ISSN: 1988-2688 http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1

http://dx.doi.org/10.5209/rev_RCCV.2012. v6.n2.41087

Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2012 6(2):58-81

VIH-1 Y ALZHEIMER: ¿UNA CONEXIÓN REAL? HIV-1 AND ALZHEIMER: A REAL CONECTION? González R, Álvarez S, Muñoz-Fernández MA H.G.U. Gregorio Marañón. Madrid, España. Correspondencia del autor: rikigonz86@gmail.com

Revista Complutense de Ciencias Veterinarias

RESUMEN

La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) causa alteraciones neurológicas que son más graves y frecuentes como consecuenia del envejecimieno de la población. Este daño se asocia a la disfunción neuronal, que patológicamente se caracteriza como una pérdida de sinapsis, acortamiento de neuritas, anormalidades dendríticas, así comon pérdida neuronal. A este respecto, varios estudios han observado un aumento significativo de placas amiloides en cerebros de individuos infectados por el VIH en comparación con controles sanos, así como en individuos VIH positivos que habían estado expuestos a la terapia antirretroviral. En este trabajo se ha investigado el efecto de la combinación del péptido β -amiloide e infección por VIH-1 en diferentes células del sistema nervioso. El pretratamiento de las células gliales y neuronales provoca un incremento en la replicación viral, así como el tratamiento combinado virus y formas de oligómeros y fibrillas producen un incremento en las especies reactivas de oxígeno y de la forma activa de la enzima proapoptótica caspasa-3, en astrocitos. Lo que podría traducirse como un incremento de neurotoxicidad y depositos de β -amiloide en el cerebro infectado.

Palabras clave:*VIH-1, beta-amiloide, neuropatogénesis, especies reactivas de oxígeno, caspasa-3*

ABSTRACT

Infection by human immunodeficiency virus (HIV) promotes neurological alterations which are more severe and frequents, due to the aging of the population. This dementia is associated

to neuronal disfunction, and is pathologicaly characterized as sinapse lose, dendritic abnormalities and neuronal death. Supporting this, several studies have shown a significant increase of the amyloid plaques in infected HIV brains compared to healthy controls as well as HIV positive individuals which were exposed to antiretroviral therapy. In the present study we have investigated the combined effect of amyloid- β and HIV-1 infection in different nervous cells. When we pretreated glial cells and neurons we found an increased viral replication, as well as the combined treatment of HIV and oligomeric and fibrils forms of amyloid- β which produce glial increased levels of oxygen reactive species and the proapoptotic enzyme caspase-3. These observations could be traduced in an increased neurotoxicity and amyloid- β deposits in infected brains.

Palabras clave: HIV-1, beta-amyloid, neuropathogenesis, oxygen reactive species, caspase-3

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central (SNC) constituye un importante reservorio para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) siendo el daño neurológico asociado a la infección por el VIH un grave problema clínico entre individuos con una infección prolongada (Sacktor et al., 2002). A pesar del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA), introducido en el año 1996, el VIH no puede ser erradicado del organismo, existiendo reservorios anatómicos y celulares donde el virus persiste y, a pesar de la terapia, continúa causando daños (Hazleton et al., 2010). Actualmente, y gracias a la TARGA, los individuos infectados viven más tiempo, por lo que la prevalencia de disfunciones cognitivas y motoras se está incrementando (Anthony et al., 2005, McArthur, 2004).

El VIH atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) y penetra en el sistema nervioso precozmente en un periodo de tiempo que va entre pocos días a semanas postinfección en la periferia (Davis et al., 1992). Una vez en el SNC la principal diana celular del virus son los macrófagos y la microglía, pero también puede infectar, mediante una vía independiente de linfocitos T CD4, células macrogliales como astrocitos y células endoteliales del endotelio vascular cerebral, las cuales representan el componente principal de la BHE (Bissel and Wiley, 2004). En cuanto al daño neuronal, la mayoría de los trabajos postulan que es debido a mecanismos inflamatorios y condiciones de estrés originados por otros tipos celulares residentes en el SNC infectados y/o activados, pero no por el contacto directo del VIH-1 con la célula neuronal. A este respecto, algunas publicaciones han mostrado que los progenitores neuronales pueden ser infectados, jugando un papel eventual como reservorio viral (Lawrence et al., 2004).

Uno de los marcadores neuropatológicos en la enfermedad de Alzheimer es la formación de placas neuríticas de péptido beta-amiloide (β A). Las placas neuríticas se forman a partir de β A1-40 y β A1-42 extracelular, que rodea neuritas distróficas, microglía reactiva y astrocitos, encontrándose la mayoría del β A de estas placas en forma de fibrillas insolubles (Selkoe, 2004), aunque se puede encontrar β A en diferentes formas como monómeros, dímeros u oligómeros solubles y fibrillas insolubles (Pulliam, 2009). El β A difuso soluble podría ser el iniciador principal de la neurodegeneración y los dímeros u oligómeros de β A podrían usarse para predecir una disfunción neurocognitiva que conduzca a la enfermedad de Alzheimer (Cummings et al., 1996).

Las neuronas son consideradas la principal fuente de β A tanto en cerebros sanos como con enfermedad de Alzheimer (Zhao et al., 1996). Dentro del SNC entre poblaciones celulares específicas las neuronas expresan niveles mayores de BACE-1 (la β -secretasa encargada de iniciar la generación del péptido β A) que las células gliales, indicando, por tanto, que las células gliales, como los astrocitos, son menos significativas a la hora de generar β A bajo condiciones normales (Vassar et al., 1999). No obstante, es importante remarcar que la enfermedad de Alzheimer podría necesitar décadas en su desarrollo y progresión, y el número de astrocitos es cinco veces mayor que el de neuronas en el cerebro (Sofroniew and Vinters, 2010). Por lo que cabe la posibilidad de que la generación de β A derivado de astrocitos, aunque con una producción basal menor por célula, pudiera contribuir significativamente a los niveles cerebrales de β A agravando la patología amiloide a lo largo de la enfermedad de Alzheimer.

Distintas evidencias indican una mayor deposición de β A en el cerebro de pacientes infectados por el VIH-1 (Esiri et al., 1998) y las neuronas de pacientes infectados con síntomas neurológicos presentan una mayor expresión de la proteína precursora amiloide (APP) (Mankowski et al., 2002). Presentando mayores niveles de β A los individuos que presentan complejo demencia SIDA (CDS) en comparación con individuos-VIH sin alteraciones neurológicas. Por último, se ha observado que el incremento en los niveles de β A no correlaciona con la edad, demencia o niveles de linfocitos T CD4, sino que el número de placas difusas de β A correlaciona con la duración de la infección por VIH (Rempel and Pulliam, 2005). Los mecanismos que subyacen a las interacciones entre el β A y la infección por el VIH-1 no se entienden completamente, pero varios factores y/o vías parecen estar implicados. Se ha postulado que el envejecimiento, el propio virus, y los efectos secundarios

del tratamiento antirretroviral, pueden contribuir a la acumulación de amiloide neuronal en el espacio perivascular (Green et al., 2005).

Proteínas virales, como Tat o gp120 pueden promover respuestas proinflamatorias a nivel de la BHE (Toborek et al., 2005) y el péptido amiloide por sí mismo es un factor proinflamatorio que puede desencadenar respuestas neuroinflamatorias (Rogers et al., 2007) y alterar la integridad del endotelio (Blanc et al., 1997). Se ha visto que elevados niveles de βA durante la causan neuroinflamación y neurodegeneración, conduciendo a demencia en última instancia, a través de una cascada de eventos neurotóxicos (Holtzman et al., 2011). Los procesos neuroinflamatorios resultantes suelen implicar la liberación por parte de células gliales activadas de un grupo de moléculas potencialmente neurotóxicas, incluyendo especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico, citocínas y quimioquínas proinflamatorias (IL-1β, TNF-α, IFN-). Niveles excesivos de estos mediadores así como un estado crónico de inflamación inducen daño neuronal en prácticamente cualquier enfermedad neurodegenerativa, como la enfermedad de Alzheimer, a través de diversos mecanismos (McGeer and McGeer, 1995). Por ejemplo, los mediadores proinflamatorios conducen a la activación astrocitaria produciéndose la expresión de proteína acida fibrilar glial (GFAP), un filamento intermedio de tipo III, identificado por primera vez en astrocitos (Eng, 1985) que, aunque no es esencial para la apariencia y función normales de la mayoría de los astrocitos en el SNC sano, se encuentra sobre expresada durante los procesos de astrogliosis reactiva y la formación de cicatrices gliales, que ocurren como respuesta a la mayoría de daños cerebrales (Eddleston and Mucke, 1993, Pekny and Pekna, 2004). También el estrés oxidativo se ha asociado a la toxicidad inducida por βA , dado que se estimula la producción de ROS (calcio dependiente) y disminuye los niveles de glutatión (GSH), en astrocitos pero no en neuronas (Abramov et al., 2004), mientras que la infección por el VIH-1 generaría un incremento en especies ROS seguramente mediado por la proteína Nef (Acheampong et al., 2009). La proteína viral Nef, de manera dosis dependiente, juega un papel principal en la despolarización de la mitocondria, la presencia de Nef en astrocitos causa una reacción de oxidación en la mitocondria, que podría disparar la actividad de las caspasas conduciendo a la apoptosis y muerte celular (Rasola et al., 2001).

Es posible que a pesar de las diferentes patologías, la neurodegeneración y la demencia en la enfermedad de Alzheimer y el CDS puedan tener mecanismos moleculares comunes que pueden estar vinculados a la inducción de las respuestas crónicas neuroinflamatorias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas celulares y stock viral

Se han empleado células U87 (glioblastoma humano de ATCC HTB-14) que expresan los correceptores CCR5 y CXCR4, se creció de forma rutinaria en Dulbecco`s modified Eagle medium (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, 1% penicilina/estreptomicina y L-glutamina 2 mM a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Y células SK-N-MC (neuroblastoma humano de ATCC HTB-10) que también expresan los correceptores CCR5 y CXCR4, y se creció en medio RPMI 1640 (Biochrom KG Seromed, Berlín, Alemania), suplementado con FBS al 10%, 1% de penicilina/estreptomicina y L-glutamina 2mM a 37°C y 5% CO₂. Además, se emplearon aislados virales establecidos: una cepa T-trópica VIH-1_{NL4.3} (X4; SI/RA) y una cepa monocitotrópica VIH-1_{Bal} (R5; NSI/LB).

Proteínas y reactivos

 β A (1-42) de Invitrogen y GenScript. Azidotimidina (AZT) y LPS fueron de Sigma-Aldrich, St Louis, MO. Enfuvirtide (T20) fue comprado a Roche (Palo Alto, CA). Las proteínas virales gp120 y Tat, así como los antagonistas de los correceptores virales AMD3100 y TAK779 fueron suministrados por el NIH. Los anticuerpos anti-caspasa3 y anti-GFAP fueron suministrados por Cell Signaling.

Monómero, oligómeros y fibrillas

Se trabajó con tres conformaciones diferentes, en las que podemos encontrar el péptido β A en el cerebro. Con el β A de Invitrogen se obtuvo la forma monomérica de β A (1-42), siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Mientras que con el β A de GenScript se llevó a cabo un proceso de solubilización y agregación desarrollado por Dahlgren K N *et al.* 2002 para la preparación de β A (1-42) oligomérico y fibrilar.

Ensayo de muerte celular (MTT)

Se realizaron ensayos de muerte celular tanto directa como indirecta sobre líneas celulares U87 y SK-N-MC. En células sin infectar o infectadas con VIH- $1_{NL4.3}$ (200ng/10⁶ células), las cuales se trataron con las formas de monómeros, oligómeros y fibrillas del βA a diferentes concentraciones, realizándose el ensayo MTT a las 24, 48 y 72h.

Cultivos celulares fueron infectados con VIH-1_{NL4.3} durante 2h, a una concentración de

200ng/10⁶ células, posteriormente se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y se trataron 2h con las distintas formas del β A, lavando también con PBS. Transcurrido el tiempo establecido se llevó a cabo la acción de revelar añadiendo primero 200 µL de Opti-MEM (Gibco, Invitrogen, NZ) y 20 µL de MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, USA) a 5 mg/mL por pocillo, incubación de 2-4h a 37°C y se reveló con 200 µL de DMSO, midiendo absorbancia a 550 nm en lector de placas (OpsysMR de Dynex). Para los ensayos de muerte celular indirecta tratamos los cultivos de células U87 infectadas con la forma monomérica del péptido amiloide y con proteínas virales, fármacos antivirales (AZT y T20) o antagonistas de los correceptores virales AMD3100, para el aislado VIH-1_{NL4.3} y TAK779 para el aislado VIH-1_{Bal}. Tras 24h de tratamiento se emplearon 200 µL del sobrenadante, el cual se puso en contacto con células SK-N-MC durante 24h. Para el revelado se siguió el mismo procedimiento descrito.

El grupo de trabajo estableció que los resultados con diferencias del 20% en la viabilidad celular ya pueden ser considerados como muerte celular.

Medida de la replicación viral

Con el fin de ver replicación viral en células U87 y SK-N-MC se realizó un ELISA para la proteína viral p24 (Innotest HIV antigen mAb, Innogenetics N.V., Bélgium), siguiendo especificaciones del fabricante. Se utilizaron células no infectadas e infectadas con VIH- $1_{NL4.3}$ y VIH- 1_{Bal} , a 200ng/10⁶, durante un período de 2h. Lavadas y tratadas con diferentes formas del β A a diferentes concentraciones, a 37°C y 5% CO₂. Tras 72h los sobrenadantes se emplearon para la cuantificación de p24.

Medida de especies reactivas de oxígeno

Se realizó en las líneas celulares U87 y SK-N-MC tratadas durante 2h con las diferentes formas del β A, la forma monomérica a concentración 1µg/mL y 10µg/mL y oligómeros y fibrillas a concentración 1µM y 10µM, lavando después e infectando a 200ng/10⁶, y dejando el cultivo durante 24h. Transcurrido ese tiempo se incubó durante 1h a 37°C con 2',7'-diclorofluoresceina-diacetato (DCFH-DA) 10µM. Se leyó fluorescencia a 485/530nm en PBS utilizando un lector de placas (Synergy, de BioTek).

Western blot

Se cuantifico la cantidad de proteína presente en los lisados celulares por el método de BCA (Bio-Rad). Después se utilizó el volumen correspondiente a 50 µg de proteína acompañada de

buffer de carga al 1x, en un gel al 10-15% SDS-PAGE para la detección de la proteína de interés, las muestras fueron sometidas a una corriente eléctrica de 70V, se transfirieron mediante transferencia semiseca a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad), realizada a 15V. Se dejaron 12 h en solución de bloqueo comercial al 5% (Bio-Rad), posteriormente se procedió al marcaje de la proteína problema, utilizándose como anticuerpo primario anti-GFAP o anti-caspasa-3 en concentración 1:1000, se lavó con PBS más Tween 20 al 0,1%, y se incubó con anticuerpo secundario a concentración 1:5000, se volvió a lavar y se reveló con un kit comercial (Inmun-Star WesternC Kit, Bio-Rad, Hercules CA) mediante quimio-luminiscencia con el aparato Gel-Doc (Bio-Rad). Se empleó como control de carga anticuerpo anti-β-actina (Sigma).

Inmunofluorescencia

Las células se pegaron al cristal durante 2h a 37°C y 5% CO₂ y se fijaron con una solución del 4% de paraformaldehido (PFA) durante 10 minutos a 4°C. Una vez fijadas se bloqueó utilizando IgG humana durante 20 minutos. Posteriormente se procedió a la permeabilización de las células utilizando saponina al 0,2% 20 minutos y se incubaron durante 1h, a temperatura ambiente, con anticuerpo primario anti-GFAP de conejo, se lavaron de nuevo y se incubó con anticuerpo secundario anti-conejo marcado en rojo (Rb 555) durante 30 minutos, de nuevo a temperatura ambiente. Para la tinción de núcleos se utilizó DAPI durante 10 minutos. Por último se montaron los cristales sobre portas y se le añadió líquido de montaje y fueron analizadas por microscopía confocal.

RESULTADOS

Muerte directa de células U87 y SK-N-MC por exposición al péptido βA solo o en combinación con el VIH-1.

Nuestro primer objetivo fue el determinar una concentración adecuada de trabajo para el péptido β A así como la medida de la viabilidad celular en respuesta a la combinación de la infección por el VIH-1 y la presencia del péptido en diferentes tipos celulares, células U87 (astroglioma humano) y células SK-N-MC (neuroblastoma humano). Para ello los diferentes cultivos se trataron con concentraciones crecientes de péptido solo o en combinación con el aislado viral VIH-1_{NL4.3}, y se midió viabilidad mediante la técnica de MTT a diferentes tiempos. Cuando realizamos los experimentos infectando o tratando con la forma monomérica

del péptido βA en las células U87 no encontramos, con respecto al grupo control, mayor toxicidad, a ninguno de nuestros tiempos de estudio. Tampoco cuando las células se infectaron y se trataron con concentraciones crecientes de péptido βA (datos no mostrados). Por otro lado, la línea celular SK-N-MC no vio afectada su viabilidad en ninguno de los casos de estudio, ni cuando las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de la forma monomérica del péptido βA ni cuando fueron infectadas y tratadas (datos no mostrados).

Durante la enfermedad de Alzheimer el β A se deposita, formando placas amiloides, responsables de mayor toxicidad (Selkoe, 1994). Se cree que las formas oligoméricas solubles y las formas fibrilares son las especies activas del péptido, que finalmente causan la perdida sináptica y demencia asociados con Alzheimer. Por lo tanto, También se realizaron experimentos con las formas de oligómeros y fibrillas del β A. No se observó citotoxicidad en células U87 ni con el tratamiento de oligómeros y fibrillas solo, ni cuando las células han sido previamente infectadas con el aislado viral VIH-1_{NL4.3}, a ninguno de los tiempos de estudio (datos no mostrados). Este mismo experimento realizado con células SK-N-MC, mostró que estas células eran más sensibles a la presencia del virus, encontrando un aumento de la muerte próximo a un 40% a las 24h y de un 25% a las 48h. Sin embargo, el tratamiento sólo con el oligómero o fibrillas o la combinación de estos con el virus, no produjo un aumento de la muerte celular a ningún tiempo estudiado (datos no mostrados).

Muerte neuronal indirecta de células SK-N-MC por contacto con el sobrenadante de células U87 sometidas a diferentes tratamientos.

Los resultados anteriores no muestran ningún efecto directo de las formas del péptido amiloide estudiadas sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma, utilizadas en este trabajo como modelo de célula neuronal. Sin embargo, es posible que exista un daño indirecto ocasionado por la liberación de diferentes moléculas al medio extracelular mediada por otros tipos celulares infectados y/o activados, en nuestro caso las células U87. Por ello, estudiamos la viabilidad neuronal tras el contacto de células SK-N-MC con sobrenadante proveniente de células U87 sometidas a diferentes tratamientos. Teniendo en cuenta también el posible efecto de los diferentes medios de cultivo y los diferentes tratamientos utilizados no observamos, en ningún caso, un aumento de la muerte celular de los cultivos de SK-N-MC, (datos no mostrados).

También se llevó a cabo un experimento de toxicidad indirecta utilizando, en este caso, la forma de oligómeros y fibrillas del β A. Por medio del ensayo de MTT en células SK-N-MC

tras 24h en contacto con el sobrenadante de células U87 sometidas tratadas, encontramos un aumento de la muerte celular. El tratamiento con oligómero a concentración 1 μ M se encuentra próximo al límite, pero a concentración 10 μ M así como tras el tratamiento con el sobrenadante de células U87 infectadas y tratadas con oligómero a 10 μ M las diferencias observadas, con respecto al grupo control son de aproximadamente un 30%. Mientras que el tratamiento indirecto con fibrillas no alteró en ningún caso la viabilidad de las células SK-N-MC (datos no mostrados).

Efecto de la presencia de βA sobre la replicación de diferentes aislados de VIH-1

Una de las hipótesis de partida de este trabajo era comprobar si la presencia del β A, en sus diferentes formas, podría alterar directamente a la replicación viral, actuando como un potenciador o activador del ciclo viral en células consideradas reservorio como los astrocitos o en células neuronales. Cuando tratamos las células U87, previamente infectadas con el aislado viral VIH-1_{NL4.3}, con la forma monomérica del péptido β A a las concentraciones de 100ng/mL y 1µg/mL observamos un incremento de la replicación viral de alrededor de un 20% con respecto a las células infectadas no tratadas. (Figura 1A). Cuando el experimento se realizó utilizando la cepa VIH-1_{Bal} y se estimuló según procedimiento anterior, no se observó ningún efecto sobre los niveles de p24 (Figura 1B).





Figura 1.

Niveles de p24 en el sobrenadante de células U87 infectadas con VIH- $1_{NL4.3}$ y VIH- 1_{Bal} (200ng/10⁶ células) y tratadas con diferentes concentraciones de la forma monomérica del βA . **A**, cantidad de p24 en pg/mL producido por células U87 infectadas con VIH- $1_{NL4.3}$ y estimuladas. **B**, cantidad de p24 en pg/mL producido por células U87 infectadas con VIH- $1_{NL4.3}$ y estimuladas.

Repetimos el experimento estimulando con las formas de oligómeros y fibrillas del péptido β A las líneas celulares de glioblastoma y neuroblastoma, pero restringiendo la infección exclusivamente a la cepa VIH-1_{NL4.3}. El experimento constó de varios grupos los cuales siempre eran infectados y estimulados, a una concentración semejante variando entre los distintos grupos el orden de estimulación o infección y el tiempo de incubación. En el primer experimento las células U87 primero fueron infectadas con el virus VIH-1_{NL4.3} y posteriormente estimuladas con oligómeros y fibrillas midiendo por último los niveles de p24, no observamos ninguna diferencia entre los diferentes tratamientos, cuando las células eran primero infectadas y posteriormente estimuladas (Figura 2A), pero observamos un importante aumento en los niveles de p24, aproximadamente un 50%, cuando pretratábamos con oligómero a dosis 1µM antes de la infección (Figura 2B).





Figura 2.

Valores de p24 en el sobrenadante de células U87 infectadas con VIH- $1_{NL4.3}$ (200ng/10⁶ células) y tratadas con diferentes concentraciones de oligómero (OL) y fibrillas (FB) de β A. **A**, cantidad de p24 en pg/mL producido por células U87 primero infectadas con VIH- $1_{NL4.3}$ y posteriormente estimuladas. **B**, cantidad de p24 en pg/mL producido por células U87 primero estimuladas y posteriormente infectadas con VIH- $1_{NL4.3}$.

El mismo experimento se llevó a cabo con células SK-N-MC. Observamos que cuando primero infectábamos y posteriormente estimulábamos no se producía aumento alguno en los niveles de p24 los niveles de replicación parecen disminuir cuando utilizamos la dosis de 10µM tanto en el caso de oligómeros como de fibrillas. Descartamos que este efecto sea por toxicidad dados los resultados obtenidos en el primer apartado de este trabajo. Mientras que cuando cambiábamos el orden del experimento, estimulando primero e infectando a continuación, encontramos que los niveles de p24 aumentaban casi un 30% en el sobrenadante de aquellas células que habían sido pretratadas con una concentración 10µM de oligómero (datos no mostrados).

Activación astroglial en respuesta a la combinación del β A con los aislados virales VIH-1_{NL4.3} Y VIH-1_{Bal}.

En la demencia-VIH se ha detectado una activación astroglial responsable de niveles elevados de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, así como la presencia de prostaglandinas (PGs) y óxido nítrico (NO) que modulan la supervivencia y función neuronal. Así pues, quisimos determinar si la combinación del virus con el péptido βA podría ser causa de mayor activación celular, midiendo los niveles de GFAP tras los distintos tratamientos. Se realizó un western blot a partir de los lisados de células U87 infectadas, con los aislados virales VIH- $1_{NL4.3Y}$ VIH- 1_{Bal} , y tratadas con la forma monomérica del péptido βA . En el western blot observamos aumentados los niveles de GFAP en un 30% cuando tratamos con la dosis más

alta de β A (1µM) en combinación con el virus (Figura 3A). La misma prueba se llevó a cabo con células U87 infectadas con VIH-1_{Bal}, obteniéndose unos resultados semejantes a los de infección por VIH-1_{NL4.3}, el GFAP aumentó en un 20% cuando tratamos con β A 1µM las células infectadas (Figura 3B).



Figura 3.

Western blot para proteína GFAP, a partir de lisados de células U87, infectadas y tratadas con forma monomérica del β A. El control de carga se realizó con anticuerpo anti- β -actina. **A**, Western blot para GFAP en células U87 infectadas con el aislado viral VIH-1_{NL4.3}. **B**, Western blot para GFAP en células U87 infectadas con el aislado viral VIH-1_{NL4.3}. **B**, Western blot mediante densitometría.

Además, quisimos comprobar estos resultados mediante una prueba de inmunofluorescencia, en la que no encontramos diferencias en los niveles de GFAP entre los distintos tratamientos (Figura 4).



Figura 4. Inmunofluorescencia para proteína GFAP, a las 72h de infección y tratamiento con la forma monomérica del βA, en células U87.

Generación de especies reactivas de oxígeno en células cerebrales en respuesta al βA solo o en combinación con el aislado viral VIH-1_{NL4.3}

Está descrito que la situación de estrés a la que está sometida la célula durante la infección o durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer podría ser un estímulo crítico para una producción anómala de ROS, intermediaros esenciales del metabolismo oxidativo, los cuales en elevada concentración pueden contribuir a la inflamación y al daño tisular. Por esto, quisimos comprobar la generación de ROS en los cultivos de células infectadas y tratadas con diferentes presentaciones de βA . Como se esperaba, las células U87 presentaron un incremento en la concentración de ROS: un 70% mayor al ser infectadas con la cepa VIH- $1_{NL4.3}$ y de aproximadamente un 30% cuando eran tratadas con 10μ g/mL de la forma monomérica del βA . Sin embargo, la combinación de la infección y la forma monomérica no indujo un aumento en la producción de ROS (Figura 5A). Cuando el experimento se realizó con células SK-N-MC, no detectamos variaciones en los niveles de ROS intracelular bajo ningún tratamiento (Figura 5B).

Cuando utilizamos la forma de oligómeros y fibrillas, observamos un aumento de más del 50% de los niveles de ROS en células U87 que son tratadas con oligómero en concentración

10μM. Además en las células infectadas y tratadas con oligómero 1μM también encontramos un aumento del 53% con respecto a las células infectadas (Figura 6A). En las células SK-N-MC los niveles de ROS se incrementaron casi un 30% cuando tratamos con oligómero a concentración 1μM, mientras que la combinación del virus con las diferentes formas del βA utilizadas no incrementa la producción de ROS con respecto al grupo infectado (Figura 6B).



Figura 5.

Medida de fluorescencia para ROS, a las 24h, realizada en células U87 y SK-N-MC infectadas con VIH- $1_{NL4.3}$ y estimuladas con diferentes concentraciones del péptido β A. **A**, medida de fluorescencia en células U87. **B**, medida de fluorescencia en células SK-N-MC.



Figura 6.

Medida de fluorescencia para ROS, a las 24h, realizada en células U87 (A) y SK-N-MC (B) infectadas con VIH- $1_{NL4.3}$ y estimuladas con diferentes concentraciones de las formas de oligómeros (OL) y fibrillas (FB) del péptido β A.

Muerte celular programada, en respuesta a la combinación del βA con el aislado viral VIH-1_{NL4.3}.

Se ha propuesto que las caspasas apoptóticas contribuyan significativamente a la muerte neuronal progresiva durante la enfermedad de Alzheimer. La caspasa-3, es la principal caspasa efectora, jugando un papel central en la degeneración sináptica durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer y también se ha encontrado implicada en el procesamiento de la proteína pre-amiloide (APP). Con el fin de observar posibles variaciones en los niveles de caspasa-3 se realizó un western blot para dicha enzima, a partir de lisados de células U87 y SK-N-MC infectadas con VIH-1_{NL4.3} y tratadas con las formas de oligómeros y fibrillas del β A. En el caso de las células U87 el tratamiento con oligómeros de las células infectadas indujo un aumento de la forma activa de 12KDa de entre 20-40% dependiendo de la dosis de trabajo (Figura 7A). Cuando las células eran tratadas primero y luego infectadas, sí que observamos un incremento importante de la forma de 12 KDa de la caspasa activa de

72

alrededor de un 70% cuando tratamos con oligómeros a concentración 1 μ M y en un 50% cuando tratamos con fibrillas 1 μ M y 10 μ M, mientras que la forma activa de 17/19 KDa, no sufre ninguna variación en sus niveles (Figura 7B).

En el caso de las células SK-N-MC los niveles de las diferentes formas de caspasa-3 fueron indetectables (datos no mostrados).



Figura 7.

Western blot para Caspasa-3, a partir de lisados de células U87. El control de carga se realizó con anticuerpo anti- β -actina. **A**, las células primero fueron infectadas con VIH-1_{NL4.3} y posteriormente tratadas con forma oligómeros (OL) y fibrillas (FB) de β A. **B**, las células primero fueron tratadas con oligómeros (OL) y fibrillas (FB) de β A y posteriormente fueron infectadas con VIH-1_{NL4.3}. La cuantificación de los niveles de caspasa-3 se realizó mediante densitometría.

DISCUSIÓN

Con el fin de conocer la relación que pueda existir entre el VIH-1 y el péptido βA en individuos VIH positivos que presenten desordenes neurológicos se han utilizado diferentes formas del péptido βA : monómeros, oligómeros y fibrillas, solos o en combinación con diferentes aislados del VIH-1: VIH-1_{NL4.3} y VIH-1_{Bal}, sobre líneas celulares U87 de glioblastoma humano y SK-N-MC de neuroblastoma humano.

El VIH infecta principalmente macrófagos y microglía en el SNC y puede infectar astrocitos a bajos niveles (Gorry et al., 2003). Hay pocas evidencias de infección de neuronas y

oligodendrocitos. Sin embargo, la disfunción neuronal, incluyendo pérdida dendrítica y axonal es prevalente en todo el SNC (Giometto et al., 1997), durante la encefalopatía VIH. Se ha descrito que las formas oligomérica y fibrilar del β A (1-42) producen patrones de neurotoxicidad diferentes, entre ellos y con respecto de la forma monomérica del péptido β A (Dahlgren et al., 2002). Según lo publicado por Dahlgreen en 2002, la viabilidad neuronal se ve afectada por las diferentes formas del β A de manera dosis dependiente, tras incubaciones de 20 horas. En el presente trabajo se utilizó un tiempo de incubación de 2h, tanto para el virus como para el β A. Este tiempo es suficiente para permitir la entrada del virus en la célula diana. La posible citotoxicidad de nuestras condiciones de estudio se comprobó sobre células U87 y SK-N-MC, infectando con el aislado viral VIH-1_{NL4.3} y tratando con diferentes concentraciones de las formas del β A, tanto solos como combinados. Los resultados indican que las diferentes combinaciones empleadas no producen citotoxicidad. Por tanto, a tiempos cortos, la viabilidad celular de U87 y SK-N-MC no se ve afectada cuando tratamos con las formas monomérica, oligomérica y fibrilar del péptido β A, solo o en combinación con el virus.

Dado que son pocas las evidencias de la infección neuronal por parte del VIH, es ampliamente aceptado que los llamados mecanismos indirectos jueguen un papel principal en la disfunción neuronal y muerte. Se ha publicado, que productos secretados en el SNC por células, como macrófagos y microglía, ya sean celulares o toxinas virales son la principal causa de daño neuronal durante encefalitis por VIH, entre estos productos se encuentran citocinas que median proceso inflamatorio (TNF-a, IL-1β), acido quinolínico, proteínas virales con efectos citotóxicos (Tat, gp120, gp41) u óxido nítrico. Por ello intentamos comprobar si las células U87 producían algún cambio en el medio extracelular, mediante liberación de alguna sustancia neurotóxica, cuando eran infectadas con diferentes aislados virales, VIH-1_{NL4.3} y VIH-1_{Bal}, y tratadas con las diferentes formas y concentraciones del péptido βA, tanto solos como en combinación, así como cuando eran tratadas con diferentes concentraciones de las proteínas virales Tat y gp120. Estudiamos un posible efecto citotóxico que afectase a la viabilidad de células SK-N-MC, cuando exponíamos estas a los sobrenadantes obtenidos en cultivos de células U87. No observamos muerte celular, en células SK-N-MC, mediada por mecanismos indirectos bajo ninguna de las condiciones de estudio. Por tanto, las células U87 no parecen producir a tiempos cortos y en cantidad suficiente la liberación de ninguna sustancia con capacidad neurotóxica, al ser infectadas y/o estimuladas con las diferentes formas del péptido βA.

Uno de los puntos más importantes de nuestro estudio es la posible relación entre el β A y el VIH-1, así que quisimos ver la influencia del β A sobre la replicación viral. En un primer experimento utilizamos diferentes aislados virales, de baja o alta replicación, solos o combinados con la forma monomérica del β A. Observamos tras la infección con VIH-1_{NL4.3} y tratamiento en células U87 una tendencia a incrementar la replicación viral bajo el tratamiento observando hasta un 20% más de replicación para las concentraciones intermedias (100ng/mL y 1µg/mL), mientras que para la concentración más alta de β A (10µg/mL) la replicación disminuye en un 15%, aunque la falta de réplicas del experimento nos impide comprobar estadísticamente la veracidad de este dato. Lo observado bajo infección con VIH-1_{Bal} y tratamiento en células U87, es que la replicación viral es similar bajo todas las condiciones de estudio. Debido a las bajas variaciones de replicación viral de VIH-1_{NL4.3} ni VIH-1_{Bal}, en células U87.

Además, se estudió el efecto de las formas de oligómeros y fibrillas sobre la replicación de VIH-1_{NL4.3} en células U87 y SK-N-MC, bajo diferentes concentraciones del tratamiento aplicadas antes o después de la infección. En la línea celular U87, cuando realizamos primero la infección y luego tratamos no observamos diferencias entre los distintos tratamientos. Mientras que cuando pretratamos las células, observamos que la forma oligomérica de menor concentración (1µM) producía un aumento en la replicación de un 50%, mientras que no observamos cambios en el tratamiento de mayor concentración de oligómeros ni a ninguna de las concentraciones de fibrillas. El mismo procedimiento se llevó a cabo con células SK-N-MC donde observamos que al infectar y luego tratar con oligómeros y fibrillas, no se producía ningún incremento en la replicación viral, sino más bien una disminución de hasta un 30% en los tratamientos de mayor concentración (10µM) de oligómeros y fibrillas. Mientras que cuando pretratábamos todos los tratamientos tendían a incrementar la replicación viral, siendo los mayores valores cercanos al 30% cuando empleábamos la máxima concentración de oligómeros (10µM) y de un 20% cuando tratábamos con la mínima concentración de fibrillas (1µM). Estas observaciones nos llevan a pensar que el incremento en la replicación cuando pretratábamos con la forma oligomérica del βA podría producir algún cambio en la membrana celular, interfiriendo en la interacción virus-célula hospedadora, permitiendo mayor entrada viral y, por tanto, mayor replicación.

Los astrocitos son una de las células más resistentes a enfermedades del SNC. Una función bien conocida de los astrocitos está relacionada con la reparación. A continuación del daño los astrocitos invariablemente proliferan, se hinchan, acumulan glicógeno e inducen fibrosis por

acumulación de filamentos, neuroquímicamente expresado como incremento en GFAP (Siegel et al., 2009). Quisimos ver cómo respondía la línea celular U87 frente a la infección por los aislados virales VIH-1_{NL4.3} y VIH-1_{Bal} en combinación con la forma monomérica del péptido amiloide ya que, en humanos, en el tejido afectado por la enfermedad de Alzheimer se da una fuerte astrogliosis en las células que rodean las placas amiloides y estos astrocitos activados acumulan gran cantidad de βA (1-42) derivado de los restos neuronales y asociado con las placas (Nagele et al., 2003). A pesar de su capacidad para degradar β A, este se acaba acumulando durante la enfermedad de Alzheimer (Nagele et al., 2003) y termina por activar a los astrocitos produciéndose una respuesta inflamatoria que termina por inducir el daño neuronal (Johnstone et al., 1999). Durante la infección por VIH-1 se podría crear un estado de retroalimentación, dado que el VIH-1 también induce mediadores inflamatorios, como CCL2/MCP-1, pudiendo contribuir a incrementar los niveles de βA (Pulliam, 2009) y un aumento en la activación astrocitaria. La detección de GFAP obtenida por western blot e inmunofluorescencia nos indica que sus niveles en células U87 se ven aumentados en un 20-30% tras la infección y tratamiento con la concentración más alta (10µg/mL) de la forma monomérica del BA, independientemente del aislado viral empleado. Según lo observado en nuestros experimentos y a nuestros tiempos de estudio, la mayor concentración de la forma monomérica de βA en combinación con la infección por diferentes aislados virales, parece producir aumento en la activación astrocitaria, que, al final, podría desencadenar una respuesta inflamatoria

Dada la implicación del péptido β A y la proteína viral Nef en la producción de ROS las condiciones de infección y tratamiento con las que trabajamos podrían ser un estímulo crítico para una producción anómala de ROS. Realizamos una cuantificación de ROS en las líneas celulares U87 y SK-N-MC, infectadas con VIH-1_{NL4.3} en combinación con las diferentes formas del β A, y hemos observado que la infección por VIH-1 no aumenta los niveles de ROS en células SK-N-MC, pero sí que lo hace en U87, incrementándolas en un 70%. La forma monomérica de β A en células U87 produjo un aumento en la cantidad ROS, siendo de un 33% para la concentración 10µM. En células SK-N-MC no vimos incremento. Cuando infectamos y tratamos ambas líneas celulares, no observamos ningún incremento en ROS. Por tanto, en nuestros tiempos de estudio, tanto la infección con VIH-1 como el tratamiento con la forma monomérica del β A parecen provocar un aumento en los niveles de ROS de astrocitos por sí solos, pero no combinados.

Cuando empleamos otras formas del βA observamos que el tratamiento con fibrillas no producía ningún incremento en ROS, ni en células U87 ni en SK-N-MC, cuando estaban solas

o en combinación con el virus. Mientras que la forma oligomérica, por sí sola provocó el aumento de ROS en ambos tipos celulares, mientras que en combinación con el virus solo apreciamos cambios en las células U87. El aumento de ROS en células U87 tratadas a 1 μ M de oligómeros es de un 50%. Además cuando infectábamos y tratábamos con la concentración 10 μ M de oligómeros el incremento en la producción de ROS en U87 también aumentaba en un 50% con respecto a ROS producido por células solo infectadas. Por tanto, parece que la forma oligomérica de β A provoca un aumento en los niveles de ROS de astrocitos, tanto sola como en combinación con el virus.

Los efectos del βA han sido ampliamente estudiados, suponen desde la inducción de muerte neuronal apoptótica (Estus et al., 1997), al desencadenamiento de un programa apoptótico parcial que da como resultado cambios en las neuritas (Mattson et al., 1998). Estos efectos neurotóxicos están principalmente mediados a través de la producción de glutamato, que es disparada por los diferentes receptores de NMDA, y se correlaciona con la activación de caspasas y la consecuente apoptosis neuronal (Erdmann et al., 2006). El VIH-1 induce mediadores neurotóxicos (Pulliam, 2009) y el ßA por sí mismo también es un factor proinflamatorio que puede disparar respuestas neuroinflamatorias crónicas (Rogers et al., 2007). Por otro lado, se ha descrito que la activación apoptótica mediada por estrés puede ocurrir por dos rutas diferentes: una desde la superficie celular y otra desde la mitocondria, donde ROS y la proteína viral Nef parecen desempeñar un papel crucial (Eddleston y Mucke, 1993), produciendo una activación secuencial de caspasas durante la fase de ejecución de la apoptosis. La caspasa-3, la principal caspasa efectora de apoptosis, también juega un papel central en la degeneración sináptica y en el procesamiento de APP (Gervais et al., 1999). Realizamos una detección de caspasa-3 en las líneas celulares U87 y SK-N-MC, que habían sido infectadas con el aislado VIH-1_{NL4.3} en combinación con oligómeros y fibrillas del péptido βA , antes o después de la infección. No pudimos detectar caspasa-3, en células SK-N-MC, en ninguna de sus formas. En las células U87 la caspasa-3 activa se pudo detectar, en diferentes cantidades, en 2 bandas: una de 17/19 KDa y otra de 12 KDa, apreciándose mucho mejor en la banda de 12KDa. Para esta banda, observamos que los niveles de caspasa-3 activa aumentan aproximadamente un 40% cuando infectamos y tratamos con forma oligomérica a 10µM, lo cual se corresponde con los resultados obtenidos en el análisis de ROS, que también aumentan bajo las mismas condiciones. Cuando tratamos primero y a continuación infectamos observamos un aumento mayor en la cantidad de caspasa-3 no procesada como procesada, en comparación con la infección. La forma oligomérica a concentración 1µM en combinación con VIH-1 muestra un incremento de aproximadamente 75% en la cantidad de caspasa-3 activa (de 12KDa) y de un 60% de la caspasa-3 no procesada. Los niveles al tratar con oligómeros 10 μ M no mostraron ninguna diferencia con nuestro control. También observamos un incremento tras el tratamiento de las células infectadas con la forma de fibrillas, donde los niveles de caspasa-3 activa se incrementaban en un 50% con cualquiera de las concentraciones empleadas. Por tanto, el pretratamiento con la forma oligomérica y fibrilar incrementan los niveles de caspasa-3 activa en células U87, cuando están presentes antes de la infección por VIH-1. Este aumento podría estar causado bien por el mecanismo propuesto mediado por ROS en el cual podrían participar tanto las formas oligoméricas y fibrilares del β A o bien, dado que cuando estas formas están presentes la entrada de virus parece verse aumentada, el VIH-1 podría por algún mecanismo directo interferir sobre el procesamiento de la caspasa-3, en astrocitos.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que a pesar de ser la forma predominante en el cerebro la forma monomérica de β A no parece tener efecto sobre la replicación viral o mecanismos asociados, bajo nuestras condiciones de estudio. Algo similar ocurre con las fibrillas de β A, la forma patológica durante la enfermedad de Alzheimer, responsable del daño neurítico, las evidencias de un posible efecto de esta forma en la infección o activación celular son escasas. Mientras que la forma oligomérica del péptido β A parece ser, en nuestros experimentos, la más eficiente a la hora de alterar los niveles de replicación viral tanto en neuronas como en astrocitos. Además, esta forma peptídica aumenta los niveles de ROS en células U87 infectadas, así como los niveles de la forma activa de caspasa-3.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Susana Álvarez, con la que he trabajado mano a mano durante el desarrollo de este proyecto, por sus enseñanzas, ayuda y dedicación. También agradecer la labor fundamental de la Dra. M^a Ángeles Muñoz-Fernández su ayuda prestada y el hacerme partícipe de este proyecto, así como a todos los componentes del grupo de trabajo del laboratorio de Inmunobiología celular del H.G.U. Gregorio Marañón.

BIBLIOGRAFÍA

Abramov, A. Y., Canevari, L. & Duchen, M. R. 2004. Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta*, 1742, 81-7. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.09.006.

- Acheampong, E. A., Roschel, C., Mukhtar, M., Srinivasan, A., Rafi, M., Pomerantz, R. J. & Parveen, Z. 2009. Combined effects of hyperglycemic conditions and HIV-1 Nef: a potential model for induced HIV neuropathogenesis. *Virol J*, 6, 183. doi:10.1186/1743-422X-6-183.
- Anthony, I. C., Ramage, S. N., Carnie, F. W., Simmonds, P. & Bell, J. E. 2005. Influence of HAART on HIV-related CNS disease and neuroinflammation. *Journal of neuropathology* and experimental neurology, 64, 529-36
- Bissel, S. J. & Wiley, C. A. 2004. Human immunodeficiency virus infection of the brain: pitfalls in evaluating infected/affected cell populations. *Brain Pathol*, 14, 97-108
- Blanc, E. M., Toborek, M., Mark, R. J., Hennig, B. & Mattson, M. P. 1997. Amyloid betapeptide induces cell monolayer albumin permeability, impairs glucose transport, and induces apoptosis in vascular endothelial cells. *J Neurochem*, 68, 1870-81
- Cummings, B. J., Pike, C. J., Shankle, R. & Cotman, C. W. 1996. Beta-amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 17, 921-33
- Dahlgren, K. N., Manelli, A. M., Stine, W. B., Jr., Baker, L. K., Krafft, G. A. & Ladu, M. J. 2002. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem*, 277, 32046-53. doi:10.1074/jbc.M201750200.
- Davis, L. E., Hjelle, B. L., Miller, V. E., Palmer, D. L., Llewellyn, A. L., Merlin, T. L., Young, S. A., Mills, R. G., Wachsman, W. & Wiley, C. A. 1992. Early viral brain invasion in iatrogenic human immunodeficiency virus infection. *Neurology*, 42, 1736-9
- Eddleston, M. & Mucke, L. 1993. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54, 15-36
- Eng, L. F. 1985. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of neuroimmunology*, 8, 203-14
- Erdmann, N. B., Whitney, N. P. & Zheng, J. 2006. Potentiation of Excitotoxicity in HIV-1 Associated Dementia and the Significance of Glutaminase. *Clin Neurosci Res*, 6, 315-328. doi:10.1016/j.cnr.2006.09.009.
- Esiri, M. M., Biddolph, S. C. & Morris, C. S. 1998. Prevalence of Alzheimer plaques in AIDS. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 65, 29-33
- Estus, S., Tucker, H. M., Van Rooyen, C., Wright, S., Brigham, E. F., Wogulis, M. & Rydel, R. E. 1997. Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J Neurosci*, 17, 7736-45
- Ferreira, S. T., Vieira, M. N. & De Felice, F. G. 2007. Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB life*, 59, 332-45. doi:10.1080/15216540701283882.
- Gervais, F. G., Xu, D., Robertson, G. S., Vaillancourt, J. P., Zhu, Y., Huang, J., Leblanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M. S., Clarke, E. E., Zheng, H., Van Der Ploeg, L. H., Ruffolo, S. C., Thornberry, N. A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R. J., Roy, S. & Nicholson, D. W. 1999. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell*, 97, 395-406
- Giometto, B., An, S. F., Groves, M., Scaravilli, T., Geddes, J. F., Miller, R., Tavolato, B., Beckett, A. A. & Scaravilli, F. 1997. Accumulation of beta-amyloid precursor protein in HIV encephalitis: relationship with neuropsychological abnormalities. *Ann Neurol*, 42, 34-40. doi:10.1002/ana.410420108.
- Gorry, P. R., Ong, C., Thorpe, J., Bannwarth, S., Thompson, K. A., Gatignol, A., Vesselingh, S. L. & Purcell, D. F. 2003. Astrocyte infection by HIV-1: mechanisms of restricted virus replication, and role in the pathogenesis of HIV-1-associated dementia. *Curr HIV Res*, 1, 463-73

- Green, D. A., Masliah, E., Vinters, H. V., Beizai, P., Moore, D. J. & Achim, C. L. 2005. Brain deposition of beta-amyloid is a common pathologic feature in HIV positive patients. *AIDS*, 19, 407-11
- Hazleton, J. E., Berman, J. W. & Eugenin, E. A. 2010. Novel mechanisms of central nervous system damage in HIV infection. *HIV/AIDS*, 2, 39-49
- Holtzman, D. M., Morris, J. C. & Goate, A. M. 2011. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med*, 3, 77sr1. doi:10.1126/scitranslmed.3002369.
- Johnstone, M., Gearing, A. J. & Miller, K. M. 1999. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *Journal of neuroimmunology*, 93, 182-93
- Lawrence, D. M., Durham, L. C., Schwartz, L., Seth, P., Maric, D. & Major, E. O. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 infection of human brain-derived progenitor cells. J Virol, 78, 7319-28. doi:10.1128/JVI.78.14.7319-7328.2004.
- Mankowski, J. L., Queen, S. E., Tarwater, P. M., Fox, K. J. & Perry, V. H. 2002. Accumulation of beta-amyloid precursor protein in axons correlates with CNS expression of SIV gp41. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 61, 85-90
- Mattson, M. P., Partin, J. & Begley, J. G. 1998. Amyloid beta-peptide induces apoptosisrelated events in synapses and dendrites. *Brain Res*, 807, 167-76
- Mcarthur, J. C. 2004. HIV dementia: an evolving disease. *Journal of neuroimmunology*, 157, 3-10. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.08.042.
- Mcgeer, P. L. & Mcgeer, E. G. 1995. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*, 21, 195-218
- Nagele, R. G., D'andrea, M. R., Lee, H., Venkataraman, V. & Wang, H. Y. 2003. Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res*, 971, 197-209
- Pekny, M. & Pekna, M. 2004. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol*, 204, 428-37. doi:10.1002/path.1645.
- Pulliam, L. 2009. HIV regulation of amyloid beta production. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 4, 213-7. doi:10.1007/s11481-009-9151-9.
- Rasola, A., Gramaglia, D., Boccaccio, C. & Comoglio, P. M. 2001. Apoptosis enhancement by the HIV-1 Nef protein. *J Immunol*, 166, 81-8
- Rempel, H. C. & Pulliam, L. 2005. HIV-1 Tat inhibits neprilysin and elevates amyloid beta. *AIDS*, 19, 127-35
- Rogers, J., Mastroeni, D., Leonard, B., Joyce, J. & Grover, A. 2007. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder? *Int Rev Neurobiol*, 82, 235-46. doi:10.1016/S0074-7742(07)82012-5.
- Sacktor, N., Mcdermott, M. P., Marder, K., Schifitto, G., Selnes, O. A., Mcarthur, J. C., Stern, Y., Albert, S., Palumbo, D., Kieburtz, K., De Marcaida, J. A., Cohen, B. & Epstein, L. 2002. HIV-associated cognitive impairment before and after the advent of combination therapy. *J Neurovirol*, 8, 136-42. doi:10.1080/13550280290049615.
- Selkoe, D. J. 1994. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *Journal of neuropathology* and experimental neurology, 53, 438-47
- Selkoe, D. J. 2004. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Annals of internal medicine*, 140, 627-38
- Siegel, G. J., Alberts, R. W., Braddy, S. T., Price D. L., Neurocellular anthomy. En: Basic Neurochemistry: Mollecular, cellular and medical aspects. San Diego: American society for neurochemistry, 2006, 3-19.

- Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. 2010. Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol, 119, 7-35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8.
- Toborek, M., Lee, Y. W., Flora, G., Pu, H., Andras, I. E., Wylegala, E., Hennig, B. & Nath, A. 2005. Mechanisms of the blood-brain barrier disruption in HIV-1 infection. *Cell Mol Neurobiol*, 25, 181-99
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. & Citron, M. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286, 735-41
- Zhao, J., Paganini, L., Mucke, L., Gordon, M., Refolo, L., Carman, M., Sinha, S., Oltersdorf, T., Lieberburg, I. & Mcconlogue, L. 1996. Beta-secretase processing of the beta-amyloid precursor protein in transgenic mice is efficient in neurons but inefficient in astrocytes. J Biol Chem, 271, 31407-11