



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Efecto de la Apolipoproteína E 2, 3 y 4 sobre la autofagia y la sobrevivencia en la línea neuronal CAD

Mauren Andrea Ortiz Barbosa

Grupo de Investigación en Muerte Celular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de Ciencias Fisiológicas

Bogotá, Colombia

2014

Efecto de la Apolipoproteína E 2, 3 y 4 sobre la autofagia y la sobrevivencia en la línea neuronal CAD

Mauren Andrea Ortiz Barbosa

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Bioquímica

Director

Gonzalo Humberto Arboleda Bustos, MD MSc PhD

Grupo de Investigación en Muerte Celular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de Ciencias Fisiológicas

Bogotá, Colombia

2014

Este trabajo está dedicado a mi Padre, Jorge Alberto Ortiz Mora.

“From His true dominion it follows that the true God is a living, intelligent and powerful Being; and from His other perfections, that He is supreme, or most perfect. He is eternal and infinite, omnipotent and omniscient; that is, His duration reaches from eternity to eternity; His presence from infinity to infinity; He governs all things, and knows all things that are or can be done” Isaac Newton.

Agradecimientos

Infinitas gracias al Ser más importante en mi vida, a la razón de mi existir: DIOS. Gracias por permitirme entender un poco tu “mente” creadora, por usar la ciencia para acercarme a ti y enamorarme.

A mis Padres, por estar siempre a mi lado, por su amor incondicional y preocupación en cada etapa de este proyecto. A mi Padre, porque me inspira, me reta a ser mejor y ha sido mi apoyo incondicional para cumplir mis metas. A mi madre, por sus brazos amorosos y oraciones.

A mis hermanas porque sé que estuve en sus oraciones y pensamientos. Paula, mi amiga, alcahueta y mamá regañona: gracias porque definitivamente fuiste un apoyo importante. A Nathalia, mi ejemplo a seguir: tu fortaleza y dedicación me inspiran cada día. Oriana, tu dulzura y ternura me dan fortaleza en este camino.

A mi Director, Gonzalo Arboleda, por su paciencia y creer en mi; por permitir mi desarrollo en la investigación; por enseñarme a discutir con argumentos claros. Al Dr. Humberto Arboleda y Juan José Yunis por sus sugerencias y apoyo durante este proceso.

A mis compañeros de laboratorio, por enseñarme y compartir sus conocimientos. A Adrian Sandoval, Diego Ordoñez, Jenny Jaramillo, Linda Moreno, Stella Lozano, Andrea Niño y María Jose Contreras.

A mis amigos, por creer en mi e impulsarme a seguir adelante. A Andrea Pinto, Karen Guerrero, Mónica Gómez, Milena Lozano, Esteban Cano y Wilson Arias.

A la Universidad Nacional de Colombia, por brindar un espacio de discusión y desarrollo de la investigación. A la Maestría en Bioquímica por ser parte fundamental para mi desarrollo como investigadora.

A Colciencias, por la financiación de esta investigación y del proyecto en general.

Resumen

La Apolipoproteína E transporta colesterol y otros lípidos en el plasma y en el sistema nervioso central. La ApoE se une a los receptores LDLR para de esta manera controlar la homeostasis de lípidos. Existen tres alelos que traducen a tres isoformas de la proteína: ApoE 2 ApoE 3 y ApoE4, de las cuales, la ApoE4 ha sido definida como un factor de riesgo de la Enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, el mecanismo molecular de esta susceptibilidad no se ha definido aún. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de las isoformas de ApoE2, 3 y 4 sobre las vías de sobrevivencia y autofagia en la línea CAD y bajo un contexto neurotóxico.

La primera parte de los experimentos se enfocó en conocer la respuesta de las ApoE en la línea celular CAD durante la diferenciación, para lo cual las células diferenciadas fueron incubadas durante 24 horas con las isoformas de las ApoE. En la segunda parte se observó la respuesta de las ApoE bajo un contexto neurotóxico, y para esto las células diferenciadas fueron incubadas con las ApoE2, 3 o 4, pasada una hora se adicionó ceramida y se dejó en incubación por 24 horas. Se realizaron ensayos de LDH y MTT. Para cuantificar la presencia de las proteínas se utilizó la técnica de *Western blot* e inmunofluorescencia para detectar autofagosomas.

En el primer modelo se observó un aumento en el metabolismo mitocondrial para el experimento con ApoE4: la viabilidad celular se mantuvo similar a la del control. En el tratamiento con la isoforma 4 de ApoE se da una hiperactivación de las vías Akt, ERK y p38; hay una disminución de AMPK y una inhibición de la autofagia, a diferencia de las isoformas de ApoE 2 y 3, donde se observa la activación de la autofagia. Estos resultados sugieren que la isoforma de ApoE4 está generando posiblemente aumento de ROS, lo que promueve la activación de vías de estrés celular como p38 y ERK. Al inhibirse la autofagia en este tratamiento, se da la acumulación de todos estos daños y se da una sensibilización de las células a la muerte, lo cual se observa en el siguiente modelo estudiado.

En el segundo modelo (neurotoxicidad), el tratamiento de ApoE4-ceramida presentó disminución en la viabilidad celular, y los tratamientos con ApoE2-ceramida y ApoE3-ceramida, no. El tratamiento de ApoE4-ceramida muestra una disminución en la fosforilación de Akt y AMPK, en comparación con los controles y los tratamientos de ApoE2-ceramida y ApoE3-ceramida. La presencia de la proteína ERK fosforilada no varía de manera significativa en los tratamientos y p38 fosforilada; evidencia una mayor presencia en los tratamientos de ApoE2-ceramida y ApoE3-ceramida que en ApoE4-ceramida.

Finalmente, estos resultados sugieren que las vías de supervivencia, metabolismo y autofagia en el tratamiento de ApoE4-ceramida presentan una desregulación principalmente en la inhibición de la autofagia que lleva a la muerte celular. En cambio, el tratamiento de ApoE2 y ApoE3 protege a la célula del efecto del neurotóxico mediante la activación de la autofagia.

Palabras claves: ApoE, autofagia, AKT, MAPK, AMPK, ceramida, CAD.

Abstract

Apolipoprotein E (ApoE) carries cholesterol and other lipids, within both, the plasma, and the central nervous system. It binds to APOE receptors in order to control lipid homeostasis. There are three ApoE alleles in humans (ApoE2, 3 y 4). Although ApoE4 has been defined as a risk factor in Alzheimer's diseases, the molecular effects associated to ApoE4 have not been fully described. The main purpose of the research is to study the differential effects of APOE isoforms in the survival and autophagy pathways under a neurotoxic model context.

The first part of the experiments was focused to find out the CAD line's reaction to the ApoE isoforms during the differentiation. In order to achieve it, the differentiation cells were incubated during a 24 hours period with ApoE isoforms. The second part of the process showed the ApoE reaction in neurotoxic context. To obtain it, the differentiated cells were incubated with the ApoE 2, 3 and 4. After 1 hour of pre-treatment with ApoE, ceramide was added for incubation process during 24 hours. Mitochondrial metabolism was measured by MTT assay and cell survivor by LDH assay. Equally, protein's expression was evaluated by Western blot's technique in order to quantify proteins presence and immunofluorescences, so to finally detect, autophagosomes.

When differentiated CAD cells were treated with ApoE 4, the first model showed an increase in MTT assay. In what cell viability is concerned, it was fairly similar to the Control one. Now, the increase in MTT assay is associated with an increase in the phosphorylation level of AKT(Ser 473), ERK 1-2 (Thr 202/Tyr 204) and p38 (Thr180/Tyr 182); AMPK decreased and the autophagy was inhibited in comparison to ApoE2 and 3, where autophagy was activated. These results suggest that the isoform ApoE 4 generated an increase in the ROS causing cellular stress pathways as p38 and ERK. The autophagy inhibition in this treatment allows accumulation damage and cell sensitization to cell death, showed in the next model studied.

The ApoE 4 and ceramide treatment causes a cellular viability decrease and the ApoE 2 and 3, does not. In the same way, it decreases in the phosphorylation level of AKT and AMPK, compared to ApoE2-ceramide and ApoE3-ceramide treatments. The presences of the phosphorylation of ERK protein does not show a significant variation in the

treatments; phosphorylation of p38 variation is mainly revealed in ApoE 2 and 3-ceramide treatments.

Finally, these results suggest that ApoE4-ceramide treatment raises metabolism, and cellular stress response associated to activation of the p38 pathway (maybe associated to an increase production of ROS). Inhibition of autophagy is associated to cellular death whereas ApoE 3 and ApoE 2-ceramide treatment protects cells from the neurotoxic effect through autophagy's activation.

Keywords: ApoE, autophagy, AKT, MAPK, AMPK, ceramide, CAD.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VIII
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas.....	XVI
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XVII
Introducción	1
1. Capítulo 1.....	5
1.1 Apolipoproteína E.....	5
1.1.1 Genética de la ApoE.....	7
1.1.2 Bioquímica de la ApoE.....	8
1.1.3 Receptores de la ApoE.....	10
1.1.4 La ApoE y la Neurodegeneración.....	14
1.2 Vías de Señalización.....	16
1.2.1 PI3K/Akt.....	16
1.2.2 Vía MAPKs.....	21
1.2.3 Vía AMPK y Hexoquinasa.....	23
1.3 Autofagia.....	26
1.4 Ceramida.....	30
1.5 Línea celular CAD.....	32
2. Capítulo 2.....	35
2.1 Objetivo General.....	35
2.2 Objetivos Específicos.....	35
3. Capítulo 3.....	36
3.1 Cultivo celular.....	36
3.2 Conteo de células viables.....	37
3.3 Tratamientos con las isoformas de ApoE.....	38
3.4 Tratamientos con la neurotóxina C2-ceramida.....	39
3.5 Tratamientos con las ApoE y C2-ceramida.....	40

3.6	Extracción y cuantificación de la concentración de proteínas	41
3.7	Electroforesis en <i>SDS-PAGE</i>	42
3.8	Detección de proteínas por <i>Western blot</i>	43
3.9	Ensayo de viabilidad celular (MTT y LDH)	45
3.10	Inmunofluorescencia para la proteína LC3.....	46
3.11	Estadística	47
4.	Capítulo 4	48
4.1	Objetivo 1.....	48
4.2	Objetivo 2.....	50
4.3	Objetivo 3.....	54
4.4	Objetivo 4.....	69
5.	Conclusiones y perspectivas.....	79
5.1	Conclusiones.....	79
	Anexo A: <i>Western blot</i> para LC3.....	81
	Anexo B: Gel y solución <i>Laemmli</i> modificada para <i>Western blot</i> de LC3	83
	Anexo C: Conteo de vesículas autofágicas.....	84
	Bibliografía.....	87

Lista de figuras

Figura 1-1. Representación esquemática de la Apolipoproteína humana.

Figura 1-2. Receptores de la Apolipoproteína E, miembros de la familia LDLR.

Figura 1-3. Dominios de la proteína PTEN

Figura 1-4. Cambios conformacionales de la proteína PTEN por modificaciones post-transduccionales.

Figura 1-5. Vías activadas por ApoE.

Figura 4-6. Nivel de expresión del receptor LDL-R en la línea celular CAD.

Figura 4-7. Efecto de las isoformas de ApoE 2, 3 y 4 en la viabilidad de células CAD determinado por la liberación de LDH

Figura 4-8. Efecto de las isoformas de ApoE ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4 en la viabilidad celular de células CAD determinado por la actividad metabólica mitocondrial (MTT)

Figura 4-9. Efecto de las isoformas de ApoE en la vía PI3K/Akt

Figura 4-10. Efecto de las isoformas de ApoE sobre la vía de las MAPKs

Figura 4-11. Efecto de ApoE 2, 3 y 4 sobre las proteínas reguladoras de la autofagia mTOR y AMPK

Figura 4-12. Efecto de ApoE 2, 3 y 4 sobre la autofagia-LC3.

Figura 4-13. Modelo propuesto del efecto de las isoformas de ApoE 2, 3 y 4 en la línea neuronal CAD.

Figura 4-14. Efecto tiempo dependiente de la ceramida en células CAD determinado por la liberación de LDH.

Figura 4-15. Efecto de la ceramida sobre la autofagia en el tiempo en células CAD.

Figura 4-16. Efecto diferencial de las isoformas de ApoE bajo un estrés celular sobre la sobrevivencia celular

Figura 4-17. Efecto de las isoformas de ApoE en la vía PI3K/Akt y MAPK bajo un contexto neurotóxico.

Figura 4-18. Efecto diferencial de las isoformas de ApoE bajo estrés celular en la vía de autofagia.

Figura 4-19. Modelo propuesto del efecto de las isoformas de ApoE 2, 3 y 4 en la línea neuronal CAD bajo un contexto neurotóxico.

Lista de tablas

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para *Western blot*.

Lista de Símbolos y abreviaturas

ApoE: Apolipoproteína E

LDLR: Receptores de Lipoproteínas de Baja Densidad

EA: Enfermedad de Alzheimer

SNC: Sistema Nervioso Central

LDLR: Receptores de lipoproteínas de baja densidad (low-density lipoprotein receptor)

CAD: CATH.a-differentiated

LDH: lactato deshidrogenasa

h: horas

SNPs: Single-Nucleotide Polymorphisms

Cys: Cisteína

arg: Arginina

Kpb: Kilo pares de bases

KDa: Kilo Dalton

Aa: Amino ácidos

Glu: Glutamina

VLDLR: Very Low Density Lipoprotein Receptor

apoER2: APOE Receptor-2

MEGF7: Multiple Epidermal Growth Factor-Like Domains 7

LRP1: Lipoprotein Receptor Related Protein-1

EGF: Epidermal Growth Factor

PTB: fosfotirosina por sus siglas en inglés Phosphotyrosine Binding

NMDA: N-methyl-D-aspartate

Ca: Calcio

JNK1: c-JUN N-terminal kinase1

βA: β-Amiloide

EP: Enfermedad de Parkinson

NT3: Neurotrofina

TrkC:Tirosina Cinasa C

ROS:Especies Reactivas de Oxigeno por sus siglas en ingles Reactive Oxygen Species

PDK-13: Phosphoinositide-dependent kinase 1

DNA-PK: DNA dependent protein kinase

PTEN: Phos- Phatase and Tensin Homologue

HK1: Hexoquinasa1

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

ERK: Extracellular Signal Regulated Kinases

p38: MAK kinase.

AMPK: AMP-activated protein kinase

CBS1-4: cystathionine beta-synthase motifs

DMEM/F12:Dulbecco's Modified Eagle Medium

μM: micro Molar

μg: micro gramos

nm: nanometro

LDH: Lactato deshidrogenasa

BCA:Ácido Bicinconínico

BSA:Albumina de suero bovino por sus siglas en inglés (Bovine Serum Albumin),

MTT:Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5- difeniltetrazólico

DE: Desviación estandar

Introducción

Una de las funciones de la Apolipoproteína E (ApoE) es el transporte de colesterol y otros lípidos esenciales para las neuronas, que se hace a través de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (Mahley *et al.*, 2006). Este transporte permite la producción de energía esencial, membranas celulares y síntesis de hormonas (Go y Mani, 2012). La ApoE es producida principalmente por la microglía y se encuentra en altas concentraciones en el hígado y el cerebro (Mahley *et al.*, 2006). También está implicada en el crecimiento, mantenimiento y reparación del sistema nervioso central (Mahley *et al.*, 2000, Mahley *et al.*, 2006 y Kim *et al.*, 2009).

La ApoE es una proteína polimórfica que está presente en varios alelos, de los cuales, para esta investigación, se tendrán en cuenta los más importantes: APOE2, APOE3 y APOE4. Las isoformas de la ApoE difieren en sus habilidades para llevar a cabo sus funciones. El estudio de la ApoE y, específicamente, de la ApoE4 ha permitido la asociación de esta isoforma con una variedad de procesos neuropatológicos dentro de los que se encuentra la enfermedad de Alzheimer (EA) (Bell *et al.*, 2012; Zhong y Weisgraber, 2009).

Debido a la gran importancia de esta proteína en las enfermedades neurodegenerativas, el grupo de investigación de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia ha realizado estudios en este campo. Los resultados obtenidos muestran una asociación altamente significativa entre el alelo APOE4 y la EA para la población colombiana, lo cual concuerda con las investigaciones realizadas en otras poblaciones (Arboleda *et al.*, 2001).

La EA es el desorden neurodegenerativo más frecuente del Sistema Nervioso Central (SNC), por lo cual se han realizado esfuerzos para identificar los factores genéticos y ambientales que permiten el desarrollo de esta patología. Los estudios han mostrado una relación con la señalización de lípidos, que incluye la muerte por ceramida (Philippov *et al.*, 2012) y alteraciones causadas por las isoformas de ApoE.

Las investigaciones que se han desarrollado hasta este momento no muestran con claridad las vías moleculares implicadas en el proceso de neurodegeneración. Si bien se ha estudiado la relación entre la EA y la autofagia, no se ha tenido en cuenta la relación que puede existir entre la ApoE y la autofagia, a pesar de que este podría ser un punto determinante para comprender algunos procesos que ocurren en el desarrollo de la neurodegeneración.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es estudiar el efecto diferencial de las isoformas de ApoE 2, 3 y 4 sobre las vías de sobrevivencia, metabolismo celular y autofagia, en una línea de neuronas catecolaminérgicas de origen mesencefálico murino (CAD), y bajo un modelo neurotóxico inducido por C2-Ceramida.

Para cumplir el objetivo, se realizaron experimentos con las variantes de la proteína ApoE. Cada una fue agregada al medio de cultivo donde se encontraban las células diferenciadas, lo cual permitió medir la viabilidad celular, por medio de la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), y el metabolismo mitocondrial, por medio de la técnica de MTT. Se realizó *Western blot* para analizar la respuesta de las vías de señalización: PI3K/Akt (PTEN, GSK-3 β , Hexoquinasa (HK)) y MAPK (p38 y ERK), AMPK de sobrevivencia y metabolismo; y mTOR-LC3-II, AMPK de autofagia.

Para analizar si las ApoE tienen algún efecto sobre la autofagia inducida por un neurotóxico como ceramida, se procedió a determinar si durante veinticuatro (24) horas (h) y a la concentración de 10 μ M (IC50) de ceramida para las células CAD, se daban

eventos de autofagia durante ese lapso de tiempo. Se encontró que la ceramida causaba autofagia a las 6 horas de tratamiento, lo cual permitió continuar los experimentos con la misma concentración y tiempo de veinticuatro (24) h. Se realizaron experimentos en los que se les agregó, por separado, ApoE2, ApoE3 y ApoE4 a las células diferenciadas. Después de una (1) h, se adicionó ceramida a una concentración de 10 μ M y se dejó en incubación por 24h. Pasado este tiempo, se realizó la recolección del medio para el ensayo de viabilidad LDH y la extracción de proteínas para el análisis de sobrevivencia y autofagia (Akt, PTEN, GSK3- β , mTOR, LC3), metabolismo (HK y AMPK), y sobrevivencia y estrés celular (ERK - p38).

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos permitieron establecer una relación de la proteína ApoE con eventos de autofagia, y correlacionarlos con vías de sobrevivencia y metabolismo celular en un modelo neuronal *in vitro*.

En la primera parte de los experimentos, el incremento de la señalización de las vías AKT y ERK, se relaciona con una sobre-activación en el metabolismo mitocondrial, lo cual puede llevar a generar ROS, hipoxia, excitotoxicidad esta última posiblemente por aumento de glucosa y ATP. Estas vías podrían estar disminuyendo las enzimas antioxidantes lo que estaría contribuyendo a la generación de estrés oxidativo. La proteína p38 es activada en respuesta a los daños que están ocurriendo en la célula. Según los resultados obtenidos en este trabajo, la autofagia esta inhibida en el tratamiento de ApoE4, ya que la proteína mTOR esta fosforilada, AMPK se encuentra disminuido y LC3II muestra la menor presencia al compararlo con los otros tratamientos con las isoformas de ApoE y el control. Esta inhibición en la autofagia puede llevar a que la célula presente un retardo o pare en la diferenciación. Indicando que en este modelo, la autofagia es requerida para la diferenciación de las células CAD, siendo favorecida por las isoformas ApoE 2 y 3. El tratamiento con la isoforma de ApoE 3 presenta resultados similares a los encontrados con la isoforma ApoE 4 pero en este caso p38 fosforilado no se encuentra tan aumentado como con ApoE4. Lo que sugiere que no se esta generando

estrés celular y esto es debido a que la vía de autofagia esta activa gracias a la proteína AMPK. También se plantea que aunque estos eventos no producen la muerte celular, si podría sensibilizar a la célula y ante otro evento negativo la célula podría llegar a la muerte.

El modelo neurotóxico permitió obtener resultados similares a lo que se observan en la enfermedad de Alzheimer. En el tratamiento de ApoE4 hubo un aumento en la fosforilación de Akt, lo cual se ha visto en cerebros *postmortem* de pacientes que presentaban la EA en una fase temprana(Griffin *et al.*, 2005 y Ksiezak-Reding *et al.*, 2003) y en algunas enfermedades neurodegenerativas (Bhaskar *et al.*, 2009; Hosoi *et al.*, 2007; Ksiezak-Reding *et al.* 2003). En el caso del tratamiento de ApoE4-ceramida, se observó una disminución en la proteína AMPK, que también se ha identificado en cerebros de pacientes en fase intermedia de la EA (Cai *et al.*, 2012 y Salminen *et al.*, 2011). Además, en esta investigación se presenta una desregulación en la autofagia que ha sido reportada por diferentes autores, quienes correlacionan esta falla con el desarrollo de diferentes patologías como la EA. En el modelo de diferenciación las ApoE muestran respuestas específicas según la isoforma y la ApoE 4 genera sensibilidad a la muerte en las células, lo que se evidencia cuando se adiciona ceramida. Este trabajo permitió observar una respuesta diferencial de las isoformas de ApoE en diferentes vías moleculares de sobrevivencia, metabolismo y permitió hacer una correlación entre autofagia y ApoE.

1. Capítulo 1

1.1 Apolipoproteína E

Apolipoproteína E (ApoE) fue descubierta en los inicios del año 1970 como un componente de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Este descubrimiento permitió que se diera una relación entre esa proteína y el metabolismo del colesterol, lo cual ha sido tema de estudio desde entonces (Mahley *et al.*, 2000). La ApoE está presente en varios órganos, aunque tiene una mayor expresión en el hígado y en el cerebro, en el que se produce principalmente por los astrocitos y la microglia. También se ha observado que las neuronas bajo ciertas condiciones pueden producir ApoE (Mahley *et al.*, 2006).La

Varios estudios han evidenciado que la ApoE es una proteína del plasma y que una de sus funciones principales es el transporte de colesterol y de otros lípidos. Esto permite la producción de energía esencial, membranas celulares y la síntesis de hormonas (Go y Mani, 2012). La ApoE también se encuentra implicada en el crecimiento, mantenimiento y reparación del sistema nervioso central (Mahley *et al.*, 2000, Mahley *et al.*, 2006 y Kim *et al.*, 2009).

La ApoE funciona como un ligando que se une a receptores de membrana, lo que permite la endocitosis de partículas de lipoproteína. La endocitosis mediada por receptores de ApoE, está a cargo de la familia de receptores de baja densidad, que por sus siglas en inglés se denomina LDLR (*low-density lipoprotein receptor*) (Mahley *et al.*, 2006; Bu, 2009; Kim *et al.*, 2009). Una vez la ApoE es endocitada, debe ser degradada o reciclada a la superficie celular. El colesterol liberado desde

las partículas de lipoproteína que contiene la ApoE es utilizado para el soporte de la sinaptogénesis y para mantener las conexiones sinápticas (Kim *et al.*, 2009).

1.1.1 Genética de la ApoE

En los humanos, el gen de Apolipoproteína E (APOE) contiene muchos *Single-Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) distribuidos a través del gen. Los tres SNPs más comunes permiten un cambio en la secuencia y dan como resultado a las isoformas: ApoE2 (cys112, cys158), ApoE3 (cys112, arg158), y ApoE4 (arg112, arg158), que se encuentran sobre un solo locus en el cromosoma 19, el cual codifica para la proteína y presenta 4 exones de 3.6 Kilo pares de bases (Kpb) (Kim y Holtzman, 2009; Chauhan *et al.*, 1996; Hauser *et al.*, 2011).

El alelo 3 es el más común (77%) y el alelo 2 el menos común (8%). La frecuencia del alelo 4 es de 15% en la población estadounidense en general, pero en pacientes con EA es del 40%. Según estudios, los individuos con el Alelo 4 son de 3 a 4 veces más propensos a desarrollar EA que los individuos que no lo presentan; y entre el 40% y el 80% de los pacientes con Alzheimer posee al menos un alelo de APOE4 (Mahley *et al.*, 2006). Se ha determinado que en la población colombiana la presencia del alelo 4 del gen APOE es un factor de riesgo para la EA así como en otras poblaciones (Arboleda *et al.*, 2001; Bu, 2009). El alelo 4 de APOE está asociado con una fase temprana de AD, el alelo 2 de APOE está asociado con un bajo riesgo de EA y el alelo 4 da una ganancia de función tóxica, una pérdida de la función de neuroprotección o ambas (Kim y Holtzman, 2009).

1.1.2 Bioquímica de la ApoE

La ApoE es un polipéptido de 299 aminoácidos (aa) que tiene un peso molecular de 34,145 kDa (Rall *et al.*, 1982). La ApoE presenta un dominio amino-terminal y uno carbono-terminal, que están unidos por una región bisagra. La región que interactúa con los receptores de la ApoE es el dominio amino-terminal (residuos 136 al 150) y la región de unión a lípidos es el dominio carbono-terminal (residuos 244 al 272) (Figura 1-1). (Bu, 2009).

Las ApoE son caracterizadas por su alto contenido de hélices alfa, que son críticas para su función en la estabilización de las partículas de lipoproteínas. Las caras hidrofílicas e hidrofóbicas permiten estados alternos entre libre de lípidos y asociada a lípidos. La hélice 1 se inicia en la posición 24 y termina en la 42, la 2 va desde la posición 54 hasta la 81, la 3 inicia en el aa 87 y termina en el 122, y la hélice 4 comienza en la posición 130 y va hasta la 164 (Yamamoto *et al.*, 2008; Hauser *et al.*, 2011).

Las tres isoformas de ApoE varían en los residuos 112 y 158, y difieren la una de la otra por solo un aa (Figura 1-1.), lo cual es suficiente para alterar la estructura tridimensional de las proteínas, que influencia la asociación de la proteína a lípidos y receptores. La ApoE3 y la ApoE4 se unen con mayor afinidad a receptores LDLR que la ApoE2. Por lo tanto, la ApoE2 transporta lípidos de manera menos eficiente. La ApoE4 se une principalmente a grandes partículas de lipoproteínas, debido a la presencia de Arginina (Arg) en la posición 112, que afecta la conformación de la cadena lateral del residuo de Arg 61. Esto da como resultado un dominio de interacción entre la Arg, en el dominio amino-terminal, y el residuo de Glutamina (Glu), en la posición 255 del dominio carbono-terminal (Bu, 2009; Mahley *et al.*, 2006).

La ApoE3, la isoforma más común, contiene una cisteína en la posición 112 y una Arg en la posición 158. La ApoE2 tiene cisteína en las dos posiciones, mientras que la ApoE4 presenta Arg en ambas (Rall *et al.*, 1982; Yamamoto *et al.*, 2008 y Liu *et al.*, 2013). Estas diferencias entre las isoformas dan una variación a la carga: ApoE4 viene a hacer mas catiónico por una unidad de carga respecto a ApoE3 y de ApoE2 por dos unidades (Mahley *et al.*, 2000).

Figura: 1-1. Representación esquemática de la Apolipoproteína E humana

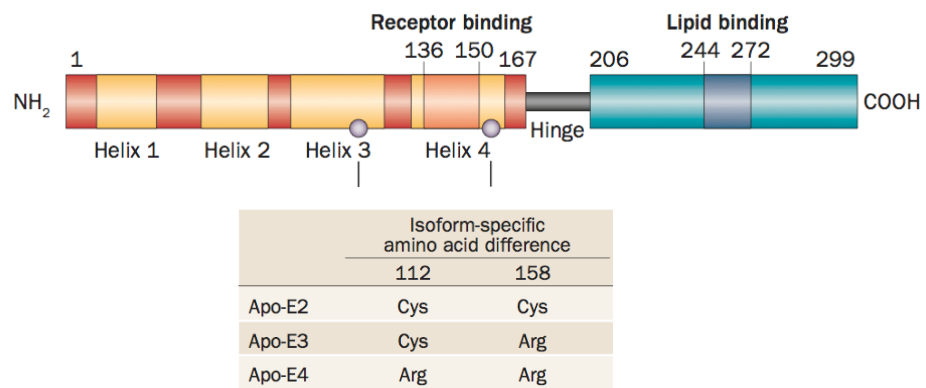


Diagrama que muestra los dominios de ApoE y los residuos en las posiciones 112 y 158 para cada isoforma de ApoE. Tomado y modificado de Liu *et al.*, 2013

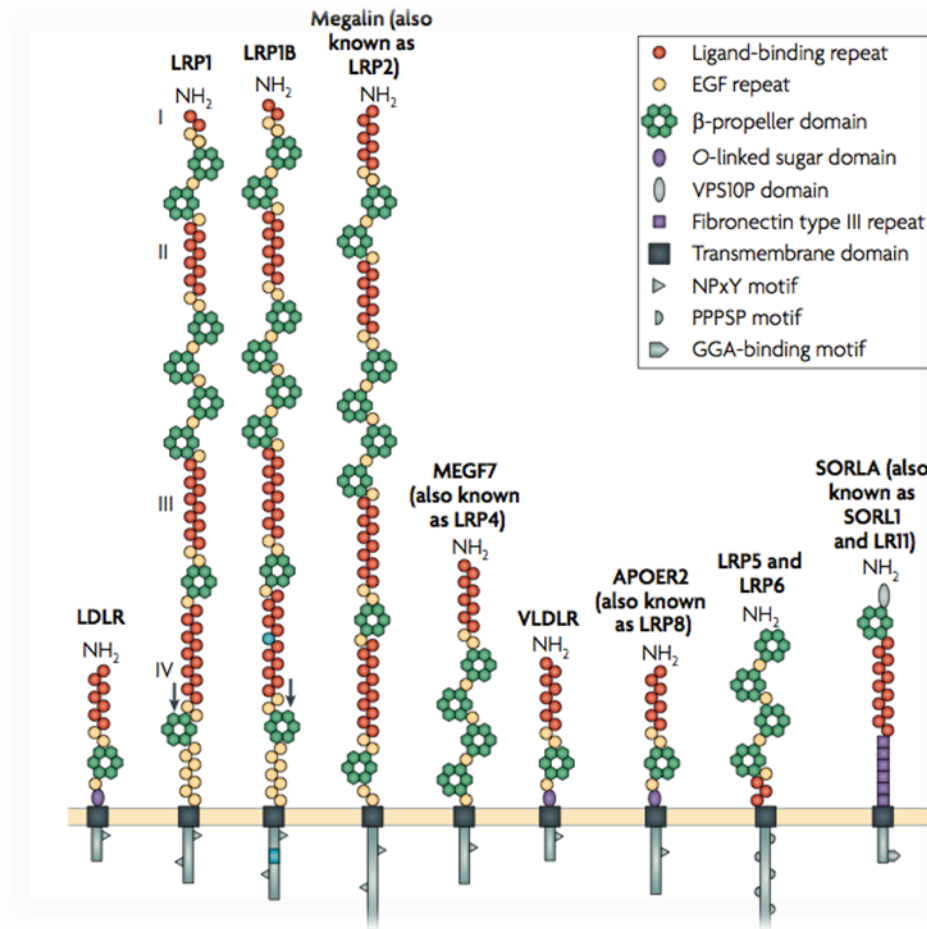
La isoforma ApoE4 se encuentra presente en un nivel bajo a comparación de las otras isoformas, lo cual podría deberse a que el dominio de interacción afecta directamente la estabilidad de esta isoforma. La configuración que toma la ApoE4 hace que esta forme una estructura característica llamada *molten globule*, que podría ser clave para el papel patogénico de la ApoE4 en la EA (Rall *et al.*, 1982).

1.1.3 Receptores de la ApoE

La lipoproteína ApoE se une a una familia de receptores integrales de membrana, conocida como LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*). Muchos de los miembros de esta superfamilia actúan como receptores endocíticos y de señalización (Herz y Beffert 2000; Narita *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2007). La internalización de las partículas bajo el proceso de endocitosis incluye: *clustering* de los receptores de lipoproteína, transporte en endosomas tempranos y tardíos, seguido por la hidrólisis en lisosomas, por la liberación de lípidos al citoplasma y por el reciclaje de los receptores hacia la superficie celular (Narita *et al.*, 2002; Beffert *et al.*, 2004).

Esta familia de receptores presenta siete miembros muy similares entre sí: LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*), VLDLR (*Very Low Density Lipoprotein Receptor*), apoER2 (*APOE Receptor-2*), MEGF7 (*Multiple Epidermal Growth Factor-Like Domains 7*), LRP1 (*Lipoprotein Receptor Related Protein-1*), LRP1B (*Lipoprotein Receptor Related Protein-1B*) y Megalin. De los cuales, LDLR, Megalin, VLDL y apoERE2 presentan una alta afinidad con la proteína ApoE (Narita *et al.*, 2002) (Figura 1-2).

Figura:1-2. Receptores de la Apolipoproteína E, miembros de la familia LDLR.



Esquema que muestra los receptores de la familia LDLR y los dominios característicos. Tomado de Bu 2009.

Estas proteínas presentan características estructurales y bioquímicas que permiten agruparlas en esta familia, la región extracelular de estos receptores contiene: repeticiones tipo complemento o *ligand-binding repeats*, repeticiones tipo *EGF repeats* por sus siglas en inglés *Epidermal Growth Factor*, estructuras *β-propeller-like* con motivos YWTD. El motivo tetra aminoácido NPxY es conservado en una o más copias de todos los miembros de la familia de los receptores LDL, este dominio facilita la unión de las proteínas al receptor es mediada por el dominio de unión fosfotirosina PTB por sus siglas en inglés *Phosphotyrosine*

Binding. Los dominios PTB están presentes en varias proteínas del citoplasma y en muchos casos no requieren la fosforilación de tirosina para su interacción con el motivo NPxY y un dominio *O-linked sugar* (Figura 1-2) (Herz y Beffert., 2000, Hauser *et al.*, 2011).

Los receptores de ApoE interactúan por medio de un motivo que contiene un tetra-péptido consenso Asn-Pro-Xaa-Tyr (NPxY), el cual se encuentra en la porción de la proteína que se encuentra en el citoplasma. NPxY interactúa con distintas proteínas citoplasmáticas como Dab1 la cual presenta un dominio PTB *Phosphotyrosine Binding Domain* (Bu 2009). Los residuos de tirosina que se encuentran en la región citoplasmática del receptor al interactuar con algunos ligandos son fosforiladas y estas tirosinas fosforiladas son las que permiten el reconocimiento por proteínas que contengan dominios PTB entre las que se encuentran Dab1 (Bu, 2009). Dab 1 es una proteína andamio la cual permite la señalización de vías moleculares como PI3K/Akt, ERK1/2, la cual se da dependiente de influjo de calcio (Ca) vía *N-Methyl-D-Aspartate* (NMDA) (Figura 1-5) (Hoe *et al.*, 2005) e inhibición de la vía *c-JUN N-terminal kinase1* (JNK1) (Hauser *et al.*, 2011).

LDLR se une a ApoE que contiene partículas de diferentes densidades, por medio de interacciones electroestáticas entre residuos de aminoácidos básicos sobre ApoE, y los residuos ácidos sobre el receptor que involucran repeticiones ricas en disulfido (Zaiou *et al.*, 2000, Hauser *et al.*, 2011). Estudios que permiten la predicción de la estructura secundaria de ApoE, han mostrado que en el dominio de unión de ApoE al receptor, región 140-150 de ApoE se encuentra una hélice alfa, siendo esta una estructura hidrofóbica. Las lisinas y argininas son cruciales para su interacción y a pesar de la similaridad en cargas, el cambio de uno de estos aminoácidos puede afectar la unión al receptor (Zaiou *et al.*, 2000).

La proteína ApoE3 es conocida por ser un ligando de alta afinidad para el receptor LDL, LRP1, apoER2 y al receptor VLDL (Hauser *et al.*, 2011, Go y Mani, 2012). ApoE pobremente lipidada o no lipidada puede ser catabolizada por LRP en la superficie celular y de esta manera ser internalizada por endocitosis (Narita *et al.*, 2002). La especificidad de unión de ApoE al receptor es influenciada probablemente por su estado conformacional y de lipidación (Bu 2009). ApoE 3 y ApoE 4 se unen a LDLR con una mayor afinidad que ApoE 2. (Yamamoto *et al.*, 2008).

La asociación de ApoE lipidada con los receptores de la superficie celular de neuronas de la familia de LDLR, ha mostrado una modulación en el crecimiento de la neurita de una manera isoforma específica (Beffert *et al.*, 2004). La activación de estos receptores promueven el crecimiento de las neuritas lo cual sugiere función de señalización para estos receptores (Hoe *et al.*, 2005).

1.1.4 La ApoE y la Neurodegeneración

Las neuronas deben ser remodeladas y reparadas para mantener las conexiones sinapto-dendríticas durante el ciclo de vida, y esto incrementa con el paso de los años. La ApoE es un factor importante en dicho proceso: se ha demostrado que las ApoE 2 y 3 son efectivas en mantener y reparar el daño en las células neuronales, pero que la ApoE 4 lo hace en una menor proporción (Bu, 2009). Los daños o estresores podrían incluir estrés oxidativo, isquemia, exceso de β A, mutaciones en SOD1 y procesos de envejecimiento propios. Los individuos portadores del alelo APOE 4 se ven más afectados con la edad, lo que indica un efecto detrimental en el SNC con el paso del tiempo (Mahley *et al.*, 2006; Bu, 2009).

La ApoE ha sido asociada a enfermedades cardiovasculares, EA y, posiblemente, a enfermedades infecciosas (Mahley y Rall, 2000). Los procesos mediados por las isoformas de la ApoE que pueden influenciar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer incluyen: transporte del colesterol y formación de sinapsis, modulación de crecimiento neurítico y plasticidad sináptica, desestabilización de microtúbulos y aclaramiento de β -amiloide.

La ApoE4 contribuye a la EA por modulación del metabolismo, por agregación del péptido β A, por la directa regulación del metabolismo lipídico en el cerebro y por funciones sinápticas a través de receptores de la ApoE. Esto coincide con estudios genéticos en los que se ha reportado que entre el 40% y el 80% de los pacientes con Alzheimer posee al menos un alelo de APOE4 (Mahley *et al.*, 2006). Por el contrario, la ApoE2 es asociada con el decrecimiento del riesgo de padecer la EA (Bu, 2009, Castellano *et al.*, 2011 y Verghese *et al.*, 2011).

El alelo 4 de APOE también aumenta el riesgo, de que haya una progresión de la enfermedad HIV, de contraer aterosclerosis u otros trastornos neurológicos

como la Enfermedad de Parkinson (EP), aunque estudios recientes han rechazado la posible asociación entre la ApoE y la EP (Mahley *et al.*, 2006 y Kim *et al.*, 2009). Estas evidencias sugieren que el alelo APOE 4 debe estar asociado con la neurodegeneración acelerada en el desarrollo y progresión de muchas enfermedades neurodegenerativas y en el decline cognitivo (Kuller, 1999 y Mahley *et al.*, 2006).

1.2 Vías de Señalización

1.2.1 PI3K/Akt

La activación de la proteína AKT se encuentra involucrada en una variedad de procesos celulares como sobrevivencia, metabolismo celular, transporte y metabolismo de glucosa y aminoácidos, transcripción de genes y síntesis de proteínas (Brunet *et al.*, 2001; Laffont *et al.*, 2002, Plas y Thompson, 2005). La proteína AKT presenta varias isoformas las cuales son altamente expresadas en el sistema nervioso, ya que es vital para promover la sobrevivencia y neuroprotección en neuronas de embrión. AKT es activada por una variedad de estímulos, incluyendo insulina, factores de crecimiento, citoquinas y estrés celular (Griffin *et al.*, 2005).

La proteína AKT es activada por una fosforilación secuencial en la treonina 308 (Thr 308) y la serina 473 (Ser 473), estos residuos están ubicados dentro del *loop* de activación y motivo hidrofóbico en la región carbono terminal de AKT. La activación de AKT en el Thr 308 es mediada por *3'phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK-1), la cual es activada por unión a PI(3,4,5)P3 y subsecuente translocación al núcleo(Laffont *et al.*, 2002). Y la fosforilación en la serina 473 es dada por la quinasa PI3K que permite el paso del fosfoinositol difosfato (PIP2) a fosfoinositol trifosfato (PIP3), lo que permite la fosforilación de Akt (Figura 1-5) (Hennessy *et al.*, 2005). Hay varias quinasas capaces de fosforilar a AKT en la Ser 473 como PDK-1, *integrin-linked kinase* (ILK), *DNA dependent protein kinase* (DNA-PK) y también puede presentar auto-fosforilación. Se ha reportado la fosforilación de AKT por medio de mTORC2, el cual puede fosforilar a Akt en la serina 473 (Memmott y Dennis, 2009).AKT es una de las proteínas encargadas de regular el balance energético y juega un rol importante en el cerebro específicamente en el mecanismo que responde a las señales nutricionales y hormonales (Laffont *et al.*, 2002).

Estudios han mostrado que la activación de la proteína Akt protege a las células de la muerte en la EA pero también hay reportes en los cuales se han mostrado evidencias de una hiperfosforilación de sustratos de Akt en cerebros con EA, y por lo tanto de Akt fosforilada que no llevan precisamente a la sobrevivencia, esto permite establecer una asociación con la EA (Pei *et al.* 2003, Griffin *et al.*, 2005).

Los sustratos de Akt como GSK3B Ser 9, Tau Ser214, mTOR Ser 2448 presentaron un incremento en el cortex temporal de cerebros con EA comparado con los controles. La disminución de Akt fosforilado y PTEN en neuronas fue observado en el hipocampo CA1 y en estadios tardíos de la EA. Estos resultados permiten establecer un posible control aberrante de la señalización de AKT y PTEN en la EA (Griffin *et al.*, 2005).

El incremento de la fosforilación de Akt podría causar hiperfosforilación de Tau en EA como se mencionó anteriormente, la proteína Tau presenta una región consenso para la fosforilación dada por Akt en la serina214 (S214) (Ksiezak-Reding *et al.*, 2003), el cual se encuentra cercano a la treonina212 (Thr212) permitiendo la formación del epitope de Tau A100 que es ampliamente específico para los *paired helical filament* (PHF) encontrados y característicos de la EA (Matsuo *et al.* 1994). Al sobre-regular la proteína Akt en experimentos con cultivo primario de neuronas humanas, se observó una regulación independiente de Tau para las posiciones Thr212 y Ser214. Thr212 es bajo regulada mientras que Ser214 fue sobrerregulada (Kyoung *et al.*, 2004).

ApoE puede inducir la fosforilación de AKT/*protein kinase* B en la línea celular neuronal Neuro-2a por dos vías diferentes PI3K (Figura 1-5) y PKA. La primera vía es estimulada por ApoE3 y ApoE4 pero no por ApoE2 después de una hora de incubación. La segunda vía es activada después de 2 horas de incubación de una

manera isoforma dependiente ($E2=E3>E4$) y es mediada por calcio. Estos resultados sugieren que ApoE debe afectar el metabolismo celular de una manera isoforma dependiente por medio de la inducción de nuevas vías de señalización (Laffont *et al.*, 2002).

AKT también es conocida como una proteína quinasa B, es un inductor corriente arriba de mTOR es capaz de regular de manera positiva a mTOR. AKT inactiva a TSC2 por la fosforilación sobre 4 residuos, produciendo el desacople del complejo TSC1/TSC2 lo que produce la pérdida de la actividad de este complejo y da como resultado la activación de mTOR e inhibición de la autofagia (Figura 1-5) (Laffont *et al.*, 2002). mTOR, siendo este el regulador negativo de la autofagia, es un sensor del estado de energía, factores de crecimiento y señalización de nutrientes. Bajo condiciones ricas de nutrientes, mTOR suprime la autofagia a través de interacciones directas con el complejo ULK1-ATG13-FIP200 (García *et al.*, 2010)

Una de las proteínas reguladoras de AKT es: *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) es una proteína que tiene un papel importante durante el desarrollo del SNC y está implicada en enfermedades neurodegenerativas (Ross y Gericke, 2009). Es una proteína de 403 aa que está compuesta por 5 dominios: un fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato-dominio de unión (PBD), un dominio fosfatasa (Phosphatase), un dominio C2, un dominio carbono-terminal (C-tail) y un dominio de unión PDZ (PDZ-BD) (Fig. 1-3) (Song *et al.*, 2012).

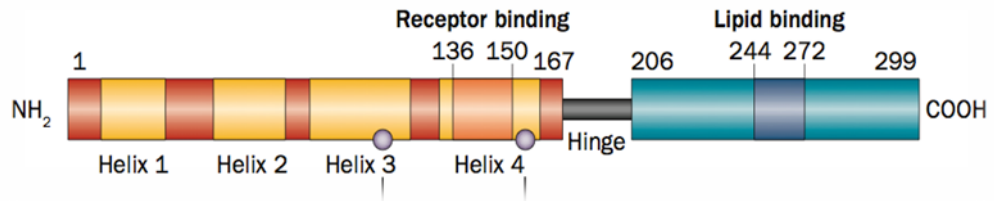
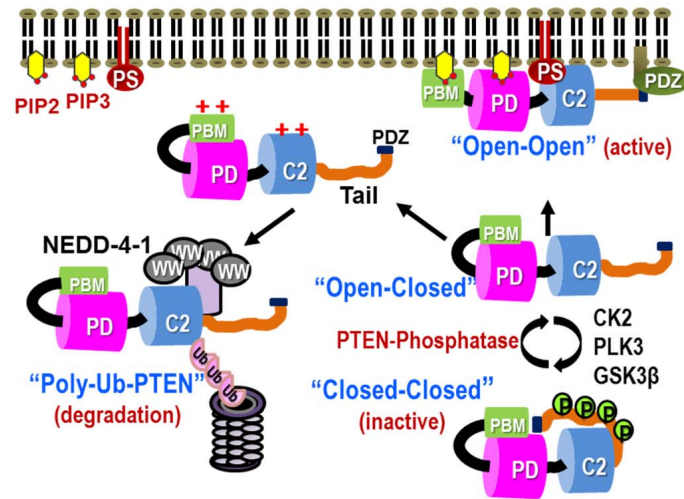
Figura:1-3. Dominios de la proteína PTEN.

Diagrama que representa los dominios de la proteína PTEN. Tomado y modificado de Song *et al.*, 2012.

La fosforilación de PTEN en el dominio C2 genera un cambio conformacional que la hace enzimáticamente inactiva denominada “*close-close*” uno de los residuos fosforilados es la serina 380. Esta fosforilación permite que el dominio carboxo-terminal se pliegue sobre los residuos de los dominios C2 y fosfatasa haciéndola incapaz de interactuar con la membrana. La desfosforilación convierte a PTEN en una forma “*open-closed*”. Interacciones electrostáticas mediadas por el dominio PBM convierten a PTEN en una forma “*open-open*” y de esta manera se une a la membrana y actúa como una fosfatasa lipídica convirtiendo a PIP3 en PIP2, de esta manera inhibe la activación de la señal de la vía PI3K/AKT/mTOR. Posterior a la unión a la membrana varias Ubiquitin-ligasas E3, poli-ubiquitinan a PTEN marcándola para su degradación vía proteosoma “*Poly-Ub-PTEN*” (Figura 1-4). Las fosforilaciones en PTEN causan una regulación negativa en su función pero positiva en su estabilidad (Ross y Gericke, 2009; Malaney *et al.*, 2013)

Figura: 1-4. Cambios conformacionales de la proteína PTEN por modificaciones post-transduccionales



Dibujo que representa las diferentes modificaciones conformacionales que puede sufrir la proteína PTEN. Tomado y modificado de Malaney *et al.*, 2013.

Un posible regulador de PTEN es la proteína CK2, la cual fosforila a PTEN en el dominio c-terminal (Torres y Pulido 2001). Investigaciones realizadas por Raftery y colaboradores (2005) muestran una asociación entre la proteína ApoE y CK2, en donde se plantea una posible activación de CK2 por ApoE (Figura 1-5). Esto se relaciona con un aumento de Tau fosforilado, lo que lleva a una asociación de estas proteínas con enfermedades como el Alzheimer.

1.2.2 Vía MAPKs

La exposición de las células a estímulos externos convergen en una respuesta celular específica a través de la activación de la vía de señalización *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) (Sun *et al.*, 2003). La familia de las MAPK está envuelta en diferentes procesos celulares entre estos: crecimiento celular, proliferación, diferenciación, sobrevivencia, inmunidad innata y desarrollo (Krens *et al.*, 2006). Las MAPKs transmiten señales por medio de eventos de fosforilaciones secuenciales (Thomas y Haganir 2004), el sistema de fosforilación está compuesto de tres quinasas, una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), una MAPK quinasa (MAPKK) y una MAPK. La fosforilación de las MAPKs ocurre en un dominio de fosforilación dual conservado (Thr-Xxx-Tyr) permitiendo la activación de las proteínas y subsecuente formación de dímeros los cuales se translocan al núcleo para activar blancos cascada abajo (Krens *et al.*, 2006).

Las MAPKs son una familia de quinasas específicas serina/treonina que traducen estímulos extracelulares en la expresión de genes y han mostrado que están implicadas en diversos eventos celulares como en la participación de eventos de daño axonal (Agthong *et al.*, 2006). Se encuentran tres subfamilias mayores las cuales son: *Extracellular Signal Regulated Kinases* (ERK), *c-Jun amino-terminal kinases* (JNK) y p38 MAK kinase. Los residuos de amino ácidos que se encuentran en el dominio central THR-Xxx-Tyr hacen parte del dominio de fosforilación dual, es específico para cada una de las subfamilias de la familia de proteínas MAPK. En general, la subfamilia ERK (TEY) es principalmente activada por factores de crecimiento, p38 (TGY) por factores de estrés y JNK (TPY) es activada por estrés, diferenciación y factores de crecimiento (Krens *et al.*, 2006).

ERK

Una de las vías más estudiadas es la activación de ERK1 y ERK2 en respuesta a factores de crecimiento y otros estímulos. Para que se de la activación de ERK se debe dar un incremento en la actividad de la proteína RAS por medio de la unión a GTP(Thomas y Haganir 2004).

Estudios han mostrado que un péptido derivado de ApoE activa diversas quinasas intracelulares, como ERK1/2. La activación de ERK 1/2 es dependiente del flujo de calcio vía receptor de glutamato NMDA (Figura 1-5) (Hoe *et al.*, 2005).

p38

La subfamilia p38 es preferiblemente activada por estrés celular o citoquinas pro-inflamatorias, las cuales juegan un rol importante en la regulación de la respuesta inflamatoria. La fosforilación de p38 se ha asociado con nuevas funciones que han sido identificadas, incluyendo procesos de desarrollo, diferenciación celular, proliferación, muerte celular y sobrevivencia. Estudios han evidenciado la presencia de p38 fosforilado (p38-p) sobre ovillos neurofibrilares y neuritas distróficas de placas neuríticas de cerebros con EA. Se ha encontrado que la inmunoreactividad de p-p38 se encuentra localizada principalmente en sitios de degeneración (Sun *et al.*, 2003).

1.2.3 Vía AMPK y Hexoquinasa

AMPK

AMP-activated protein kinase (AMPK) es un regulador de la homeostasis energética celular y tiene un papel central en el metabolismo de glucosa y lípidos (Vingtdeux *et al.*, 2011; Gwinn *et al.*, 2008). AMPK es un complejo heterotrimerico el cual esta compuesto de una subunidad catalítica alfa y unas subunidades regulatorias beta y gamma. La subunidad alfa, que contiene el residuo de treonina 172 debe ser fosforilada por quinasas corriente arriba para su activación y un dominio auto-inhibitorio que inhibe el dominio quinasa activado. El dominio carbono terminal de la subunidad alfa es necesario para la unión de las subunidades beta y gamma. La subunidad beta tiene un dominio de unión a glicogeno y el dominio c-terminal es requerido para la unión de las subunidades alfa y gamma. Las isoformas de la subunidad gamma tienen dominios N-terminal variables y conservan *Cystathionine Beta-Synthase motifs* (CBS1-4) que unen AMP o ATP (Cai *et al.*, 2012 y Salminen *et al.*, 2011).

AMPK alfa puede ser fosforilada en la treonina 172 en el *loop* de activación, mediante la proteína LKB1 en respuesta al incremento en el radio AMP/ATP, esto permite que la subunidad gamma experimente un cambio conformacional para exponer el sitio activo (Treonina 172) sobre la subunidad alfa y la subunidad beta actúa como una proteína andamio entre las subunidades alfa y gamma y de esta manera AMPK se activa (Cai *et al.*, 2012). AMPK también es activado por los niveles de glucosa intracelulares, cuando la glucosa es suficiente, AMPK se inactiva y de esta manera mTOR es activado lo que produce la inhibición de la autofagia (Figura 1-5) (Kim *et al.*, 2011).

La activación de AMPK puede inhibir la actividad de la vía de señalización de mTOR, y de esta manera promover la autofagia al activar a la proteína ULK-1 (Figura 1-5) (García *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Salminen y Kaarniranta 2012;

Roberts *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2013) y la degradación lisosomal. Estudios dan evidencia que AMPK es un factor neuroprotector contra el estrés metabólico (Cai *et al.*, 2012).

La activación de AMPK promueve la señalización para la toma de glucosa y glicolisis potenciando la producción de energía, siendo uno de los mayores reguladores de estos procesos (Lum *et al.*, 2005). La disfunción de la señalización de AMPK es asociada con varias enfermedades como diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares. Se ha observado que pacientes con la enfermedad de Alzheimer son resistentes a la insulina y la toma de glucosa es disminuida, lo cual se ha relacionado con una disminución en la proteína AMPK. La activación de AMPK en un contexto patológico podría reprimir la patogenicidad de enfermedades como Alzheimer como se ha visto en ratones transgénicos, cultivos *in vitro* y pacientes con EA moderada (Salminen *et al.*, 2011 y Caberlotto *et al.*, 2013).

Cerebros con EA muestran un decrecimiento en la actividad de AMPK, lo cual indica decrecimiento en la biogénesis y función mitocondrial. También se ha encontrado que AMPK está implicado en la patogenicidad de Alzheimer al regular la generación de la proteína β -amiloide y la fosforilación de la proteína Tau. Debido a la disminución de AMPK en tejidos de pacientes con EA se han hecho estrategias para activar esta proteína y de esta manera promover la inhibición de mTOR, así facilitar la autofagia y promover la degradación lisosomal de β -amiloide (Vingtdeux *et al.*, 2011).

La enfermedad de Alzheimer es asociada con anormalidades en el metabolismo energético como disfunción mitocondrial, disminución de la toma de glucosa y defectos en el metabolismo del colesterol y en la homeostasis del

Ca²⁺ posiblemente estas alteraciones pueden ser relacionadas con defectos en la señalización de AMPK (Salminen *et al.*, 2011)

Hexoquinasa

Hexoquinasa cataliza el primer paso de la glicolisis fosforilando la glucosa y convirtiéndola en glucosa-6-fosfato. El mecanismo que utiliza la célula es mediante la proteína Akt la cual fosforila a Hexoquinasa I, lo que promueve la translocación de HK1 a la membrana externa mitocondrial donde altas concentraciones de ATP favorecen la fosforilación enzimática de la glucosa (Plas y Thompson, 2005). Estudios dan evidencia de que la sobreexpresión de HKI potencia la autofagia inducida por disminución de glucosa. Esto lo logra mediante la unión al complejo 1 de mTOR (TORC1) (Roberts *et al.*, 2014) .

1.3 Autofagia

Autofagia o auto-digestión celular es una vía en la cual ocurre la degradación de proteínas y organelos. Permite el recambio de organelos y es un proceso protector para la célula pero también puede ocasionar la muerte celular (Mizushima *et al.*, 2008; Krüger *et al.*, 2011).

La función pro sobrevivencia de la autofagia ha sido demostrada en varias células y organismos en diferentes contextos, durante la privación de factores de crecimiento o nutrientes, estrés del retículo, hipoxia y en enfermedades caracterizadas por la acumulación de agregados de proteínas (Mizushima *et al.*, 2008; Eisenberg-Lerner *et al.*, 2009). Esto forma un agregado el cual es degradado para generar aa libres y ácidos grasos. Los aa liberados de la degradación de la autofagia pueden ser procesados y junto con los ácidos grasos son usados por el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) para mantener la producción de ATP (Levine y Kroemer, 2008; Funderburk *et al.*, 2010).

Se han descrito tres clases de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (Funderburk *et al.*, 2010). La autofagia se caracteriza por el re arreglo de membranas sub-celulares, las cuales son parte del citoplasma o provenientes de las cisternas del aparato de Golgi y se denominan fagoforos (Mazushima, 2007; Longatti y Tooze, 2009), estas recubren a los organelos que presenten alguna falla, agregados proteicos o proteínas disfuncionales formando una estructura denominada autofagosoma, el cual es posteriormente transportado a los lisosomas para que se de la proteólisis de los materiales “secuestrados”(Kim y Lee., 2014).

La autofagia puede ser constitutiva o adaptativa, para el primer caso su principal función es la remoción de organelos dañados o senescentes y para mantener el balance de energía basal, mientras que la autofagia adaptativa es caracterizada

por la movilización de nutrientes intracelulares para de esta manera obtener los requerimientos energéticos en situaciones de deficiencia de nutrientes. La autofagia es esencialmente un proceso metabólico que puede controlar la homeostasis energética de una célula y de un organismo (Kim y Lee., 2014).

Mecanismo molecular de la autofagia

El proceso de autofagia es altamente controlado desde su iniciación hasta su terminación por medio de la actividad coordinada de diversos componentes regulatorios. Los estudios evidencia que hay más de 30 proteínas relacionadas con la autofagia (ATG). La autofagia presenta pasos claves altamente conservados incluyendo: iniciación, nucleación vesicular, elongación vesicular, fusión y degradación (Kim y Lee., 2014).

Iniciación de la autofagia

El inicio de la autofagia es dado por las proteínas *serine-threonine protein kinase* ULK1. Al darse la inducción de la autofagia, el complejo de ULK1 que esta formado por ULK1, ATG13, ATG101 y FIP200 se disocia del complejo de mTORC1 y ULK1 fosforila a ATG13 y a FIP200 para que se de el inicio de la autofagia. (Kim y Lee., 2014).

Seguido a esto, se da el proceso de nucleación, en donde el complejo Beclin 1 – Vps34 (Beclin-1, Vps34, Vps15 y ATG14L) participa. ULK1 recluta al complejo de Beclin1 – Vps34 y esto permite que se de el sitio de formación del autofagosoma por medio de la fosforilación de la proteína Ambra1. Ambra1 interactúa con TRAF6 actuando esta ultima como una Ubiquitina – ligasa E3 para unirse a ULK1. El complejo activado de ULK1 aumenta la actividad de ATG14 que se encuentra en el complejo Beclin1-Vps34, por medio de la fosforilación directa sobre Beclin1. Akt y EGFR también pueden modular la autofagia a través de fosforiación directa sobre Beclin 1 independiente de mTORC1. Luego la fosfatidilinositol-3-fosfato

producida por Vps34 recluta a la proteína efectora DFCP1 que promueve la nucleación vesicular de doble membrana. (García *et al.*, 2010, Kim y Lee., 2014).

Elongación vesicular

Es mediada por las proteínas ATG por medio de dos sistemas: ATG12 es conjugado con ATG5 por medio de una reacción ubiquitina que requiere de ATG7 y ATG10. ATG12 y ATG5 interactúan covalentemente con ATG16 para formar un gran complejo. Por otro lado, LC3 es clivado en su c-terminal por la proteasa ATG4 y genera LC3I, el cual es conjugado con fosfatidil-etanolamina (PE) en una reacción de ubiquitinación que requiere de ATG7 y 3. Esta forma lipídada de LC3 es denominada LC3II y es unida a la membrana del autofagosoma (Kim y Lee., 2014).

Fusión y degradación

LC3 recluta a la proteína adaptadora p62/SQSTM que funcionan como puente entre lo que va a hacer degradado y el autofagosoma. Autofagosomas maduros se fusionan con lisosomas y forman los auto-lisosomas. (Kim y Lee., 2014).

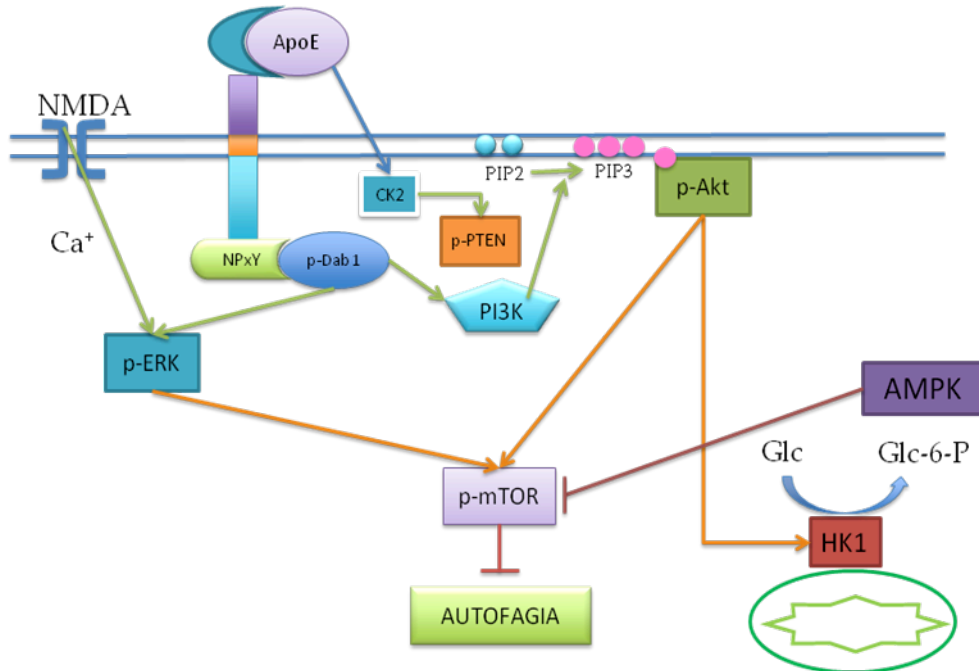
La disfunción de la autofagia se ha relacionado con desordenes neurodegenerativos (Komatsu *et al.*, 2006) que son asociados a la acumulación de proteínas mal plegadas las cuales forman agregados proteicos. La EA es el desorden neurodegenerativo mas común y se caracteriza por dos clases de agregados, ovillos de Tau y placas de β -amiloide (Funderburk *et al.*, 2010).

Pickford y colaboradores (2008) muestran un decrecimiento en la proteína Beclin 1 en regiones del cerebro afectadas por la EA en una fase temprana. Delección de la proteína Beclin 1 en ratones da como consecuencia el decrecimiento de la autofagia en neuronas y da como resultado la neurodegeneración. Según Krüger y colaboradores (2011) la activación de la autofagia suprime la agregación de Tau y

elimina la citotoxicidad. Varios estudios han sugerido que la autofagia tiene un rol neuroprotector (Funderburk *et al.*, 2010; Mizushima *et al.*, 2008).

La macroautofagia es crucial para proteger a las células del sistema nervioso del daño por la acumulación de estrés oxidativo generado por la síntesis de proteínas defectuosas y otros daños genéticos y ambientales con el paso de los años (Nixon R. 2006). Se ha observado que la pérdida de la autofagia en el SNC de ratones causa neurodegeneración (Komatsu *et al.*, 2006 Hara *et al.*, 2006)

Figura 1-5. Vías activadas por ApoE.



Esquema que resume algunas de las vías que activa ApoE como lo son ERK y PI3K-Akt. Las líneas verdes indican activación de la proteína. Las líneas naranjas, activación de la proteína y que su relación con ApoE aún no se ha descrito en literatura. Las líneas rojas representan inhibición de la vía. Y la línea azul muestra la actividad quinasa de HK1 sobre la glucosa.

1.4 Ceramida

Ceramida es un segundo mensajero, que está implicado en la regulación del crecimiento, proliferación, senescencia, y muerte celular (Villena *et al.*, 2008). Hay dos vías principales por las que se puede generar ceramida: Una de ellas es la síntesis de *novo* y la segunda es mediante la degradación de la esfingomielina de la membrana por las esfingomielinasas. La esfingomielina es clivada por la enzima esfingomielinasa y genera mediadores lipídicos entre los que se encuentran la ceramida. Esta enzima es activada por citoquinas inflamatorias y estrés oxidativo (Cutler *et al.*, 2004).

Este segundo mensajero modula la actividad de un gran número de proteínas de señalización incluyendo fosfatasa, quinasas como Akt, fosfolipasas y proteasas y promueve diferentes formas de muerte celular como apoptosis, necrosis y autofagia (Cutler *et al.*, 2004).

Ceramida induce muerte celular necrótica en linfocitos por la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y disminución del ATP intracelular (Villena *et al.*, 2008). Modula de manera directa la función mitocondrial, al inhibir el complejo III de la cadena respiratoria, donde se encuentra el *pool* de ubiquinonas, generando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) (Oh *et al.*, 2006; Villena *et al.*, 2008).

Estudios realizados por Arboleda y colaboradores (2007) han mostrado que ceramida lleva a la muerte celular de la línea neuronal CAD, mediante la activación de caspasas y calpains. Ceramida ha sido implicada en la muerte patológica de neuronas en isquemia, Parkinson y Alzheimer (Cutler *et al.*, 2004 y Filippov *et al.*, 2012). También se ha asociado a incrementos en los niveles de estrés oxidativo asociado a la membrana. Estudios han mostrado evidencia de largas cadenas de ceramida y colesterol libre en las células del cerebro durante el

envejecimiento normal del ratón, en pacientes con EA, y en neuronas expuestas a β -amiloide (Cutler *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2006). Otras enfermedades en las que el metabolismo de ceramida esta alterado es en cáncer, diabetes tipo II y en varias enfermedades neurodegenerativas como se mencionó con anterioridad (Guenther *et al.*, 2008).

1.5 Línea celular CAD

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó como modelo celular una línea murina de neuronas catecolaminérgicas de origen mesencefálico, llamadas *CATH.a*. La línea celular *CATH.a*. diferenciada (CAD) fue donada por la Dra. Donna Chikaraishi del departamento de Neurobiología del *Duke University Medical Center*, Durham, *North Carolina* al Dr. Gonzalo Arboleda, profesor asociado de la Universidad Nacional de Colombia y director de este proyecto.

La línea celular CAD es una variante de la línea celular *CNS-derived CATH.*, que fue establecida a partir de un tumor mesencefálico murino de un ratón transgénico que expresaba el antígeno SV40T bajo el control transcripcional del promotor tirosina hidroxilasa. Esta línea celular expresa la enzima tirosina hidroxilasa y presenta propiedades neuronales como neurofilamentos y la proteína sinaptofisina (Suri *et al.*, 1993). Las células *CATH.a* presentan canales voltaje-dependiente de potasio, sodio y calcio (Wang y Oxford *et al.*, 2000).

Estudios realizados en 1997, por el grupo de investigación de Qi y colaboradores, establecen una línea celular derivada de la línea *CATH.a*, a la que se le dio el nombre de *CATH.a* diferenciadas (*CATH.a-differentiated*) o CAD, por sus siglas en inglés. La diferenciación de esta línea se logró al cultivar las *CATH.a* en medio libre de Suero Fetal Bovino (SFB), lo cual era reversible al suplementarlas con SBF.

Las CAD detienen su ciclo celular y dan inicio a un cambio en su morfología similar al neuronal. El antígeno SV40 fue espontáneamente perdido. Estas células expresan proteínas neuronales específicas, como β -tubulina clase III, GAP-43, SNAP-25, entre otras; y actividad enzimática tirosina hidroxilasa, acumulación de L-DOPA. Además, presentan características bioquímicas y morfológicas de neuronas primarias (Qi *et al.*, 1997; Baraban *et al.*, 1995 y Lazaroff *et al.*, 1995).

La supervivencia de las células CAD está dada de manera autocrina por medio de la producción y secreción de neurotrofina (NT3), lo cual permite la activación de los receptores de membrana Tirosina Kinasa C (TrkC) (Horton *et al.*, 2001). Las características de esta línea celular la hacen un modelo celular apropiado para el estudio de enfermedades neurodegenerativas del SNC.

2. Capítulo 2

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de las isoformas de ApoE en la autofagia y sobrevivencia en las células CAD y bajo un contexto neurotóxico.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar en qué día de diferenciación de las células CAD se da la mayor expresión del receptor LDL-R.
- Analizar el efecto de las isoformas de ApoE sobre la sobrevivencia y metabolismo mitocondrial en células CAD.
- Evaluar la sobrevivencia e inducción de autofagia dada por las isoformas de ApoE en células CAD.
- Investigar el efecto de las isoformas de ApoE en la autofagia y viabilidad celular bajo un contexto neurotóxico.

3. Capítulo 3

3.1 Cultivo celular

Las Células CAD fueron cultivadas en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* DMEM/F12 suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SFB), penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL en platos de cultivo de 75 cm² a una densidad de 5×10^6 , en una incubadora con medio humidificado y a una concentración de CO² al 5% y temperatura de 37°C. Las células fueron sometidas a pases cada 3-4 días o cuando alcanzaban una confluencia entre el 70 y el 80% eran transferidas a un medio nuevo. Para inducir la diferenciación, las células CAD fueron sembradas a una densidad de 1.8×10^4 por pozo para placas de 6 pozos y 7×10^3 por pozo para placas de 96 pozos, en medio DMEM/F12 con 0,25% de SFB; suplementado con Selenita de Sodio 50 ng/mL y transferrina 1X durante 48 horas.

3.2 Conteo de células viables

Para mantener el cultivo en las condiciones ideales de confluencia y realizar la siembra con las densidades adecuadas para los experimentos, se realizó el siguiente procedimiento. Se utilizó el colorante azul Trypan el cual permite diferenciar las células viables de las células muertas, ya que en las células viables presentan una membrana intacta, el colorante no puede entrar y por lo tanto las células no son teñidas, mientras que en las células muertas el azul Trypan es incorporado y las células son teñidas.

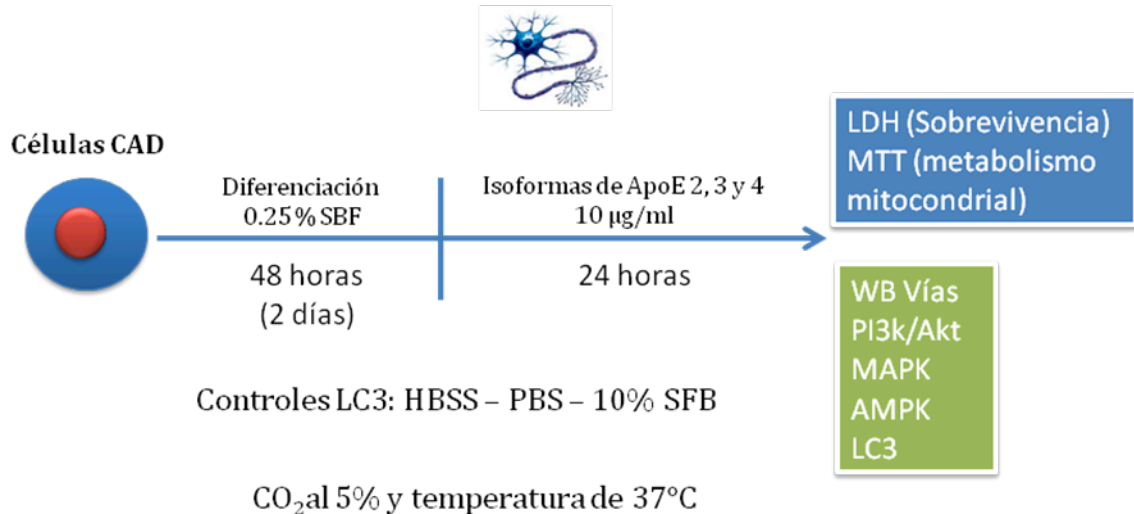
Las células fueron desprendidas y resuspendidas usando Tripsina al 0.25% p/v en una solución de PBS y EDTA 0.1% p/v, se tomó la muestra de la suspensión y se diluyó en una solución de azul Trypan al 0.4% en una porción 1:4. De esta solución se colocaron 10 μL en un hemocitometro, se realizó el conteo de los cuatro cuadrantes de las esquinas de ambos retículos. Para obtener el número de células vivas por mL se tuvo en cuenta el número de cuadrantes contados (8 cuadrantes cada uno con un volumen de $0,1 \text{ mm}^3$) y el factor de dilución que por lo general fue de 2, con estos datos se aplicaba la siguiente ecuación.

$$\text{células/ml} = \frac{\text{células vivas contadas}}{0,8 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ ml}} \times \text{Factor de dilución}$$

3.3 Tratamientos con las isoformas de ApoE

Las células CAD fueron cultivadas a una densidad de 1.8×10^4 por pozo en una placa de 6 pozos y 7×10^3 por pozo para placas de 96 pozos, por triplicado, en medio de cultivo de diferenciación (DMEM/F12 suplementado con 1% de suero fetal bovino, sodio selenita 50 ng/mL, transferrina 1X, sin antibiótico). Cada una de las isoformas de ApoE recombinante (*Cell Science, Canton, MA, USA*) fueron agregadas al medio a una concentración de $25 \mu\text{M}$ durante 24 horas. Terminados los tiempos de exposición a ApoE, se realizaron ensayos de viabilidad celular y expresión de proteínas por medio de la técnica de *Western blot*, descritas más adelante en este documento.

MODELO DE DIFERENCIACIÓN

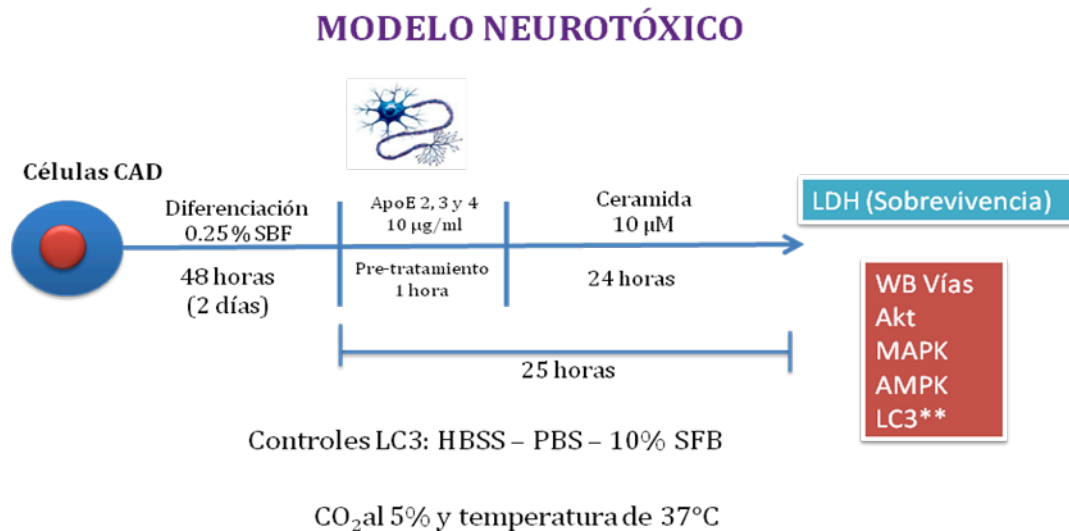


3.4 Tratamientos con la neurotóxina C2-ceramida

Las células CAD fueron cultivadas de la misma manera que para los tratamientos con ApoE. La neurotóxina C2-ceramida se utilizó a una concentración de 10 μM (LD50, establecida previamente por el Grupo de Muerte celular de la Universidad Nacional) y se hicieron experimentos a los siguientes tiempos: 4, 6 y 24 horas. Una vez cumplidos los tiempos se procedió a evaluar viabilidad celular y expresión de proteínas.

3.5 Tratamientos con las ApoE y C2-ceramida

Una vez las células diferenciadas en placas de 6 pozos se agregaron las isoformas de la ApoE a una concentración de $10\mu\text{M}$ por 1 hora. Pasado este tiempo se adicionó el neurotóxico ceramida a una concentración de $10\mu\text{M}$ y se dejó en incubación por 24 horas. Para los experimentos de autofagia, 4 horas antes de terminar las 24h de incubación se adiciono al medio de cultivo Pepstatin y E64 a una concentración de $10\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada una. Al finalizar las horas de tratamiento se hizo la extracción de proteínas para analizar la expresión de las mismas y se recolecto el medio de cultivo para el ensayo de viabilidad LDH. Se realizó este mismo procedimiento para el experimento de inmunofluorescencia descrito mas adelante.



3.6 Extracción y cuantificación de la concentración de proteínas

Las células cultivadas en placas de 6 pozos de los tratamientos previamente descritos, se lisan en frío usando el buffer de lisis RIPA suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini, EDTA Free*. Roche) y fosfatasa (*PhosphoStop*. Roche) para el caso de los experimentos de autofagia debe ser adicionado 1% de Triton X100. Los lisados se pasaron a tubos *ependorf* y se centrifugaron a 7200g por 10min a 4°C y el sobrenadante se almacenó a -20°C.

Para determinar la concentración de proteína en cada muestra se usó Ácido Bicinónico (BCA *Protein Assay*, Pierce) que tiene la ventaja de ser método muy sensible, con pocas interferencias debido a su compatibilidad con detergentes iónicos y no iónicos. Se realizó una curva de calibración con 5 patrones de trabajo desde 0 a 25 mg de Albumina de suero bovino por sus siglas en inglés BSA (*Bovine Serum Albumin*), que abarca el rango de linealidad del ensayo. Se realizó una mezcla de reactivos del kit y muestra 50:1, se incubó a 37 °C durante 30 minutos, y la absorbancia se midió mediante espectrofotometría en placas de 96 pozos a una longitud de onda 540 nm.

3.7 Electroforesis en *SDS-PAGE*

Se utilizó una cámara de electroforesis *BIORAD mini PROTEAN III* para la separación de proteínas de acuerdo a su tamaño en geles SDS-poliacrilamida en gradiente de 6 a 20%, 12% o para el caso de LC3 ver Anexo B. El gel se colocó entre dos placas de vidrio separadas por espaciadores de 0.75mm en un soporte vertical. Una vez polimerizado el gel, este se colocó en tanques de electroforesis y se cubrió con buffer de corrido. Las muestras de proteína (20 µg en total) diluidas en buffer Laemmli y el marcador de peso molecular se colocaron en los pozos y se llevó a cabo la electroforesis a 100V.

3.8 Detección de proteínas por *Western blot*

Luego de la electroforesis, las proteínas se transfieren a membranas de nitrocelulosa usando una cámara de transferencia *BIORAD Mini Trans-Blot*. El gel se cubrió con la membrana de nitrocelulosa que se colocó entre papel *Whatmann* y dos esponjas de filtración. El ensamblaje se colocó en un *cassette* de soporte, se insertó en el tanque lleno de buffer de transferencia, con la membrana de nitrocelulosa mirando hacia el ánodo. La transferencia se lleva a cabo durante 1h a 100V.

Una vez terminada la transferencia, la membrana se removió del ensamblaje y se incubó en buffer de bloqueo (5% leche descremada en TBS con 0.1% (v/v) Tween-20 (TBS-T) por 1h. La membrana de nitrocelulosa se incubó con 3ml de la solución apropiada de anticuerpos primarios en buffer de bloqueo durante toda la noche a 4°C, se lavó 3 veces en TBS-T (5min/lavado). El respectivo anticuerpo (Tabla 1) unido se visualizó mediante la incubación de la membrana con el anticuerpo secundario específico por 1h a temperatura ambiente y se lavó luego 3 veces con TBS-T (10min/lavado). El anticuerpo secundario (Tabla 1) unido se detectó usando quimioluminiscencia (ECL, *Thermo Scientific*). La membrana se incubó con una mezcla 1:1 de los reactivos A y B de ECL por 1min, y se leen por medio del fotodocumentador *BIORAD ChemiDoc™*. La imagen de las bandas es analizada por medio del software *Image-J* versión 1.44 y las gráficas y el análisis estadístico fue realizado por medio de *GraphPad Prism 5*.

Ver Anexo A, en donde se encuentra la descripción del procedimiento del *Western blot* para LC3.

Tabla:3-1. Anticuerpos utilizados para *Western blot*.

Proteína	Marca	Dilución	Anticuerpo 2º	Dilución	KDa
LDL	Dr. Joachim Herz	1:3000	<i>Anti-rabbit</i>	1:3000	110 - 150
Akt	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	<i>Anti-rabbit</i>	1:1000	60
mTOR	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	<i>Anti-rabbit</i>	1:1000	289
PTEN	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	<i>Anti-rabbit</i>	1:1000	54
GSK-3	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	<i>Anti-rabbit</i>	1:100	46
Hexoquinasa	<i>Abcam</i>	1:1000	<i>Anti-mouse</i>	1:2000	102
AMPK	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	<i>Anti-rabbit</i>	1:1000	62
p38	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	<i>Anti-rabbit</i>	1:1000	43
ERK	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	<i>Anti-rabbit</i>	1:1000	42 - 44
LC3-II	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	<i>Anti-rabbit</i>	1:1000	14 - 16
B-actina	Sigma	1:25000	-----	-----	42

Tabla que muestra la marca, dilución utilizada para cada anticuerpo primario y secundario y el valor de la masa molecular de la proteína en Kilo Daltons.

3.9 Ensayo de viabilidad celular (MTT y LDH)

La viabilidad de la células fue evaluada mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico). Las células CAD fueron sembradas a una densidad de 7000 células por pozo en un volumen de 200 μ L de medio de diferenciación en una placa de 96 pozos. Una vez cumplido el tiempo de incubación se removió 100 μ L de medio de cultivo de cada pozo, y se adicionó 20 μ L de la solución MTT (5 mg/ml), las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C y 5% CO₂. Una vez cumplido el período de incubación el medio fue removido completamente con micropipeta teniendo la precaución de no retirar los cristales de formazán formados gracias la metabolismo mitocondrial. Luego se adicionó 100 μ L del buffer de lisis MTT (20% w/v SDS, 50% v/v dimetilformamida en agua destilada, pH 4.7). Para disolver los cristales, se cubrió la placa con papel de aluminio y se incubó por 1 horas a 37° C. Se cuantificó la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 590 nm. El porcentaje de supervivencia celular se calcula como:

$$\% \text{ de supervivencia} = 100 \times \frac{X}{\text{control}}$$

Donde X es el promedio de la lectura del metabolismo de MTT en un grupo de tratamiento.

Ensayo LDH. Para este ensayo se utilizó el kit Cyto Tox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) cual permite cuantificar de manera relativa la cantidad de enzima lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo. Para el uso de este producto se siguieron las instrucciones emitidas por el fabricante. La lectura se realizó a 490nm.

3.10 Inmunofluorescencia para la proteína LC3

La evaluación de la autofagia se va a realizo mediante microscopía de fluorescencia. Para este fin se hará inmunomarcaje de la proteína LC3, la cual actúa citoplasmáticamente como un marcador de vesículas que hacen parte del sistema de autofagia y que serán objeto de digestión enzimática. Cuando la célula no está en proceso autofagico, la distribución de LC3 es difusa en el citoplasma. De manera contraria, cuando la célula entra en autofagia, la distribución de esta proteína cambia hace una localización preferencialmente perivesicular. Este cambio en la distribución permite determinar qué célula se encuentra en autofagia.

Las células fueron sembradas en placas de seis pozos conteniendo un cubreobjetos tratado con Poly-L-Lisina para mejorar la adherencia celular. Las células CAD se cultivaron en medio de diferenciación por 3 días y se hizo el procedimiento descrito en la sección 3.3. Se realizó fijación usando paraformaldehído al 4% en PBS a 37°C por 5 minutos. Se lavó dos veces con PBS, seguido se adiciono digitonina a una concentración de 50 µg/mL en PBS se dejo a una temperatura de 37°C durante 5 minutos.

Luego se agregó la solución *quenching* 50mM de NH₄CL en PBS a 37°C por 5 minutos (mins). Se lavó con TBS 2 veces por 3 minutos y se procedió a bloquear durante 30 minutos a 37°C usando BSA 2%, SBF 5%, 20mM de Tris-HCL(pH 7.5), 150mM de NaCl. Se hicieron tres lavados con TBS por 3 minutos. Posteriormente, los cubreobjetos fueron incubados con anticuerpos primarios dirigidos contra LC3 1:40. Los anticuerpos secundarios usados fueron AlexaFluor-568 (*Anti-goat*) 1:1000 por 60 minutos a 37°C. Se lavó cinco veces con TBS y se adiciono DAPI para el marcaje del núcleo. Se colocaron en portaobjetos conteniendo 25 µL de medio de montaje Vectashield® (Vector Labs). Las láminas fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia Olympus BX41 y analizadas con el *software Image J*.

3.11 Estadística

Para el estudio estadístico se utilizó el test de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, posterior a esto se realizó el test de comparación múltiple: Tukey-Kramer, para averiguar si existen diferencias significativas entre grupos y en cuál de los grupos esta la diferencia. Los valor-p obtenidos en el test de Tukey-Kramer son expresados en las gráficas de la siguiente manera:

* si valor-p es inferior a 0,05

** si valor-p es inferior a 0,01

*** si valor-p es inferior a 0,001

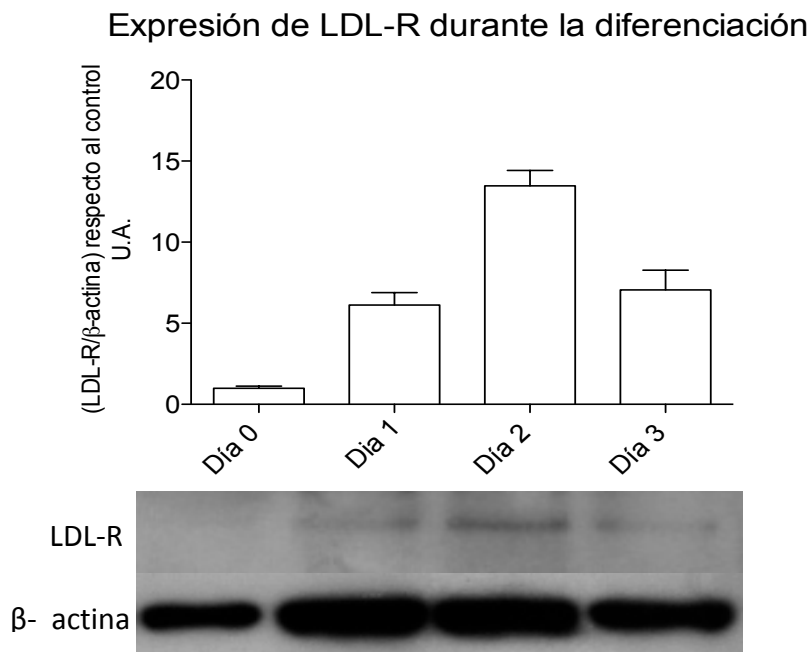
Los datos presentados son promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados con el software *GraphPad Prism* versión 5.0 (*Prism 5, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA*).

4. Capítulo 4

4.1 Objetivo 1

Determinar en qué día de diferenciación de las células CAD se da una mayor expresión del receptor LDL-R.

Figura 4-6: Nivel de expresión del receptor LDL-R en la línea celular CAD.



Las células fueron diferenciadas y posteriormente se realizó la extracción de proteínas en los días 1, 2 y 3 de diferenciación, para después medir la expresión del receptor LDL-R con la técnica de *Western blot*, detectado con anti-LDL-R.

Resultado

La mayor expresión del receptor LDL-R se da en el día 2 de diferenciación de las células CAD.

Discusión

La producción de la ApoE en el cerebro está dada principalmente por astrocitos y microglía (Holtzman *et al.*, 2012). Por lo anterior, este estudio utilizó un modelo en el cual, de manera exógena, la ApoE tuviera contacto con neuronas, simulando lo que ocurre en condiciones *in vivo*. Un rol muy importante del cual se encarga la ApoE es el de la señalización neuronal, que permite la activación de vías moleculares mediante la unión a receptores de la familia LDL-R (Zaiou *et al.*, 2000).

Estudios previos realizados en la línea celular CAD mostraron una mayor expresión del receptor LDLR hacia el término de la diferenciación. Por esta razón, se realizó el primer experimento con el que se buscó el día de diferenciación en el que se presentara la mayor expresión del receptor LDLR y, de esta manera, tomar ese día de diferenciación como punto de partida para agregar las ApoE.

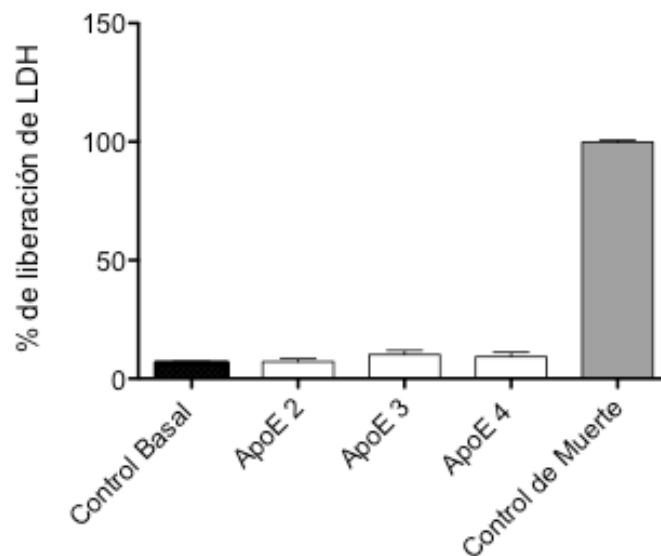
Los resultados muestran una mayor expresión del receptor LDLR en el día 2 de diferenciación de las células CAD y una posterior disminución en el día 3 (Figura 4-6). Esto podría indicar que en el día 2 la célula censa las condiciones del medio y desarrolla procesos de plasticidad sináptica (Beffert *et al.*, 2004), mientras que en el día 3, las células continúan con otros procesos de diferenciación partiendo de las conexiones establecidas previamente. Debido a que la mayor expresión de la proteína LDLR se dio en el día 2 de diferenciación, se tomó este tiempo para agregar la ApoE al medio de cultivo y proceder con los experimentos.

4.2 Objetivo 2

Analizar el efecto de las isoformas de ApoE sobre la sobrevivencia y metabolismo mitocondrial en células CAD.

Figura 4-7: Efecto de las isoformas de ApoE 2, 3 y 4 en la viabilidad de células CAD determinado por la liberación de LDH.

Efecto de las isoformas de ApoE en la Viabilidad Celular



Las células diferenciadas fueron sometidas a una concentración de 25 μ M de las isoformas de ApoE durante 24h. El eje 'Y' representa el porcentaje de liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) relativo al control de muerte (barra gris). La medición se realizó a una absorbancia de 490 nm. El eje 'X' indica los tratamientos con las isoformas de ApoE. Los valores representan el promedio +/- DE (desviación estándar) n=3. Resultados de 3 experimentos por separado.

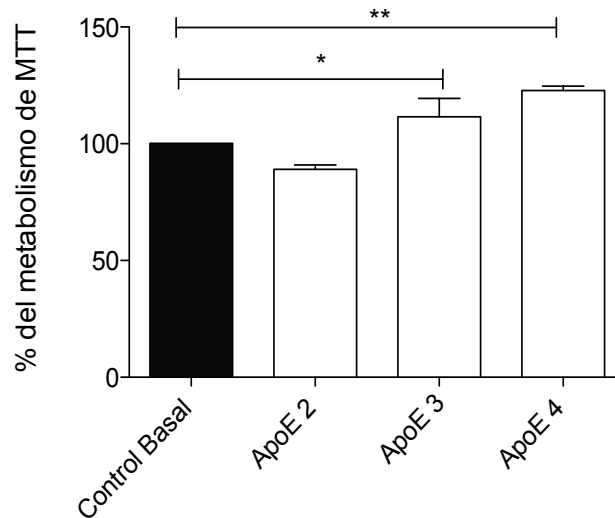
Resultado

Para evaluar la muerte celular de las células CAD expuestas a las diferentes isoformas de ApoE, se midió la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa por medio del ensayo de LDH. Los tratamientos con las isoformas de ApoE no presentan diferencias significativas con respecto al control basal en la liberación

del LDH. El control basal y los tratamientos con las ApoE presentan una baja liberación de la enzima lactato deshidrogenasa respecto al control de muerte. Los resultados muestran que los tratamientos con las isoformas de ApoE no causan la muerte celular durante ese tiempo y a esta concentración (Figura 4-7).

Figura 4-8. Efecto de las isoformas de ApoE 2, 3 y 4 en la viabilidad celular de células CAD, determinado por la actividad metabólica mitocondrial (MTT).

Efecto de las isoformas de ApoE en la Viabilidad Celular



Las células diferenciadas fueron sometidas a una concentración de 25 μ M (10 μ g/mL) de las isoformas de ApoE durante 24h. El eje 'Y' representa el porcentaje de actividad metabólica mitocondrial relativo al control. La medición se realizó a una absorbancia de 590 nm. El eje 'X' indica los tratamientos con las isoformas de ApoE y el control basal. Los valores representan el promedio \pm DE (desviación estándar), n=3. (* valor $p < 0,05$. ** valor $p < 0,01$).

Resultado

Se realizó un ensayo de MTT para determinar la actividad metabólica mitocondrial mediada por las isoformas de ApoE, específicamente del complejo II de la mitocondria para, de esta forma, tener una medida indirecta de la viabilidad celular. Los tratamientos con las ApoE 3 y 4 presentan un incremento significativo

en el metabolismo del MTT a diferencia del control basal y este resultado presenta mayores diferencias significativas en las células tratadas con ApoE 4.

Discusión

Por una parte, el ensayo de LDH es una medida de la viabilidad celular, pues cuantifica la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH). Cuando hay un daño en la membrana plasmática, la LDH sale de la célula al medio de cultivo y se cuantifica por medio de una reacción enzimática. Por lo tanto, el aumento de la reacción enzimática producida por la lactato deshidrogenasa es un indicador de muerte celular. Las células expuestas a las isoformas de ApoE y el control basal no presentan diferencias en la liberación de la LDH, lo que indica que las isoformas de ApoE no afectan la viabilidad celular a las 24h de tratamiento (Figura 4-7).

Por otra parte, el ensayo MTT, el cual mide el metabolismo mitocondrial y de manera indirecta mide la viabilidad celular, muestra que en el tratamiento de las ApoE 3 y 4 se da un aumento del metabolismo mitocondrial, lo cual difiere de lo encontrado con el experimento de LDH para el caso del tratamiento de la ApoE 4 (Figura 4-8). Esto puede deberse a que el ensayo de MTT es una medida indirecta de la viabilidad celular, puesto que mide la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (EC 1.3.5.1), que se encuentra en el complejo II mitocondrial. Por lo tanto, la disminución en su actividad puede deberse a un decrecimiento en el metabolismo mitocondrial, pero no asociarse con la viabilidad medida por el ensayo de LDH.

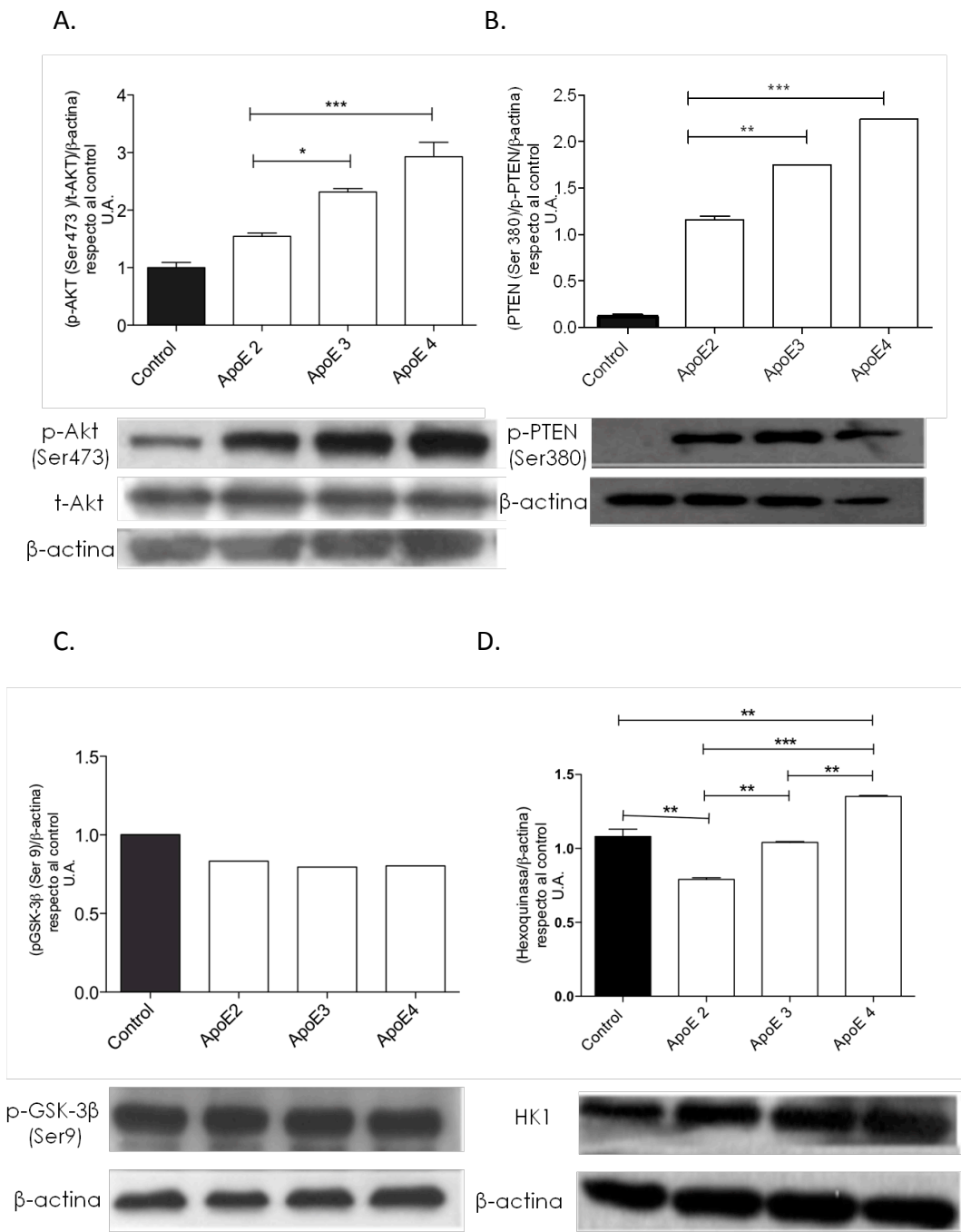
Lo anterior es lo que podría estar ocurriendo en los tratamientos con las isoformas de ApoE, en los cuales no se da una diferencia en la sobrevivencia celular medida por LDH, pero sí se da en los ensayos con MTT, siendo mayores los valores para las ApoE 3 y 4, y menores para la ApoE 2 y el control basal. Esto

indica que las ApoE 3 y 4 promueven un aumento en la actividad mitocondrial y que la ApoE 2 y el control basal no, lo cual no afecta la viabilidad celular.

4.3 Objetivo 3

Evaluar la sobrevivencia e inducción de autofagia dada por las isoformas de ApoE en células CAD.

Figura 4-9. Efecto de las isoformas de ApoE en la vía PI3K/Akt.

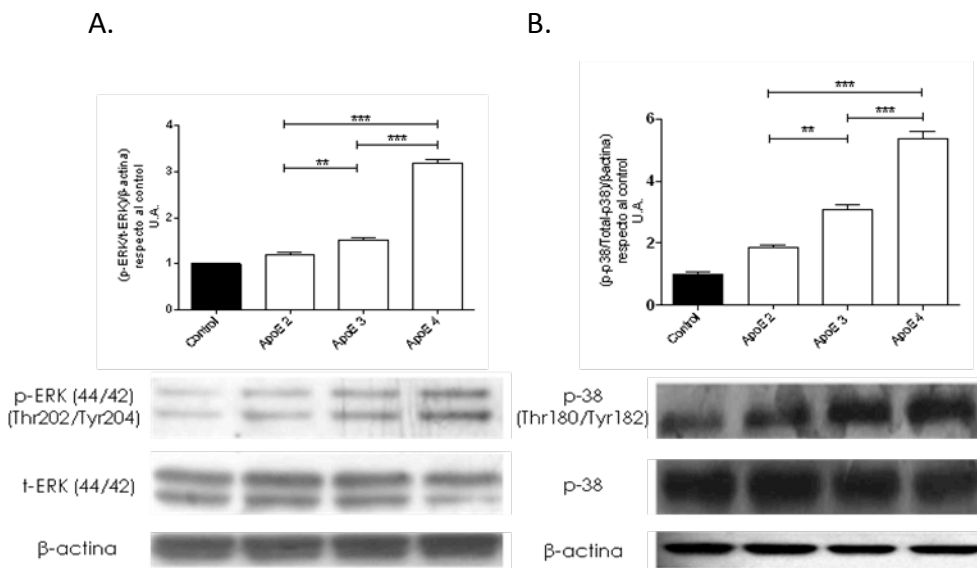


Análisis por densitometría de la relación A). (AKT-p (Ser 473)/AKT-t)/ β -actina y B). PTEN-p (Serina 380)/ β -actina C). GSK-3 β (Ser 9)/ β -actina D). Hexoquinasa1/ β -actina en células CAD, tratadas con las isoformas de ApoE a un concentración de 25mM (10ug/mL) durante 24h. Los datos se encuentran normalizados respecto al control (fosforilación basal de las células CAD diferenciadas).

Resultado

La expresión de las proteínas Akt-p y PTEN-p se presenta de la siguiente manera: ApoE4 > ApoE3 > ApoE2, siendo estas fosforilaciones mayores que las del control. Los tratamientos con las isoformas de ApoE no presentaron diferencias en la fosforilación de la proteína GSK-3 β en la serina 9. Al comparar estos resultados con el control basal, se observó que los tratamientos estaban por debajo de este. La fosforilación de la proteína hexoquinasa presenta una respuesta diferencial a las isoformas de ApoE. Las isoformas ApoE 2 y 3 presentan un nivel menor al control, mientras que el tratamiento con la isoforma ApoE4 muestra un aumento significativo con respecto al control (Figura 4-9)

Figura 4-10. Efecto de las isoformas de ApoE sobre la vía de las MAPKs ERK (sobrevivencia) y p38 (estrés).

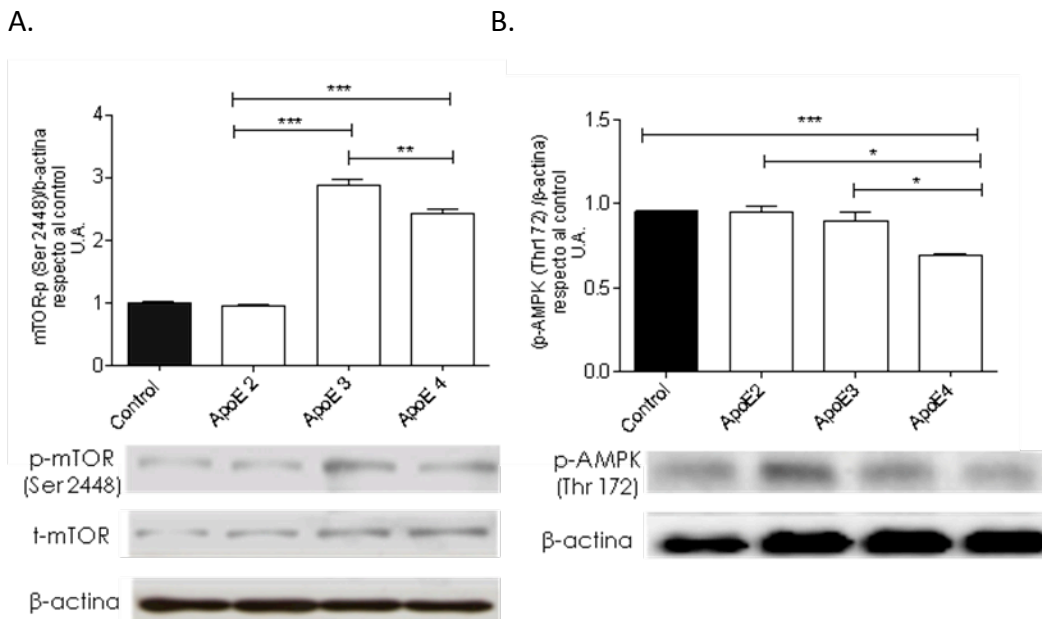


Análisis por densitometría de la relación A) p-ERK (Thr202/Tyr204)/t-ERK y B) p-p38 (Thr180/Tyr182)/t-p38 en células CAD tratadas con las isoformas de ApoE durante 24h, los datos se encuentran normalizados respecto al control (fosforilación basal de las células CAD diferenciadas). Western blot. n=3.

Resultado

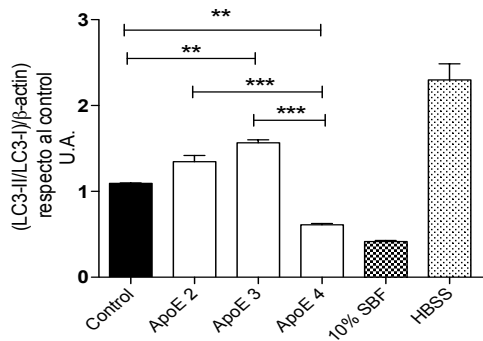
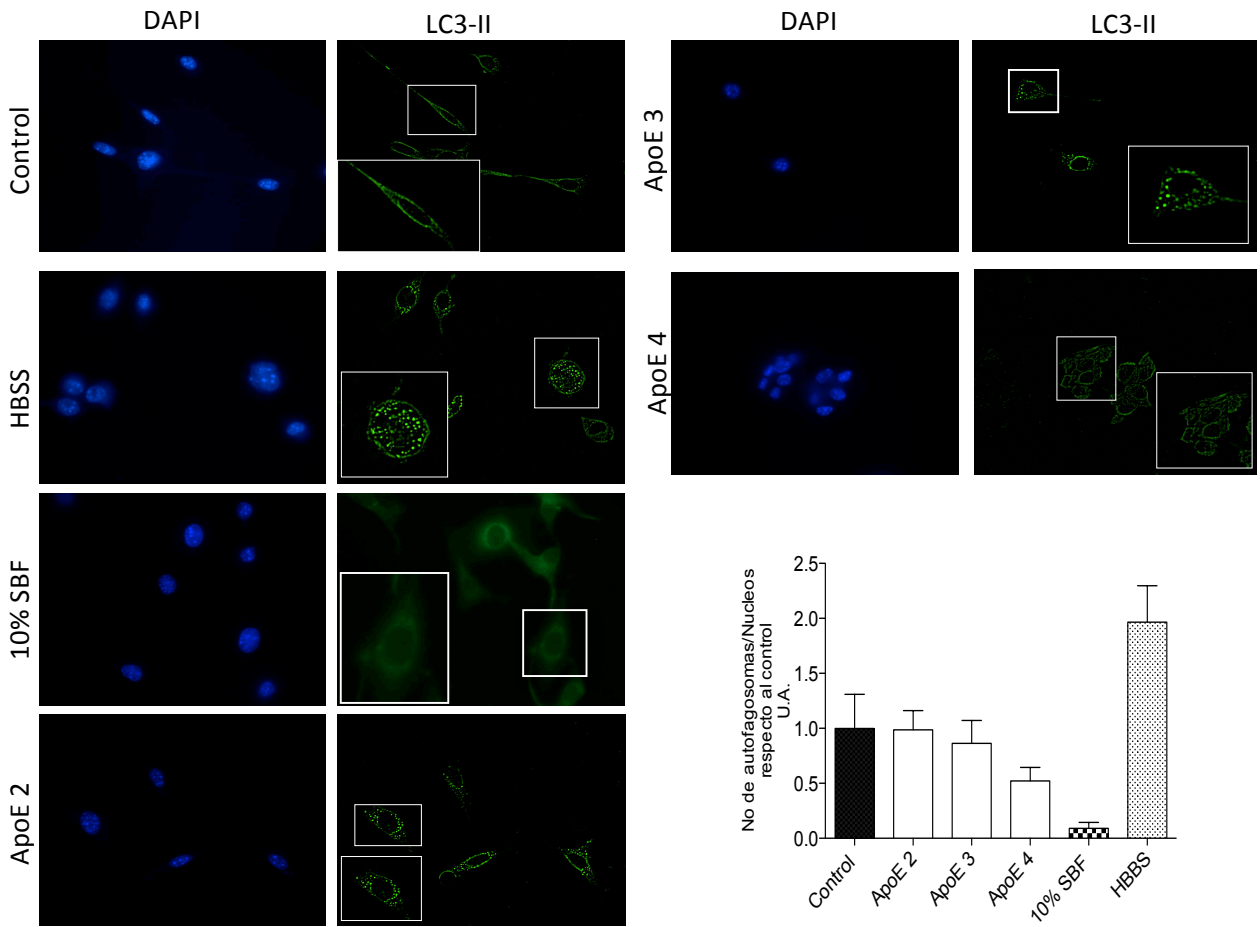
La presencia de la proteína fosforilada de ERK1/2 se encuentra en mayor medida en el tratamiento con ApoE4, seguido de ApoE3. El menor valor se encuentra en el tratamiento con ApoE2. De la misma manera se comporta la fosforilación de la proteína p38 (Figura 4-10).

Figura 4-11. Efecto de ApoE 2, 3 y 4 sobre las proteínas reguladoras de la autofagia mTOR y AMPK



Células CAD diferenciadas fueron tratadas con 25 μ M de ApoE 2, 3 y 4 durante 24h. Se hizo un análisis por densitometría de la relación de la proteína fosforilada sobre el control de carga (β -actina) en células CAD tratadas con las isoformas de ApoE. A. Se observan los resultados obtenidos para la proteína mTOR fosforilada. B. Resultados de los niveles de la presencia de la proteína AMPK fosforilada. Los datos se encuentran normalizados respecto al control (fosforilación basal de las células CAD diferenciadas).

4-12. Efecto de ApoE 2, 3 y 4 sobre la autofagia-LC3.



Las células CAD diferenciadas fueron tratadas con 25 μ M de ApoE 2, 3 y 4 durante 24h. Los datos para autofagia son expresados por medio de densitometría, midiendo el recambio de la proteína LC3II/LC3I y normalizado sobre β -actina. El control positivo de autofagia se realizó incubando las células con medio HBSS. Para hacer el control negativo de autofagia, las células se incubaron en medio DMEM-12 con 10% SBF durante 24h. Pasado el tiempo de incubación con los diferentes tratamientos y controles, se procedió a extraer las proteínas y realizar el *Western-blot*. Para la inmunofluorescencia se utilizó el anticuerpo contra LC3 (verde), y para la marcación del núcleo se utilizó DAPI (azul), de esta manera se realizó la cuantificación del número de autofagosomas por núcleo (Anexo C).

Resultado

mTOR presentó diferencias entre los tratamientos con las isoformas de ApoE. La fosforilación de mTOR disminuye con la ApoE 2 al compararlo con el control, a diferencia de ApoE 3 y ApoE 4, donde se observa un aumento en la fosforilación de esta proteína (Figura 4-11).

La presencia de la proteína AMPK fosforilada en los tratamientos con las isoformas de ApoE 2 y 3 es similar al control. En el tratamiento con ApoE 4, se da una disminución en la presencia de la fosforilación para esta proteína (Figura 4-11).

Los tratamientos con las isoformas de ApoE muestran una diferencia con respecto al radio de expresión de las proteínas LC3II/LC3I. La ApoE2 no presenta diferencia con el control, mientras que la ApoE3 aumenta este radio significativamente y la ApoE4 lo disminuye (Figura 4-12).

Discusión

Los resultados obtenidos de los ensayos de sobrevivencia permiten el planteamiento de varias preguntas. Una de ellas es: En los tratamientos con las isoformas de ApoE, ¿cuáles podrían ser las vías moleculares por las cuales se está dando una respuesta diferencial en el metabolismo mitocondrial? Para comenzar

a responder esta pregunta, se optó por estudiar la vía de la autofagia, que tiene un papel muy importante en las enfermedades neurodegenerativas y presenta un vínculo importante con los eventos mitocondriales. Una de las vías principales por las cuales se regula la autofagia es PI3K/AKT, de la cual se escogieron diferentes proteínas para así obtener una visión más clara de lo que podría estar sucediendo en los tratamientos con las isoformas. Esto permite tener un panorama general de sobrevivencia, metabolismo y estrés celular hasta llegar a la autofagia. En este experimento se establece una relación importante entre las isoformas de ApoE y su efecto sobre la autofagia, la cual no está establecida aún en la literatura.

Como punto de partida se analizó la proteína PTEN, la cual es un regulador negativo de Akt. Estudios previos muestran que cuando PTEN está fosforilada en la serina 380 del dominio C-terminal ocurre un cambio conformacional, que hace que la proteína no sea degradada vía proteosoma y disminuya su actividad fosfatasa. Al ocurrir este cambio conformacional, las proteínas blanco que se unen a PTEN no lo pueden hacer, por lo tanto, PTEN no puede actuar desfosforilándolas (Vazquez *et al.*, 2001; Rahdar *et al.*, 2009; Benesh *et al.*, 2013 y Correia *et al.*, 2014).

Los resultados con las isoformas de ApoE sobre las células CAD diferenciadas muestran la regulación entre PTEN y Akt (Figura 4-9. B). El comportamiento que se da en la presencia de Akt y PTEN fosforilado es directamente proporcional (Figura 4-9. A y B), lo cual sugiere que las isoformas de ApoE de manera diferencial están regulando la vía Akt por medio de la proteína PTEN.

Un posible regulador de PTEN es la proteína CK2, la cual fosforila a PTEN en el dominio c-terminal (Torres y Pulido 2001). Investigaciones realizadas por Raftery y colaboradores (2005) muestran una asociación entre la proteína ApoE y CK2, en donde se plantea una posible activación de CK2 por ApoE. Esto se asocia con un

aumento de Tau fosforilado, lo que lleva a plantear una relación de estas proteínas con enfermedades como el Alzheimer. Esta regulación podría estar ocurriendo en los experimentos del presente trabajo, en donde el tratamiento con la ApoE 4 muestra la mayor presencia de la proteína PTEN fosforilada y de Akt fosforilado (Figura 4-9. A. B).

Los resultados del tratamiento con ApoE 4 muestran un incremento en la activación de la proteína Akt visto por el aumento de la fosforilación de Akt en la serina 473. Este resultado también ha sido encontrado en cerebros *postmortem* con EA en una fase temprana (Griffinet *et al.*, 2005), al igual que en el estudio realizado por Perluigi y colaboradores (2014) y por Annika y colaboradores (2014). Ese resultado es respaldado por la presencia de la proteína PTEN fosforilada en la serina 380 (Griffinet *et al.*, 2005), al igual que en nuestro estudio.

El incremento observado en la proteína Akt por los tratamientos con las isoformas de la ApoE fue reportado por Hoey colaboradores en el año 2005. El aumento que se da en los tratamientos con ApoE 3 y 4 puede deberse a la activación de esta vía por medio de los receptores de membrana de la familia LDLR, los cuales tienen mayor afinidad para las isoformas 3 y 4 (Figura 4-9. A.) (Yamamoto *et al.*, 2008).

La proteína Akt ha sido ampliamente estudiada y se ha evidenciado su relación con la sobrevivencia celular. Sin embargo, en algunas enfermedades se ha mostrado que la desregulación de la Akt, reflejada en una sobre-activación de esta proteína, puede ocasionar consecuencias negativas que pueden llevar a la neurodegeneración (Bhaskar *et al.*, 2009; Hosoi *et al.*, 2007; Ksiezak-Reding *et al.*, 2003), al incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido al consumo de oxígeno y a la inhibición del factor de transcripción FoxO el cual permite la expresión de enzimas antioxidantes (Dolado y Nebreda, 2008; Nogueira *et al.*, 2008).

Seguido a esto, se procedió al análisis de proteínas corriente abajo de Akt como la proteína GSK-3 β y Hexoquinasa 1. La proteína GSK-3 β presentó una disminución en la presencia de su forma fosforilada en la serina 9 para los tratamientos con ApoE, en comparación con el control (Figura 4-10 .C). Sin embargo, no presentó diferencias entre los tratamientos con las isoformas de la Apolipoproteína (Figura 4-9). Esto sugiere que no se está dando una regulación de la fosforilación en GSK3 β por Akt en el tiempo que dura el tratamiento.

Las isoformas de ApoE de manera directa o indirecta no permiten la fosforilación de GSK-3 β en la serina 9, lo que indicaría que hay una desregulación de las vías PI3K y MAPK, ya que Akt y Erk inhiben a GSK-3 β por medio de la fosforilación en el residuo de serina 9, pero esta regulación no se ve en estos tratamientos. Al no estar fosforilada GSK-3 β en la serina 9 esta proteína está activa, ya que la fosforilación en este residuo produce la inactivación de la proteína GSK-3 β . La activación de la proteína GSK-3 β se ha visto que puede inducir una serie de cambios patológicos, los cuales se han asociado principalmente como marcadores para la enfermedad de Alzheimer y *Type 2 Diabetes Mellitus* (T2DM) (Gao *et al.*, 2011).

En cuanto a la proteína Hexoquinasa 1 (HK1), se observa que hay diferencias significativas entre los tratamientos. La presencia de la proteína de las células tratadas con las isoformas 2 y 3 se encuentra por debajo del control, mientras que en el tratamiento con ApoE 4 se observa un incremento con respecto al control y a los tratamientos con las isoformas 2 y 3 (Figura 4-9. D). El aumento de la presencia de hexoquinasa 1 para el tratamiento de ApoE 4, sugiere una regulación por la vía Akt. HK1 es translocada del citoplasma a la mitocondria, en donde utiliza el ATP intra-mitocondrial para la fosforilación de glucosa. Lo anterior podría asociarse con la alta actividad del metabolismo mitocondrial para este tratamiento aunque la limitante de este resultado es que no se puede saber si

HK1 esta activa y ubicada en la mitocondria (Robey y Hay, 2005; Regenold *et al.*, 2012 y Wang *et al.*, 2008).

Las proteínas MAPK fueron cuantificadas para obtener una vista general de la respuesta de la célula a las isoformas de ApoE. En el tratamiento con la isoforma 4, se observa una sobre-activación de ERK seguido de ApoE 3 (Figura 4-10). Una posible explicación a este resultado es la mayor afinidad de los receptores con la ApoE 4 y la ApoE 3, a diferencia de la ApoE2, en la que disminuye la unión (Yamamoto *et al.*, 2008 Hoe *et al.*, 2005). Estos resultados son acordes con los experimentos de Korwek y colaboradores (2009).

Estudios realizados con muestras de tejidos *post-mortem* de pacientes con EA evidencian el incremento de ERK fosforilado, en comparación con las muestras control. Las muestras de los pacientes EA presentan daño oxidativo (ROS). Los resultados muestran que ERK fosforilado es una característica prominente de las muestras de pacientes con EA en áreas que han sido afectadas por ROS (Perry *et al.*, 1999). Estudios han mostrado una activación de la vía de ERK en respuesta a ROS (Wu *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2011; Keshari *et al.*, 2013), lo cual podría explicar lo observado en los tratamientos con la isoforma de ApoE 4, siendo esta isoforma la asociada a neurodegeneración.

La proteína p38 es otra vía importante en la respuesta al estrés celular, que se activa principalmente por estrés oxidativo, citoquinas pro-inflamatorias, choque térmico, entre otros. Los resultados de este trabajo muestran un aumento de p38 fosforilado para todos los tratamientos comparados con el control y una respuesta isoforma dependiente entre los tratamientos, siendo mayor para ApoE 4, seguido de ApoE 3 y finalmente ApoE2, este último tratamiento no presenta diferencias significativas con el control a diferencia de los otros tratamientos. Estos resultados sugieren que en los tratamientos con las isoformas de ApoE 2 y 3

se esta dando una señal en respuesta a estrés celular, siendo esta señal aumentada en el tratamiento de ApoE 4.

En investigaciones realizadas con tejido *post-mortem* de pacientes con EA muestran un aumento notable en la presencia de p38, y p38 fosforilado, que se encuentra ubicada en ovillos neurofibrilares, placas seniles, entre otros. También se ha visto que colocaliza con la proteína Tau(Zhu *et al.*, 2000).Esto podría relacionarse con lo visto en el tratamiento con ApoE 4, en donde se da un aumento de ERK y p38, proteínas que se han visto aumentadas en EA y que posiblemente están siendo activadas en respuesta al estrés celular.

La mTOR es otra proteína corriente abajo de Akt, que cumple una función importante en la regulación de la autofagia. Estudios han mostrado la implicación de esta proteína en la enfermedad de Alzheimer; en donde se observa una sobre-activación de mTOR (Wang *et al.*, 2014). Los resultados de este trabajo muestran un aumento en la presencia de mTOR fosforilado en la serina 2448 para los tratamientos con ApoE 3 y 4, en comparación con el tratamiento de ApoE 2 y el control (Figura 4-11. A). Esto indica que se está dando una regulación de mTOR por la vía Akt y que posiblemente se encuentre una respuesta diferencial en la autofagia para cada uno de los tratamientos.

La proteína AMPK, al igual que mTOR es una proteína que regula la autofagia. Los resultados muestran que, para los tratamientos con ApoE 2 y 3, los niveles de expresión de AMPK fosforilado son similares a los del control, pero que para el tratamiento de ApoE 4 hay una disminución en la fosforilación de la proteína (Figura 4-11.B). Lo cual coincide con los resultados de mTOR para el tratamiento con ApoE 4, donde AMPK y mTOR están enviando la señal de inhibición de la autofagia mientras que en el tratamiento de ApoE 4 se está dando la inhibición de la autofagia por mTOR y activación de esta vía por AMPK. En cuanto al

tratamiento de ApoE 2, las dos vías AMPK y mTOR están dando la señal de activación de la autofagia.

Estudios han mostrado la implicación de AMPK en la EA y han observado su disminución en la actividad en muestras de pacientes con esta enfermedad (Cai *et al.*, 2012 y Salminen *et al.*, 2011). Esto podría asociarse a las células expuestas a la isoforma 4 de ApoE, que está implicada en el desarrollo de la EA.

La siguiente proteína a estudiar fue LC3-II, que está implicada en el proceso de autofagia. Los resultados evidencian que para los tratamientos con ApoE 2 y 3 se da una autofagia similar a la que se observa en las células control, pero que hay una disminución marcada en el tratamiento de ApoE 4 (Figura 4-12). Aunque se podría pensar que se está dando el estímulo para la inhibición de la autofagia en el tratamiento de ApoE 3, por medio de la vía de señalización Akt-mTOR, el resultado de LC3-II muestra un leve aumento de la autofagia para este tratamiento, lo que indica una regulación vía AMPK y la necesidad de la sincronización de las dos vías para la inhibición de la autofagia, como se da en el tratamiento de ApoE 4 y para la activación de esta vía como se observa en el tratamiento de ApoE 2.

Las isoformas de ApoE 3 y 4 presentan resultados similares pero al llegar a la respuesta de autofagia se da una diferencia marcada para cada tratamiento. Lo cual podría sugerir, que en el tratamiento de la ApoE 3 hay un equilibrio en la señal para activación o inhibición de la autofagia, lo que permite finalmente un aumento de la autofagia vía AMPK y dando como resultado valores de activación de autofagia similares a el control y a ApoE 3. Mientras que para la isoforma ApoE 4 se da la inhibición de la autofagia por las dos vías AMPK y mTOR y esto es lo que se observa en el resultado de LC3II. Al darse la inhibición de la autofagia en este tratamiento posiblemente los organelos dañados y/ o proteínas mal plegadas a

causa del estrés celular detectado por p38 y ERK, estarían siendo acumulados y posiblemente en un tiempo más prolongado o la exposición a un insulto podría llevar finalmente a la muerte celular. Otro punto importante es el modelo utilizado, siendo este de diferenciación probablemente la inhibición de la autofagia en este punto es determinante para este proceso de diferenciación.

Modelos planteados de la regulación de la autofagia por las isoformas de ApoE (Figura. 4-13): La hiperactivación de vías como Akt y ERK en el tratamiento de ApoE 3 y ApoE 4 es dada posiblemente por la alta afinidad de estas isoformas con el receptor LDL-R, siendo mayor para ApoE4.

El incremento de la señalización de las vías anteriormente mencionadas, se relaciona con una sobre-activación en el metabolismo mitocondrial, lo cual puede llevar a generar ROS y/o excitotoxicidad, esta última posiblemente por aumento de ATP y glucosa que puede ser explicado por el aumento de la actividad en la vía AKT, que tiene como blanco a la proteína Hexoquinasa, la cual está asociada con la producción de glucosa y por lo tanto con un aumento en el metabolismo mitocondrial, que fue confirmado por el ensayo de MTT. Estas vías, específicamente Akt, podrían estar disminuyendo las enzimas antioxidantes lo que estaría contribuyendo a la generación de estrés oxidativo. La proteína p38 es activada en respuesta a los daños que están ocurriendo en la célula.

La célula requiere eliminar los organelos y/o proteínas agregadas afectados por estos eventos negativos y una de las vías por la cual la célula lo hace es vía autofagia. Según los resultados obtenidos en este trabajo, la autofagia esta inhibida en el tratamiento de ApoE4, ya que la proteína mTOR esta fosforilada, AMPK se encuentra disminuido y LC3II muestra la menor presencia al compararlo con los otros tratamientos con las isoformas de ApoE y el control. Esta inhibición en la autofagia puede llevar a que la célula presente un retardo o pare en la

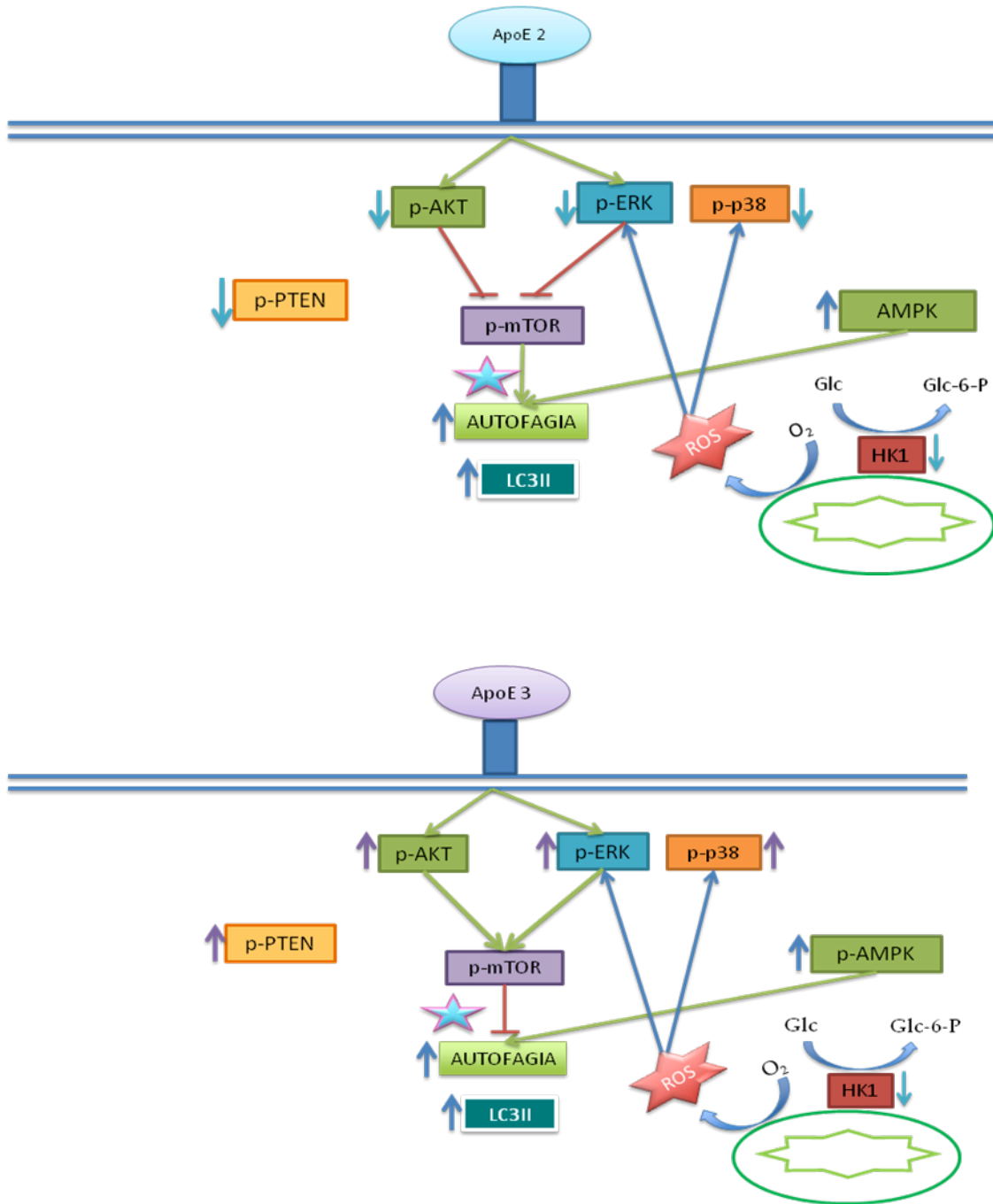
diferenciación. Indicando que en este modelo, la autofagia es requerida para la diferenciación de las células CAD, siendo favorecida por las isoformas ApoE 2 y 3.

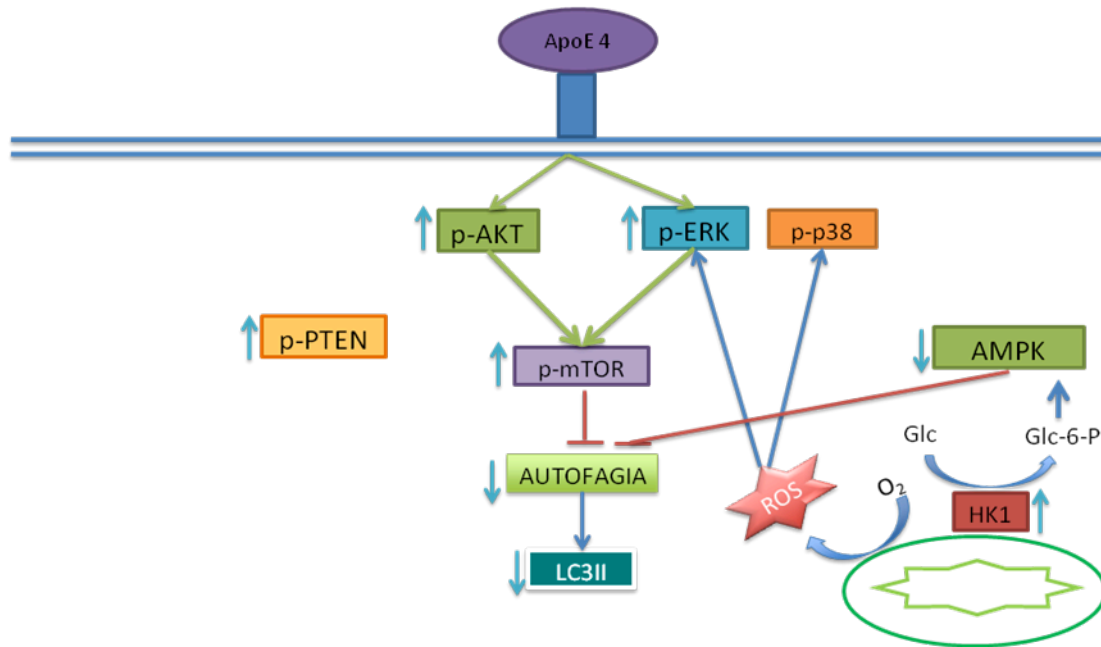
El tratamiento con la isoforma de ApoE 3 presenta resultados similares a los encontrados con la isoforma ApoE 4 pero en este caso p38 fosforilado no se encuentra tan aumentado como con ApoE4. Lo que sugiere que se está generando estrés celular pero es eliminado o reparado el daño debido a la activación de la vía de autofagia gracias a la proteína AMPK. También se plantea que aunque estos eventos no producen la muerte celular, si podrían sensibilizar a la célula y ante otro evento negativo la célula podría llegar a la muerte en el tratamiento de ApoE 4. Esto fue estudiado en el siguiente objetivo.

En cuanto a la isoforma 2, se observa que se da una respuesta similar al del control, lo cual rectifica su actividad protectora como se ha descrito para la EA.

En la EA es notable que un número de componentes del ciclo celular son sobre-regulados (Zhu *et al.*, 2000) lo cual se puede observar en los resultados del presente trabajo. Este modelo celular permite observar la asociación que se a encontrado entre EA, diabetes tipo 2 y ApoE 4 las cuales convergen en la proteína AMPK.

Figura 4-13. Modelos propuestos del efecto de las isoformas de ApoE 2, 3 y 4 en la línea neuronal CAD





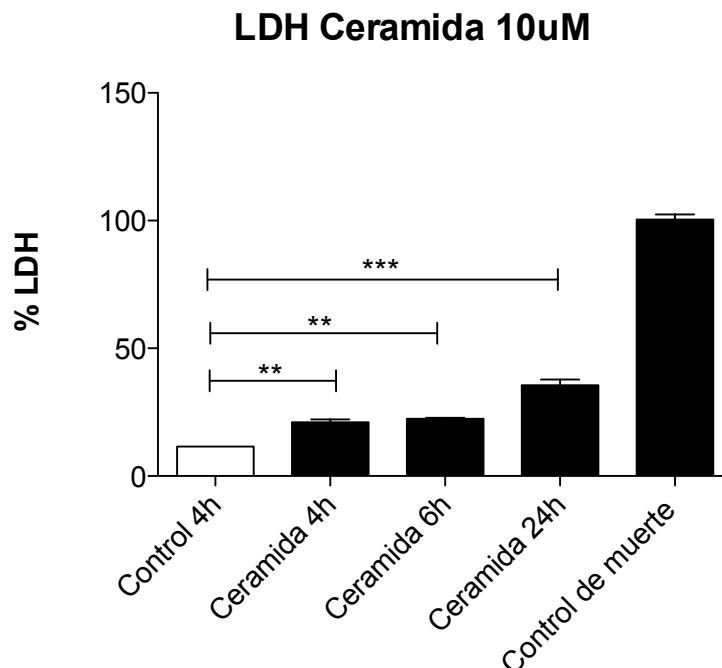
Líneas rojas: inhibición de la vía. Líneas verdes: activación de la vía. Líneas azules: activación de la vía por ROS.

4.4 Objetivo 4.

Investigar el efecto de las isoformas de ApoE en la autofagia y viabilidad celular bajo un contexto neurotóxico.

Para el desarrollo de este objetivo se utilizó el modelo de neurotoxicidad y para esto se evaluó inicialmente la toxicidad e inducción de autofagia de ceramida.

Figura 4-14. Efecto tiempo dependiente de la ceramida en células CAD determinado por la liberación de LDH.

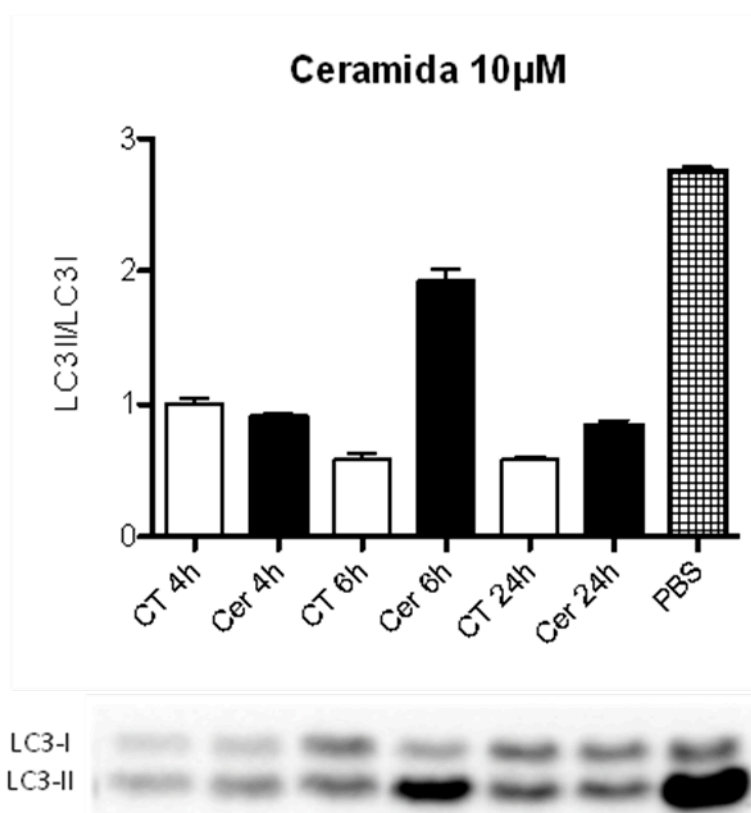


Posterior a la diferenciación de las células CAD, se trataron con 10 μ M de ceramida durante 4h, 6h y 24h y el control basal que fueron células diferenciadas sin ceramida. El eje 'Y' representa el porcentaje de liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) relativo al control de muerte (100%) y el eje 'X' se encuentran los diferentes tiempos a los que se expusieron las células a ceramida. La medición se realizó a una absorbencia de 490 nm. Los valores representan el promedio \pm DE (desviación estándar), n=3.

Resultado

Los tratamientos con ceramida a las diferentes horas muestran una disminución en la viabilidad celular y a las 24h de tratamiento con ceramida se observa un aumento en la liberación de LDH cercano al 50% con respecto al control (Figura 4-14).

Figura 4-15. Efecto de la ceramida sobre la autofagia en el tiempo en células CAD.

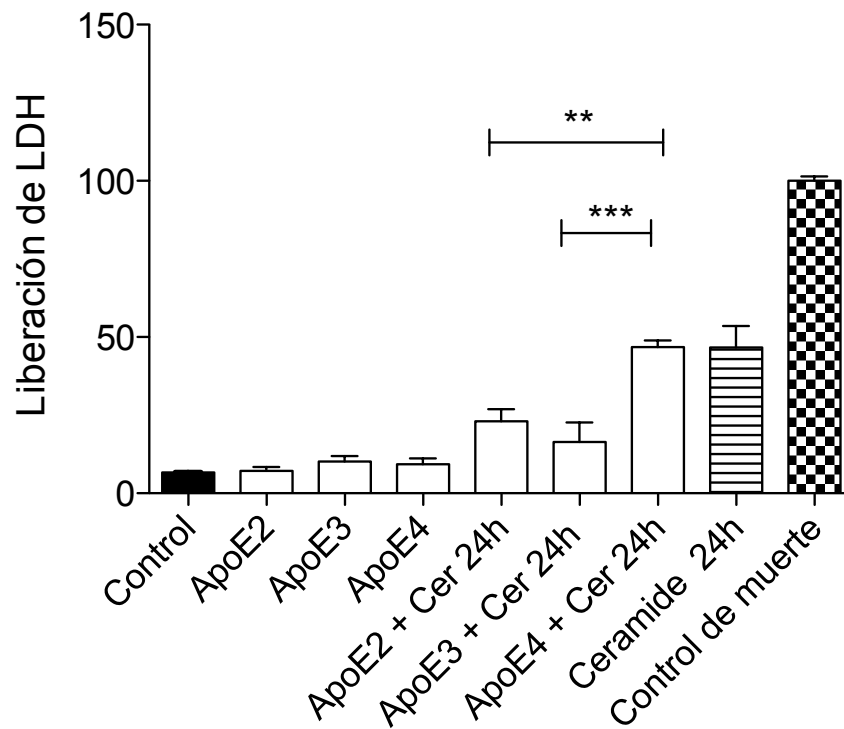


Análisis de LC3II y LC3I en respuesta a una concentración de 10 μ M de ceramida. Células CAD diferenciadas fueron tratadas con ceramida a diferentes tiempos: 4h, 6h y 24h. Para el control positivo de autofagia se eliminó el medio y se agregó PBS, 4 horas antes de realizar la extracción de proteínas. Los datos se encuentran normalizados respecto al control (CT) (barras blancas) (autofagia basal de las células CAD diferenciadas).

Resultado

Se observa que a las 6 horas se da un aumento en la medida del radio de las proteínas LC3-II/LC3I con respecto a los controles (Figura 4-15).

Figura 4-16. Efecto diferencial de las isoformas de ApoE bajo un estrés celular sobre la sobrevivencia celular.



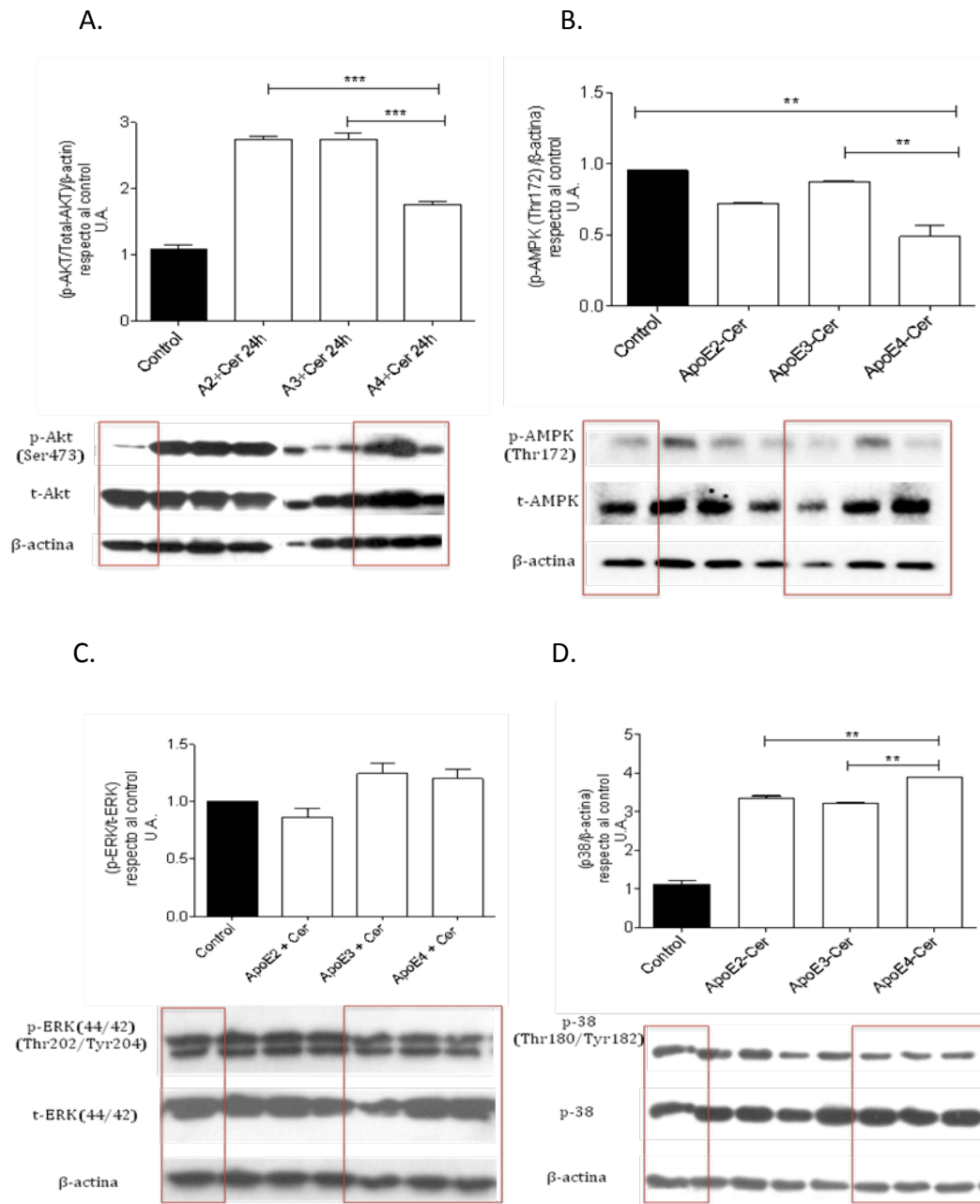
Las células CAD diferenciadas por 48 horas fueron tratadas con ApoE 2, 3 y 4 a un concentración de 25mM (10ug/mL) respectivamente, pasada 1 hora las células fueron expuestas al neurotóxico ceramida por 24 horas. Los controles utilizados fueron: células basales (control) y células tratadas con ceramida 10uM por 24 horas. Las células tratadas con ApoE 4 y ceramida y las tratadas con ceramida presentaron un aumento en la liberación de LDH.

Resultados

Las isoformas de ApoE no presentan diferencias respecto al control en la sobrevivencia celular. Los tratamientos con ApoE2-ceramida y ApoE3-ceramida presentan un valor menor en la liberación de la LDH que le observado en el tratamiento de ApoE 4-ceramida, en donde la liberación de LDH aumenta

significativamente similar al tratamiento con ceramida, alcanzando casi el 50% de liberación de LDH comparado con el control de muerte (Figura 4-16).

Figura 4-17. Efecto de las isoformas de ApoE en la vía PI3K/Akt y MAPK bajo un contexto neurotóxico.



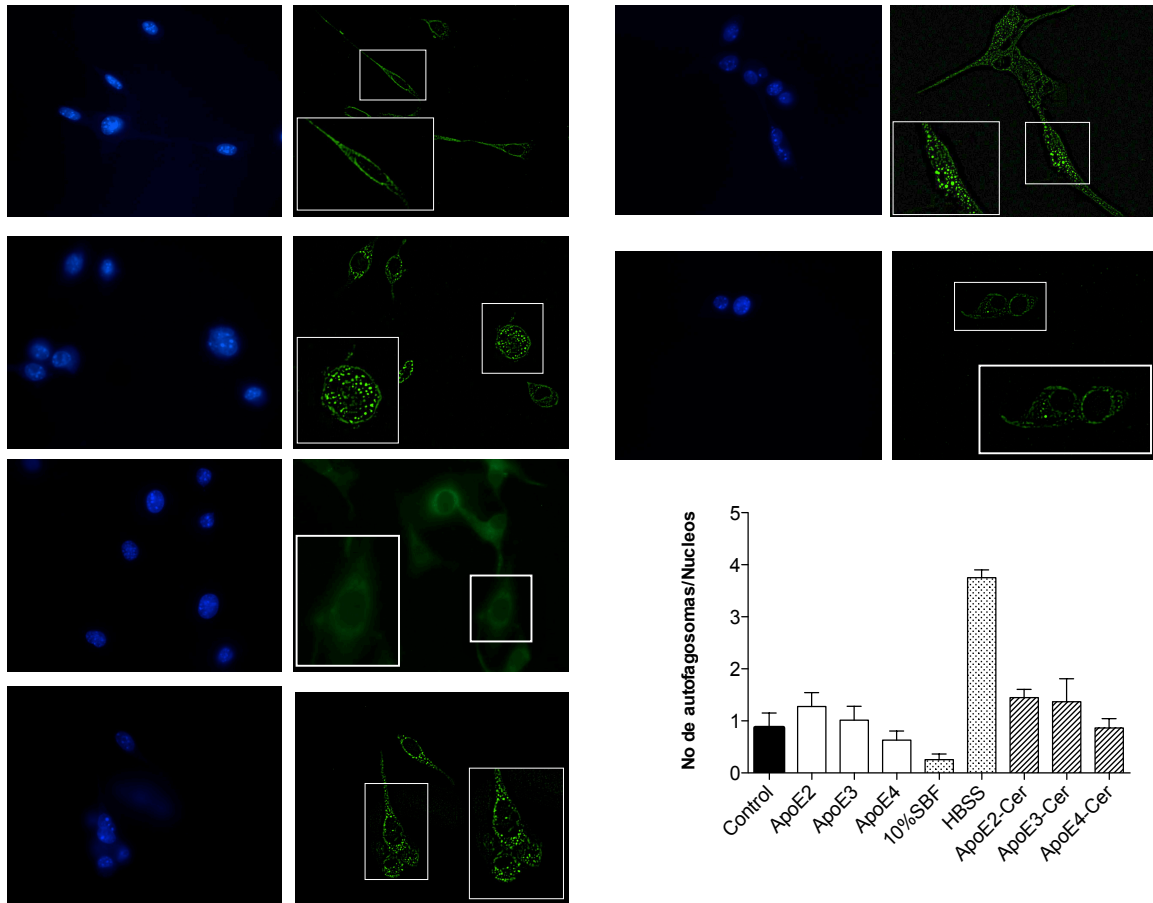
Análisis por densitometría de la relación A). (AKT-p (Ser 473)/AKT-t)/ β-actina y B). (AMPK-p/AMPK-T)/β-actina C) p-ERK (Thr202/Tyr204)/t-ERK y D) p-p38

(Thr180/Tyr182)/t-p38 en células CAD tratadas con las isoformas de ApoE, pasado 1 hora se agregó C2-ceramida 10 μ M por 24 horas. Los datos se encuentran normalizados respecto al control (fosforilación basal de las células CAD diferenciadas). Los recuadros rojos indican el control y los tratamientos con ApoE + Cer, respectivamente. Western blot. n=3.

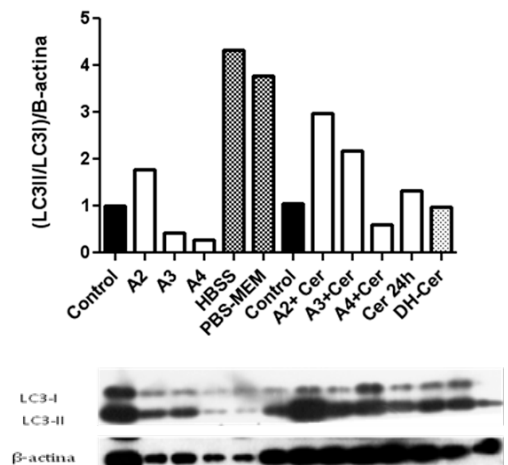
Resultados

Los tratamientos con ApoE 2-ceramida y 3-ceramida aumentan la fosforilación de Akt a diferencia del tratamiento con ApoE 4-ceramida, en donde se observa una disminución. AMPK presenta una disminución en el tratamiento de ApoE 4-ceramida. La proteína ERK no presenta diferencias significativas. La presencia de la proteína p38 fosforilada es similar en los tratamientos y mayor con respecto al control (Figura 4-17).

Figura 4-18. Efecto diferencial de las isoformas de ApoE bajo estrés celular en la vía de autofagia.



ApoE ε2, ε3 y ε4 [10μM]



Células CAD diferenciadas por 48 horas fueron tratadas con ApoE 2, 3 y 4 respectivamente, pasada 1 hora las células fueron expuestas al neurotóxico ceramida por 24 horas. Los controles utilizados fueron células basales (control), células cultivadas con medio HBSS por 24h y células mantenidas con PBS por 4 horas pasado este tiempo se cultivaron en MEM por 20h (controles positivos de autofagia), células cultivadas con DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB (control negativo de autofagia) y células tratadas con ceramida 10uM por 24 horas. A. Autofagosomas fueron visualizados con microscopía de fluorescencia, marcando la proteína LC3 (Anexo C). B. Análisis cuantitativo del ensayo de inmunofluorescencia realizado con el *software Imagej*. C. Presencia de la proteína LC3-II vista por *Western blot*.

Resultados

Cuando las células son tratadas con ApoE se observa una posible regulación de la autofagia por la vía Akt, ya que se da un comportamiento opuesto en la presencia de las proteínas LC3-II y Akt. Al exponer las células a ApoE y el neurotóxico no se ve la misma regulación (Figura 4-18).

Discusión

En este experimento se realizó un pre-tratamiento con ApoE y pasada una hora se adicionó el neurotóxico ceramida, de esta manera se simula lo que ocurre en las enfermedades neurodegenerativas, donde hay una protección o predisposición que en este caso sería dadas por las isoformas de ApoE y al pasar el tiempo se da la acumulación o aumento en la concentración de proteínas, lípidos entre los que se encuentra ceramida (Cutler *et al.*, 2004).

Cuando las células son sometidas a ApoE y ceramida, se observa que en el caso de los tratamientos con las isoformas 2 y 3 se da un aumento de la proteína Akt fosforilada con respecto al control y en el tratamiento de ApoE 4 con ceramida se observa una disminución de esta proteína. Sugiriendo un evento protector para la defosforilación de Akt o un aumento en su fosforilación gracias a las ApoE 2 y 3, lo que le permite la sobrevivencia a este grupo de células expuestas a estas isoformas, mientras que para ApoE 4 se observa la defosforilación de Akt por

ceramida(Arboleda *et al.*, 2010),lo cual puede ser una de las causas de la muerte celular para este tratamiento, ya que la isoforma 4 no logra revertir la fosforilación de Akt o protegerla de la desfosforilación. Experimentos realizados por el grupo de Ong y colaboradores (2013) muestran como al pasar las semanas se da un decrecimiento de Akt en ratones homólogos para ApoE4.

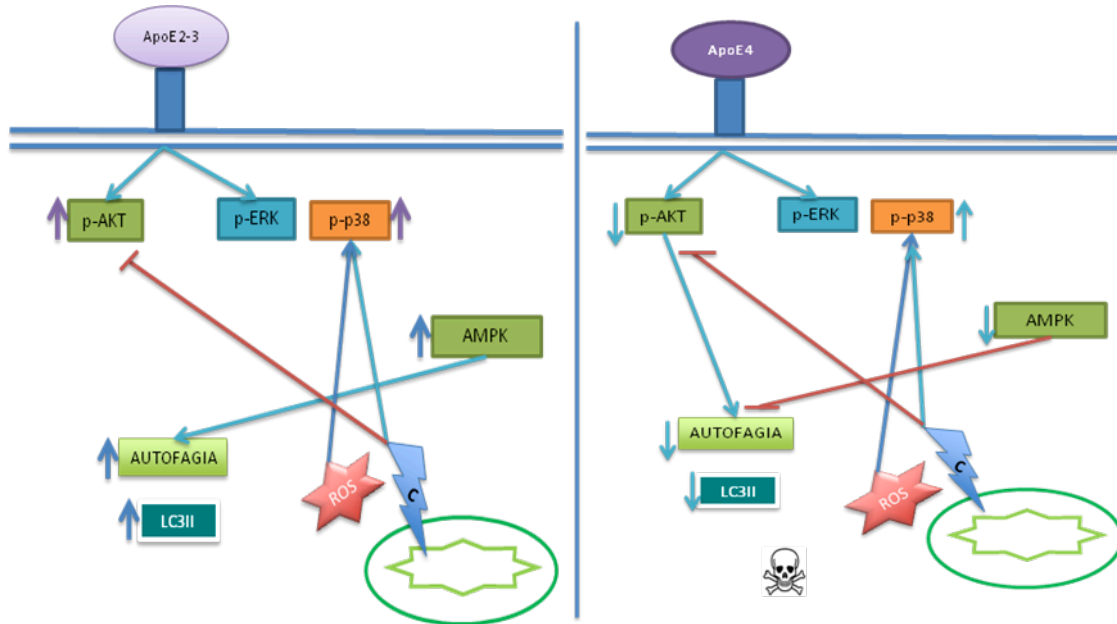
Al exponer las células aun neurotóxico su respuesta a las isoformas de ApoE cambia, posiblemente el aumento de la fosforilación de Akt en los tratamientos de ApoE 2 – 3 y ceramida se debe a un mecanismo de defensa en donde el aumento de Akt fosforilado permite la sobrevivencia de estas células. Mientras que el experimento con la isoforma 4 se da una disminución que no es menor que el control, pero debido a la exposición al neurotóxico es importante y debe afectar las células en otras vías de señalización y en la sobrevivencia de las mismas. En este caso ApoE 4 genera una susceptibilidad o sensibilidad de las células a la muerte celular.

En cuanto a la proteína AMPK no se observan diferencias en la presencia de esta proteína fosforilada en los tratamientos con ApoE 2-ceramida y ApoE4–ceramida comparados con el control. Mientras que ApoE 4 presenta una disminución de la presencia de AMPK fosforilado. Estos datos son acordes con lo visto en cerebros de pacientes con Alzheimer, en donde se da una disminución de la actividad de AMPK (Cai *et al.*, 2012) y nuestros resultados pueden sugerir que al exponer la célula a ApoE 4 que es una isoforma que actúa como factor de riesgo en EA y un neurotóxico como lo es ceramida, el cual se ha visto aumentado en pacientes con Alzheimer da como resultado una disminución en AMPK y esto posiblemente estaría afectando procesos metabólicos y señalización celular como alteración en la vía de la autofagia.

En la vía de las MAPK en el caso específico de ERK no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con las isoformas de ApoE y ceramida. Para la proteína p38 se da un aumento de la presencia de esta proteína fosforilada en todos los tratamientos pero las células expuestas a la isoforma 4 presenta un aumento significativo de esta proteína al ser comparada contra el control. ApoE 2+Cer y ApoE 3+Cer. Esto puede deberse a la señal de estrés que genera la célula por el daño causado por el neurotóxico ceramida que a diferencia de ApoE 4, los tratamientos con ApoE 2 y 3 logran superar el daño causado por ceramida y activar señales como AMPK para que se de la activación de autofagia y así el recambio de posibles organelos afectados por ceramida (Figura 4-17. B.).

Para comprobar la inhibición de la autofagia en el tratamiento de ApoE4-ceremida y la activación para los tratamientos con la isoforma 2-ceramida y 3-ceramida, se midió la proteína LC3II (Figura 4-18) y los resultados son coherentes con los datos obtenidos de la proteína AMPK. Estos resultados sugieren que los tratamientos con ceramida generan estrés celular pero en los tratamientos con las isoformas 2 y 3 logran activar vías moleculares como AKT y AMPK que permiten la sobrevivencia de las células, siendo AMPK el regulador clave de la autofagia en este modelo y permitiendo que se de la activación de la autofagia, opuesto a lo que ocurre en el tratamiento con la isoforma ApoE 4, en donde se da una disminución en la fosforilación de AKT y una inhibición de la autofagia vía AMPK, generando la muerte celular. Lo que sugiere que la autofagia en este modelo se asocia con la sobrevivencia de las células CAD y su inhibición lleva a la muerte celular (Figura 4-19).

Figura 4-19. Modelo propuesto del efecto de las isoformas de ApoE 2, 3 y 4 en la línea neuronal CAD bajo un contexto neurotóxico.



Líneas rojas: inhibición de la vía. Líneas verdes: activación de la vía. Líneas azules: activación de la vía por ROS. C: Ceramida

5. Conclusiones y perspectivas

5.1 Conclusiones

Las células CAD presentan la mayor expresión de LDL-R en el día 2 de diferenciación. Las isoformas de ApoE 2, 3 y 4 regulan de manera diferencial las vías involucradas con sobrevivencia, estrés celular, metabolismo y autofagia.

Durante la diferenciación, la isoforma ApoE 4 inhibe la autofagia y genera mayor susceptibilidad celular.

Las isoformas 2 y 3 de ApoE se asocian con un efecto protector en el modelo con ceramida, mientras la isoforma 4 genera mayor muerte celular.

La ApoE4 generó la hiperactivación de vías moleculares como AKT, ERK lo cual sensibiliza a la célula a la muerte tras un daño posterior, en este caso ceramida. Ceramida inhibe las vías de AKT, además activa la vía de p38.

La autofagia está relacionada con la diferenciación o sobrevivencia dependiendo del contexto celular (modelos).

5.2 Perspectivas

Analizar si las vías moleculares estudiadas en este trabajo fueron activadas por unión de la ApoE al receptor y/o por su internalización a la célula.

Realizar estudios bajo las mismas condiciones de este trabajo en los cuales se analice ROS, hipoxia, glucosa, actividad de HK1, Tau y mitofagia.

Activar la autofagia en el modelo de ceramida-ApoE 4, con el propósito de analizar su efecto protector.

Utilizar inhibidores de las vías estudiadas para confirmar datos y buscar posibles blancos terapéuticos.

Anexo A: *Western blot* para LC3

Luego de la electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF la cual fue sumergida en metanol por 3 minutos. Se realizaron los mismos pasos anteriormente descritos con la variación de realizar la transferencia a 16V por una hora.

Una vez terminada la transferencia, la membrana se removió del ensamblaje y se incubó en buffer de bloqueo (5% leche descremada en TBS con 0.1% (v/v) Tween-20 (TBS-T) por 30 minutos. Se hicieron tres lavados de 2 minutos a la membrana con TBS - *Tween* (0.05%). La membrana de nitrocelulosa se incubó con 3ml de la solución apropiada de anticuerpos primarios en buffer de bloqueo al 1% de BSA en lugar de leche durante toda la noche a 4°C, se lavó 5 veces en TBS-*Tween* 0.05% (10min/lavado). El anticuerpo unido se visualizó mediante la incubación de la membrana con el anticuerpo secundario específico diluido en el buffer de bloqueo con SBF al 1.5% en lugar de leche por 1h a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con TBS-*Tween* 0.05% (10min/lavado). El anticuerpo secundario unido se detectó usando quimioluminiscencia (ECL, *Thermo Scientific*). La membrana se incubó con una mezcla 1:1 de los reactivos A y B de ECL por 1min, y se leen por medio del fotor-documentador *BIORAD ChemiDoc™*. La imagen de las bandas es analizada por medio del software *Image-J* versión 1.44 y las graficas y análisis estadístico fue realizado por medio de *GraphPad Prism 5*.

Anexo B: Gel y solución *Laemmli* modificada para *Western blot* de LC3

Gel acrilamida 12.5%	1 gel
Agua dd	3,2mL
Acrilamida	4,2mL
Tris 1.5 M pH 8,8	2,5mL
SDS	0,1mL
APS 10%	33uL
TEMED	5uL

Buffer Laemmli	Modificado	Normal
Tris – HCl pH 6,8	0,1 M	62,5 mM
Glicerol	10%	25%
SDS	2%	2%
Bromofenol	0,03%	0,01%
b-mercaptoetanol	6%	5%

Anexo C: Conteo de vesículas autofagicas.

Para el conteo de los autofagosomas se utilizó el marcaje de la proteína LC3-II y se visualizó por microscopia de fluorescencia. Paso seguido se realizó la toma de las fotos y procesamiento de las imágenes de inmunofluorescencia por medio del software Image J.

El software da la opción de realizar un macro creado por el usuario el cual permite hacer el análisis de imágenes de manera automática con los parámetros de interés. En este caso el procedimiento fue el siguiente:

Se abre una imagen en el programa y se va a la pestaña de Plugins y se escoge la opción de Macros, allí se despliega una ventana y damos clic en Record. En este punto ponemos los procesos y parámetros que queremos que el macro haga sobre cada imagen.

1. Quitar el background para lo cual se va a Process – Subtract Background (se escoge 50.0 pixels) – OK.
2. Filtros: Process – Filters – Gaussian Blur.. – Radius (1)
Process-Filters – Unsharp Mask.. – Radius (10)
Process-Filters – Convolve –OK (permite la definición de los bordes)
3. Image – Type – RGBColor.
Image- Type- 8-bit
4. Image – Adjust – Threshold (min: -30 y max:255)- Apply.
5. Analyzed – Analyze Particles, Size: determinar tamaño mínimo de un autofagosoma en pixeles. Se escoge la opción de Summarize y OK (Esto permitirá tener al final de procesar las imágenes, una tabla con la información del número de partículas o autofagosomas en este caso).

6. Una vez se establecieron los parámetros, volvemos a la ventana de Record: Macro y le damos create y de esta manera tenemos el macro creado y guardado.
7. Para correr el macro vamos a: Process – Batch process – Macro. Se escoge la carpeta donde se tienen las imágenes que van a hacer procesadas en input y en output se escoge la carpeta que se creó para guardar los resultados.
8. Finalmente, vamos a obtener número de autofagosomas por imagen.
Para el conteo de los núcleos se hizo de manera manual por cada imagen procesada, de esta manera se obtuvo: Numero de autofagosomas por célula (número de autofagosomas / Núcleo). Para el análisis estadístico y graficar los datos se utilizó el programa *GraphPad Prism 5*.

*El análisis de datos se hizo mínimo con 30 células por tratamiento.

Bibliografía

1. Agthong S, Kaewsema A, Tanomsridejchai N, Chentanez V (2006) Activation of MAPK ERK in peripheral nerve after injury. *BMC Neurosci.* 7:45.
2. Annika R, Nenad B, Inga V, Bengt W, Rivka R, Richard C. (2004) Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neurochemistry.* 15: 955-959.
3. Arboleda G, Cárdenas Y, Rodríguez Y, Morales LC, Matheus L, Arboleda H (2010) Differential regulation of AKT, MAPK and GSK3 β during C2-ceramide-induced neuronal death. *Neurotoxicology.* 31:687-697.
4. Arboleda G, Huang T-J, Waters C, Verkhatsky A, Fernyhough P, Gibson RM (2007) Insulin-like growth factor-1-dependent maintenance of neuronal metabolism through the phosphatidylinositol 3-kinase–Akt pathway is inhibited by C2-ceramide in CAD cells. *European Journal of Neuroscience.* 25: 3030–3038.
5. Arboleda GH, Yunis JJ, Pardo R, Gomez CM, Hedmont D, Arango G, Arboleda H (2001) Apolipoprotein E genotyping in a sample of Colombian patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 305:135-8.
6. Baraban SC, Lothman EW, Lee A, and Guyenet PG (1995) Kappa opioid receptor-mediated suppression of voltage-activated potassium current in a catecholaminergic neuronal cell line. *J Pharmacol Exp Ther.* 273, 927-933.
7. Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt JD, Li WP, Adelman G, Frotscher M, Hammer RE, Herz J (2005) Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron* 47: 567–579.
8. Beffert U., Stolt P.C., Herz J (2004) Functions of lipoprotein receptors in neurons. *Journal of Lipid Research.* 45: 403-409.
9. Bell RD, Winkler E, Sagare A, Singh I, Deane R, Wu Z, Holtzman DM, Betsholtz C, Armulik A, Sallstrom J, Berk B, Zlokovic BV (2012) Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature.* 485: 512-516.
10. Benesh EC, Humphrey PA, Wang Q, Moley KH (2013) Maternal high-fat diet induces hyperproliferation and alters Pten/Akt signaling in prostates of offspring. *Sci Rep.* 10:3466.
11. Bhaskar Kiran, Miller Megan, Chludzinski Alexandra, Herrup Karl, Zagorski Michael, Lamb Bruce T (2009) The PISK-Akt-mTOR pathway regulates AB oligomer induced neuronal cell cycle events. *Mol Neurodegener.* 2009. 4: 14.

12. Brunet A, Datta S R, Greenberg M E (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current Opinion in Neurobiology*. 11:297-305.
13. Bu G (2009) Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*. 10:333-44.
14. Caberlotto L, Lauria M, Nguyen T-P, Scotti M (2013) The Central Role of AMP-Kinase and Energy Homeostasis Impairment in Alzheimer's Disease: A Multifactor Network Analysis. *PLoS ONE*. 8: e78919.
15. Cai Z, Yan LY, Li K, Quazi B, Zhao B (2012) Roles of AMP-activated Protein Kinase in Alzheimer's Disease. *NeuroMolecular Medicine*. 14: 1-14
16. Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, Fagan AM, Morris JC, Mawuenyega KG, Cruchaga C, Goate AM, Bales KR, Paul SM, Bateman RJ, Holtzman DM (2011) Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med*. 3:89-57.
17. Chauhan A, Pirttilä T, Mehta P, Chauhan VP, Wisniewski HM (1996) Effect of cerebrospinal fluid from normal and Alzheimer's patients with different apolipoprotein E phenotypes on in vitro aggregation of amyloid beta-protein. *J Neurol Sci*. 141:54-8.
18. Correia NC, Gírio A, Antunes I, Martins LR, Barata JT (2014) The multiple layers of non-genetic regulation of PTEN tumour suppressor activity. *Eur J Cancer*. 50:216-125.
19. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, Troncoso JC, Mattson MP (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci*. 101:2070-5.
20. Dolado I, Nebreda AR (2008) AKT and Oxidative Stress Team Up to Kill. *Cancer Cells*. 14:427-429.
21. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A (2009) Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death and Differentiation*. 16: 966-975
22. Filippov V, Song MA, Zhang K, Vinters HV, Tung S, Kirsch WM, Yang J, Duerksen-Hughes PJ (2012) Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis*. 29:537-47.
23. Funderburk S. F., Marcellino, B. K. and Yue, Z. (2010), Cell "Self-Eating" (Autophagy) Mechanism in Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med*, 77: 59-68.
24. Gao C, Hölscher C, Liu Y, Li L (2011) GSK3: a key target for the development of novel treatments for type 2 diabetes mellitus and Alzheimer disease. *Rev Neurosci*. 23: 1-11.

25. García-Arencibia M, Hochfeld WE, Toh PPC, Rubinsztein DC (2010) Autophagy, a guardian against neurodegeneration. *Seminars in cell & developmental biology*. 21: 691-698
26. Go GW, Mani A (2012) Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med*. 85:19–28
27. Goa Gwang-Woong and Mania Arya (2012) Low-density Lipoprotein receptor (LDLR) Family orchestrates cholesterol Homeostasis. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 85:19-28.
28. Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R, O'Neill C (2005) Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem*. 93:105-17.
29. Guenther GG, Peralta ER, Romero R K, Wong SY, Siskind LJ, Edinger AL (2008) Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 17402-17407.
30. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 30:214-26.
31. Hara Taichi 1, Nakamura Kenji 2, Matsui Makoto Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 441:885-889
32. Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO (2011) Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res*. 50:62–74
33. Herz J, Beffert U (2000) Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 1:51-58.
34. Hoe HS, Harris DC, Rebeck GW (2005) Multiple pathways of apolipoprotein E signaling in primary neurons. *J Neurochem*. 93:145-55.
35. Holtzman D M., H J, Bu G (2012) Apolipoprotein E and Apolipoprotein E Receptors: Normal Biology and Roles in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2(3).
36. Horton C. D., Qi Y., Chikaraishi D. and Wang J. K. (2001) Neurotrophin-3 mediates the autocrine survival of the catecholaminergic CAD CNS neuronal cell line. *J Neurochem*. 76, 201–209.
37. Hosoi T, Hyoda K, Okuma Y, Nomura Y, Ozawa K (2007) Akt up- and down-regulation in response to endoplasmic reticulum stress. *Brain Res*. 1152:27-31.
38. Johnson S C. 1, Rabinovitch P S, Kaeberlein M (2013) mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*. 493: 338-345

39. Keshari R S, Verma A, Barthwal MK, Dikshit M (2013) Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *Journal of Cellular Biochemistry*. 114: 532-540.
40. Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. 63:287–303.
41. Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. 63:287-303.
42. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*. 13:132–141.
43. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 441:880-884.
44. Komatsu Masaaka, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J-J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 441: 880-884.
45. Korwek KM, Trotter JH, LaDu M J, Sullivan P M, Weeber E J (2009) ApoE isoform-dependent changes in hippocampal synaptic function. *Molecular Neurodegeneration*. 4:21.
46. Krügera U, Wanga Y, Kumara S, Mandelkowa E-M (2012) Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose. *Neurobiology of Aging*. 33: 2291–2305.
47. Ksiezak-Reding H, Pyo H K, Feinstein B, Pasinetti G M (2003) Akt/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta* 1639:159–168.
48. Ksiezak-Reding H, Pyo HK, Feinstein B, Pasinetti GM (2003) Akt/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*. 1639:159-68.
49. Kuller L (1999) The role of APOE [epsilon]4 in modulating effects of other risk factors for cognitive decline in elderly persons. *J Am Med Assoc*. 282:40. 29.
50. Kyoung Pyo H, Lovati E, Pasinetti G.M, Ksiezak-Reding H (2004) Phosphorylation of tau at THR212 and SER214 in human neuronal and glial cultures: The role of AKT. *Neuroscience*. 127: 649–658.
51. Laffont I, Takahashi M, Shibukawa Y, Honke K, Shuvaev V V, Siest G, Visvikis S, Taniguchi N (2002) Apolipoprotein E activates Akt pathway in neuro-2a in an isoform-specific manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 292, 83–87.
52. Lazaroff M, Dunlap K, Chikaraishi DM (1996) A CNS catecholaminergic cell line expresses voltage-gated currents. *J Membr Biol*. 151:279–291.
53. Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 132:27-42.

54. Liu Chia-Chen, Kanekiyo Takahisa, Xu Huaxi, Bu Guojun (2013) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews Neurology*. 9:106-118.
55. Longatti A, Tooze SA. (2009) Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death and Differentiation*. 16: 956–965.
56. Lum J, De Berardinis R J, Thompson C B. (2005) Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature Reviews*. 6: 439-448.
57. Mahley RW, Rall SC Jr (2000) Apolipoprotein E: Far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1: 507–537.
58. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y (2006) Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:p5644–5651.
59. Malaney P, Pathak RR, Xue B, Uversky VN, Davé V (2013) Intrinsic disorder in PTEN and its interactome confers structural plasticity and functional versatility. *Sci Rep*. 3:2035.
60. Matsuo E S, Shin R W, Van Billingsley M L, DeVoorde A, O'Connor M, Trojanowski J. Q, Lee V M (1994) Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron*. 13:989–1002.
61. Memmott RM, Dennis PA (2009) LKB1 and mammalian target of rapamycin as predictive factors for the anticancer efficacy of metformin. *J Clin Oncol*. 27:226-227.
62. Mizushima N (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 21:2861-2873.
63. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. 2008 Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 451:1069-75.
64. Narita M, Holtzman DM, Fagan AM, LaDu MJ, Yu L, Han X, Gross RW, Bu G, Schwartz AL (2002). Cellular catabolism of lipid poor apolipoprotein E via cell surface LDL receptor-related protein. *J Biochem*. 132: 743–749
65. Nixon, R. A. (2006). Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat. *Trends Neurosci*. 29: 528-535.

66. Nogueira V, Park Y, Chen C.-C, Xu P.-Z, Chen M.-L, Tonic I, Unterman T, Hay N(2008) Akt Determines Replicative Senescence and Oxidative or Oncogenic Premature Senescence and Sensitizes Cells to Oxidative Apoptosis.*Cancer Cell*. 14: 458-470.
67. Oh HL, Seok JY, Kwon CH, Kang SK, Kim YK (2006) Role of MAPK in ceramide-induced cell death in primary cultured astrocytes from mouse embryonic brain. *Neurotoxicology*. 27:31–38.
68. Pei JJ, Khatoon S, An WL, Nordlinger M, Tanaka T, Braak H, Tsujio I, Takeda M, Alafuzoff I, Winblad B, Cowburn RF, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2003). Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathol*.105, 381–392.
69. Perluigi Marzi, Pupo G, Tramutola A, Cini C, Coccia R, Barone , Head E, Butterfield D. A, Di Domenico F. M. (2014) Neuropathological role of PI3K/Akt/mTOR axis in Down syndrome brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1842: 1144–1153.
70. Perry G, Roder H, Nunomura A, Takeda, Friedlich Avi L, Zhu Xi, Raina A K, Holbrook N, Siedlak S L., Harris P L. R. Smith M A.(1999) Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation.*NeuroReport*. 10:2411-2415.
71. Perry RJ, Hodges JR1999 Attention and executive deficits in Alzheimer's disease. A critical review. *Brain*. 122:383-404
72. Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T (2008) The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest*. 118:2190-9.
73. Plas D R, Thompson C B (2005) Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene*. 24, 7435–7442.
74. Qi Y, Wang JK. T. McMillian M, Chikaraishi D M. (1997) Characterization of a CNS Cell Line, CAD, in which Morphological Differentiation Is Initiated by Serum Deprivation. *The Journal of Neuroscience*. 17:1217–1225.
75. Raftery M, Campbell R, Glaros EN, Rye KA, Halliday GM, Jessup W, Garner B (2005) Phosphorylation of apolipoprotein-E at an atypical protein kinase CK2 PSD/E site in vitro. *Biochemistry*. 44:7346-53.
76. Rahdar M, Inoue T, Meyer T, Zhang J, Vazquez F, Devreotes PN.(2008) A phosphorylation-dependent intramolecular interaction regulates the membrane association and activity of the tumor suppressor PTEN.*Proc Natl Acad Sci USA*. 106:480-5.
77. Rall, S. C. Jr.; Weisgraber, K. H. and Mahley, R. W (1982) Human apolipoprotein E – the complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem*. 257: 4171-4178.
78. Regenold WT, Pratt M, Nekkallapu S, Shapiro PS, Kristian T, Fiskum G (2012) Mitochondrial detachment of hexokinase 1 in mood and psychotic disorders:

- implications for brain energy metabolism and neurotrophic signaling. *J Psychiatr Res.* 46: 95-104.
79. Roberts DJ, Tan-Sah VP, Ding EY, Smith JM, Miyamoto S. 2014 Hexokinase-II positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition. *Mol Cell.* Feb 20;53(4):521-33.
80. Robey R B, Hay N (2006) Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene.* 25, 4683–4696
81. Ross A, Gericke A (2009) Phosphorylation Keeps PTEN Phosphatase Closed for Business. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 1297 – 1298.
82. Salminen A, Kaarniranta K, Haapasalo A, Soininen H, Hiltunen M (2011) AMP-activated protein kinase: a potential player in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry.* 118:460-474.
83. Salminen A, Kaarniranta K (2012) AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Research Reviews* 11 (2012) 230–241.
84. Son Y, Cheong Y-K, Kim N-H, Chung H-T, Kang D G, Pae H-O (2011) Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?. *Journal of Signal Transduction*
85. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol.*13:283-96.
86. Sun A, Liu M, Nguyen XV, Bing G (2003) P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol.*183:394-405.
87. Suri C, Fung BP, Tischler AS, Chikaraishi DM (1993) Catecholaminergic cell lines from the brain and adrenal glands of tyrosine hydroxylase-SV40 T antigenic mice. *J Neurosci* 13:1280–1291.
88. Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5: 173–183.
89. Torres Josema, Pulido Rafael (2001) The Tumor Suppressor PTEN Is Phosphorylated by the Protein Kinase CK2 at Its C Terminus. *The Journal of Biological Chemistry.* 276: 993–998.
90. Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y, Rokas MV, Nakamura N, Sellers WR (2009) Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem.* 28:48627-30
91. Verghese P. B., Castellano J. M., Holtzman D. M. (2011) Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* 10: 241–252.

92. Villena J, Henriquez M, Torres V, Moraga F, Diaz-Elizondo J, Arredondo C, Chiong M, Olea-Azar C, Stutzin A, Lavandero S, Quest AF (2008) Ceramide-induced formation of ROS and ATP depletion trigger necrosis in lymphoid cells. *Free Radic Biol Med.* 44:1146–1160.
93. Vingtdeux V, Chandakkar P, Zhao H, d'Abramo C, Davies P, Marambaud P (2011) Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid-b peptide degradation. *FASEB J.* 25:219–231.
94. Wang C, Yu JT, Miao D, Wu ZC, Tan MS, Tan L (2014) Targeting the mTOR signaling network for Alzheimer's disease therapy. *Mol Neurobiol.* 49: 120-35.
95. Wu HW, Li HF, Wu XY, Zhao J, Guo J (2008) Reactive oxygen species mediate ERK activation through different Raf-1-dependent signaling pathways following cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 432:83-7.
96. Yamamoto H, Ngan C Y, Monden M (2008) Cancer cells survive with survivin. *Cancer Science.* 99: 1709-1714
97. Yamamoto T, Choi HW, Ryan RO (2008) Apolipoprotein E isoform-specific binding to the low-density lipoprotein receptor. *Anal Biochem.* 372:222-6.
98. Zaiou M, Arnold KS, Newhouse YM, Innerarity TL, Weisgraber KH, Segall ML, Phillips MC, Lund-Katz S (2000) Apolipoprotein E₃-low density lipoprotein receptor interaction. Influences of basic residue and amphipathic alpha-helix organization in the ligand. *J Lipid Res.* 41:1087-1095.
99. Zhong N, Weisgraber KH (2009) Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer disease: clues from its structure. *J Biol Chem.* 284:6027–31.
100. Zhu X, Rotkamp CA, Boux H, Takeda A, Perry G, Smith MA. Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 59:880-8.
101. Reduced phosphorylation of brain insulin receptor substrate and Akt proteins in apolipoprotein-E4 targeted replacement mice
102. Qi-Rui Ong^{1*}, Elizabeth S. Chan^{1*}, Mei-Li Lim¹, Gregory M. Cole^{2,3} & Boon-Seng Wong¹ NATURE. SCIENTIFIC REPORTS | 4 : 3754
103. Hennessy B T, Smith D L, Ram Pr T, Lu Y, Mills G B. (2005) Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery Nature Reviews Drug Discovery. 4:988-1004.
104. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology.* 13:132–141.