.*, 2004). La proteína priónica celular (PrP<sup>c</sup>), por su parte, funcionaría como receptor o molécula de adhesión del sistema

nervioso central, estaría ligada a los mecanismos de transducción de señales, metabolismo del cobre y actividades antioxidantes y antiapoptóticas (Hur *et al.*, 2002). Para el caso de la proteína precursora del péptido  $\beta$  amiloide (APP), cuyo fragmento A $\beta$ P ha sido uno de los más estudiados dada su importantísima participación como agente etiológico en la enfermedad de Alzheimer, se le ha descrito su participación en procesos tan importantes como la plasticidad neuronal, transmisión de señales, adhesión celular y también por poseer propiedades neurotróficas y neuroprotectivas (Turner *et al.*, 2003).

Cuando una proteína adquiere un plegamiento anormal, no sólo pierde la función para la cual está destinada originalmente, sino que también da origen a una gran variedad de efectos tóxicos a nivel celular. Se han realizado muchos estudios que demuestran la importancia de los péptidos amiloides como agentes que producen daño celular. Los efectos citotóxicos parecen ser muy variados pues involucran numerosas estructuras y funciones celulares. Algunos de estos efectos citotóxicos se describen a continuación:

1. Se han descrito asociaciones entre la presencia de péptidos amiloides y un aumento del estrés oxidativo. Las células en el cerebro de pacientes con Alzheimer y Creutzfeldt-Jacob exhiben altas cantidades de proteínas, lípidos y DNA oxidados. También se ha observado un aumento en la producción de radicales libres en células  $\beta$  pancreáticas afectadas por IAPP (Hur *et al.*, 2002; Hull *et al.*, 2004; Mattson, 2004).
2. La disfunción mitocondrial también pareciera ser un fenómeno común en células afectadas por los péptidos amiloides. En estos casos, se han observado alteraciones en la cadena transportadora de electrones, aumento en la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) y calcio intramitocondrial, disminución en la actividad de la citocromo c oxidasa y un aumento de su liberación hacia el citoplasma, alteraciones de la permeabilidad mitocondrial y disminución de metabolitos energéticos (razón ATP/ADP). Una falla mitocondrial, además de generar una disminución en la producción de energía, está directamente relacionada con la inducción de apoptosis (Hur *et al.*, 2002; Mattson, 2004; Takuma *et al.*, 2005).
3. La interacción de los péptidos amiloides con la membrana celular puede producir daño oxidativo en su estructura, peroxidando los lípidos de membrana y oxidando

proteínas tales como los transportadores de membrana, receptores y canales iónicos. Esto último está directamente relacionado con una alteración de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Mattson, 2004).

4. Las alteraciones en la regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y las especies reactivas de oxígeno, entre otras, pueden producir un stress del retículo endoplásmico. Se sabe que si este stress es prolongado se produce la liberación de caspasa 12, induciendo una activación de la apoptosis mediada específicamente por el retículo endoplásmico (Takuma *et al.*, 2005).
5. Los factores anteriormente mencionados parecen converger en un mecanismo común de muerte celular: la apoptosis. La detección de proteínas involucradas en la vía apoptótica es un evento común para muchas enfermedades causadas por los péptidos amiloides.

#### **4. Formación de canales iónicos en la membrana:**

A pesar de los mecanismos de daño celular antes mencionados, un evento clave en la citotoxicidad celular corresponde a la generación de canales iónicos en la membrana, observaciones descritas por primera vez por Arispe *et al.* (1993a) en membranas artificiales. Estos canales iónicos fueron observados en un principio al fusionar liposomas que contenían A $\beta$ P (1-40) incorporado en la membrana y luego se demostró que el péptido podía hacerlo también desde un estado soluble. Estos descubrimientos y estudios realizados por otros investigadores, llevaron a los mismos autores a postular la hipótesis de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  generados por el péptido A $\beta$ P como mecanismo de muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer (Arispe *et al.*, 1994a).

Algunas de las características más importantes de los canales descubiertos en estos estudios se describen a continuación (Arispe *et al.*, 1994b):

1. Se detecta su actividad minutos después de la adición del péptido soluble.
2. Se incorporan en membranas artificiales uni y bilaminares.
3. Son selectivos para cationes en el siguiente orden de permeabilidad:  $\text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{Ca}^{++} \geq \text{K}^+ > \text{Na}^+$ .
4. Son bloqueados por trometamina y Zinc.

5. Exhiben múltiples niveles de conductancia.
6. Un mismo canal puede interconvertirse espontáneamente en distintos niveles de conductancia en rangos de los picosiemens y nanosiemens.

El hecho de que posean múltiples niveles de conductancia implica que los canales son de tamaños variables, lo que sugiere que los monómeros de A $\beta$ P (1-40) polimerizan en dímeros y oligómeros de mayor tamaño para formar un canal. Otro hecho importante derivado de estas observaciones radica en que un canal de las dimensiones gigantescas en el rango de los nanosiemens se encuentra en pocas instancias en la biología, como por ejemplo, en la interacción del complemento con las células blanco. Esto implica un daño mayor en las membranas biológicas y el flujo masivo de iones a favor de su gradiente de concentración generado por los canales, alteraría la homeostasis celular de forma irreversible (Arispe *et al.*, 1993b; Arispe *et al.*, 1994b).

Desde el descubrimiento de los canales formados por los péptidos amiloides, un número creciente de investigaciones ha demostrado la veracidad de estas observaciones, aportando evidencia de que estos descubrimientos son válidos tanto para membranas artificiales como para membranas de distintos tipos celulares. Además, estos estudios han demostrado que distintos tipos de péptidos amiloides y no sólo el péptido  $\beta$  amiloide pueden formar canales iónicos citotóxicos en membranas celulares y artificiales (Kawahara *et al.*, 1997; Kawahara *et al.*, 2000).

## **5. Composición de las membranas artificiales y su interacción con los péptidos amiloides:**

Un factor clave para la inserción de los péptidos amiloides en la membrana comprende tanto la adquisición de una estructura  $\beta$  plegada en la estructura de las proteínas como la composición de la membrana con la cuál los péptidos interactúan. Los estudios realizados por Arispe *et al.* (1993a), mencionados arriba, fueron realizados en membranas artificiales compuestas por fosfolípidos de tipo ácido o aniónicos (fosfatidil etanolamina y fosfatidil serina). Otro estudio realizado por Alarcón *et al.* (2006), demostró que los cambios en las concentraciones intracelulares de cationes inducidas por A $\beta$ P sólo fueron observadas en membranas artificiales (liposomas) compuestas por fosfatidil serina (PS), y no en aquellas

compuestas por fosfolípidos neutros como fosfatidil colina (PC). El estudio determinó que una pequeña cantidad de fosfatidil serina (5%) estimulaba el influjo de calcio hacia el interior de los liposomas, sugiriendo que cambios menores en la distribución de fosfolípidos de las membranas podrían tener un efecto importante en la interacción péptido-membrana. Esto también fue observado por Seelig *et al.* (1995), quienes demostraron que las interacciones electrostáticas entre los péptidos y las membranas son fundamentales, lo que determina que la estructura del péptido al interactuar con la membrana adquiera o no la estructura que le permita insertarse en ella y generar canales.

## **6. Distribución de los fosfolípidos en membranas celulares y las “flipasas”:**

La composición de los componentes de las membranas celulares y su distribución son fundamentales para el funcionamiento adecuado de la célula y estos deben ser mantenidos bajo un estricto control (Daleke, 2003). La composición lipídica de las membranas celulares está formada principalmente por fosfolípidos, glicolípidos y colesterol (Tannert *et al.*, 2003). Los diferentes organelos celulares y la membrana celular poseen distintas distribuciones de sus componentes de membrana, lo que demuestra que esta distribución está determinada por actividades enzimáticas. Mientras que los organelos como el retículo endoplásmico (RE) y el Golgi tienen una distribución más bien simétrica de los fosfolípidos de membrana, la membrana celular es absolutamente asimétrica. Los lípidos que contienen colina como la fosfatidil colina (PC), y otros como esfingomielina y colesterol, se encuentran principalmente en la monocapa externa de la membrana, mientras que los lípidos que contienen aminas, como fosfatidil etanolamina (PE) y fosfatidil serina (PS), se localizan de preferencia en la monocapa interna. Esta asimetría se debe a la actividad de enzimas dependientes de ATP, siendo la flipasa o translocasa aminofosfolipídica la encargada de dirigir los fosfolípidos ácidos o aminoacídicos como PS y PE hacia el interior en contra de su gradiente de concentración (Daleke, 2003; Tannert *et al.*, 2003; Pomorski *et al.*, 2004). Este proceso es de vital importancia para las células y puede verse modificado en situaciones patológicas o en situaciones de activación celular. En el proceso de coagulación, la exposición de PS en la membrana de las plaquetas permite a éstas adherirse al sitio de la injuria; la reacción acrosomal (fundamental en el proceso de maduración de

los espermatozoides), requiere de la externalización de PS a la superficie; en células apoptóticas la externalización de PS es indispensable para su reconocimiento por parte de las células fagocíticas para su remoción. Por otra parte, existen una serie de enfermedades que están asociadas a la exposición de PS en la superficie de las células afectadas, como por ejemplo, el síndrome antifosfolipídico, malaria, talasemia, preeclampsia, entre otras (Zwaal *et al.*, 2005).

### **7. Mecanismo común de toxicidad, pero distintas predisposiciones celulares:**

Kawahara *et al.* (2000), extendieron los resultados obtenidos en membranas artificiales con el péptido  $\beta$  amiloide, utilizando células de una línea celular hipotalámica GnRH para observar los cambios producidos en las concentraciones intracelulares de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) debidas a las interacciones entre péptidos como la amilina, PrP<sup>sc</sup> y A $\beta$ P con la membrana de ésta línea celular. Los resultados fueron concluyentes y demostraron que los tres péptidos producían aumentos sustanciales en el calcio citosólico libre intracelular.

Sin embargo, los investigadores observaron también que para estas células, que son genéticamente idénticas, la heterogenicidad en sus respuestas al aumento del  $[Ca^{2+}]_i$  era muy elevada. Las curvas de los aumentos de  $[Ca^{2+}]_i$  presentaban al menos 6 tipos de patrones distintos, que representaban células que reaccionaban inmediatamente o con cierto retardo a la aplicación de los péptidos y otras en que la magnitud y duración de la respuesta era diferente. Pero el hecho más significativo correspondió a la observación que dentro de un mismo grupo de células, muchas de ellas no se vieron afectadas por la adición de los péptidos amiloides.

Los autores, basándose en el hecho de que estaban trabajando con células idénticas, propusieron la hipótesis de que las propiedades o composición de la membrana celular, en particular, de la monocapa externa, podría contribuir a esta diferencia de respuestas de  $[Ca^{2+}]_i$  así como también a las distintas susceptibilidades celulares observadas frente a los péptidos amiloides (Kawahara y Kuroda, 2000).

La información obtenida a partir de estas observaciones, sumadas a los conocimientos existentes sobre la formación de canales iónicos, la interacción entre los péptidos amiloides con las membranas artificiales y la distribución de los componentes de membrana en las

células, permitieron proponer el siguiente mecanismo: las diferencias en las susceptibilidades celulares frente a la acción citotóxica de los péptidos amiloides corresponde a diferencias particulares en el estado energético de las células. El efecto del *stress* metabólico o deficiencia de energía permitiría observar una respuesta incrementada en los aumentos de  $[Ca^{2+}]_i$  y citotoxicidad producto de la aplicación de péptidos amiloides en éstas células, a diferencia de células en condiciones metabólicas normales. Este aumento en la susceptibilidad estaría relacionado con una disminución en la actividad de la flipasa o translocasa aminofosfolípídica, la cual, como fue mencionado arriba, requiere de ATP para dirigir los fosfolípidos ácidos como PS y PE hacia la monocapa celular interna. Al no poder mantener esta asimetría de membrana por un bajo aporte de energía, los fosfolípidos ácidos se redistribuirían hacia el exterior de la membrana celular. En el caso de estar expuesta la célula a los péptidos amiloides, los fosfolípidos ácidos interactuarían con estos péptidos y facilitarían su incorporación en la membrana, generando los canales iónicos permeables a  $Ca^{2+}$ , que alterarían la homeostasis celular.

El mecanismo antes propuesto será la base de investigación en este estudio, en el cual se pretende ahondar en los mecanismos de daño celular que generan los péptidos amiloides, determinar qué poblaciones celulares se encuentran más expuestas a estos daños y eventualmente proponer mecanismos que prevengan, al menos en cierto grado, el efecto citotóxico generado por los péptidos amiloides.

## **OBJETIVOS.**

### **1. HIPÓTESIS.**

Una disminución en el aporte de energía celular produce una reducción de ATP y aumenta la susceptibilidad celular frente a los péptidos amiloides.

### **2. OBJETIVO GENERAL.**

Demostrar que el *stress* metabólico incrementa el efecto citotóxico generado por los péptidos amiloides.

### **3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- 1) Evaluar el efecto de la exposición a bajos niveles de glucosa y un bloqueador metabólico en la concentración de ATP intracelular en células neuronales y endocrinas.
- 2) Evaluar los efectos del *stress* metabólico en la viabilidad celular en presencia y ausencia de péptidos amiloides.
- 3) Evaluar los efectos del *stress* metabólico sobre los cambios en la concentración de calcio intracelular inducidas por los péptidos amiloides.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

La presente memoria de título fue desarrollada en el Laboratorio de Neuroendocrino, Programa de Genética Humana del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### 1. Líneas celulares y péptidos amiloides:

Los experimentos fueron realizados en dos líneas celulares: células de la línea U373MG derivadas de astrocitoma humano y células pancreáticas de la línea MIN 6 derivadas de insulinoma de ratón. Los astrocitos fueron mantenidos en un medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 10 mM de HEPES, 11,9 mM de bicarbonato y 1% de penicilina-estreptomina. Las células MIN 6 fueron mantenidas en un medio DMEM con alta glucosa (25 mM) suplementado con 15% de SFB, 17,85 mM de bicarbonato, 1 mM de piruvato de sodio, 1% de  $\beta$ -Mercaptoetanol y 1% de penicilina-estreptomina. Ambas líneas celulares se mantuvieron en una cámara de cultivo con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37 °C hasta la experimentación.

Los péptidos amiloides utilizados fueron: péptido amiloide  $\beta$  o A $\beta$ P (1-40) humano y amilina humana (8-37). Estos fueron reconstituidos en agua bidestilada estéril y se mantuvieron en *stock* a una concentración de 100  $\mu$ M a -20 °C hasta su uso.

### 2. Medición de los niveles de luminiscencia:

Para la medición de los cambios en las concentraciones de ATP en células expuestas a distintos niveles de glucosa, se cultivaron células en concentraciones fisiológicas o bajas en glucosa por distintos periodos de tiempo. Para comparar el efecto del *stress* metabólico producido por la disminución en las concentraciones de glucosa, se utilizó un reactivo conocido como ácido 3 bromopirúvico (3 BrPA), el cual bloquea la glicólisis, disminuyendo las concentraciones de ATP celular (Ko *et al.*, 2004). El objetivo fue comparar los efectos de ambos tratamientos sobre las variaciones en los niveles de ATP celular, como también los efectos de los péptidos en ambas condiciones y así definir que los

resultados obtenidos se debieran al mismo efecto de la disminución de ATP y no a otro mecanismo diferente provocado por la reducción en los niveles de glucosa.

Las mediciones de ATP se realizaron utilizando un sistema de luminometría (Bioluminescent Somatic Cell Assay Kit®, Sigma-Aldrich® Cat # FL-ASC). El kit contiene un agente liberador de ATP de células somáticas (detergente que permite la lisis y posterior liberación del contenido de ATP celular) y una mezcla de luciferín y luciferasa, que reaccionan con el ATP emitiendo luminiscencia. Al contactar a los fabricantes para conocer la composición del agente liberador de ATP, éstos nos informaron que se trata de un detergente no iónico, pero que su formulación es exclusiva y por ende no la revelan. El mecanismo mediante el cual se hace posible la medición de la bioluminiscencia corresponde a la reacción entre la luciferina y el ATP libre, catalizado por la luciferasa de luciérnaga y  $Mg^{2+}$ , de modo que el sustrato que se genera corresponde a la adenil-luciferina. Este compuesto al reaccionar con  $O_2$  genera oxiluciferina, AMP,  $CO_2$  y luz. El protocolo recomendado por los fabricantes es el siguiente:

- Se cultivan las células en placas *multiwell* de 24 pocillos con el medio de cultivo respectivo. Se cuenta el número de células exactamente entre 50.000 y 75.000 por pocillo, utilizando una cámara de Neubauer.
- Se adicionan las distintas concentraciones de glucosa o 3 BrPA a cada placa y se colocan en una cámara de cultivo a 37 °C y 5% de  $CO_2$  durante 3, 6, 12 o 24 h.
- Transcurrido el tiempo de exposición, se extrae el medio de cultivo, se realiza un lavado con PBS pH 7,4 y se desprenden las células con 0,5 mL de tripsina 0,1% más EDTA.
- Se agregan 0,5 mL de PBS y se traspasan las células a un tubo *ependorf* de 1,5 mL. Se centrifuga por 5 min a 235 xg.
- Se extrae el sobrenadante y se resuspende el pellet en 200  $\mu$ L de DPBS pH 7,8.
- En una cubeta para la medición de luminiscencia, se colocan 100  $\mu$ L de la mezcla para ensayo, que contiene el indicador de ATP (luciferín luciferasa).
- Luego de 3 min se agregan a la cubeta 50  $\mu$ L de las células en suspensión, 50  $\mu$ L de agua bidestilada estéril y 100  $\mu$ L del agente liberador (detergente que produce lisis celular y liberación de ATP). La luminiscencia debe medirse inmediatamente.

- La luminiscencia emitida es captada por un fotomultiplicador, para luego ser amplificada y digitalizada por un fotómetro utilizando el programa Axoscope®.
- Las unidades de medición que se utilizaron fueron arbitrarias, puesto que el interés principal fue comparar la luminiscencia entre las distintas condiciones y no obtener datos precisos de la cantidad de ATP.

El protocolo mencionado fue modificado puesto que presentaba algunos inconvenientes, entre los cuales podemos mencionar una excesiva manipulación de las células. Se libera una gran cantidad de ATP sólo por exponer las células a un medio de cultivo frío (comentarios personales, Dra. Sonja Buvinic). Se decidió entonces trabajar con las células directamente adheridas a la placa, se retiraba el medio de cultivo y se colocaban los reactivos directamente sobre las células. Los fabricantes no poseen un protocolo para células adheridas, pero aseguran que el agente liberador es capaz de lisar células adheridas a la placa y de esta forma liberar ATP. Este procedimiento reducía el *stress* producido a las células debido a la tripsinización, centrifugación y resuspensión y permitía analizar un mayor número de muestras por experimentación. El resto del protocolo se mantuvo igual.

### **3. Cuantificación de la viabilidad celular:**

Para evaluar los efectos del *stress* metabólico sobre la citotoxicidad inducida por los amiloides, se cuantificó el nivel de muerte celular en células expuestas a bajos niveles de glucosa o 3 BrPA en presencia y ausencia de los péptidos amiloides. De este modo, las células en distintas concentraciones de glucosa o 3 BrPA fueron expuestas a los péptidos amiloides y luego fueron sometidas a la prueba de viabilidad o ensayo de toxicidad (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells, Invitrogen® Cat # L-3224). El objetivo fue detectar el número o proporción de células vivas y muertas para determinada condición de experimentación y así evaluar el grado de citotoxicidad en células metabólicamente estresadas y en células bajo condiciones normales. Para esto, el *kit* contiene dos fluoróforos que evalúan dos reconocidos parámetros de viabilidad celular: la actividad de las esterasas intracelulares y la integridad de la membrana celular. La actividad de las esterasas hidroliza la Calceína AM (que puede atravesar la membrana celular), la que adquiere una intensa fluorescencia verde en células vivas. Las células que

presenten daños en su membrana celular permitirán el ingreso del Ethidium Homodímero-1 (que no puede atravesar una membrana intacta) a su interior, el que adquirirá una fluorescencia roja 40 veces mayor al unirse con los ácidos nucleicos de las células muertas. El procedimiento a realizar es el siguiente:

- Se prepara una solución que contenga 0,5  $\mu\text{M}$  de Calceína AM y 5  $\mu\text{M}$  de Ethidium Homodímero-1 en tampón DPBS.
- Después de incubar las células (previamente cultivadas en cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro) con el tratamiento adecuado, se extrae el medio de cultivo y se lavan las placas dos veces en PBS.
- Se agregan 50  $\mu\text{L}$  de la solución ya preparada directamente sobre el cubreobjetos.
- Se incuban las placas durante 45 min en placas Jumbo que contengan una pequeña película de agua destilada y se cubren con una bolsa negra. Luego se colocan en la cámara de flujo laminar a baja luz y con el mechero apagado.
- Transcurridos los 45 min se lavan las placas dos veces en PBS.
- Se extrae cada cubreobjetos con unas pinzas y se apoya con su parte inferior (canto) levemente en una toalla para extraer el exceso de PBS.
- Se coloca una gota de medio de montaje en un portaobjetos y sobre ella se deposita suavemente el cubreobjetos.
- Se limpia con una toalla suavemente la superficie de la muestra y se mantiene en la oscuridad.

Inmediatamente se observan los resultados en un microscopio con los filtros correspondientes para las longitudes de onda de los indicadores de viabilidad. Las células muertas se observarán de color rojo, mientras que las vivas se observarán de color verde.

#### **4. Protocolo para la determinación de la concentración de calcio intracelular:**

Para medir la concentración de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), se utilizó un sistema de microfluorimetría montado en un microscopio invertido. Las células se cultivaron en cubreobjetos de vidrio y se cargaron con el indicador de calcio indo-1 AM (2  $\mu\text{M}$ ) por 45 min. Luego, el cubreobjetos se colocó en una cámara que permite la adición de soluciones para experimentación y se montó para ser observado en el microscopio. Las células

cargadas con indo-1 AM son excitadas con luz UV de 340 nm, que en respuesta emiten fluorescencia a 405 y 485 nm. La intensidad de la luz en cada longitud de onda es constantemente medida por un fotomultiplicador y es digitalizada y grabada en un PC, utilizando el programa Axoscope®, el cual calcula la razón de las emisiones de fluorescencia 405/485 en el tiempo, obteniéndose la correspondiente  $[Ca^{2+}]_i$  mediante una curva de calibración. Las señales obtenidas fueron digitalizadas a 1 Hz (una muestra por seg). El protocolo para la determinación de la concentración de calcio intracelular se describe a continuación:

- En un tubo *ependorf* de 0,5 mL se dispensan 10  $\mu$ L de ácido plurónico al 20% y 10  $\mu$ L de indo-1 AM a 1 mM en DMSO. Se traspasan los reactivos a 5 mL de una solución fisiológica normal para obtener una concentración final del indicador de calcio de 2  $\mu$ M.
- Se lavan las células cultivadas previamente en cubreobjetos de vidrio de 15 mm de diámetro con PBS y luego se coloca la solución con el indicador de calcio.
- Luego de una incubación por 45 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, se realizan 2 lavados con PBS y se mantienen las células en solución fisiológica protegidas de la luz hasta la medición de la concentración de calcio intracelular en el microfluorímetro.
- Las concentraciones de  $[Ca^{2+}]_i$  serán calculados utilizando la ecuación:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d * \beta * (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

donde  $K_d$  es la constante de disociación para indo-1 (224 nm); R es la razón de las emisiones de fluorescencia  $F_{405}/F_{485}$ ;  $R_{min}$  es la razón  $F_{405}/F_{485}$  para una solución de 10  $\mu$ M de indo-1 sin calcio;  $R_{max}$  es la razón  $F_{405}/F_{485}$  para una solución de 10  $\mu$ M de indo-1 con 39,8  $\mu$ M de calcio y  $\beta$  es la señal de fluorescencia a 405 nm para 0  $\mu$ M de  $Ca^{2+}$  dividida por la señal de fluorescencia a 485 nm para 39,8  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ .

Para realizar la calibración se utilizaron células de la línea de astrocitoma humano. Las células, cultivadas en cubreobjetos de vidrio de 15 mm de diámetro, se incubaron por 45 min con el indicador de calcio indo-1 AM. Luego, a un cubreobjetos se le agregó un medio rico en calcio (10 mM Hepes, 100 mM KCl y 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,2) y a otro un medio libre de calcio (10 mM Hepes, 100 mM KCl y 10 mM EGTA; pH 7,2) y se dejaron en la estufa de cultivo por 30 min. A cada medio de cultivo de 5 mL se le incorporaron 15  $\mu$ L de ionomicina 10 mM, un ionóforo de  $Ca^{2+}$  que forma poros en la

membrana y permite el ingreso de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Luego de este periodo, se midieron las señales basales emitidas por 10 células para cada condición y se obtuvieron los promedios de las razones de fluorescencia  $F_{405}/F_{485}$  para las células cultivadas con calcio y para aquellas cultivadas sin calcio. Los valores que se obtuvieron fueron los siguientes:

- $R_{\max}$ : 6,0697
- $R_{\min}$ : 0,478
- $\beta$ : 3,744

Por lo tanto, la fórmula utilizada para calcular las concentraciones de calcio (en nanomolar) fue la siguiente:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = 224 * 3,744 * (R - 0,478) / (6,0697 - R)$$

## 5. Análisis de resultados:

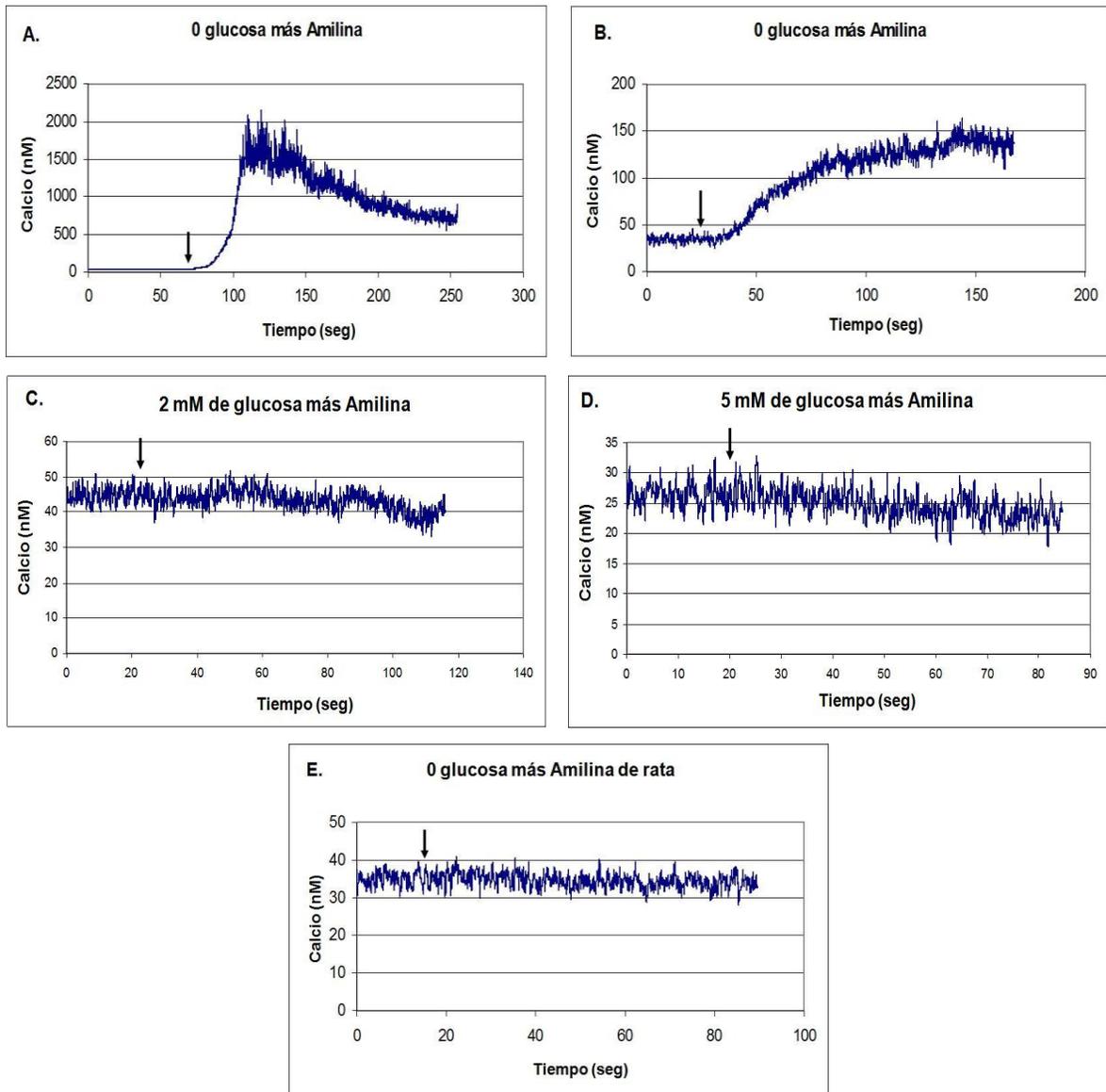
Para el análisis estadístico de los resultados, las medias aritméticas fueron representadas en gráficos con sus respectivas desviaciones estándar. Para el análisis del efecto de concentraciones crecientes de reactivos, se utilizó una prueba de regresión del valor de  $\beta$ . Se utilizó el Análisis de Varianza de una vía para las variables múltiples y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para los casos en los cuales las variables fueron expresadas como probabilidades, se realizó la transformación de Bliss para los valores menores a 30% y mayores a 70% previo al Análisis de Varianza. Los análisis se realizaron mediante el programa GraphPad Prism 4. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados significativos.

## RESULTADOS.

### **1. La reducción en las concentraciones de glucosa en astrocitos expuestos a los péptidos amiloides favorecen la respuesta de ingreso de $\text{Ca}^{2+}$ hacia el citoplasma.**

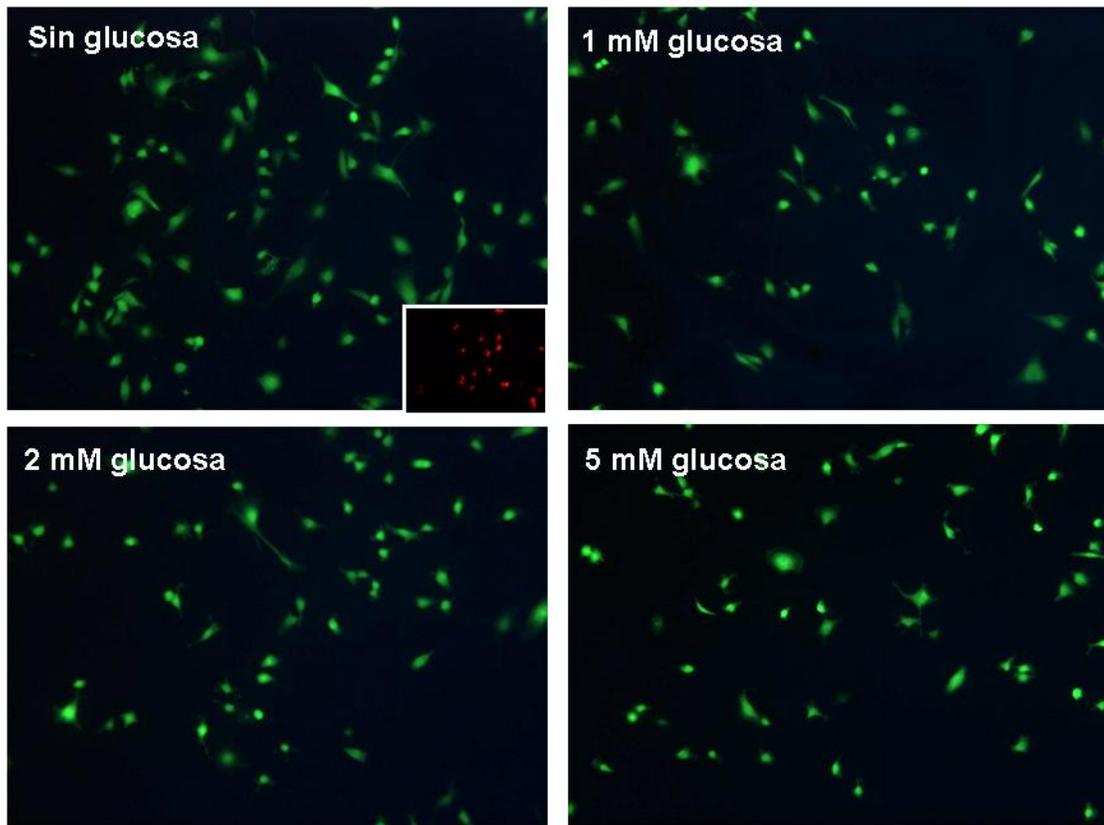
A través del uso del sistema de microfluorimetría se evaluó el efecto del ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma de astrocitos, producto de la aplicación de 5  $\mu\text{M}$  de amilina (Fig.1). Estas células fueron cultivadas con concentraciones de 0 (ausencia de glucosa), 2 y 5 mM de glucosa durante 45 min. El indicador de calcio utilizado fue indo-1 AM. Sólo las células en la condición de ausencia de glucosa (3 de 6 células) respondieron a la aplicación de amilina con aumentos considerables de calcio citosólico. Ninguna célula (0 de 6 células) cultivada en medios con 2 o 5 mM de glucosa reaccionó luego de ser expuesta a amilina. La aplicación de la prueba estadística de Fischer determinó que estos resultados son significativos con un valor de  $p=0,02$ .

Posterior a la obtención de estos resultados, se descartó un posible efecto de la adición de soluciones en los cambios de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células en el proceso de medición de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Para esto se trabajó con células cultivadas en medios sin glucosa y se realizó el mismo procedimiento que para el primer experimento, pero esta vez se utilizó también amilina de rata, la cual posee una estructura muy similar a la amilina humana pero carece de toxicidad. 4 de 5 células reaccionaron ante la aplicación de amilina humana, mientras que ninguna (0 de 5 células) reaccionó luego de la aplicación de amilina de rata, a pesar de haber sido cultivadas en medios libres de glucosa (Fig. 1). La prueba de Fischer para el análisis de estos resultados arrojó un valor de  $p=0,02$ . Las curvas de aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  son básicamente de dos tipos, de las cuales algunas presentan una reacción de tipo exacerbado, donde la reacción frente a la aplicación del péptido es inmediata y muy elevada, alcanzando elevaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de 1500 nM o mayores, lo que implicaría la generación de poros de tamaño del rango de los nanosiemens, mencionados en el punto 4 de la revisión bibliográfica. Las otras curvas serían de tipo más discreto, alcanzando un máximo de elevación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de 300 nM y con aumentos más paulatinos. Esta heterogenicidad en los tamaños y tipos de las curvas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , coincide con las observaciones realizadas por Kawahara y Kuroda (2000).



**Figura 1.** Las distintas curvas son registros representativos de los cambios en la concentración de calcio intracelular en astrocitos cultivados durante 45 min en medios con distintas concentraciones de glucosa y luego expuestos a 5  $\mu$ M de amilina. **A.** Respuesta exacerbada en el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  en células cultivadas en ausencia de glucosa. **B.** Respuesta discreta en el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  en células cultivadas en ausencia de glucosa. La respuesta se observa pocos seg luego de la aplicación del péptido (5 seg aprox.), y fue detectada en 3 de 6 células cultivadas en ausencia de glucosa y luego expuestas al péptido. **C y D.** En astrocitos cultivados con 2 y 5 mM de glucosa (6 por condición) por el mismo periodo de tiempo, no hubo una respuesta en el aumento intracelular de calcio cuando éstos fueron expuestos a amilina. **E.** En otro experimento donde se utilizó amilina de rata (no tóxica), 4 de 5 células respondieron a amilina humana y ninguna (0 de 5) lo hizo para amilina de rata. Para ambas condiciones los astrocitos fueron cultivados en medios sin contenido de glucosa. Para el primer y segundo experimentos los resultados fueron analizados utilizando la prueba de Fischer, con un valor de  $p=0,02$ .

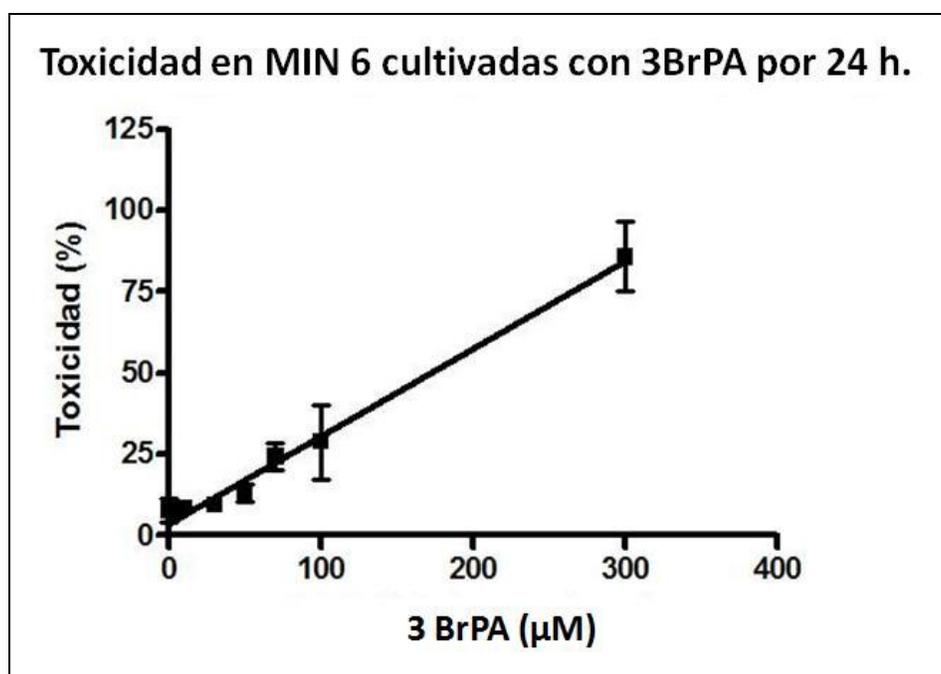
Utilizando el ensayo de toxicidad LIVE/DEAD®, se determinó que la viabilidad para los astrocitos en las condiciones arriba mencionadas fue de un 100% para todos ellos (Fig. 2). A través del sistema de luminometría que utiliza la enzima luciferín-luciferasa para la detección de los cambios en el ATP citosólico, no se detectaron variaciones significativas en el contenido de ATP en astrocitos cultivados con distintas concentraciones de glucosa o en ausencia de glucosa (datos no presentados). Estos datos nos indican que bajos niveles de glucosa tendrían un efecto en la respuesta celular ante la presencia de péptidos amiloides que en un principio no podrían explicarse por una disminución en el contenido celular de ATP.



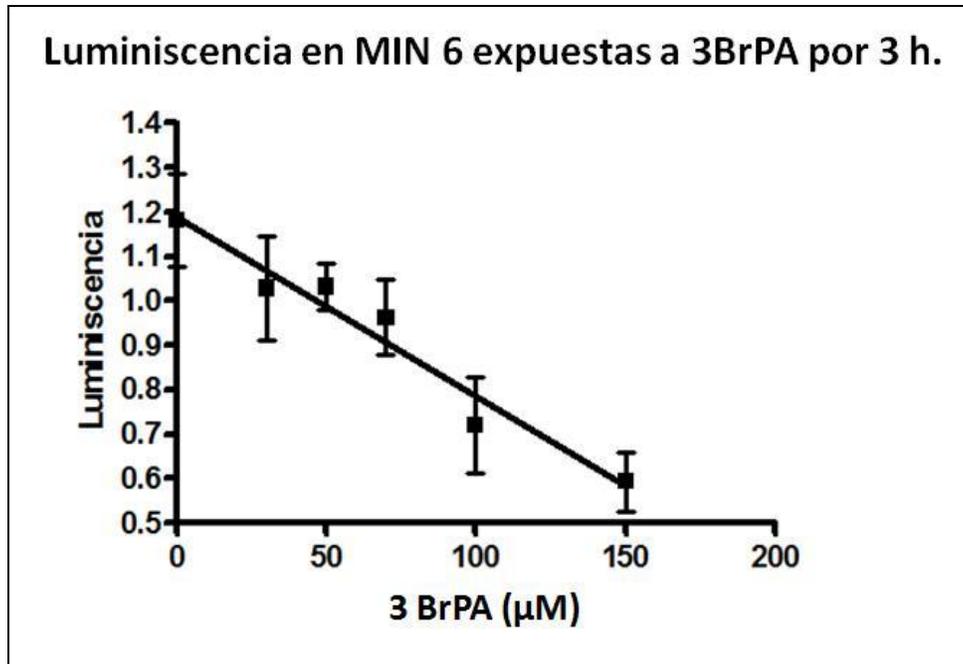
**Figura 2. Bajas concentraciones de glucosa no afectan la viabilidad celular en astrocitos.** Células cultivadas durante 24 h sin glucosa y 1, 2 y 5 mM de glucosa no mostraron diferencias en la viabilidad celular. Las células vivas se observan de color verde (tinción con calceína). En el inserto se observan células necróticas de color rojo (tinción con ethidium homodímero-1) tratadas con alcohol etílico al 70%. (n=3).

## 2. Efecto del ácido 3 bromopirúvico como bloqueador de la producción de ATP y como incrementador de la muerte celular en la línea MIN 6.

Mediante el ensayo de toxicidad LIVE/DEAD® y el sistema de luminometría se determinaron la viabilidad (Fig.3) y los niveles de ATP celular (Fig.4), respectivamente, en células MIN 6. Como una vía alternativa a la glucosa para la reducción de los niveles de ATP celular, se utilizó ácido 3 bromopirúvico (3 BrPA), un bloqueador de la hexoquinasa II. Al bloquear esta enzima se impide la fosforilación de la glucosa y de esta forma, la glicólisis se ve inhibida en una de sus primeras etapas de la producción de ATP. Se observó un aumento en la mortalidad y una disminución en los niveles de ATP celular en la medida en que se incrementaban las concentraciones de 3 BrPA.



**Figura 3.** El efecto tóxico de 3 BrPA aumenta a mayor concentración del reactivo en células MIN 6. Utilizando el ensayo de toxicidad LIVE/DEAD®, se observó un aumento de la mortalidad celular, que se incrementa a mayores concentraciones del inhibidor de la producción de ATP. Las células fueron tratadas con el reactivo por un periodo de 24 h. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  desviación estándar (n=3). Análisis de regresión del valor de  $\beta$ ;  $p < 0,0001$ .

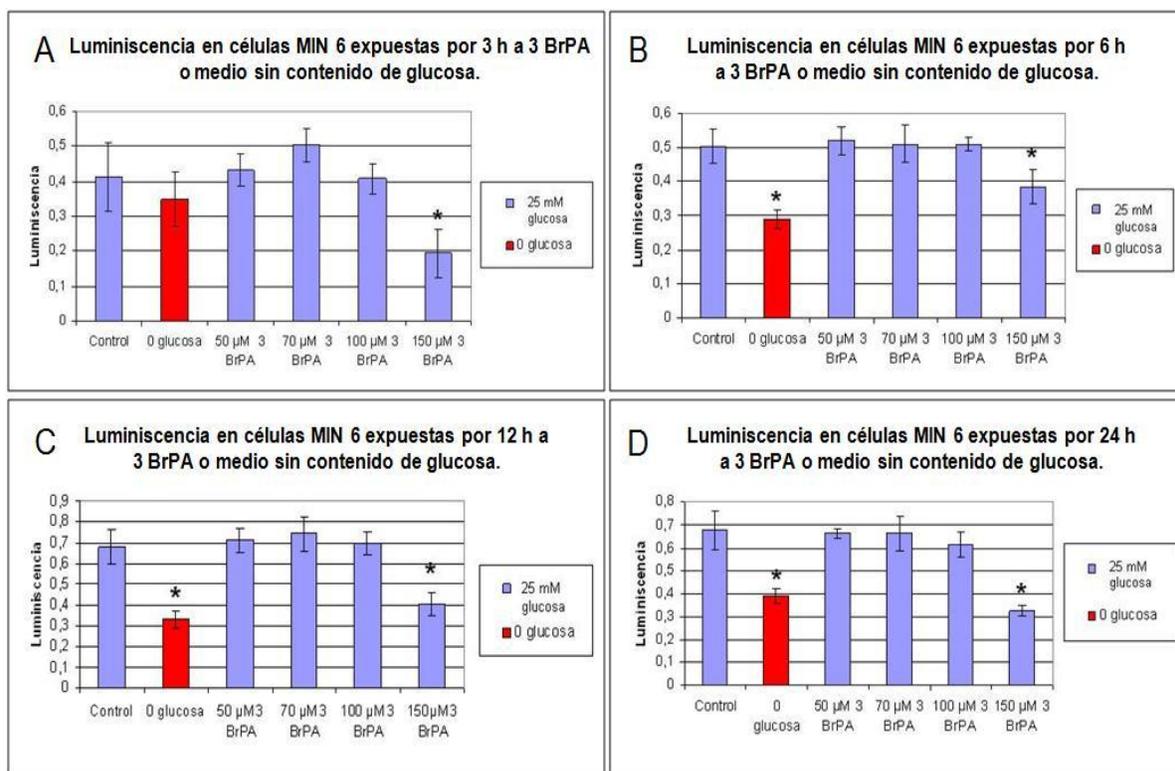


**Figura 4. Disminución en la producción de ATP al aumentar la concentración de 3 BrPA en MIN 6.** Se utilizó un sistema de luminometría, siendo luciferín-luciferasa la enzima que reacciona con ATP para emitir luminiscencia. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  desviación estándar (n=4). Análisis de regresión del valor de  $\beta$ ;  $p=0,0008$ .

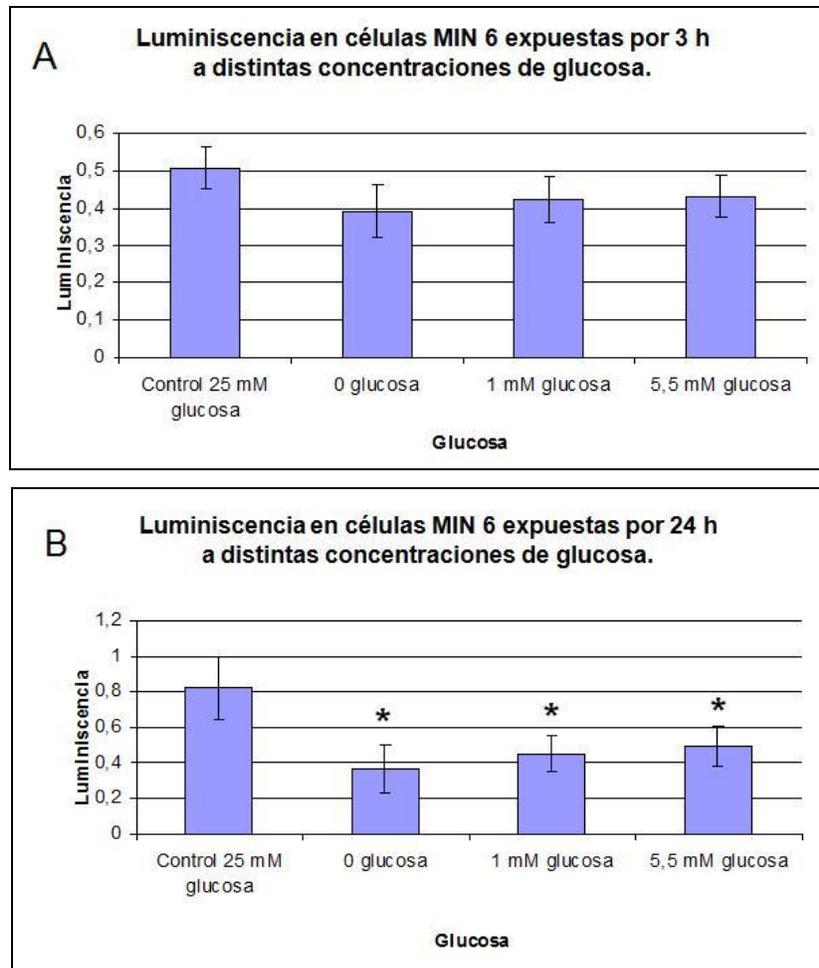
### 3. Efecto de 3 BrPA y la depleción de glucosa sobre el contenido de ATP celular.

Se estudiaron los efectos que tendrían la depleción de glucosa y el reactivo 3 BrPA sobre la disminución en las concentraciones de ATP en la línea celular MIN 6. Para esto, se realizaron mediciones de la luminiscencia producida por células expuestas a distintas concentraciones de 3 BrPA (en medio de cultivo DMEM con 25 mM de glucosa) y en ausencia de glucosa (en medio de cultivo RPMI sin glucosa), durante distintos periodos de tiempo (Fig.5). En todos los periodos de tiempo se observaron diferencias significativas en células tratadas con 150  $\mu$ M de 3 BrPA con respecto al control. Las células cultivadas en medio con ausencia de glucosa, presentaron diferencias en sus cantidades de ATP a partir de 6 h de tratamiento respecto al control. Se determinó entonces que el tiempo de exposición a los tratamientos para los experimentos que se realizaron a continuación sería de 6 h, puesto que mayores tiempos de tratamiento podrían significar un daño excesivo para las células. Con la finalidad de determinar si concentraciones intermedias de glucosa

lograban producir cambios en la producción de ATP en células MIN 6, se utilizó el sistema de luminometría para comparar condiciones sin glucosa (0 glucosa), baja glucosa (1 mM de glucosa), fisiológicas (5,5 mM de glucosa) y altas en glucosa (25 mM de glucosa). No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones intermedias de glucosa (Fig.6), estableciéndose como futuro modelo de trabajo comparaciones sólo entre las condiciones altas y libres de glucosa.



**Figura 5. Medición de la producción de ATP en MIN 6 expuestas a 3 BrPA y un medio sin glucosa por periodos de 3, 6, 12 y 24 h.** Para todos los casos, se observó una disminución significativa de la luminiscencia en las células tratadas con 150  $\mu$ M de 3 BrPA. A partir de las 6 h se detectaron cambios significativos en la producción de ATP para células privadas de glucosa. Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar (n=4); \*  $p < 0,05$  vs condiciones control con alta glucosa; ANDEVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

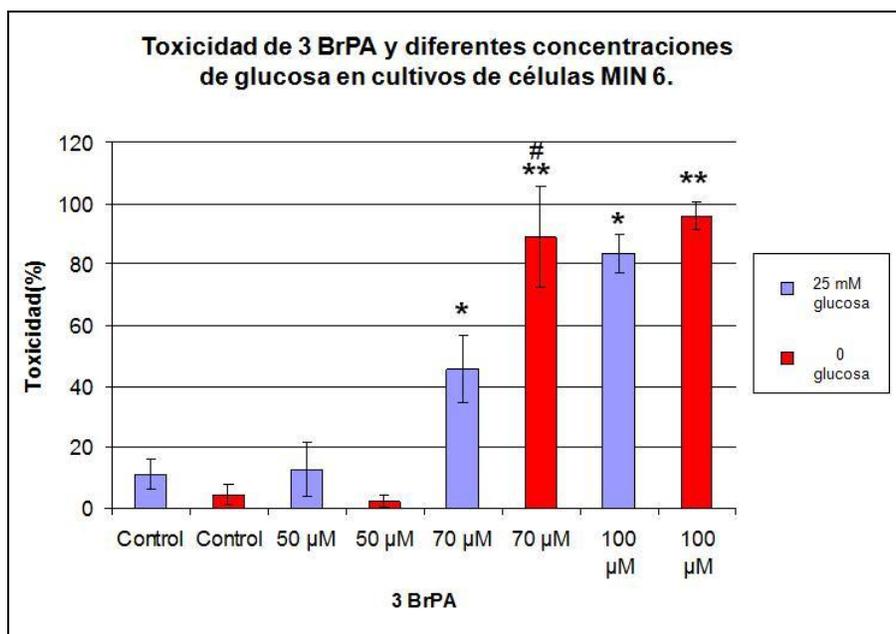


**Figura 6.** El efecto de concentraciones intermedias de glucosa no aumenta significativamente la cantidad de ATP respecto de células privadas de glucosa. **A.** No se detectaron diferencias significativas respecto al control alto en glucosa para células tratadas durante 3 h.  $p > 0,05$ ; ANDEVA de una vía. **B.** Sólo se observaron diferencias significativas entre células privadas de glucosa y aquellas cultivadas con altos niveles de glucosa para células tratadas durante 24 h. Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n=4$ ); \*  $p < 0,05$  vs control alto en glucosa; ANDEVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

#### 4. Evaluación de la viabilidad en células tratadas con 3 BrPA y en un medio RPMI libre de glucosa.

Para este experimento y los que se realizaron a continuación, se utilizó sólo el medio de cultivo RPMI para todas las condiciones con el propósito de descartar posibles variaciones en la toxicidad y producción de ATP que no dependieran exclusivamente de la presencia o ausencia de glucosa. El uso de este medio de cultivo permite el manejo de las cantidades de

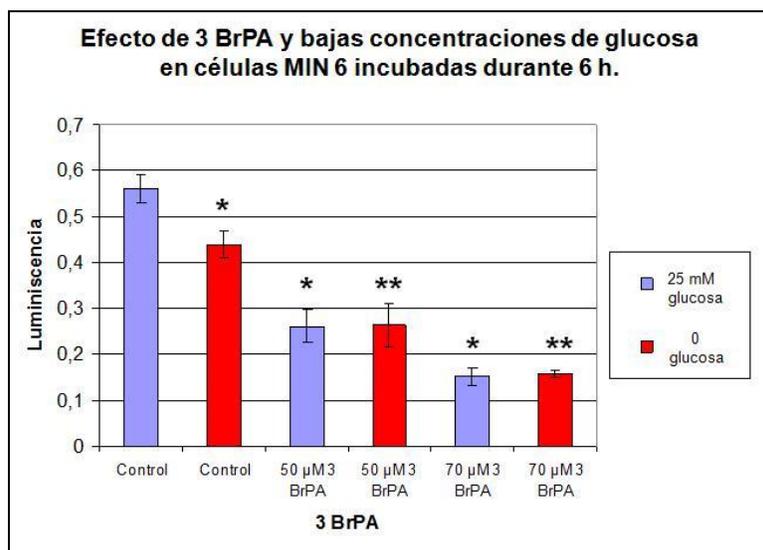
glucosa, pues éste no contiene glucosa en su formulación, por lo que ésta se agrega al medio de cultivo durante su preparación, dependiendo de las concentraciones requeridas. Se realizó el ensayo de toxicidad LIVE/DEAD® para comparar la viabilidad en células tratadas con medios libres y altos en glucosa (25 mM), así como para definir la concentración de 3 BrPA que no produjera aumentos importantes en la mortalidad celular (Fig.7). Esto es de importancia puesto que se busca obtener células con una elevada susceptibilidad frente a los péptidos amiloides, para lo cual no deben existir incrementos en la mortalidad. Como se determinó anteriormente, las células fueron tratadas por un periodo de 6 h. No se observaron cambios significativos entre las altas concentraciones comparadas con las bajas concentraciones de glucosa (controles), así como entre estas condiciones y aquellas tratadas con altas y bajas concentraciones de glucosa adicionadas con 50  $\mu$ M del reactivo. Concentraciones de 70  $\mu$ M o mayores de 3 BrPA, permiten observar aumentos significativos en la mortalidad celular.



**Figura 7. Concentraciones altas y libres de glucosa, así como la presencia de bajas concentraciones de 3 BrPA, no producen un incremento significativo en la mortalidad celular.** Sólo se detectaron diferencias a partir de 70  $\mu$ M de 3 BrPA. \* indica diferencias significativas respecto al control alto en glucosa;  $p < 0,001$ . \*\* indica diferencias significativas respecto al control libre de glucosa;  $p < 0,001$ . # indica diferencias significativas respecto a la condición con 70  $\mu$ M de 3 BrPA alta en glucosa;  $p < 0,001$ . Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ); ANDEVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

## 5. Observación de los cambios en la liberación de ATP citoplasmático en células expuestas a 50 $\mu\text{M}$ de 3 BrPA y concentraciones libres y altas de glucosa por un periodo de 6 h.

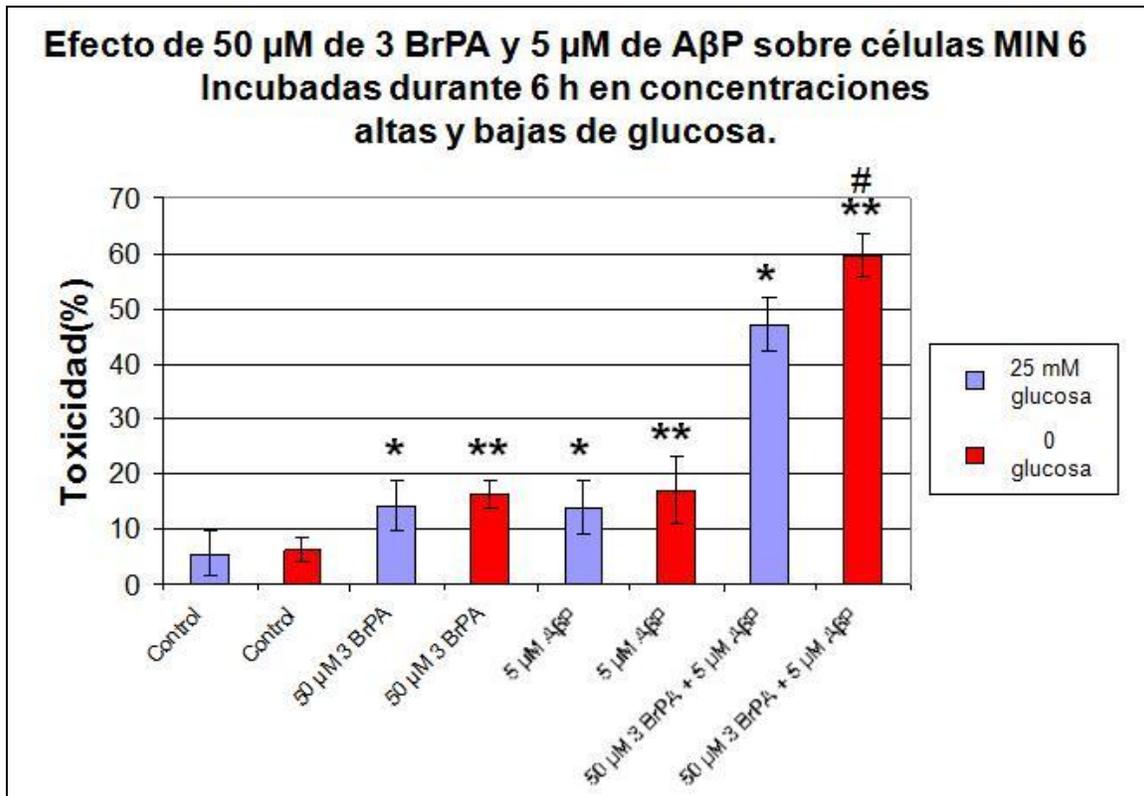
Luego de determinar que las condiciones libres y altas en glucosa y aquellas tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de 3 BrPA no produjeron cambios significativos en la viabilidad celular, se estudiaron los efectos que estas condiciones tendrían sobre la producción de ATP celular por un periodo de 6 h (Fig.8). Se observó una disminución significativa en la luminiscencia para células cultivadas en un medio libre de glucosa comparadas con aquellas tratadas con altas concentraciones de glucosa (controles). Asimismo, se observaron disminuciones significativas en la luminiscencia para células tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de 3 BrPA respecto a los controles, pero no se observaron dentro de este tratamiento diferencias para las condiciones altas y libres de glucosa. Estos experimentos demuestran que existe una diferencia en las susceptibilidades entre células cultivadas con medio de cultivo DMEM y RPMI, puesto que estas últimas se ven más afectadas por concentraciones menores del reactivo 3 BrPA (no se detectaron diferencias en la producción de ATP cuando las células fueron cultivadas con DMEM y expuestas a 50 y 70  $\mu\text{M}$  del reactivo).



**Figura 8. Existen diferencias significativas en la producción de ATP entre células cultivadas con medios elevados y libres de glucosa.** Estas diferencias desaparecen cuando se aplica 3-BrPA, donde se observa una disminución aún mayor en los niveles de luminiscencia. \* indica diferencias significativas respecto al control con 25 mM de glucosa;  $p < 0,001$ . \*\* indica diferencias significativas respecto al control libre de glucosa;  $p < 0,001$ . Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n=4$ ); ANDEVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

## **6. Evaluación de la viabilidad celular en MIN 6 tratadas con 3 BrPA y concentraciones libres y altas en glucosa expuestas a los péptidos amiloides.**

Una vez determinado que las diferencias en las concentraciones de glucosa y 50  $\mu$ M de 3 BrPA no producían cambios importantes en la viabilidad celular, pero sí lo hacían para la producción de ATP, se estudió el efecto que tendría la aplicación del péptido amiloide A $\beta$ P (1-40) para células tratadas en estas condiciones (Fig.9). A diferencia de lo observado en la figura 7, se determinaron diferencias en la viabilidad para células expuestas a 50  $\mu$ M de 3 BrPA versus los controles. La aplicación de A $\beta$ P mostró un aumento en la toxicidad respecto a los controles, muy similar al observado en células tratadas con 3 BrPA, pero no hubo diferencias significativas entre células tratadas con A $\beta$ P y diferentes concentraciones de glucosa, como se esperaba. Sin embargo, sí se observaron diferencias en la mortalidad celular cuando los tratamientos libres y altos en glucosa adicionados con 50  $\mu$ M de 3 BrPA fueron expuestos a A $\beta$ P. El aumento en la toxicidad fue mucho mayor respecto a los controles y células tratadas con 3 BrPA y A $\beta$ P por separado, lo que indicaría un efecto potenciador del tóxico sobre la susceptibilidad celular frente a los péptidos amiloides.



**Figura 9. El efecto tóxico de A $\beta$ P es sustancialmente mayor en células tratadas previamente con 3 BrPA.** Los efectos en la toxicidad para A $\beta$ P y 3 BrPA por separado son significativos respecto a los controles pero no alcanzan los altos niveles de ambos reactivos combinados. Dentro de cada tratamiento sólo fue significativa la diferencia para aquellas células tratadas con ambos reactivos, lo que indicaría que para este caso la disminución en las concentraciones de glucosa por sí sola no es suficiente para aumentar la susceptibilidad celular frente a los péptidos amiloides. \* indica diferencias significativas respecto al control alto en glucosa;  $p < 0,05$ . \*\* indica diferencias significativas respecto al control sin glucosa;  $p < 0,01$ . # indica diferencias significativas dentro del tratamiento con 3 BrPA y A $\beta$ P;  $p < 0,001$ . Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ); ANDEVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

## DISCUSIÓN.

El estudio de los péptidos amiloides abarca una cantidad considerable de investigaciones dada su relevancia en una gran cantidad de enfermedades que afectan al hombre y a los animales (Tabla 1). Se han sugerido numerosos mecanismos mediante los cuales estos péptidos generan daño celular y enfermedad, cobrando especial importancia el descubrimiento de que éstos agentes son capaces de generar poros en las membranas celulares que alteran de forma irreversible la homeostasis celular. El objetivo de esta memoria de título, fue profundizar en los mecanismos mediante los cuales los péptidos amiloides ejercen su efecto citotóxico, basado en la hipótesis que sugiere que el estado metabólico de la célula tendría un efecto en la composición fosfolipídica de su membrana, lo que favorecería la interacción péptido-membrana. Esto último determinaría que los péptidos atacaran a la célula en un período susceptible, ya que se ha determinado que éstos se generan producto del metabolismo normal de las células (Haass *et al.*, 1992). En este trabajo, se obtuvieron resultados que apoyan la hipótesis planteada y sirve como base para futuras investigaciones relacionadas al tema.

### **1. Diferencias entre la depleción de glucosa y el bloqueador metabólico 3 BrPA:**

El tratamiento de células tumorales con 3 BrPA fue considerado en un principio como un análogo a la reducción o depleción de glucosa y se utilizó con la finalidad de observar los efectos en la susceptibilidad celular frente a los péptidos amiloides con un inhibidor específico de la producción de ATP. De esta forma, tendríamos dos vías complementarias que utilizadas por separado corroborarían la hipótesis inicial y atribuirían el aumento de la susceptibilidad celular a una disminución en la producción de ATP, ya que los mecanismos de ambos tratamientos tendrían un efecto similar sobre el metabolismo celular. Sin embargo, los resultados sugieren otro mecanismo.

Las observaciones de los resultados obtenidos demuestran claramente que 3 BrPA tiene un efecto mayor en el aumento de la susceptibilidad celular frente a los péptidos amiloides que el solo hecho de disminuir las concentraciones de glucosa en el medio de cultivo (Fig. 9). Esto a pesar de haber evaluado previamente la concentración más baja posible del reactivo

de modo que no afectara la viabilidad celular en forma significativa, siendo esta muy similar a la observada para células cultivadas en medios libres de glucosa. Un análisis más específico de los mecanismos mediante los cuales ambos tratamientos afectan el metabolismo energético de las células, podría acercarnos a una respuesta.

Podríamos sugerir, para el caso de una reducción en las concentraciones de glucosa, que efectivamente este tratamiento reduce los niveles de ATP celular. Sin embargo, este efecto podría verse compensado de forma parcial por las reservas celulares de energía. La célula entonces obtendría su energía a partir de estas reservas, cuya producción bien podría desviarse hacia la vía mitocondrial o glicolítica. También debemos considerar que los medios de cultivo en general poseen un alto contenido de nutrientes (excluyendo a la glucosa) que perfectamente podrían derivarse a estas vías alternativas de producción de energía.

Sin embargo, el 3 BrPA no permitiría utilizar las reservas de nutrientes en la vía glicolítica, al bloquear una enzima fundamental para el proceso: la hexoquinasa II, que fosforila la glucosa para permitir su ingreso a la glicólisis. Cabe destacar que la hexoquinasa II es una de las cuatro diferentes isoformas de la hexoquinasa (HK) encontradas en los mamíferos (HK-I, -II, -III y IV o glucoquinasa), las cuales poseen distintas propiedades cinéticas y se distribuyen en distintos tejidos (Moreno-Sánchez *et al.*, 2007). La hexoquinasa II, por su parte, se ha descrito como la principal isoenzima que cumple la función de fosforilar la glucosa en una gran cantidad de tumores malignos, encontrándose el gen que la codifica amplificado y sobrerregulado y por ende, esta enzima se encuentra sobreexpresada en la célula. También se ha descrito que la enzima se encuentra acoplada a la proteína VDAC, que le permite asociarse a la membrana externa de la mitocondria y a un complejo productor de ATP (ATP sintasoma). Así, obtiene ATP para fosforilar glucosa de forma que aumenta la velocidad y eficiencia del proceso, más que si lo hiciese a través de simple difusión en el citoplasma. Esto explicaría en gran parte porqué una cantidad considerable de tumores (especialmente los de mayor malignidad) poseerían un actividad glicolítica muchas veces superior a las células normales, aún en presencia de oxígeno, lo que se conoce como el “Efecto Warburg” (Chen *et al.*, 2007; Pedersen, 2007). Por otra parte, esto explicaría también la gran capacidad de crecimiento tumoral, pues la velocidad de este proceso permitiría que aun siendo la glicólisis un proceso mucho menos eficiente que la respiración

oxidativa, se obtenga una mayor cantidad de ATP neto que a partir de este último proceso (Pedersen, 2007).

La especificidad que tiene 3 BrPA por la hexoquinasa II, permite explicar porqué en experimentos *in vitro* e *in vivo* el reactivo es altamente tóxico para células cancerígenas, pero su efecto sea casi nulo en células normales, incluso en aquellas adyacentes al tumor en tratamientos realizados de forma local (Ko *et al.*, 2004). Es por esta última razón que el modelo de *stress* metabólico utilizando 3 BrPA aplicado en este proyecto, es válido sólo para células de origen tumoral y no para células normales.

Los resultados obtenidos con la línea celular de astrocitoma humano permitieron observar que estas células son más susceptibles a los péptidos amiloides al ser cultivadas en un medio de cultivo sin glucosa (Fig.1). Esto no ocurrió con la línea celular pancreática MIN 6, en la cual las diferencias en las concentraciones de glucosa no parecieron afectar su respuesta frente a los péptidos amiloides (Fig.9). Sólo se observó un aumento de la susceptibilidad a los amiloides cuando estas células fueron expuestas al bloqueador metabólico. Los resultados indican que ambas líneas celulares son susceptibles al *stress* metabólico, pero pareciera que las células MIN 6 pudieran compensar de mejor forma la falta de glucosa que los astrocitos. Se han descrito líneas celulares altamente glicolíticas en las cuales sus mitocondrias prácticamente han perdido su función (Xu *et al.*, 2005), haciéndolas de esta forma altamente dependientes de la glucosa para la generación de ATP. Este puede ser el caso de los astrocitos, a diferencia de las células MIN 6, que dados los resultados permite suponer que las mitocondrias de estas últimas eran funcionales, característica que les permitía compensar la falta de glucosa para generar ATP. Este efecto se vio inhibido por 3 BrPA, ya que la hexoquinasa II se encuentra asociada al funcionamiento mitocondrial, probablemente impidiendo de esta forma la producción de ATP en células MIN 6.

## **2. Mecanismos de defensa celulares frente al *stress* metabólico:**

El mecanismo planteado originalmente para este trabajo de investigación, sugiere que los efectos en el aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  y citotoxicidad producidos por los péptidos amiloides observados en células sometidas previamente a *stress* energético se deba a una

inactivación de la enzima flipasa (translocasa aminofosfolipídica en particular) dependiente de ATP. De este modo, los fosfolípidos ácidos (como fosfatidil serina y fosfatidil etanolamina) normalmente ubicados activamente en la monocapa interna de la membrana celular se reubicarían en la monocapa externa y de esta forma reaccionarían con los péptidos amiloides formando canales iónicos. Sin embargo, el estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales las células regulan el metabolismo energético pareciera no encajar en su totalidad con el mecanismo arriba planteado. Esto pues las células normalmente mantienen una razón ATP:ADP muy elevada, normalmente de 10:1, dentro de límites muy estrechos. Los mecanismos para lograrlo están ampliamente distribuidos en las células eucariotas y para el caso de los mamíferos involucra a la protein quinasa dependiente de AMP (AMPK), un sensor clave del estado energético celular (Kemp *et al.*, 2003; Hardie, 2004). El sistema es ultrasensible y cambios mínimos en las concentraciones de AMP (aumento de este nucleótido acompañado de una disminución de ATP) producen una rápida e intensa activación de esta enzima. Su actividad produce cambios fundamentales en el metabolismo celular, como inhibición de la síntesis de proteínas, glicógeno, colesterol, crecimiento celular y procesos que requieren de ATP en general, mientras que favorece procesos catabólicos (como la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos y la glicólisis), aumenta la captación de glucosa y la biogénesis mitocondrial, entre muchos otros (Kemp *et al.*, 2003; Hardie, 2004; Mukherjee *et al.*, 2008). Tiene también efectos en la expresión de genes, en la estabilidad del mRNA y en la traducción de proteínas. La presencia de un mecanismo sensible y eficiente en tal magnitud, no coincide totalmente con la hipótesis planteada, en la cual la enzima translocasa aminofosfolipídica es inhibida por disminuciones en las concentraciones de ATP. Esto pues una leve disminución de ATP gatillaría cambios inmediatos en el metabolismo celular mediante el sistema AMPK sensor de energía, de forma de equilibrar rápidamente la razón ATP:ADP y poniendo ATP rápidamente a disposición para los procesos celulares, en espera de la desaparición del *stress*. Para que la flipasa dejase de recibir las cantidades de ATP necesarias para funcionar, sería de esperar que la célula ya hubiera gatillado los mecanismos de defensa frente al *stress* metabólico y estuviera cercana a morir. Es por esto que sería razonable pensar que el mecanismo de exposición de fosfolípidos ácidos en la membrana externa se debiera a una activación de los mecanismos de apoptosis producto de un *stress* energético prolongado,

más que a una simple disminución de ATP. Es muy conocido el hecho de que uno de los primeros acontecimientos luego de activado el proceso de apoptosis sea la exposición de fosfolípidos ácidos (en especial de fosfatidil serina o PS) a la membrana externa. De hecho, una forma muy común de evaluar apoptosis es la utilización de anexina V unida a un fluoróforo, la cual tiene una afinidad muy elevada por fosfatidil serina. Los mecanismos directos mediante los cuales esto ocurre no están bien esclarecidos, pero se sabe que la depleción de energía producto de diversos tipos de *stress* energético activa la cascada de la apoptosis (caspasa 3, IP<sub>3</sub>/AKT, p53, entre otros). Luego de un *stress* metabólico prolongado que no revierte, el mecanismo sensor de energía mediado por AMPK, en un principio diseñado para preservar la viabilidad celular, gatillaría el proceso de apoptosis. Se han descrito como parte de este proceso la activación de caspasas (caspasa 3 entre ellas), la supresión del potencial mitocondrial de membrana, la inhibición del sistema de señalización fosfatidil inositol 3-quinasa/AKT, la activación de apoptosis mediada por el factor antitumoral p53, entre otros (Tzatsos y Tsihchlis, 2007; Mukherjee *et al.*, 2008; Okoshi *et al.*, 2008).

Este mecanismo explicaría de mejor forma los resultados obtenidos en los astrocitos, donde a pesar de observar un claro aumento en la susceptibilidad frente a amilina en células depletadas de glucosa, no observamos una disminución en los niveles de ATP, puesto que el sistema AMPK sensor de energía mantendría estos niveles dentro de límites muy estrechos.

Nosotros proponemos que, más que un efecto directo sobre la actividad de la translocasa aminofosfolipídica, la disminución de ATP activaría la cascada de la apoptosis indirectamente mediante la activación del sistema AMPK sensor de energía. Mediante un mecanismo no bien esclarecido, la apoptosis sería el factor gatillador de los cambios en la composición de la membrana, exponiendo los fosfolípidos ácidos en la superficie que finalmente reaccionarían con los péptidos amiloides.

Una hipótesis que explicaría la exposición de PS hacia la monocapa celular externa, corresponde a la actividad de una enzima de membrana conocida como “escramblasa”, la cual no requiere de ATP para funcionar, redistribuye los fosfolípidos bidireccionalmente y no posee afinidad específica por ningún tipo de fosfolípido. Se ha descrito que esta enzima produce una disminución de la asimetría de membrana (lo que resulta en la exposición de

PS en la membrana externa) al ser activada por procesos apoptóticos, algunos de los cuales fueron mencionados arriba (Tannert *et al.*, 2003). También se ha propuesto que producto de la liberación de la citocromo c oxidasa desde la mitocondria durante procesos apoptóticos, se promoviera la oxidación de los PS seguidos por su migración hacia la membrana celular externa (Zwaal *et al.*, 2005).

### **3. La esquivada determinación de la composición de la membrana:**

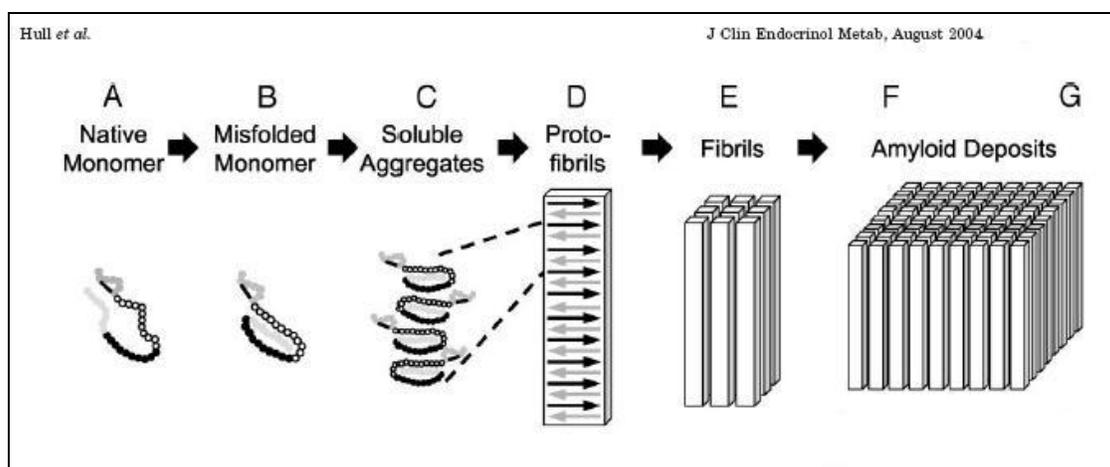
Dados los resultados y análisis antes presentados, cabe preguntarse por el estudio de la detección directa de fosfolípidos ácidos (PS) expuestos en la membrana externa en células metabólicamente estresadas y de esta forma corroborar la hipótesis planteada. Para esto se utiliza un sistema diseñado originalmente para la detección de células apoptóticas, las cuales exponen PS en su superficie. Estos fosfolípidos ácidos reaccionan intensamente con una proteína llamada anexina V, la cual está unida a un fluoróforo que permite detectar esta reacción.

Efectivamente estos experimentos fueron realizados en células MIN 6 con distintas concentraciones de 3 BrPA, pero los resultados fueron del todo contradictorios (datos no presentados). Es así como a medida que aumentábamos la concentración del tóxico, observábamos una disminución en la cantidad de células necróticas y apoptóticas. La única explicación que pudimos plantear, fue que a mayor cantidad de 3 BrPA, una gran cantidad de células moría y se desintegraba rápidamente (de forma que los fluoróforos no pudieron detectarlas), mientras que sólo aquellas resistentes quedaban presentes. Sin embargo, similares resultados utilizando distintos métodos de inducción de apoptosis se han presentado en otros estudios (Mukherjee *et al.*, 2008). Otro obstáculo para la detección de PS en la membrana en células estresadas corresponde a la interrogante de que si estas células efectivamente no han iniciado el proceso de apoptosis, el sistema (originalmente desarrollado para detectar apoptosis) fuera muy poco sensible para poder observar cambios efectivos en la composición de la membrana producto de una disminución en el aporte de energía. Este tema plantea un interesante desafío para futuras investigaciones, ya que el estandarizar una metodología para determinar los cambios en la composición fosfolipídica

puede aportar evidencia más directa de la interacción entre los fosfolípidos de membrana y los péptidos amiloides.

#### 4. La problemática de la dilución de los péptidos amiloides y la obtención de oligómeros solubles:

Un obstáculo no previsto en la investigación correspondió a la incertidumbre de la reactividad de los péptidos amiloides con las membranas celulares. Mientras que al utilizar amilina los resultados fueron satisfactorios, no sucedió lo mismo con el péptido  $\beta$  amiloide y con prion. Aún al aumentar la concentración del péptido (de 5 a 10  $\mu\text{M}$ ), no se observaron aumentos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a pesar de haber expuesto las células a bajas concentraciones de glucosa (datos no presentados). Al indagar sobre el origen del problema, se llegó a la conclusión de que esto se debe probablemente a una baja toxicidad de los péptidos, puesto que posterior a su dilución no se obtuvo suficiente concentración de oligómeros solubles, que serían los intermediarios más tóxicos. Como se mencionó en el punto 1 de la revisión bibliográfica, los péptidos amiloides tienen la capacidad de polimerizar. En la figura 10 se observan las distintas etapas de polimerización, donde los monómeros se agregan para dar origen a los oligómeros solubles, estos luego originan subprotofibrillas, que a su vez generan protofibrillas, las que luego se ensamblan en fibrillas y por último, se generan los depósitos o placas amiloides. Los estados solubles, en particular los oligómeros solubles, serían los responsables de la citotoxicidad.



**Figura 10.** Esquema de la formación de fibras amiloides. (Modificado de Hull *et al.*, 2004).

La obtención de una concentración de oligómeros adecuada no es un proceso sencillo y se encuentran disponibles una gran variedad de protocolos sin una técnica estandarizada para obtenerlos (Klug *et al.*, 2003; Stine *et al.*, 2003; Avidan-Shpalter y Gazit, 2006; Baglioni *et al.*, 2006). Esto también ha sido un gran obstáculo para trabajar con péptidos en otras investigaciones (Cleary *et al.*, 2005). A esto se suma el hecho de que el proceso de polimerización es dinámico y pasado cierto tiempo comienza la formación de fibrillas, disminuyendo la toxicidad de una solución. Una solución de péptidos fresca tampoco poseería gran toxicidad, puesto que estaría compuesta principalmente por monómeros. Es por esta gran cantidad de variables asociadas a la reconstitución de los péptidos por las cuales creemos que no se obtuvieron datos de aumentos de  $[Ca^{2+}]_i$  al usar A $\beta$ P y prion en astrocitos y células MIN 6. Para los experimentos de toxicidad realizados en la línea celular MIN 6, sin embargo, se obtuvieron resultados interesantes puesto que se utilizó un protocolo de dilución en el cual se reconstituyó el péptido A $\beta$ P (1-40) en 10 mM de NaOH, se sonicó durante 10 min y luego fue diluido en DPBS (Avidan-Shpalter y Gazit, 2006). Esto además se ve respaldado por el hecho de que las células estuvieron expuestas durante un tiempo prolongado al péptido (6 h) y la técnica permite la evaluación de una gran cantidad de células a la vez. La observación de los aumentos de  $[Ca^{2+}]_i$ , por otra parte, tiene el inconveniente de que sólo se puede examinar una célula por vez, sumado a que el péptido se coloca en el mismo momento de la experimentación.

A pesar de los obstáculos que se nos presentaron para la realización de esta memoria y de los cuestionamientos planteados a la hipótesis inicial, este modelo nos permitió observar un efecto claro de que la exposición al *stress* energético celular favorece el efecto tóxico de los amiloides. La finalidad de estos experimentos es de ahondar en el conocimiento de los mecanismos de toxicidad de los péptidos amiloides para entender cómo estos afectan a su vez a los organismos vivos. Podríamos suponer entonces, extrapolando estos conocimientos a los organismos vivos, que las células más expuestas al daño por la presencia de los péptidos serían aquellas limitadas en su proceso de obtención de energía, ya sea por hipoxia o privación de nutrientes, como también células con fallas metabólicas intrínsecas (por ejemplo, mutaciones). También se han estudiado los efectos del envejecimiento sobre el metabolismo celular y se ha determinado que estas células fallan en su mecanismo de producción de energía, lo que puede tener directa relación con el aumento en la

susceptibilidad a los péptidos amiloides. Si sabemos que existen diferencias de susceptibilidad en células genéticamente idénticas, entonces podríamos suponer que las células más propensas al daño de los péptidos serían aquellas en proceso de senescencia. Para el caso de la enfermedad de Alzheimer, esto último se ve apoyado por estudios en los cuales se ha determinado que el envejecimiento predispone al daño neurotóxico producido por A $\beta$ P (Geula *et al.*, 1998). Ocurre también que, pese a las modificaciones propuestas para el mecanismo planteado originalmente, los efectos no variarían en forma significativa puesto que finalmente la composición de la membrana celular tendría un efecto sobre la predisposición al daño generado por los péptidos amiloides. No obstante, el mecanismo finalmente propuesto que atribuye este aumento de la susceptibilidad a fallas metabólicas, concuerda con estudios realizados previamente para la enfermedad de Alzheimer en los cuales asocian una buena nutrición, consumo de antioxidantes, ejercicio y estimulación cognitiva, entre otros, con el buen funcionamiento de las células neuronales y una menor predisposición a presentar la enfermedad (Mattson, 2004).

Nosotros proponemos para futuras investigaciones, ahondar en los mecanismos metabólicos aquí planteados que puedan tener incidencia en la predisposición celular frente a los péptidos amiloides (por ejemplo: procesos metabólicos de obtención de energía, funcionamiento del sistema AMPK en células normales y con fallas metabólicas), como también establecer un sistema sensible y confiable para determinar la composición de la membrana y así poder evaluar directamente cómo se ve afectada en los distintos procesos metabólicos.

## CONCLUSIONES.

- El *stress* metabólico incrementa el daño celular producido por los péptidos amiloides, determinado por incrementos citotóxicos de  $[Ca^{2+}]_i$  y por aumentos en la mortalidad celular.
- Las curvas de aumento del  $[Ca^{2+}]_i$  generados por los péptidos amiloides son de distintos tipos, magnitudes y latencias.
- Las disminuciones en la cantidad de glucosa no siempre inducen disminuciones en la cantidad de ATP celular.
- El *stress* metabólico producido por 3 BrPA es mayor que aquél generado por la ausencia de glucosa.
- El 3 BrPA aumenta la susceptibilidad celular frente al efecto tóxico de los péptidos amiloides.
- El efecto de los péptidos amiloides es inespecífico e independiente del origen celular: la amilina es de origen  $\beta$  pancreático y generó aumentos de la  $[Ca^{2+}]_i$  en astrocitos, mientras que A $\beta$ P es de origen neuronal y tuvo efecto en la mortalidad de células  $\beta$  pancreáticas.

## BIBLIOGRAFÍA.

- ALARCÓN, J.M.; BRITO, J.A.; HERMOSILLA, T.; ATWATER, I; MEARS, D; ROJAS, E.** 2006. Ion channel formation by Alzheimer's disease amyloid  $\beta$ -peptide ( $A\beta_{40}$ ) in unilamellar liposomes is determined by anionic phospholipids. *Peptides*, 27(1):95-104.
- ÁLVAREZ-RUIZ, S.; GARCÍA-RÍO, I; DAUDÉN, E.** 2005. Amiloidosis sistémicas. *Actas Dermosifiliogr.* 96(2):69-82.
- ARISPE, N.; ROJAS, E.; POLLARD, H.B.** 1993a. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90(2):567-71.
- ARISPE, N.; POLLARD, H.B.; ROJAS, E.** 1993b. Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90(22):10573-7.
- ARISPE, N.; POLLARD, H.B.; ROJAS, E.** 1994a. Beta-Amyloid  $Ca^{2+}$ -channel hypothesis for neuronal death in Alzheimer disease. *Mol. Cell. Biochem.* 140(2):119-25.
- ARISPE, N.; POLLARD, H.B.; ROJAS, E.** 1994b. The ability of amyloid beta-protein [A beta P (1-40)] to form  $Ca^{2+}$  channels provides a mechanism for neuronal death in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 747:256-66.
- AVIDAN-SHPALTER, C.; GAZIT, E.** 2006. The early stages of amyloid formation: Biophysical and structural characterization of human calcitonin pre-fibrillar assemblies. *Amyloid*, 13(4): 216-225.
- BAGLIONI, S.; CASAMENTI, F.; BUCCIANINI, M.; LUHESI, L.M.; TADDEI, N.; CHITI, F.; DOBSON, C.M.; STEFANI, M.** 2006. Prefibrillar amyloid aggregates could be generic toxins in higher organisms. *J. Neurosci.* 26(31):8160-7.
- CHÁNEZ-CÁRDENAS, M.E.; CISNEROS, D.A.; YAUNER, L.P.; BECERRIL, B.; FERNÁNDEZ-VELASCO, A.** 2002. Enfermedades relacionadas al plegamiento anómalo de las proteínas. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVI. Depto Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, México. pp. 73-97.
- CHEN, Z.; LU, W.; GARCIA-PRIETO, C.; HUANG, P.** 2007. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39(3):267-74.

**CLEARY, J.P.; WALSH, D.M.; HOFMEISTER, J.J.; SHANKAR, G.M.; KUSKOWSKI, M.A.; SELKOE, D.J.; ASHE, K.H.** 2005. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* 8(1):79-84.

**DALEKE, D.L.** 2003. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J. Lipid. Res.* 44(2):233-42. Erratum in: *J. Lipid. Res.* 44(12):2429.

**DEMURO, A.; MINA, E.; KAYED, R.; MILTON, S.C.; PARKER, I.; GLABE, C.G.** 2005. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* 280(17):17294-300.

**GEULA, C.; WU, C.K.; SAROFF, D.; LORENZO, A.; YUAN, M.; YANKNER, B.A.** 1998. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat. Med.* 4(7):827-31.

**GLABE, C.G.** 2006. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol. Aging.* 27(4):570-5.

**HAASS, C.; SCHLOSSMACHER, M.G.; HUNG, A.Y.; VIGO-PELFREY, C.; MELLON, A.; OSTASZEWSKI, B.L.; LIEBERBURG, I.; KOO, E.H.; SCHENK, D.; TEFLOW, D.B.** 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359(6393):322-5.

**HARDIE, D.G.** 2004. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J. Cell. Sci.* 117(Pt 23):5479-87.

**HULL, R.L.; WESTERMARK, G.T.; WESTERMARK, P.; KAHN, S.E.** 2004. Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(8):3629-43.

**HUR, K.; KIM, J.I.; CHOI, S.I.; CHOI, E.K.; CARP, R.I.; KIM, Y.S.** 2002. The pathogenic mechanisms of prion diseases. *Mech. Ageing. Dev.* 123(12):1637-47.

**KAWAHARA, M.; ARISPE, N.; KURODA, Y.; ROJAS, E.** 1997. Alzheimer's disease amyloid beta-protein forms Zn(2+)-sensitive, cation-selective channels across excised membrane patches from hypothalamic neurons. *Biophys. J.* 73(1):67-75.

**KAWAHARA, M.; KURODA, Y.** 2000. Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's  $\beta$ -amyloid protein: Channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Cell. Mol. Neurobiol.* 53(4):389-97.

**KAWAHARA, M.; KURODA, Y.; ARISPE, N.; ROJAS, E.** 2000. Alzheimer's  $\beta$ -amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. *J. Biol. Chem.* 275(19):14077-83.

**KAYED, R.; HEAD, E.; THOMPSON, J.L.; MCINTIRE, T.M.; MILTON, S.C.; COTMAN, C.W.; GLABE, C.G.** 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300(5618):486-9.

**KEMP, B.E.; STAPLETON, D.; CAMPBELL, D.J.; CHEN, Z.P.; MURTHY, S.; WALTER, M.; GUPTA, A.; ADAMS, J.J.; KATSIKIS, F.; VAN DENDEREN, B.; JENNINGS, I.G.; ISELI, T.; MICHELL, B.J.; WITTERS, L.A.** 2003. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem. Soc. Trans.* 31(Pt 1):162-8.

**KLUG, G.M.; LOSIC, D.; SUBASINGHE, S.S.; AGUILAR, M.I.; MARTIN, L.L.; SMALL, D.H.** 2003. 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.* 270(21):4282-93.

**KO, Y.H.; SMITH, B.L.; WANG, Y.; POMPER, M.G.; RINI, D.A.; TORBENSON, M.S.; HULLIHEN, J.; PEDERSEN, P.L.** 2004. Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324(1):269-75.

**KOURIE, J.I.; SHORTHOUSE, A.A.** 2000. Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *Am. J. Physiol.* 278(6):C1063-87.

**LYUBCHENKO, Y.L.; SHERMAN, S.; SHLYAKHTENKO, L.S.; UVERSKY, V.N.** 2006. Nanoimaging for protein misfolding and related diseases. *J. Cell. Biochem.* 99(1):52-70.

**MATTSON, M.P.** 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430(7000):631-9.

**MORENO-SÁNCHEZ, R.; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S.; MARÍN-HERNÁNDEZ, A.; SAAVEDRA, E.** 2007. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274(6):1393-418.

**MUKHERJEE, P.; MULROONEY, T.J.; MARSH, J.; BLAIR, D.; CHILES, T.C.; SEYFRIED, T.N.** 2008. Differential effects of energy stress on AMPK phosphorylation and apoptosis in experimental brain tumor and normal brain. *Mol. Cancer.* 7:37.

**OKOSHI, R.; OZAKI, T.; YAMAMOTO, H.; ANDO, K.; KOIDA, N.; ONO, S.; KODA, T.; KAMIJO, T.; NAKAGAWARA, A.; KIZAKI, H.** 2008. Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J. Biol. Chem.* 283(7):3979-87.

**PEDERSEN, P.L.** 2007. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39(3):211-22.

**PICKEN, M.M.** 2001. The changing concepts of amyloid. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125(1):38-43.

**POMORSKI, T.; HOLTHUIS, J.C.; HERRMANN, A.; VAN MEER, G.** 2004. Tracking down lipid flippases and their biological functions. *J. Cell. Sci.* 117(Pt 6):805-13.

**PRUSINER, S.B.; SCOTT, M.R.; DEARMOND, S.J.; COHEN, F.E.** 1998. Prion protein biology. *Cell*, 93(3):337-48.

**RYMER, D.L.; GOOD, T.A.** 2000. The role of prion peptide structure and aggregation in toxicity and membrane binding. *J. Neurochem.* 75(6):2536-45.

**SEELIG, J.; LEHRMANN, R.; TERZI, E.** 1995. Domain formation induced by lipid-ion and lipid-peptide interactions. *Mol. Membr. Biol.* 12(1):51-7.

**STINE, W.B. Jr.; DAHLGREN, K.N.; KRAFFT, G.A.; LADU, M.J.** 2003. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 278(13):11612-22.

**TAKUMA, K.; YAN, S.S.; STERN, D.M.; YAMADA, K.** 2005. Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Sci.* 97(3):312-6.

**TANNERT, A.; POHL, A.; POMORSKI, T.; HERRMANN, A.** 2003. Protein-mediated transbilayer movement of lipids in eukaryotes and prokaryotes: the relevance of ABC transporters. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 22(3):177-87.

**TURNER, P.R.; O'CONNOR, K.; TATE, W.P.; ABRAHAM, W.C.** 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* 70(1):1-32.

**TZATSOS, A.; TSICHLIS, P.N.** 2007. Energy depletion inhibits phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling and induces apoptosis via AMP-activated protein kinase-dependent phosphorylation of IRS-1 at Ser-794. *J. Biol. Chem.* 282(25):18069-82.

**WEISSMANN, C.; ENARI, M.; KLÖHN, P.C.; ROSSI, D.; FLECHSIG, E.** 2002. Molecular biology of prions. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 62(3):153-66.

**XU, R.H.; PELICANO, H.; ZHOU, Y.; CAREW, J.S.; FENG, L.; BHALLA, K.N.; KEATING, M.J.; HUANG, P.** 2005. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* 65(2):613-21.

**ZWAAL, R.F.; COMFURIUS, P.; BEVERS, E.M.** 2005. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 62(9):971-88.