

El péptido β -amiloide: mecanismos de neurotoxicidad. Neuroprotección por antioxidantes y estrógenos

Muñoz López, F. J.

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut. Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida. Universitat Pompeu Fabra. Barcelona.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por la muerte neuronal asociada a la presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares. El componente principal de las placas seniles es el péptido β -amiloide ($A\beta$) el cual es considerado como un inductor de la neurodegeneración observada en el cerebro de individuos con EA. El objetivo del presente trabajo es revisar el estado actual de la investigación básica sobre los mecanismos de acción neurotóxicos del $A\beta$, así como el efecto neuroprotector de los estrógenos y de distintos antioxidantes como la vitamina E y la melatonina.

Palabras clave

β -amiloide. Estrés oxidativo. Antioxidantes. Estrógenos.

Amyloid β -peptide: Mechanisms of Neurotoxicity. Neuroprotection by Antioxidants and Estrogens

SUMMARY

The hallmarks of Alzheimer's disease (AD) are neuronal death, senile plaques and neurofibrillary tangles. Senile plaques are mainly composed of amyloid β -peptide ($A\beta$) which is considered to trigger the neurodegeneration found in the brains of AD patients. The main goal of the present work is to review the proposed mechanisms which are involved in the $A\beta$ -mediated cytotoxicity and the neuroprotective role of estrogens and antioxidants such as vitamin E and melatonin.

Key words

β -amyloid. Oxidative stress. Antioxidants. Estrogens.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA), descrita por Alois Alzheimer en 1907, se caracteriza histopatológicamente

por la presencia de placas seniles, ovillos neurofibrilares y muerte neuronal (1). Es un proceso neurodegenerativo que afecta principalmente a la vía colinérgica iniciándose el daño en el núcleo basal de Meynert, progresando hacia la formación hipocámpal y la amígdala, y desde ahí se generaliza hacia distintas áreas corticales (2).

EL PÉPTIDO β -AMILOIDE

El componente principal de las placas seniles es el péptido β -amiloide ($A\beta$), producto del procesamiento proteolítico de una proteína transmembrana denominada proteína precursora del amiloide (APP) (3). La función fisiológica del APP se supone que está relacionada con procesos de adhesión celular (4). Esta glicoproteína puede ser secretada (5) tras la acción de α -secretasas produciendo APP no amiloidogénico (6). Sin embargo, existe otra ruta alternativa de procesamiento mediante la acción secuencial de β - y γ -secretasas que producen la liberación de $A\beta$ soluble (6) (Fig. 1). Estas enzimas, β - y γ -secretasas, están relacionadas con las presenilinas, y ha sido ampliamente demostrado que las mutaciones en los genes de las presenilinas determinan una aparición temprana de la EA que cursa con el aumento en la liberación de $A\beta$ (7, 8).

El procesamiento del APP genera la liberación de $A\beta$ en fragmentos de distintos tamaños pero principalmente de 40 y 42 aminoácidos (9). El $A\beta$ en estado soluble no es neurotóxico (10) pero tiende a agregarse formando fibrillas que sí lo son (11) (Fig. 2). Estas fibrillas presentan una longitud de 6-10 nm (12) y se acomplejan macroscópicamente configurando las placas seniles (1). Los mecanismos que determinan la agregación del $A\beta$ *in vivo* son desconocidos, aunque se han propuesto distintos aceleradores del proceso. En la fibrillogénesis es fundamental una alta concentración de $A\beta$ (13, 14). También se ha propuesto la existencia de «semillas» o nucleadores de $A\beta_{1-42}$ que inducirían la agregación del $A\beta_{1-40}$ (15), reacciones redox catalizadas por metales de transición (16) o la acción de chaperones (moléculas que favorecen la adquisi-

Correspondencia: F. J. Muñoz López. Universitat Pompeu Fabra. Dr. Aiguader, 80. 08003 Barcelona. E-mail: paco.munoz@cexs.upf.es.

Recibido el 11-7-00; aceptado el 18-11-00.

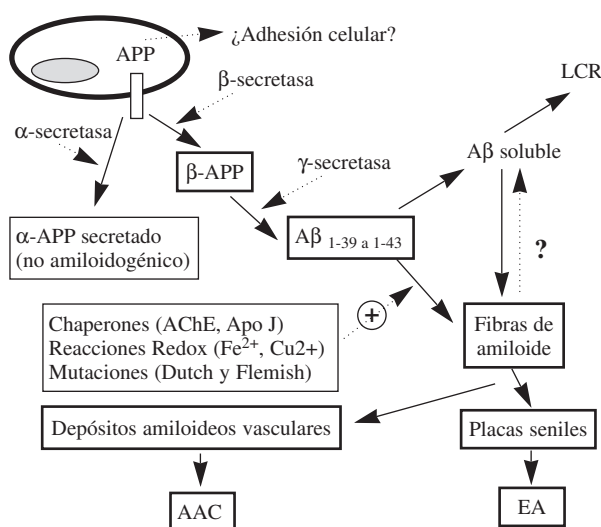


Figura 1. Liberación y agregación del péptido β-amiloide (Aβ). El Aβ deriva de la proteína precursora del amiloide (APP), la cual podría mediar procesos de adhesión celular. La acción enzimática de la α-secretasa sobre el APP libera α-APP al espacio extracelular. Este α-APP no es amiloidogénico porque la secretasa lo escinde directamente por la mitad de la secuencia del Aβ. Sin embargo, el APP puede ser procesado por otra ruta alternativa en la que la β-secretasa produce β-APP, el cual incluye la secuencia íntegra del Aβ. Posteriormente la γ-secretasa liberará el Aβ en fragmentos de 39 a 43 aminoácidos, pero principalmente de 40 y 42 aminoácidos (Aβ₁₋₄₀ y Aβ₁₋₄₂ respectivamente). El Aβ puede permanecer en estado soluble pasando al líquido cefalorraquídeo (LCR) o bien agregarse formando fibras de amiloide insolubles. La formación de fibras de amiloide va a ser desencadenada o acelerada por la presencia de chaperones como la acetilcolinesterasa (AChE) y la apolipoproteína J (Apo J), por metales que actuarían como catalizadores de reacciones de óxido-reducción (Fe²⁺ y Cu²⁺) o por mutaciones de la secuencia del Aβ (mutaciones dutch y flemish). Las fibras de amiloide constituirán las placas seniles que se localizan en el neuropilo de los individuos afectados por la enfermedad de Alzheimer (EA), y en los vasos sanguíneos cerebrales y meníngeos produciendo la angiopatía amiloidea cerebral (AAC).

ción por parte de las proteínas de determinadas estructuras tales como la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (12) o la clusterina (apo J) (17), componentes comunes de las placas seniles (18, 19) (Fig. 1). Experimentos *in vitro* muestran que la AChE no sólo induce la fibrilación del Aβ (12) sino que estos complejos fibrilares Aβ-AChE son altamente neurotóxicos (20, 21). Por otra parte, las mutaciones en el gen que codifica para la secuencia de Aβ también han demostrado un aumento de la capacidad fibrillogénica del mismo (22, 23).

El origen de la neurodegeneración asociada a la EA desata controversias respecto al papel desempeñado por la fibrilación del péptido β-amiloide —componente principal de las placas seniles— y la hiperfosforilación de la proteína *tau* —proteína asociada a los microtúbulos (MAP) cuya hiperfosforilación es causante de la alteración del citoesqueleto que conduce a la formación de los ovillos neurofibrilares—. Esta controversia se basa fundamentalmente en la falta de correlación entre el número de placas seniles en el cerebro y el grado de demencia de los pacientes de EA (24). El grado de demencia encuentra

correlación únicamente con la presencia de ovillos neurofibrilares corticales (25). Sin embargo, la gran mayoría de las publicaciones actuales otorgan el protagonismo de la neurodegeneración asociada a la EA a la acción del Aβ. Su relevancia viene avalada por:

a) Estudios *in vitro* con Aβ que reproducen procesos similares a los observados en tejidos *postmortem* de pacientes de EA (26).

b) Estudios histopatológicos que demuestran una directa correlación entre demencia y la presencia de placas seniles en la corteza entorinal (27), una de las áreas cerebrales más afectadas por la neurodegeneración tipo EA (28).

c) Los casos de aparición temprana de demencia tipo EA presentan mutaciones que afectan directamente a la secuencia aminoacídica del Aβ (23, 29) o al procesamiento del mismo (7, 8).

d) Los individuos con trisomía en el cromosoma 21, donde se sitúa el gen que codifica para el precursor del Aβ (26), desarrollan una demencia en edades adultas con una gran profusión de placas seniles cerebrales (30).

MECANISMOS DE NEUROTOXICIDAD DEL Aβ

El receptor de Aβ

La existencia de un receptor específico que medie la acción del Aβ ha conducido a una exhaustiva búsqueda de posibles candidatos. Sin embargo, la idoneidad de los receptores propuestos es controvertida.

El receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) es uno de los que más expectativas produjo, porque asociaba la existencia de un receptor con mecanismos que involucran al estrés oxidativo derivado de la acción de los productos finales de glicación avanzada (AGEs). El RAGE es un receptor que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que se supone que interviene en otras patologías como las disfunciones vasculares (31). La acción del Aβ a través del RAGE fue propuesta por Yan et al (32), aunque existen evidencias de que la toxicidad del Aβ es independiente del RAGE considerando que células conocidas por ser dianas naturales del Aβ carecen del RAGE y del ARNm que lo codifica (33).

Se ha propuesto la participación del receptor de residuos celulares (SR) presente en la microglía (34). El origen inmunológico de la EA ha sido planteado considerando la existencia de microglía activada que rodea a las placas seniles (35) así como por diversos datos experimentales (36, 37) (Fig. 3). La proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP) presente en la microglía también ha sido involucrada como un posible receptor para Aβ. La LRP une múltiples ligandos que están presentes en las placas seniles tales como la apolipoproteína E (apo E) o la α2-macroglobulina (38) y algunos autores la consideran

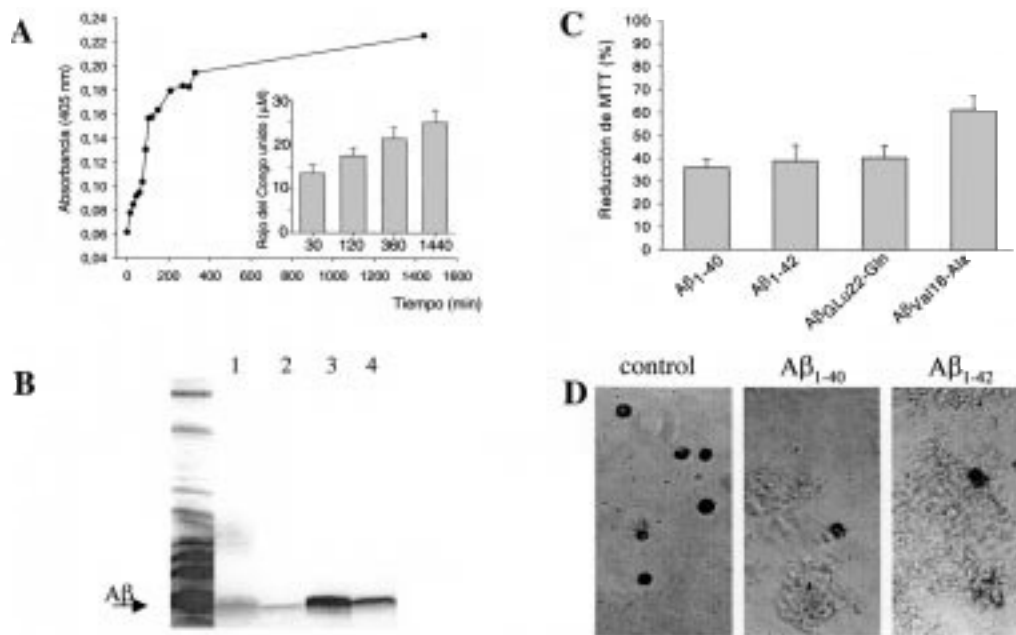


Figura 2. Agregación y toxicidad del Aβ sobre células PC12. El uso del Aβ en pruebas de laboratorio requiere su agregación en fibras de amiloide. Existen diversas técnicas para caracterizar el amiloide como son la turbidimetría (A) o la unión de rojo del Congo (inserto en A). En la turbidimetría el proceso de agregación se sigue mediante la medida de la absorbancia de la muestra a 405 nm en distintos tiempos (21). La unión a rojo del Congo se cuantifica calculando la relación existente entre las absorbancias obtenidas a 480 y 540 nm (21). Posteriormente, las fibras son cuantificadas mediante análisis densitométrico de geles de poliácridamida (SDS-PAGE) (21). En la figura B se muestra un gel SDS-PAGE con las bandas de fibras correspondientes a las secuencias nativas de Aβ₁₋₄₂ (carril 1) y Aβ₁₋₄₀ (carril 2), la variedad dutch del Aβ₁₋₄₀ con una sustitución del glutámico en la posición 22 por una glutamina (carril 3), que confiere a este péptido una extrema capacidad agregante, y un péptido sintético Aβ₁₋₄₀ con una sustitución en la posición 18 de una valina por alanina (carril 4) caracterizado por una baja capacidad fibrillogénica. Estos péptidos fueron incubados a una concentración de 10 μM con células PC12 durante 48 horas (C) y la viabilidad celular obtenida se ha expresado como porcentaje de reducción de un derivado de tiazolio (MTT) siendo los controles sin tratar con amiloide asumidos como el 100%, los que más reducen MTT (21). Los datos representan la media ± error estándar de 6-10 experimentos realizados por triplicado. En la figura D se muestran las células vivas teñidas por la reducción del MTT en los controles y en los tratamientos con 10 μM de Aβ₁₋₄₀ y Aβ₁₋₄₂ respectivamente.

como un marcador de EA (39). Sin embargo, las células neuronales dianas del Aβ carecen de ambos receptores, SR y LRP, sin que este hecho descarte que estén jugando un papel fisiopatológico importante en el progreso de la neurodegeneración en la EA.

Otro receptor propuesto es la glicoproteína 330/megalina (LRP-2), un receptor para múltiples ligandos, entre ellos la apo J. La LRP-2 ha sido propuesta como un internalizador de Aβ, así como un transportador del mismo a través de la barrera hematoencefálica (40), pero no existen evidencias experimentales de que la unión a este receptor desencadene una respuesta de tipo citotóxica.

El candidato más prometedor actualmente es el receptor colinérgico β7-nicotínico (ACh-β7-NR) que ha demostrado la capacidad de unir Aβ, el cual actúa como un antagonista (41), mientras que la nicotina y otros agonistas nicotínicos disminuyen la neurotoxicidad inducida por Aβ (42, 43). El interés de este receptor reside en que se propone un mecanismo de acción específico para el Aβ a la vez que se justifica la degeneración colinérgica característica de la EA. Sin embargo, y en contra de lo esperado, existen estudios que muestran cómo la expresión de ACh-

α7-NR corticales no se ve modificada en individuos con EA frente a controles sin EA (44).

El estrés oxidativo y la EA

Una teoría integradora de los distintos efectos desencadenados por la toxicidad mediada por Aβ es la que involucra directamente al estrés oxidativo (45) (Fig. 3).

Existen evidencias de peroxidación lipídica en cerebros de pacientes de EA (46), así como datos experimentales de lipoperoxidación mediada por Aβ (47) con producción de 4-hidroxynonenal (4-HNE). El 4-HNE se une directamente a la proteína *tau* inhibiendo su defosforilación, y favoreciendo por tanto la aparición de los ovillos neurofibrilares (48). La lipoperoxidación de la membrana plasmática inducida por Aβ alteraría las rutas de traducción de señales (49) e impediría la función de proteínas de membrana tales como la Na⁺/K⁺ ATPasa y la Ca²⁺ ATPasa (47, 50) con la consiguiente pérdida de la homeostasis para tales iones. El resultado final produce un aumento del Ca²⁺ intracelular, convirtiendo a las células en más sensibles a la acción de agentes tóxicos (51). Por otra parte el daño oxi-

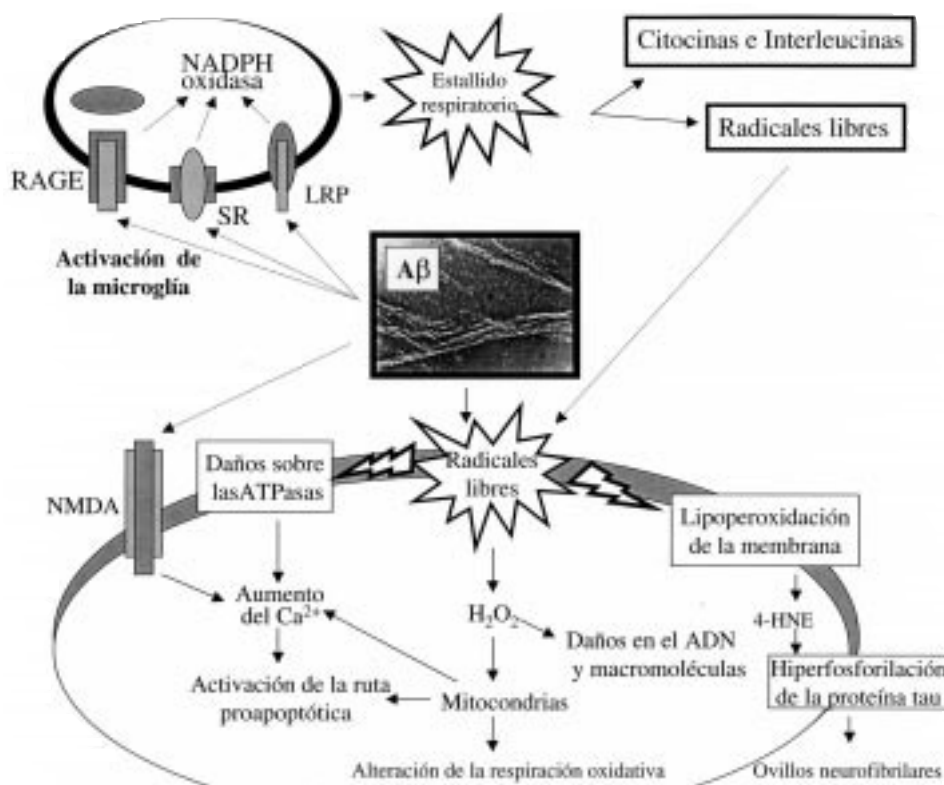


Figura 3. El Aβ y el estrés oxidativo. Las fibras de amiloide producen radicales libres que dañan la membrana de las neuronas. La lipoperoxidación de la membrana conduce a una pérdida de la funcionalidad de la misma, así como a la producción de 4-HNE, el cual se une a la proteína tau favoreciendo su hiperfosforilación, y en consecuencia la aparición de los ovillos neurofibrilares. Por otra parte existe un daño oxidativo sobre las proteínas de membrana que imposibilita el correcto funcionamiento de las ATPasas, con una consecuente pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} citosólico. El aumento del Ca^{2+} iniciaría la señalización de la ruta apoptótica. Asimismo el Aβ ha demostrado tener una acción potenciadora de la acción de agentes excitatorios a través de receptores glutamatérgicos (NMDA) contribuyendo al aumento del Ca^{2+} citosólico. La producción de endoperoxidos (H_2O_2) desencadena daños en las macromoléculas tales como el ADN, así como especialmente sobre las mitocondrias. Los daños sobre las mitocondrias conducen a una disfunción de la cadena respiratoria (con la consecuente pérdida de la carga energética de la célula) así como a la liberación de Ca^{2+} hacia el citosol. Por otra parte, la microglía puede ser activada a través de la unión del Aβ a distintos receptores (RAGE, SR o LRP) produciéndose el estallido respiratorio por la actividad de la NADPH oxidasa. La microglía activada libera diversas interleucinas y citocinas, así como radicales libres que contribuyan al estrés oxidativo sobre las neuronas del parénquima cerebral.

dativo de proteínas se ha descrito a través de la presencia de carbonilos en la EA (52). Igualmente se ha constatado la aparición de daños oxidativos en ARN y ADN en cerebros de pacientes de EA (53, 54).

Más evidencias que implican a los radicales libres en la neurodegeneración asociada a la EA son las siguientes: a) Concentraciones micromolares de Aβ producen H_2O_2 en células en cultivo (55), aunque existe cierta controversia sobre el papel del H_2O_2 en el daño mediado por Aβ (56). b) La catalasa, enzima que convierte H_2O_2 en O_2 y H_2O , bloquea la toxicidad inducida por Aβ (55). c) Las células resistentes a la toxicidad del Aβ son también resistentes a la toxicidad de H_2O_2 (55, 57). d) Células de neuroblastoma (Neuro 2a) resistentes a Aβ, glutamato y H_2O_2 , presentan una alta actividad de la glutatión peroxidasa (57). e) Las células neuronales de individuos con trisomía 21 presentan evidencias de un extendido daño oxidativo (58). f) Antioxidantes como el 17β-estradiol, la vitamina E o la melatonina han demostrado ser efectivos neuroprotectores frente al Aβ (59-62).

APOPTOSIS Y Aβ

Aunque algunos trabajos sugieren que la toxicidad del Aβ induce necrosis (55), existen múltiples evidencias de procesos apoptóticos mediados por Aβ *in vitro* (63, 64), y en cerebros de pacientes de EA (52). La relación entre apoptosis y estrés oxidativo a través de la acción del Aβ fueron sugeridos por Guo et al (64) en un modelo de EA de aparición temprana. Ensayos *in vitro* informan que tanto el Aβ₁₋₄₀ como el Aβ₁₋₄₂ disminuyen la expresión de *bcl-2*, una proteína clave antiapoptótica, mientras que el Aβ₁₋₄₂ aumenta la expresión de *bax*, proteína proapoptótica (65). Otra molécula relacionada con apoptosis es el factor de transcripción NF-κβ (66), el cual se trasloca al núcleo en neuronas tratadas con Aβ (67). Cuando se induce la expresión de NF-κβ, se observa una mayor resistencia a la apoptosis mediada por Aβ₁₋₄₀, Aβ₂₅₋₃₅ y $FeSO_4$ (48). Por otra parte, la inducción de una proteína de shock térmico como es la hemoxygenasa-1 (HO-1) —ARNm y proteína— ha sido demostrada en neocórtex y en vasos

cerebrales de EA, en asociación con los ovillos neurofibrilares (68). La expresión en cerebro de HO-1 aumenta bajo condiciones críticas que comprometen a la supervivencia neuronal, tales como la isquemia (69), sugiriendo que esta enzima puede estar relacionada con la protección de las células neuronales frente al daño oxidativo y la apoptosis (70).

PAPEL DE LOS ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes presentan efectos neuroprotectores sobre la toxicidad amiloidea. Dentro de los antioxidantes descritos destacan principalmente la vitamina E (59) y hormonas como los estrógenos (60, 62) y la melatonina (71). La vitamina E es un antioxidante con propiedades neuroprotectoras frente a la toxicidad inducida *in vitro* por A β (59) previniendo la peroxidación lipídica (72) y actuando como un atrapador de radicales libres (73). Tratamientos con vitamina E confirman efectos beneficiosos en pacientes con EA (74).

La hormona pineal melatonina es un potente antioxidante natural (75, 76), tanto por su capacidad para atrapar radicales libres como por aumentar los niveles endógenos de enzimas antioxidantes (77). Existen estudios que sugieren que la melatonina actúa también como un antifibrillogénico frente al A β (78) y protege a las células frente a la citotoxicidad inducida por A β (71).

LOS ESTRÓGENOS Y LA EA

Estudios epidemiológicos

Los datos epidemiológicos muestran que las mujeres tienen una mayor prevalencia de EA que los hombres (79). Este hecho se supone que está en relación con la disminución de los estrógenos en mujeres post-menopáusicas. Aquellas que son sometidas a un tratamiento de reemplazamiento estrogénico muestran una disminución en el riesgo de padecer EA (80), aunque existe cierta controversia al respecto (81, 82).

Actividad antioxidante

Los efectos antioxidantes del 17 β -estradiol (17 β -E) han sido descritos con anterioridad a su implicación neuroprotectora en la EA (83). El 17 β -E inhibe la peroxidación de las membranas inducida por A β a la vez que estabiliza la homeostasis del Ca²⁺ (84). Se supone que la acción antioxidante del 17 β -E radicaría en su estructura química que presenta un grupo hidroxilo en un anillo aromático mesomérico (85) al igual que la vitamina E. Esta actividad protectora es independiente de la vía clásica a través de la unión a sus receptores, ya que los efectos neuroprotectores se manifiestan de forma temprana (62), han sido ob-

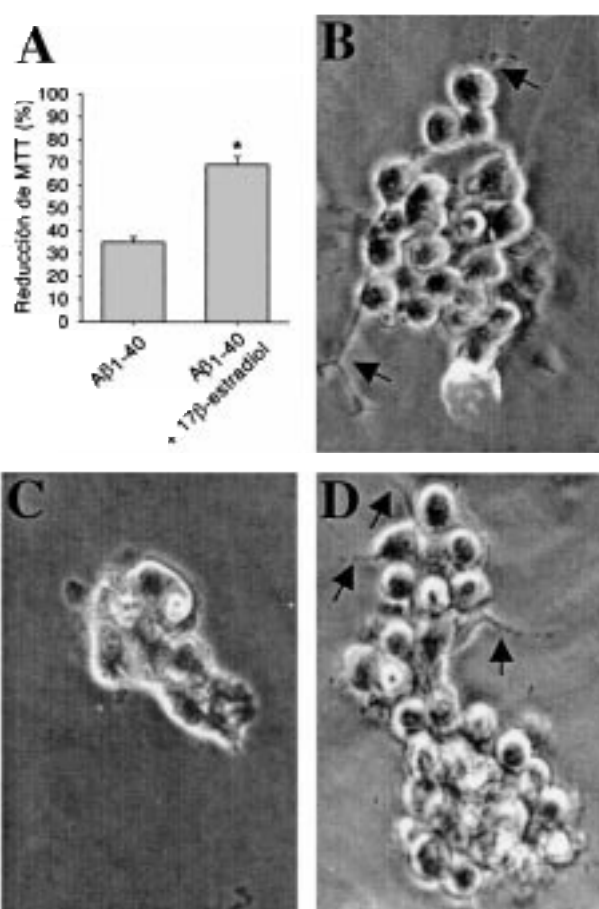


Figura 4. Papel protector del 17 β -estradiol sobre la toxicidad inducida por fibras de A β en células PC12. Células PC12 fueron incubadas durante 48 horas con 10 μ M de fibras de A β 1-40 en ausencia o presencia de 0,1 μ M de 17 β -estradiol (A). La viabilidad celular se expresa como porcentaje de reducción de MTT (62). Los datos representan la media \pm error estándar de seis experimentos realizados por triplicado. * $p < 0,05$ (t de Student). En otro diseño experimental, las células PC12 fueron diferenciadas con NGF y se observaron los cambios morfológicos inducidos por fibras de A β y el papel neuroprotector del 17 β -estradiol. Los controles (B) no fueron tratados con ningún agente, observándose claramente el perímetro de células turgentes, así como la emisión de neuritas (flechas). El tratamiento con 10 μ M de fibras de A β (C) produce la desaparición de las neuritas, así como deteriora las células hasta hacerlas indistinguibles. Cuando las células son coincubadas con 10 μ M de fibras de A β y 0,1 μ M de 17 β -estradiol (D) las neuritas son preservadas y las células presentan una morfología definida y turgente.

servados con el 17 α -E (57, 60), no se inhiben con tamoxifeno (86) y son independientes de su naturaleza esteroide (62) (Fig. 4).

Efectos sobre el metabolismo del amiloide y neurotransmisores

Los estrógenos inducen la síntesis de colinacetiltransferasa (AChT), lo que favorece la disponibilidad de acetilcolina (87), la capacidad de promover la formación de APP no amiloidogénico (88), y la disminución de la pro-

ducción de A β soluble (89). Este último efecto, también observado con testosterona (90), considerado como un resultado de la conversión en estrógeno por la aromatasas, sugiere la modulación de las secretasas y/o de las presenilinas por los estrógenos. Además el 17 β -E ha demostrado ser un neuroprotector frente a la toxicidad amiloidea mediante su unión a los ACh- α 7-N (91).

Estrógenos y neurotrofia

Los estrógenos han demostrado la capacidad de aumentar significativamente el crecimiento de neuritas en neuronas colinérgicas (92), inducir interacciones interneuronales (93) o aumentar el número de interneuronas embrionarias en la zona CA1 del hipocampo (94), zona hipocámpal que muestra daños severos en los pacientes de EA (95). Los mecanismos que intervendrían en esta actividad neurotrófica de los estrógenos se supone que son mediados por su interacción con las neurotrofinas. Los receptores de estrógenos y neurotrofinas colocan en neuronas colinérgicas del cerebro anterior proponiéndose una sinergia entre ambos (96). También se ha descrito un aumento del ARNm del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) tras el tratamiento con estrógenos (97). Se desconoce si el efecto neurotrófico de los estrógenos está relacionado con la activación de los receptores de neurotrofinas o con la síntesis de las mismas, o bien se debe a que los receptores nucleares de estrógenos disparan la transcripción de genes inicialmente controlados por las neurotrofinas.

CONSIDERACIONES FINALES

Aunque en los últimos años se ha avanzado en la comprensión de los mecanismos inherentes a la toxicidad amiloidea, aún no existe una hipótesis totalmente satisfactoria que explique el origen de la EA en los casos esporádicos (más del 95%) y delimite claramente cuál es el factor desencadenante de la neurodegeneración de las vías colinérgicas. Los receptores ACh- α 7-N o una mayor desprotección antioxidante en las neuronas colinérgicas están entre las hipótesis más atractivas actualmente, pero la existencia de otros mecanismos protagonistas no se puede descartar, así como tampoco el efecto sumatorio de la activación de la microglía, la presencia de la apo E4, un mayor papel de la hiperfosforilación de la proteína tau, o la interacción con la señalización de rutas que inicialmente intervienen en el desarrollo como son *Notch* y *Wnt/wingless*.

Atendiendo a la neuroprotección, los estrógenos se presentan altamente prometedores por el amplio espectro de acciones que promueven, pero los efectos indeseables de los mismos sobre útero y mama obligarían al diseño de moléculas más específicas en su acción neuroprotectora. Igualmente, existe una plétora de compuestos antioxidantes más allá de la vitamina E que podrían resultar eficaces en la terapéutica de la EA, entre los que destacan los de-

rivados del *Ginkgo biloba* y los polifenoles.

BIBLIOGRAFÍA

1. Muller-Hill B, Beyreuther K. Molecular biology of Alzheimer's disease. *Annu Rev Biochem* 1989;58:287-307.
2. Jacobs RW, Farivar N, Butcher LL. Plaque-like lesions in the basal forebrain in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1985;56:347-51.
3. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987;325:733-36.
4. Coulson EJ, Barrett GL, Storey E, Bartlett PF, Beyreuther K, Masters CL. Down-regulation of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease by antisense oligonucleotides reduces neuronal adhesion to specific substrata. *Brain Res* 1997;770:72-80.
5. Saitoh T, Sundsmo M, Foch JM, Kimura N, Cole G, Schubert D, et al. Secreted form of amyloid- β -protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 1989;58:615-22.
6. Selkoe DJ. The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 1998;8:447-53.
7. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-Tur J, et al. Increased amyloid- β 42 (43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 1996;383:710-3.
8. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Suzuki N, Bird TD, et al. Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996;2:864-70.
9. Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA. Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2092-6.
10. Luo Y, Sunderland T, Roth GS, Wolozin B. Physiological levels of beta-amyloid peptide promote PC12 cell proliferation. *Neurosci Lett* 1996;217:125-8.
11. Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. Aggregation-related toxicity of synthetic beta-amyloid protein in hippocampal cultures. *Eur J Pharmacol* 1991;207:367-8.
12. Inestrosa NC, Álvarez A, Pérez CA, Moreno FD, Vicente M, Linker C, et al. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 1996;16:881-91.
13. Cai XD, Golde TE, Younkin SG. Release of excess amyloid β protein from a mutant amyloid β protein precursor. *Science* 1993;259:514-6.
14. Le W, Xie WJ, Nyormoi O, Ho BK, Smith RG, Appel SH. beta-Amyloid1-40 increases expression of beta-amyloid precursor protein in neuronal hybrid cells. *J Neurochem* 1995;65:2373-6.
15. Harper JD, Lansbury PT. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Ann Rev Biochem* 1997;66:385-407.
16. Dyrks T, Dyrks E, Hartmann T, Masters C, Beyreuther K. Amyloidogenicity of β A4 and β A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation. *J Biol Chem* 1992;267:18210-17.
17. Oda T, Wals P, Osterburg HH, Johnson SA, Pasinetti GM, Morgan TE, et al. Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid β -peptide (A β 1-42) and forms slowly sedimenting A β complexes that cause oxidative stress. *Exp Neurol* 1995;136:22-31.
18. Mesulam MM, Geula C, Moran MA. Anatomy of cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease: effect of physostigmine and tetrahydroaminoacridine on plaques and tangles. *Ann Neurol* 1987;22:683-91.
19. McGeer RL, Kawamata T, Walker DG. Distribution of clusterin in Alzheimer brain tissue. *Brain Res* 1992;579:337-41.

20. Alvarez A, Alarcon R, Opazo C, Campos EO, Muñoz FJ, Calderon FH, et al. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid- β peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J Neurosci* 1998;18:3213-23.
21. Muñoz FJ, Inestrosa NC. Neurotoxicity of acetylcholinesterase-amyloid- β -peptide aggregates is dependent on the type of A β -peptide and the AChE concentration present in the complexes. *FEBS Lett* 1999;450:205-9.
22. Wisniewski T, Ghiso J, Frangione B. Peptides homologous to the amyloid protein of Alzheimer's disease containing a glutamine for glutamic acid substitution have accelerated amyloid fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;179:1247-54.
23. Wang Z, Natta R, Berliner JA, van Duinen SG, Vinters HV, Felsenblum WI. Toxicity of Dutch (E22Q) and Flemish (A21G) mutant amyloid β proteins to human cerebral microvessel and aortic smooth muscle cells. *Stroke* 2000;31:534-8.
24. Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, et al. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol* 1988;23:138-44.
25. McKee AC, Kosik KS, Kowall NW. Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1991; 30:156-65.
26. Selkoe DJ. Amyloid- β -protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1996;271:18295-8.
27. Cummings BJ, Pike CJ, Shankle R, Cotman CW. β -amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996;17:921-33.
28. Xu Y, Jack CR Jr, O'Brien PC, Kokmen E, Smith GE, Ivnik RJ, et al. Usefulness of MRI measures of entorhinal cortex versus hippocampus in AD. *Neurology* 2000;54:1760-7.
29. Timmers WF, Tagliavini F, Haan J, Frangione B. Parenchymal preamyloid and amyloid deposits in the brains of patients with hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type. *Neurosci Lett* 1990;118:223-6.
30. Armstrong RA. Factors determining the morphology of β -amyloid deposits in Down's syndrome. *Neurodegeneration* 1995;4:179-86.
31. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 84:489-97.
32. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Fother A, et al. FAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996;382:685-91.
33. Liu Y, Dargusch R, Schubert D. β -amyloid toxicity does not require FAGE protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:37-40.
34. Paresce DM, Ghosh BN, Maxfield FR. Microglial cell internalize aggregates of Alzheimer's disease amyloid β -protein via a scavenger receptor. *Neuron* 1996;17:553-65.
35. McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 1995;21:195-218.
36. McGeer PL, McGeer EG. Mechanisms of cell death in Alzheimer disease-immunopathology. *J Neural Transm Suppl* 1998;54:159-66.
37. Bianca VD, Dusi S, Bianchini E, Dal Pra I, Rossi F. β -amyloid activates the O-2 forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1999;274:15493-9.
38. Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, et al. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 1998;19:357-60.
39. Kang DE, Saitoh T, Chen X, Xia Y, Masliah E, Hansen LA, et al. Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 1997;49:56-61.
40. Zlokovic BV, Martel CL, Matsubara E, McComb JG, Zheng G, McCluskey RJ, et al. Glycoprotein 330/ megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer's disease amyloid- β at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4229-34.
41. Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 2000;275:5626-32.
42. Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Kimura J, Kume T, Kochiyama H, et al. Nicotinic receptor stimulation protects neurons against β -amyloid toxicity. *Ann Neurol* 1997;42:159-63.
43. Zamani MR, Allen YS, Owen GP, Gray JA. Nicotine modulates the neurotoxic effect of β -amyloid protein (25-35) in hippocampal cultures. *Neuroreport* 1997;8:513-7.
44. Perry E, Martín-Ruiz C, Lee M, Griffiths M, Johnson M, Piggott M, et al. Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing, Alzheimer and Lewy body diseases. *Eur J Pharmacol* 2000;393:215-22.
45. Miranda S, Opazo C, Larrondo LF, Muñoz FJ, Ruiz F, Leighton F, Inestrosa NC. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2000;62:633-48.
46. Lovell MA, Ehmann WD, Mattson MP, Markesbery WR. Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997;18:457-61.
47. Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP. A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid β -peptide. *J Neurochem* 1997;68:255-64.
48. Mattson MP. Cellular actions of β -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 1997;77:1081-32.
49. Kelly JF, Furukawa K, Barger SW, Rengen MR, Mark RJ, Blanc EM, et al. Amyloid β -peptide disrupts carbachol-induced muscarinic cholinergic signal transduction in cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:6753-8.
50. Mark RJ, Hensley R, Butterfield DA, Mattson MP. Amyloid β -peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca^{2+} homeostasis and cell death. *J Neurosci* 1995;15:6239-49.
51. Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 1992;12:376-89.
52. Smith MA, Perry G, Fitch FL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, Kowall N. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 1996;382:120-1.
53. Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, Smith MA. FNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1999;19:1959-64.
54. Lovell MA, Gabbita SP, Markesbery WR. Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J Neurochem* 1999;72:771-6.
55. Behl C, Davis J, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* 1994;77:817-27.
56. Zhang Z, Rydel RE, Drzewiecki CJ, Fuson K, Wright S, Wogulis M, et al. Amyloid β -mediated oxidative and metabolic stress in rat cortical neurons: no direct evidence for a role for H_2O_2 generation. *J Neurochem* 1996;67:1595-606.
57. Calderón FH, Bonnefont A, Muñoz FJ, Fernández V, Videla LA, Inestrosa NC. PC12 and Neuro 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase-amyloid complexes, amyloid 25-35 fragment, glutamate, and hydrogen peroxide. *J Neurosci Res* 1999;56:620-31.
58. Busciglio J, Yankner BA. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* 1995; 378:776-9.
59. Behl C, Davis J, Cole GM, Schubert D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid β protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186:944-50.

60. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 1997;51:535-41.
61. Pappolla MA, Sos M, Omar FA, Bick RJ, Hickson-Bick DL, Reiter RJ, et al. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. *J Neurosci* 1997;17:1683-90.
62. Bonnefont AB, Muñoz FJ, Inestrosa NC. Estrogen protects neuronal cells from the cytotoxicity induced by acetylcholinesterase-amyloid complexes. *FEBS Lett* 1998;441:220-4.
63. Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW. Apoptosis is induced by β -amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7951-5.
64. Guo Q, Sopher BL, Furukawa K, Pham DG, Robinson N, Martin GM, Mattson MP. Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neuronal cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid β -peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 1997;17:4212-22.
65. Paradis E, Douillard H, Koutroumanis M, Goodyer C, LeBlanc A. Amyloid- β -peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons. *J Neurosci* 1996;16:7533-9.
66. Kitamura Y, Shimohama S, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y, Taniguchi T. Alteration of transcription factors NF- κ B and STAT1 in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett* 1997;237:17-20.
67. Kaltschmidt B, Uhrek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C. Transcription factor NF- κ B is activated in primary neurons by amyloid- β -peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2642-7.
68. Smith MA, Kutty RK, Fitchey RL, Yan SD, Stern D, Chader GJ, et al. Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1994;145:42-7.
69. Takeda A, Kimpara T, Onodera H, Itoyama Y, Shibahara S, Kogure K. Regional difference in induction of heme oxygenase-1 protein following rat transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett* 1996;205:169-72.
70. Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res* 1991;51:974-8.
71. Pappolla MA, Chyan YJ, Boeggeler B, Frangione B, Wilson G, Ghiso J, Reiter RJ. An assessment of the antioxidant and the anti-amyloidogenic properties of melatonin: implications for Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2000;107:203-31.
72. Koppal T, Subramaniam R, Drake J, Prasad MR, Dhillon H, Butterfield DA. Vitamin E protects against Alzheimer's amyloid peptide- (25-35) induced changes in neocortical synaptosomal membrane lipid structure and composition. *Brain Res* 1998;786:270-3.
73. Naiki H, Hasegawa K, Yamaguchi I, Nakamura H, Gejyo F, Nakakuki K. Apolipoprotein E and antioxidants have different mechanism of inhibiting Alzheimer's β -amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry* 1998;37:17882-9.
74. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, et al. A controlled trial of selegiline, β -tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* 1997;336:1216-22.
75. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidant defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997;29:363-72.
76. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin: an emerging mystery. *Biochem Pharmacol* 1998;56:1265-72.
77. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998;56:359-84.
78. Pappolla M, Bozner P, Soto C, Shao H, Bobakis NK, Zagorski M, et al. Inhibition of Alzheimer β -fibrillogenesis by melatonin. *J Biol Chem* 1998;273:1785-8.
79. Aronson MK, Ooi WL, Morgenstern H, Hafner A, Masur D, Crystal H, et al. Women, myocardial infarction, and dementia in the very old. *Neurology* 1990;40:1102-6.
80. Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, et al. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;348:429-32.
81. Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, et al. Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. Alzheimer's Disease Cooperative Study. *JAMA* 2000;283:1007-15.
82. Shaywitz BA, Shaywitz SE. Estrogen and Alzheimer disease: plausible theory, negative clinical trial. *JAMA* 2000;283:1055-6.
83. Sugioka K, Shimosegawa Y, Nakano M. Estrogen as natural antioxidant of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett* 1987;210:37-9.
84. Keller JN, Germeyer A, Begley JG, Mattson MP. 17- β -estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na⁺/K⁺-ATPase activity, glucose transport, and glutamate transport induced by amyloid β -peptide and iron. *J Neurosci Res* 1997;50:522-30.
85. Moosmann B, Behl C. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8876-2.
86. Green PS, Bishop J, Simpkins JW. 17 α -estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J Neurosci* 1997;17:511-5.
87. Luine VN. Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific basal forebrain nuclei and projection areas of female rats. *Exp Neurol* 1985;89:484-90.
88. Jaffe AB, Torand-Allerand CD, Greengard P, Gandy SE. Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid- β -precursor protein. *J Biol Chem* 1994;269:13065-8.
89. Xu H, Gouras GK, Greenfield JP, Vincent B, Naslund J, Mazarrelli L, et al. Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer β -amyloid peptides. *Nat Med* 1998;4:447-51.
90. Gouras GK, Xu H, Gross RS, Greenfield JP, Hai B, Wang R, Greengard P. Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1202-5.
91. Svensson AL, Nordberg A. Beta-estradiol attenuate amyloid beta-peptide toxicity via nicotinic receptors. *Neuroreport* 1999;10:3485-9.
92. Honjo H, Tamura T, Matsumoto Y, Kawata M, Ogino Y, Tanaka K, et al. Estrogen as a growth factor to central nervous cells. Estrogen treatment promotes development of acetylcholinesterase-positive basal forebrain neurons transplanted in the anterior eye chamber. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;41:633-5.
93. Lustig RH. Sex hormone modulation of neural development in vitro. *Horm Behav* 1994;28:383-95.
94. McEwen BS, Alves SE, Bulloch K, Weiland NG. Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. *Neurology* 1997;48:S8-15.
95. Bobinski M, de Leon MJ, Tarnawski M, Wegiel J, Reisberg B, Miller DC, Wisniewski HM. Neuronal and volume loss in CA1 of the hippocampal formation uniquely predicts duration and severity of Alzheimer disease. *Brain Res* 1998;805:267-9.
96. Toran-Allerand CD, Miranda RC, Bentham WD, Sohrabji F, Brown TJ, Hochberg RB, MacLusky NJ. Estrogen receptors colocalize with low-affinity nerve growth factor receptors in cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:4668-72.
97. Sohrabji F, Miranda RC, Toran-Allerand CD. Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11110-4.