



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**ESTUDIOS SOBRE TOXICIDAD Y GENERACIÓN DE LA
PROTEÍNA β -AMILOIDE EN DOS MODELOS IN VITRO.
RELEVANCIA PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

TESIS

Que para obtener el título de:

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

P r e s e n t a

Ricardo David Quiroz Baez



BIOMÉDICAS

Directora de tesis:

Dra. Ana Clorinda Arias Alvarez



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



VNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Dr. José Narro Robles
Director de la Facultad de Medicina
UNAM
Presente

Por este conducto le informamos que la tesis "Estudios sobre toxicidad y generación de la proteína β - amiloide en dos modelos *in vitro*, relevancia para la enfermedad de Alzheimer ", que presenta el alumno: **Ricardo David Quiroz Baez**, reúne los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto los suscritos miembros del Jurado otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.

Atentamente.

Dr. Julio E. Morán Andrade

Dra. Ana B. Clorinda Arias Álvarez

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Dr. Luis Vaca Domínguez

Antes de abandonar el mundo del todo,
es el mundo mismo quien comienza a
abandonarnos, llevándose los
recuerdos que nos prestó.

- Voltaire -

A mis papás y Mauricio , por su cariño y guía .

A Clorinda por su apoyo y
confianza durante todo este tiempo.

A Cecilia y Sofía, gracias por
todo lo que hemos vivido.

Una abrazo para todos los colegas:

A los Pedicanos (ambos campus), al conclave, a la hermana ratus y mi madre, al
Clauth, la Sarapastrosa, y todos los logoitos.

A Pati por su apoyo técnico y paciencia durante estos años.

Y de manera muy especial a la UNAM

ÍNDICE

I. RESUMEN	7
II. SUMMARY	9
III. INTRODUCCIÓN	11
IV. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	13
IV.1 PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE	17
IV.2 PROTEÍNA β -AMILOIDE	18
V. ALTERACIONES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO EN LA EA	20
V.1 DROGAS QUE MIMETIZAN DEFICIENCIA ENERGÉTICA	21
VI. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y LA EA	24
VII. AGENTES PROTECTORES DEL ESTRÉS OXIDANTE	25
VII.1 ANTIOXIDANTES	26
VII.2 ATRAPADORES DE RADICALES LIBRES	28
VIII. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DEL β -AMILOIDE Y DEL METABOLISMO DE LA APP	30
VIII.1 SINAPTOSOMAS COMO UN MODELO DE TOXICIDAD DEL β -AMILOIDE	30
VIII.2 CULTIVOS DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO PARA EL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LA APP	31
IX. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
X. HIPÓTESIS	34
XI. OBJETIVOS	34
XII. MÉTODOS	35
XII.1 OBTENCIÓN DE SINAPTOSOMAS	35
XII.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL POR EL ENSAYO DE REDUCCIÓN DEL MITT	36
XII.3 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN LOS SINAPTOSOMAS	37
XII.4 CULTIVOS DE NEUROBLASTOMA HUMANO	37
XII.5 ELECTROFORESIS E INMUNOBLOT	38
XII.6 ESTADÍSTICA	39
XIII. RESULTADOS	40
XIV. DISCUSIÓN	58
XV. CONCLUSIONES GENERALES	66
XVI. BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

EA	Enfermedad de Alzheimer
Aβ	Proteína β -amiloide
APP	Proteína Precursora del Amiloide
3NP	Ácido 3-Nitropropiónico
IA	Yodo Acetato
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
PBN	α -fenil-N-ter-butil nitrona
MTT	3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazodio
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
ZnCl₂	Cloruro de Zinc
FeCl₂	Cloruro Ferroso
CuCl₂	Cloruro Cúprico
kDa	Kilo dalton

I. RESUMEN

La proteína β -amiloide ($A\beta$) deriva de la proteína precursora del amiloide (APP) y es el principal componente de las placas seniles en la Enfermedad de Alzheimer (EA). El papel de la APP y su producto, la $A\beta$, en la patogenia de la EA se ha visto apoyado por la asociación entre la EA familiar que incluye mutaciones en el gen de la APP, así como en los genes de las presenilinas, que producen incrementos significativos de la $A\beta$. Experimentos *in vitro* han mostrado que la $A\beta$ y su fragmento activo 25-35 poseen efectos neurotóxicos directos o exacerban los efectos dañinos de otros insultos neurotóxicos. Una de las alteraciones más consistentes en la EA es la reducción en el consumo de glucosa previa al daño neuronal. Evidencia importante sugiere que la disfunción en el metabolismo energético cerebral puede aumentar la vulnerabilidad neuronal y favorecer la neurodegeneración ante los efectos nocivos de algunos otros agentes neurotóxicos.

En el presente trabajo se estudió la influencia del metabolismo energético en la toxicidad de la $A\beta$ en dos modelos: la inhibición glucolítica inducida por yodo acetato (IA), un inhibidor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; y la disfunción mitocondrial inducida por el uso del ácido 3-nitropropiónico (3NP), un inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa. Evidencia reciente sugiere que los eventos neurodegenerativos tempranos asociados con la EA probablemente se inicien en las sinapsis. Por lo anterior, en el presente trabajo se estudiaron los efectos neurotóxicos de la $A\beta$ (fragmento 25-35), en ausencia y presencia de los inhibidores del metabolismo energético mencionados sobre terminales nerviosas aisladas de la neocorteza y el hipocampo de la rata. Además se evaluaron los efectos protectores de algunos sustratos energéticos y de compuestos antioxidantes. Se utilizaron ratas macho Wistar de 250 g (jóvenes de 3 meses de edad) y viejas entre 18-20 meses de edad. Los resultados muestran que la

actividad mitocondrial de los sinaptosomas obtenidos del cerebro de ratas jóvenes no se altera por la presencia de la A β , mientras esta actividad mitocondrial de los obtenidos de ratas viejas muestran un aumento en la susceptibilidad a la A β . Así mismo, las terminales nerviosas provenientes tanto de ratas jóvenes como viejas pueden ser particularmente sensibles a perturbaciones metabólicas, como lo son la disminución del metabolismo de la glucosa y la producción mitocondrial de ATP, lo cual lleva a la exacerbación de la toxicidad de la A β . Estos datos dan un sustento experimental a la hipótesis de que ciertos factores de riesgo, como pueden ser disfunciones del metabolismo energético y la acumulación de la A β pueden incrementar la toxicidad de esta última proteína relacionada con la fisiopatología de la EA.

En este estudio se observó que la presencia de la A β es capaz de aumentar por sí misma la producción de radicales libres. Sin embargo, los sinaptosomas poseen la capacidad de manejarlos, siempre y cuando su metabolismo energético se encuentre en buen estado.

Dada la importancia de la acumulación de la A β en el origen y manifestaciones de la EA, fue interesante valorar algunas condiciones *in vitro*, usando como modelo cultivos neuronales provenientes de un neuroblastoma humano, el cual puede generar este fragmento neurotóxico a partir del metabolismo proteolítico de la APP. Los resultados en este sentido mostraron que los niveles de la APP aumentan en los cultivos tratados con cafeína; mientras que en los cultivos expuestos a H₂O₂ se observó su disminución. Por otro lado, los cultivos incubados en presencia de ZnCl₂ no mostraron ningún cambio en relación con los niveles de APP controles. La A β sólo se detectó en las células expuestas al H₂O₂, aunque a niveles muy bajos, mientras que en las otras condiciones la A β no pudo ser cuantificada.

II. SUMMARY

β -amyloid protein ($A\beta$) derives from the amyloid precursor protein (APP), and is the main component of senile plaques in Alzheimer Disease (AD). The role of the APP and its product $A\beta$ in the pathology of AD has been supported by the association between familiar AD and mutations in the APP gene, as well as the role of presenilins in its metabolism and its deleterious effects. In vivo experiments have shown that $A\beta$ and its 25-35 active fragment possess not only direct neurotoxic effects but also exacerbate the harmful effects of other neurotoxic insults. One of the most consistent alterations in AD is the reduced use of glucose. Important evidence suggests that the impairment in the cerebral metabolism can lead to neuronal injury and facilitate the nocive effects of some neurotoxic agents.

In the present work, we studied the influence of metabolism in the toxicity of $A\beta$ in two models: the inhibition of glycolysis induced by iodoacetate, an inhibitor of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; and the mitochondrial dysfunction induced by 3-nitropropionic acid (3NP), an irreversible inhibitor of succinate dehydrogenase. Recent evidence suggests that the early neurodegenerative effects associated with AD probably start in synapsis. Therefore, in the present work the neurotoxic effects of $A\beta$ (25-35 fragment), were studied both in presence and absence of inhibitors of the energetic metabolism over isolated nervous terminals in the rat neocortex and hippocampus. The protector effects of some energetic substrates and antioxidant compounds were also evaluated. Young male Wistar rats (three months old weighing 250 g) and old rats (between 18-20 months old) were used. Results show that synaptosomes obtained from young rats are not altered by the unique presence of $A\beta$, meanwhile old rats show an increased susceptibility to $A\beta$. The same way nervous terminals from both young and old rats may be particularly sensible to metabolic disturbances, such as the fall of glucose metabolism and the production of

mitochondrial ATP, which leads to an exacerbate A β toxicity. These data give experimental sustenance to the hypothesis that certain risk factors, such as metabolic dysfunction and the accumulation of A β may interact to increase the toxicity of this protein related to the physiopathology of AD.

In the different experimental conditions studied it was seen that only A β alone increases the production of free radicals, but that synaptosomes possess the capacity of dealing with them as long as the energetics metabolism is unaltered.

Given the importance of the accumulation of A β in the origin and manifestations of AD, it was interesting to evaluate certain conditions which *in vitro*, in a model of neurons coming from cultures of human neuroblastoma, may generate the neurotoxic fragment from the proteolytic metabolism of APP. In this sense, the results show that the level of APP increase in cultures exposed to caffeine; meanwhile, in cultures exposed to H₂O₂ we could observe a decrease. On the other hand, cultures incubated in the presence of ZnCl₂ did not show any change in relationship controls regarding the levels APP. A β only could be quantified in the H₂O₂ condition.

III. INTRODUCCIÓN

La expectativa de vida hoy en día es significativamente mayor, comparada con aquella observada hace unos cincuenta años. En México, la edad promedio de muerte en mujeres es aproximadamente de 67 años y en el hombre de 63, mientras que hace 100 años apenas se alcanzaban la quinta década. Sin embargo, la posibilidad de alcanzar una mayor longevidad trae apareada una mayor propensión a padecer un conjunto de alteraciones y padecimientos que van disminuyendo la calidad de vida de los individuos.

El envejecimiento es un proceso característico de todos los organismos, en los cuales, las capacidades de reproducción, alimentación y la homeostasis general pueden verse disminuidas. Factores como la radiación solar, la alimentación y la temperatura entre otros, influyen significativamente en el metabolismo celular y la fisiología general del organismo. En consecuencia, es frecuente la presencia de mutaciones en el DNA mitocondrial y alteraciones en algunas vías metabólicas, lo que conduce a un funcionamiento anormal de los sistemas de generación energética, comunicación, mantenimiento y reparación celulares. Esto lleva a un manejo inadecuado de las variables ambientales y a la incapacidad de adaptarse de forma rápida y eficiente a éstas, con lo que finalmente se llega a la muerte.

En el caso del sistema nervioso central (SNC), al envejecer pueden ocurrir una variedad de cambios que involucran el deterioro de las capacidades cognitivas (procesos de memorización y evocación), así como de las habilidades visuo-espacial y motoras (la velocidad de respuesta refleja y motriz disminuye considerablemente, la postura erecta se pierde y se favorece la pérdida del balance). El peso del cerebro se reduce, ciertas poblaciones neuronales son más propensas a cambios morfológicos, la concentración o la actividad de algunas enzimas involucradas en la síntesis de neurotransmisores (dopamina, norepinefrina, serotonina y en menor medida acetilcolina) decrece y el sueño

alcanza con menos frecuencia el estado MOR y su duración total se reduce conforme se va envejeciendo, aunque no desaparece por completo.

Las neuronas son células altamente especializadas que han perdido la capacidad de dividirse, además de ser particularmente sensibles a un gran número de factores externos. Cuando una neurona es dañada, el sistema suple su función reorientando las sinapsis de otras neuronas con el fin de completar el nodo faltante. Pero si un grupo de ellas muere, dejará tras de sí una función alterada irreparable. Así, ciertas anomalías en circuitos neuronales específicos pueden resultar en signos o síntomas relacionados con el envejecimiento. De esta forma, al envejecer, la disminución de ciertas funciones cerebrales es un proceso frecuente a medida que la edad es más avanzada.

De manera paralela al proceso de envejecimiento, un número cada vez mayor de individuos presentan padecimientos neurodegenerativos, que se caracterizan por ser crónicos y progresivos, los cuales culminan con la muerte del sujeto. La neurodegeneración es un proceso cuya aparición depende principalmente del estado del individuo, que se da con mayor o menor velocidad tomando en cuenta la predisposición genética, las características particulares del metabolismo así como los factores externos imperantes. Las características clínicas de estos padecimientos están dadas por las poblaciones neuronales que se vean afectadas.

Por lo tanto, es de interés central para la neurociencia básica, conocer los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a estos procesos, los cuales determinan la selectividad de las poblaciones neuronales afectadas, así como la propensión por parte de algunos individuos a desarrollarlas.

El estudio de los factores que intervienen en la muerte neuronal y de los mecanismos que los gobiernan, es útil desde el punto de vista médico al tratar de mejorar la calidad de vida de los ancianos y desde el punto de vista biológico permite vislumbrar cómo madura y se regula la actividad funcional del sistema nervioso central (SNC) durante las diversas etapas de su vida.

IV. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad demencial neurodegenerativa de mayor frecuencia en personas mayores de 60 años que afecta a varios millones de individuos en todo el mundo. La EA fue descrita a principios del siglo XX por el médico alemán Alois Alzheimer, tras realizar estudios histopatológicos al cerebro de una mujer de 51 años que presentaba un tipo de demencia presenil. Hasta el momento no se conocen del todo las causas que provocan la muerte neuronal, tampoco existe ninguna prueba definitiva para el diagnóstico en vida del paciente, ni un tratamiento efectivo.

Algunos de los síntomas clínicos característicos de la EA son, la pérdida de la memoria a corto plazo, el deterioro cognoscitivo progresivo, cambios en la personalidad, alteraciones en los patrones del habla, dificultad para realizar tareas rutinarias y en etapas finales de la enfermedad, una pérdida total de independencia. Estos síntomas se han dividido en tres etapas dependiendo del progreso de la enfermedad. En la primera se presenta una pérdida en la memoria a corto plazo y desorientación espacio-temporal. En la segunda se presentan los primeros síntomas no cognoscitivos (cambios en la personalidad, ansiedad, tensión, irritabilidad, apatía, etc.), una afectación generalizada de la memoria, diafasias, pérdida del juicio y del pensamiento abstracto. En la última etapa, hay un aumento del tono muscular, el deterioro cognoscitivo es tal que el individuo es incapaz de reconocer a sus familiares e incluso a sí mismo hasta que pierde todo contacto consciente con el mundo. El control de algunas funciones corporales (regulación de esfínteres) desaparece, por lo que en este momento el individuo presenta una dependencia total (para revisión ver Arias, 1999). Desde el inicio de la enfermedad hasta la muerte del individuo pueden transcurrir de 12 a 20 años.

Entre las principales características de este padecimiento se encuentran dos lesiones histopatológicas: las marañas neurofibrilares y las placas amiloides o seniles. Las primeras son depósitos intraneuronales de proteína *tau*, la cual estabiliza los microtúbulos axonales, mientras que las segundas son depósitos extraneuronales de una proteína llamada proteína β -amiloide ($A\beta$). Aunque hasta el momento no se conocen los mecanismos por los cuales se generan estos dos rasgos histopatológicos, la presencia de $A\beta$ parece ser un factor importante en el desencadenamiento de la muerte neuronal.

Las personas que padecen la EA, presentan grandes alteraciones en la estructura del citoesqueleto neuronal (Delacourte, 1986). Como resultado de este evento, se generan estructuras conocidas como filamentos helicoidales apareados (FHA), las cuales se asocian para producir las marañas neurofibrilares (Kidd, 1963; Wisniewski, 1976). Las marañas se encuentran principalmente en el soma neuronal abarcándolo casi en su totalidad (Iqdal, 1991). El análisis de los FHA permitió la identificación de la proteína asociada a microtúbulos *tau* en forma de polímeros insolubles (Wischik, 1988).

El gen de la proteína *tau* se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 en el humano (Neve, 1986), a partir del cual, en el cerebro adulto se generan 6 isoformas (Goedert, 1989). *Tau* se localiza principalmente en los axones (Binder, 1985) participando en su elongación y estabilización (Caceres, 1991) y siendo fundamental para las funciones neuronales ya que regula su morfología (Knops, 1991) y fisiología. La asociación de *tau* con los microtúbulos, permite una mayor estabilización de estos, promoviendo la polimerización de la tubulina al bajar la concentración crítica requerida para el ensamblaje de los microtubulos y suprimiendo su despolimerización (Cleveland, 1977; Weingarten, 1975). Su actividad biológica se encuentra regulada por el grado de fosforilación que presenta. De manera normal *tau* posee 2-3 moles de fosfato, pero pacientes con la

EA muestran una hiperfosforilación que alcanza de 10-12 moles de fosfato por mol de proteína (Alonso, 1994; Ksiezak- Reding, 1992). La hiperfosforilación de tau reduce su capacidad de unión a microtúbulos, además de promover su auto agregación (Alonso, 1996). Esto conduce a un ensamblaje defectuoso de los microtúbulos y a la formación de estructuras filamentosas (marañas neurofibrilares) que afectan el flujo axoplásmico, la morfología y el funcionamiento normal de las neuronas favoreciendo la neurodegeneración (Davies, 1994).

Las placas seniles están conformadas por un núcleo compuesto principalmente por proteína A β rodeadas por neuritas distróficas y procesos de células gliares reactivas, se observan más frecuentemente en la amígdala, el hipocampo y la neocorteza (para revisión ver Arias C., 1999). El núcleo proteico alcanza cerca del 25% del peso seco de las placas seniles, y de este porcentaje alrededor del 70% es A β (Millar, 1993). Entre las proteínas que también han sido identificadas se encuentran la α_1 -antiquimotripsina (Abraham, 1988), la apolipoproteína E (Namba, 1991), proteasas lisosomales (Cataldo, 1992) y enzimas antioxidantes (Pappolla, 1992), aunque se desconoce si tienen participación en la formación de la placa o simplemente son absorbidas por esta. Adicionalmente se han detectado proteoglicanos de heparan sulfato, los cuales podrían participar en al formación de fibrillas amiloideas (Snow, 1990).

Además de la existencia de placas seniles, la disminución en la densidad sináptica y neuronal que sucede en el hipocampo y la neocorteza en algunos individuos durante el envejecimiento, parece ser responsable y correlaciona con la deficiencia cognoscitiva que tipifica la primera etapa de la EA (Carter y Liapp, 2001; Masliah, 1991). La disminución en la densidad sináptica se refleja como la pérdida de la mayoría de los componentes de las vesículas sinápticas y la mayoría de los péptidos almacenados en vesículas (Arendt, 2001). Esta pérdida sináptica, puede llegar a ser hasta de un 75% en el hipocampo, y parece ser un evento previo

a la muerte neuronal (Terry y Katzman, 2000). De hecho, la pérdida de la proteína sinaptofisina, la cual está asociada a las terminales sinápticas, es un evento temprano en la EA.

Estas alteraciones en los sitios de comunicación neuronal no son exclusivos de la EA, en la mayoría de las patologías neurodegenerativas la pérdida sináptica parecería ser una condición previa a la degeneración celular. Más aún, durante el envejecimiento, el número promedio de sinapsis en el cerebro de humanos se encuentra disminuido con respecto al número de neuronas en individuos jóvenes (Terry y Katzman, 2000). Esto nos hace pensar que si, además de la pérdida sináptica aparentemente inevitable en el envejecimiento, existen algunas otras condiciones que pueden influir de manera no favorable en el funcionamiento sináptico, sometido a mecanismos de neuroplasticidad continuos, se generarían condiciones muy propicias para la rápida degeneración sináptica y posteriormente la muerte neuronal.

Entre los principales factores que parecen influir en el daño sináptico destaca la presencia de la proteína A β soluble, en el parénquima y en las paredes de los vasos sanguíneos del cerebro y las meninges de los pacientes con EA. Se ha mostrado que pacientes con la EA (de origen familiar) presentan mutaciones en la proteína precursora del péptido amiloide (APP), lo cual favorece la formación y secreción de la A β . Esto también ha sido demostrado en modelos animales que expresan la APP humana con dichas mutaciones y que de manera interesante presentan una disminución de la proteína actina, la cual se encuentra en las terminales nerviosas y se puede considerar como marcador de pérdida sináptica. (Cole, 1999).

IV.1 PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE.

El gen de la APP se localiza en el cromosoma 21, consta de 18 exones que a partir del procesamiento alternativo puede generar 10 isoformas. Las proteínas generadas pueden constar de 563 hasta 770 amino ácidos. Las neuronas expresan la isoforma APP₆₉₅ (Coulson, 2000). La APP es una glicoproteína transmembranal del tipo 1 de entre 120-200 kD, integrada por 3 regiones (Kang, 1987): un gran dominio extracelular en la región N-terminal que forma una estructura globular (Rossonjohn, 1999); una sola región transmembranal, que contiene parte de la secuencia de la A β ; y un pequeño dominio citoplasmático en la región C-terminal.

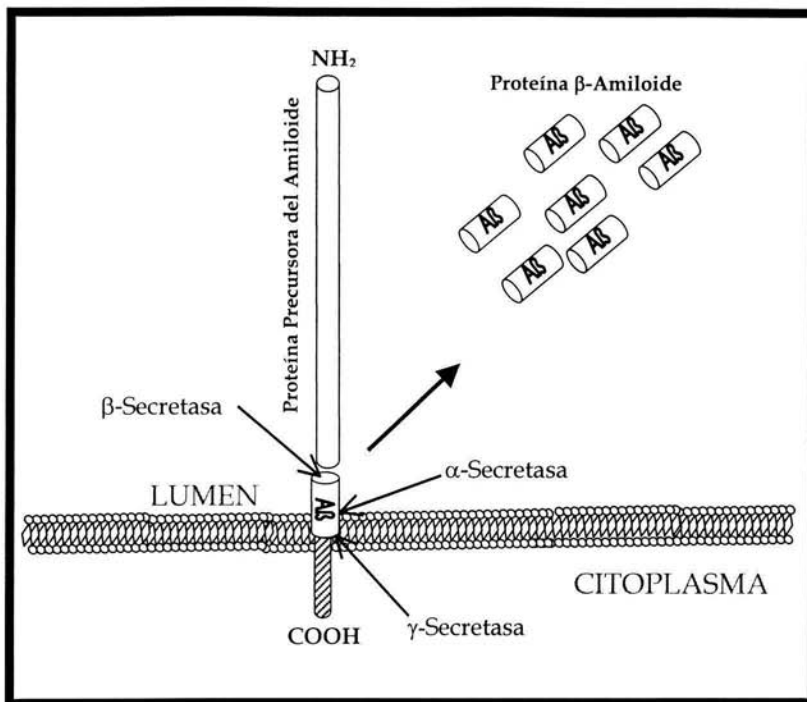
Entre las características celulares de la APP se ha mostrado que sufre de un rápido transporte hacia las terminales sinápticas y se ha encontrado también presente en las uniones neuromusculares. Adicionalmente, se conoce su capacidad de interactuar con componentes de la matriz extracelular lo que sugiere su participación en la fisiología de la neurona como un receptor membranal involucrado en la adhesión celular (Ghiso, 1992). De esta manera, la APP podría participar en el mantenimiento, estabilidad y función sinápticas. También se ha sugerido su interacción con los microtúbulos implicándola en el proceso de tráfico vesicular. Además de participar como un factor involucrado en el crecimiento y guía axonal durante el desarrollo (Ninomiya, 1993). Dentro de la región citoplasmática de la APP, se han identificado ciertos dominios consenso que sugieren su participación en vías de señalización (Nishimoto, 1993; Nordstedt, 1993), así como en la regulación de factores de transcripción (Minopoli, 2001).

La APP, implicada en la EA, es una proteína ubicua que se expresa de manera normal. En el SNC puede funcionar como un factor neurotrófico, participando durante el desarrollo y la vida adulta. Algunos reportes reciente han señalado que el proceso de transcripción de la APP se encuentra regulado a la alta

durante la inducción de la LTP, y que este efecto se ve disminuido durante la vejez (Stéphan, 2002).

IV.2 PROTEÍNA β -AMILOIDE.

La A β es un péptido de 40-42 amino ácidos, que se origina a partir del corte proteolítico de la APP por la acción de la β y γ -secretasas (como se ilustra en el Esquema 1) (Lichtenthaler SF., 1999; Seubert P., 1993; Tienari PJ., 1997). Por esta razón es relevante el conocimiento de algunas condiciones bioquímicas que favorezcan la formación exacerbada de A β , al inducir un procesamiento anormal de la APP, el cual favorezca la vía amiloidogénica. En un inicio se creía que era necesario que la A β se encontrara en un estado agregado para ejercer sus efectos tóxicos. Sin embargo, un estudio reciente señala que formas diméricas y oligoméricas también pueden tener un efecto deletéreo sobre las neuronas (Freir, 2001; Wang HW, 2002). Entre estos efectos destacan: la desregulación de la homeostasis del calcio (Hartmann H., 1993; Mattson, 1992); la generación de radicales libres y la subsecuente oxidación de lípidos de membrana y proteínas (Behl, 1994; Buttterfield, 1994; Smith-Swintosky, 1995). Así mismo, la A β es capaz de potenciar el efecto de distintos agentes tóxicos neuronales, incluyendo el producido por los aminoácidos excitadores (Koh, 1990; Behl, 1992; Mattson, 1992), la privación de glucosa (Copani, 1991) y el estrés oxidante (Lockhart, 1994; Behl, 1997). También se ha reportado la capacidad de la A β para promover la fosforilación de la proteína Tau, en cultivos neuronales de corteza e hipocampo (Busciglio, 1995); así como la inhibición de la LTP en el hipocampo de rata, tanto *in vivo* como *in vitro* (Freir, 2001; Wang, 2002).



Esquema 1. Participación de las distintas secretasas involucradas en el procesamiento de la APP para la generación de la Aβ.

Así, un escenario plausible de eventos que pueden conducir a la muerte neuronal en la EA y que nos sirve como hipótesis de trabajo, podría iniciar con algún tipo de daño sináptico en las áreas de la neocorteza y el hipocampo (excitotoxicidad, deficiencia energética, desregulación de la homeostasis del calcio, inducción de radicales libres, envejecimiento), lo que generaría señales aberrantes desde los sitios de lesión (sinapsis) hacia el soma neuronal, alterando la funcionalidad normal celular y provocando finalmente la muerte neuronal. Estos eventos de manera crónica y con intensidad variable, dependiendo de la susceptibilidad genética y de factores exógenos aún no identificados, conducirían a la neurodegeneración y finalmente a la muerte de poblaciones neuronales interconectadas.

V. ALTERACIONES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO EN LA EA

Existe evidencia epidemiológica que sugiere una fuerte correlación entre enfermedades vasculares que predisponen a problemas cerebrovasculares o isquemia y EA, lo que ha llevado a proponer este tipo de alteraciones como un factor de riesgo (Grammas, 2000; Kalaria 2000). Más aún, se ha observado que episodios de isquemia vascular cerebral empeoran y aceleran el decaimiento cognoscitivo de pacientes con EA comparado con el que ocurriría en pacientes sin esta demencia (Pasquier, 1997).

Las enfermedades cerebrovasculares que incluyen la isquemia cerebral y la hemorragia cerebral se caracterizan por una depleción energética celular profunda, seguida de una acumulación extracelular de glutamato. Ambos eventos, que comúnmente se asocian con un incremento en la producción de radicales libre y con la desregulación de la homeostasis del calcio, entre otras situaciones, culminan con la muerte neuronal (Ikonomidou y Turski, 1995).

El cerebro depende continuamente del metabolismo de la glucosa para su funcionamiento normal. Aunque el cerebro representa sólo el 2% de la masa corporal total, utiliza cerca del 20% del total de glucosa circulante. Interrupciones mínimas en el aporte de glucosa afectan la función cerebral de manera inmediata. Por ejemplo una disminución de oxígeno o glucosa disminuye la memoria (Gibson, 1981) y en algunos casos pueden llevar a convulsiones y coma. La disminución de la actividad de las enzimas α -cetoglutarato deshidrogenasa y transenolasa, se ha correlacionado con deficiencias de memoria severa en el hombre (Butterworth, 1993). Los cambios en el metabolismo energético están estrechamente ligados a la generación de especies reactivas de oxígenos (ROS) y alteraciones en la regulación del calcio intraneuronal.

Varios grupos han reportado, en el cerebro de pacientes con EA, una disminución en la utilización de glucosa, comparado al de sujetos sanos pero de edades similares. Esta reducción es particularmente importante en la corteza entorrinal de manera muy temprana. A mayor demencia, mayor reducción del metabolismo energético (Pietrini, 2000). También se ha encontrado que aquellos pacientes predispuestos genéticamente a la EA tienden a desarrollar cambios en el metabolismo cerebral antes de iniciar con la sintomatología (Small, 2000). Es interesante el hecho de que aquellos pacientes con impedimento cognoscitivo medio y una reducción en el metabolismo energético cerebral, frecuentemente desarrollan EA, y, además, la reducción del metabolismo de la glucosa puede predecir la deficiencia cognoscitiva en sujetos normales envejecidos (de Leon, 2001; De Santi, 2001).

Por estos datos se puede concluir que el metabolismo energético, principalmente la utilización de glucosa, juega un papel muy importante, aunque no bien conocido, en la etiopatogenia de la EA. De esta manera en este trabajo de tesis un primer planteamiento es estudiar las repercusiones de una disminución en el metabolismo energético en la toxicidad de una de las proteínas que se acumulan en la EA, la A β .

Una manera de reducir el metabolismo energético es utilizar sustancias que inhiban enzimas relacionadas con la glucólisis, el ciclo de Krebs o la cadena del transporte de electrones.

V.1 DROGAS QUE MIMETIZAN DEFICIENCIA ENERGÉTICA

La excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial y los radicales libres son capaces de inducir daño oxidativo, el cual ha sido implicado en la patogenia de diversas enfermedades neurodegenerativas. Para estudiar el papel de la disfunción

mitocondrial y el daño oxidativo dentro de los procesos neurodegenerativos se han utilizado diversas toxinas mitocondriales para el desarrollo de modelos animales capaces de mimetizar dichas patologías. Entre estas drogas se encuentra el MPTP, cuyo metabolito activo el MPP⁺, actúa como un inhibidor del complejo I de la cadena transportadora de electrones. Con este tratamiento se ha logrado generar parkinsonismo en humanos, primates y ratones. De manera similar, la inhibición de la enzima succinato deshidrogenasa (complejo II) a través del uso del malonato, así como el del ácido 3-nitropropiónico (3NP) mimetiza de forma muy cercana las características histológicas, neuroquímicas y clínicas de la enfermedad de Huntington (EH) tanto en ratas como en primates.

3-Nitropropiónico.

El 3NP es una toxina mitocondrial que interfiere con la síntesis de ATP. Su aplicación en modelos animales (y su ingestión accidental en humanos) induce una neurodegeneración selectiva en estructuras de los ganglios basales, así como disfunciones motoras caracterizadas por distonía, corea e hipocinesia. El compromiso metabólico generado por su aplicación, involucra tres vías principalmente: el desacoplamiento energético, la excitotoxicidad y el estrés oxidante. Sin embargo, el 3NP es capaz de inducir un desacoplamiento generalizado del metabolismo energético a través de todo el cerebro y el cuerpo, sin que esto lleve a la degeneración celular.

La interrupción de la fosforilación oxidativa resulta en un decremento de los niveles de ATP, como consecuencia, la despolarización parcial de la neurona y la activación secundaria de receptores tipo NMDA dependientes de voltaje conducen a una muerte neuronal por excitotoxicidad. El incremento de la concentración intracelular de Ca²⁺ conduce a la activación de enzimas dependientes de Ca²⁺, como la sintasa de óxido nítrico constitutiva (csNOS). El

óxido nítrico (ON) producido es capaz de reaccionar con el anión superóxido y generar peroxinitritos, que son una de las especies de oxígeno más reactivas.

Yodoacetato

El yodoacetato (IA) es un compuesto capaz de unirse a la enzima glucolítica, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Esta enzima interviene en la catálisis del gliceraldehído 3-fosfato hacia 1,3 difosfoglicerato, paso importante en la vía de la glucólisis ya que se generan 2 moléculas de NADH que entran hacia la cadena del transporte de electrones para generar 2 ATPs.

El IA produce una inhibición irreversible de la enzima mencionada ya que acetila a la cisteína 149 que se localiza en el sitio activo de la enzima. Existen varios modelos animales *in vitro* e *in vivo* en los cuales se ha utilizado yodo acetato para inducir un estado de depleción energética (Izumi, 1999).

VI. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y EA

Las ROS se definen como moléculas que contienen un átomo de oxígeno con un electrón no apareado capaz de oxidar moléculas funcionales, o bien moléculas derivadas del oxígeno que son muy reactivas y electrónicamente inestables. En el cerebro de los pacientes con EA existe un incremento en la producción de ROS (Smith, 2000) debido a la disminución del metabolismo energético y en parte por la presencia de la acumulación de la A β , el estado inflamatorio crónico y la muerte neuronal. La excesiva producción de ROS daña proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Existe evidencia de la producción de aldehídos reactivos como la acroleína, que se encuentra presente en las marañas neurofibrilares, y el hidroxinonenal (Markesbery, 1999) puede ocasionar aumento de la lipoperoxidación en el cerebro de los pacientes con EA.

El estrés oxidante y la disminución del metabolismo energético puede, por su parte, aumentar la producción de la A β . Se ha visto que pacientes que mueren por padecimientos asociados con mutaciones del ADN mitocondrial, tienen presencia de placas de A β (Kaido, 1996). En animales transgénicos que sobreexpresan el gen mutado de la APP, se ha observado que la producción de ROS precede a la formación de placas amiloideas (Pratico, 2001). Un dato interesante es que el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) incrementa la producción y acumulación de A β en el cristalino (Frederikse, 1996).

Aunque existen algunas evidencias más en este sentido, es claro que el estrés oxidante juega un papel patológico importante en el cerebro de pacientes con EA, tanto dañando y exacerbando la toxicidad de otros compuestos que se acumulan en estos pacientes, como aumentando la producción de la A β . Por lo tanto resulta importante valorar el papel de agentes antioxidantes para contrarrestar algunos de los eventos que inducen neurotoxicidad y que se relacionan con una producción aumentada de ROS.

VII. AGENTES PROTECTORES DEL ESTRÉS OXIDANTE

Durante la respiración celular se producen ROS, como parte de los procesos fisiológicos normales y las células mantienen un estado de equilibrio redox, debido a la acción de diversos sistemas de amortiguamiento (entre los que se encuentran las enzimas catalasa y superóxido dismutasa, por ejemplo). Mantener este equilibrio es indispensable para la célula, ya que las ROS poseen múltiples funciones dentro del contexto celular, pudiendo actuar como segundos mensajeros. Sin embargo, cuando su regulación sale de control, generan severos daños a los componentes celulares afectando su integridad funcional y estructural.

El estrés oxidante se genera cuando el sistema antioxidante de defensa no puede actuar, ya sea por deficiencia energética o por su incapacidad de revertir la generación exacerbada de ROS.

Así, algunos estudios muestran que el cerebro es particularmente sensible al daño oxidante, ya que este contiene altas concentraciones de ácidos grasos polinsaturados, tasa elevada de consumo de oxígeno además de poseer un sistema de defensa antioxidante relativamente más débil en comparación con el resto del cuerpo. Otros trabajos señalan que conforme aumenta la edad, los sistemas de remoción de radicales libres empiezan a disminuir y sus efectos se notan en un incremento en la peroxidación de lípidos de membrana y oxidación de proteínas. Este daño se considera como el producto de un continuo estrés oxidante al cual todos los sistemas aeróbicos están expuestos.

La mitocondria es el único organelo en las células animales que posee su propio ADN, el cual codifica para componentes de la cadena respiratoria y para el sistema de fosforilación oxidativa. Diversos investigadores han encontrado que de manera normal, las mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNm) aumentan con la

edad como resultado de la actividad oxidoreductora mitocondrial, aunado a que el ADNm carece de sistemas de reparación (Yakes y Houten, 1997). Adicionalmente, se han descrito varios padecimientos mitocondriales resultado de mutaciones en algunos genes específicos del ADNm, lo que genera un incremento en la producción de radicales libres. Así mismo, en pacientes con la EA se ha reportado la inhibición del complejo mitocondrial IV, lo que conduce a un aumento en la generación de ROS y también al manejo inadecuado del iCa^{2+} (Sheehan, 1997). En conjunto, estos hallazgos parecen validar la teoría mitocondrial del envejecimiento.

De este modo, las mitocondrias dañadas generan un exceso de radicales libres y ello puede favorecer la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares causando la desorganización y rompimiento de las membranas mitocondriales, promoviendo la retroalimentación del mismo proceso. Adicionalmente se induce la oxidación de proteínas, lo cual conduce a la formación de proteínas carboniladas, lo que afecta su función. Así mismo, durante la vejez este tipo de proteínas oxidadas aumenta y su tasa de remoción disminuye (Subramaniam, 1998). Estos cambios tienen importantes repercusiones en la fisiología celular normal, por lo que la utilización de compuestos antioxidantes y atrapadores de radicales libres presentan grandes posibilidades terapéuticas. Entre estos compuestos se encuentran la vitamina E, que actualmente tiene un uso terapéutico en la clínica, así como el atrapador de radicales, llamado PBN, el cual ha sido muy estudiado desde el punto de vista experimental.

VII. 1 ANTIOXIDANTES.

Vitamina E

Se denomina como vitamina E a un grupo de ocho isómeros derivados de tocoles y tocotrienoles, del cual el α -tocoferol es el compuesto con actividad

biológica más importante. La vitamina E es un componente ubicuo, presente en membranas lipídicas y lipoproteínas. Su metabolismo está estrechamente asociado a los lípidos durante la absorción intestinal, la secreción y transporte plasmático, así como su integración a las células. Es un elemento clave involucrado en diversos procesos fisiológicos (neurológicos e inmunes). Diversos estudios han sugerido que las ocho isoformas son absorbidas casi por igual en el intestino, posteriormente el α -tocoferol, posee mecanismos específicos que promueven su acumulación en el cuerpo humano.

La función con la que de manera más común se relaciona a la vitamina E, es por su efecto antioxidante, al proteger moléculas y tejidos en contra de los efectos dañinos de los radicales libres. Otras funciones descritas para el α -tocoferol son: su contribución a la estabilización de las membranas biológicas; sus efectos inhibitorios sobre la proliferación celular, la agregación plaquetaria, la adhesión de monocitos y el estallido de oxígeno en neutrófilos; su capacidad para regular diversas enzimas, por ejemplo, inhibir a la proteína cinasa C y a la 5-lipoxigenasa, o activar a la fosfatasa 2A y la diacilglicerol cinasa; y el mediar la expresión de algunos genes, como el del receptor CD36, la proteína transportadora del α -tocoferol (α -TTP) y la colagenasa. Aunque se desconoce la naturaleza exacta en los mecanismos moleculares de su acción.

La acción protectora del α -tocoferol, se presenta al funcionar como un atrapador de radicales peroxilo lipídicos, capaz de detener la propagación de la reacción oxidante en cadena que se desarrolla en las membranas. El componente cíclico que integra a la molécula de tocoferol, le permite manejar de una forma más adecuada al electrón desapareado que adquiere después de oxidarse, con lo que se da origen a un radical más estable y poco reactivo. El radical tocoperoxil así formado, es transformado a su forma reducida al entrar a un ciclo de oxidoreducción en el que pueden participar la coenzima Q (Ingold, 1993) o las vitaminas

A y C (Bohm, 1998; Constantinescu, 1993). La eficiente reconversión del α -tocoferol potencia de manera muy importante su papel como antioxidante lipídico. La vitamina E forma complejos con lisofosfolípidos y ácidos grasos libres, liberados por la acción de la hidrólisis de lípidos de membrana. La estequiometría de dichos complejos es de 1:1 y en consecuencia el balance general en la afinidad hidrofóbica-hidrofílica dentro de la membrana se ve restaurada.

VII.2 ATRAPADORES DE RADICALES LIBRES.

PBN

El uso de nitronas como una herramienta farmacológica de utilidad ha sido estudiado extensamente debido a su baja toxicidad, su habilidad para penetrar y encontrarse disponible en la mayoría de los tejidos del cuerpo y su gran capacidad para atrapar radicales libres, tanto en el caso de enfermedades neurodegenerativas como en algunas otras asociadas a la vejez. (Floyd, 1999; Hensley, 1999) Entre estos compuesto se encuentra el α -fenil-N-ter-butil nitrona (PBN). La estructura molecular del PBN le permite interactuar y capturar a los radicales libres (altamente reactivos y de vida media muy corta) para formar un radical nitróxido de menor reactividad y mayor estabilidad. El PBN, es rápidamente absorbido alcanzando su pico de concentración alrededor de 20 min después de haber sido inyectado intraperitonealmente. Tiene una vida media de alrededor de 135 minutos, alcanzando una concentración aproximada en el cerebro de 500 μ M. La cinética de desaparición del PBN en el cerebro, es mucho más lenta que en el resto del cuerpo.

En 1985, Novelle reportó por primera vez los efectos protectores del PBN usando como modelo a la rata, y posteriormente esto fue confirmado en gerbos. Su actividad neuroprotectora fue demostrada después de inducir un infarto cerebral, observándose sus efectos incluso horas después de haberse presentado el infarto, al

proteger de los daños producto de la isquemia y reperfusión (Floyd, 1990). También, el tratamiento crónico con PBN en cobayos viejos demostró su eficacia para restaurar la memoria espacial a corto plazo. Este hallazgo apunta a una conexión importante entre la acumulación de formas oxidadas de proteínas y un mal funcionamiento del sistema nervioso central (pérdida de la memoria).

VIII. ESTUDIO LA TOXICIDAD DEL β -AMILOIDE Y DEL METABOLISMO DE LA APP

A pesar de que la participación de la β A en el desarrollo de la EA ya ha sido aceptada, aun existen controversias sobre su papel en los mecanismos que desencadenan la neurodegeneración en la enfermedad. Diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* señalan que la A β puede desencadenar una serie de eventos bioquímicos, como alterar el balance oxidoreductor del sistema, así como los niveles de Ca^{2+} (Pike, 1993). Esto último puede promover la activación o inhibición de ciertas enzimas que intervengan en el desarrollo de la enfermedad.

Como ya ha sido mencionado, la A β se genera a partir del procesamiento de la APP, por lo que es de gran importancia determinar que factores intervienen en la regulación de sus procesos proteolíticos.

VIII.1 SINAPTOSOMAS COMO UN MODELO DE TOXICIDAD DEL β -AMILOIDE.

Aislados por primera vez por Hedd en 1957, los sinaptosomas han sido utilizados como un modelo que ha permitido estudiar la ultraestructura de las terminales sinápticas, así como parte de los mecanismos bioquímicos y moleculares de su funcionamiento y regulación.

Estructuralmente, los sinaptosomas contienen todos los componentes involucrados en la formación y consolidación de las uniones sinápticas, así como para el almacenamiento de transmisores. Bajo condiciones metabólicas, los sinaptosomas tienen la capacidad de respirar, capturar oxígeno y glucosa, acumular K^+ y extruir Na^+ , así como mantener su potencial de membrana en niveles normales. En condiciones de despolarización, liberan transmisores de manera Ca^{2+} -dependiente (Bernstein y Bumburg, 1997). De manera interesante, condiciones patológicas que promuevan el estrés oxidante o la presencia de A β

son capaces de bloquear el transporte de glutamato en sinaptosomas (Mattson, 1998^a).

Como ya ha sido mencionado previamente, la pérdida sináptica parece ser un evento temprano característico en la EA, el cual puede estar promovido por las grandes fluctuaciones en las concentraciones de Ca^{2+} y el estrés oxidante resultado de los procesos normales de transmisión sináptica a lo largo de toda la vida (Mattson, 1998). Diversos reportes señalan que la pérdida sináptica puede ser el resultado de un proceso conocido como sinaptoapoptosis, en el cual de forma muy localizada se puede presentar la activación de ciertas caspasas, cuyo efecto proteolítico se ve restringido a la terminal sináptica (Mattson, 1998^{a,b}; Mungarro-Menchaca, 2002).

El uso de los sinaptosomas como modelo de estudio, es de gran utilidad debido a la facilidad con que pueden ser aislados, además de que permite explorar los posibles mecanismos a través de los cuales ejerce su acción el A β de una manera directa y alejada de la influencia de otros componentes celulares. Para poder determinar así sus efectos específicos sobre algún proceso particular en las terminales nerviosas.

VIII.2 CULTIVO DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO PARA EL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LA APP.

El uso de cultivos celulares nos permite estudiar de manera más detallada y bajo condiciones controladas el procesamiento de la APP, con la ventaja de que este sistema posee todos los elementos celulares y moleculares que intervienen en la generación de la A β . Es importante señalar, que la utilización de una línea celular derivada de humano posee una mayor relevancia, a fin de entender que

factores pueden estar interviniendo en el desarrollo de la EA de origen esporádico, al alterar el procesamiento y regulación de la APP.

Algunos estudios realizados *in vivo* e *in vitro* (tanto en cultivos primarios como en líneas celulares) muestran evidencias de diferentes factores que pueden influir en la producción de A β , y cuya presencia se ha documentado en la EA. Entre estos se encuentran los radicales libres (Yankner, 1996). Algunos metales como el Cu²⁺, Fe²⁺ y Zn²⁺, los cuales pueden interactuar de forma directa ya sea con el ARNm o la misma APP, así como con algunas de las proteínas que participan en su procesamiento (Strausak, 2001). Así como los niveles del AMPc (Lee, 1999), en este sentido existen algunos reportes epidemiológicos que indican que situaciones que aumenten la concentración de adrenalina o noradrenalina favorecen el desarrollo de la EA. Sin embargo, hasta el momento se desconocen de qué manera estos factores pueden inducir una sobreproducción de A β *in vivo*. Por lo tanto resulta fundamental para el conocimiento de la etiopatogenia de la EA, encontrar situaciones metabólicas que generen un exceso tanto en la producción de APP como en la generación de A β .

IX. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Evidencia experimental y epidemiológica sugiere que una reducción del metabolismo energético puede inducir daño neuronal o facilitar el efecto deletéreo de agentes neurotóxicos. Siendo las terminales nerviosas compartimentos que demandan una gran cantidad de energía para su funcionamiento y un sitio particularmente vulnerable al daño inicial en la EA, en el presente trabajo se analizará la influencia de la inhibición glicolítica y el bloqueo de la actividad mitocondrial en la toxicidad de la A β en sinaptosomas.

X. HIPÓTESIS

1. La toxicidad de la proteína A β se exacerbará en condiciones de deficiencia energética en terminales nerviosas aisladas. Esta toxicidad se acompañará de un aumento en la producción de radicales libres y el uso de antioxidantes prevendrá dichos efectos tóxicos.

2. El metabolismo de la APP bajo ciertas condiciones bioquímicas, como la elevación de los niveles de AMPc, la presencia de metales y un estado de estrés oxidante, generará un exceso de A β en neuronas en cultivo.

XI. OBJETIVOS

- Caracterizar la potenciación de la toxicidad de la A β , utilizando su fragmento activo 25-35, bajo condiciones de deficiencia energética en terminales nerviosas aisladas de ratas jóvenes y viejas.
- Evaluar los efectos protectores de sustratos del metabolismo energético y compuestos antioxidantes.
- Analizar el grado de lipoperoxidación en sinaptosomas bajo las diferentes condiciones experimentales.
- Identificar algunas condiciones que potencien la generación de la A β al alterar los mecanismos de procesamiento de la APP, en cultivos de células de neuroblastoma humano.

XII. MÉTODOS

XII.1 OBTENCIÓN DE SINAPTOSOMAS.

Para este estudio se utilizaron ratas Wistar machos jóvenes de 250 g y viejas de entre 18-20 meses de edad siguiendo los lineamientos de investigación en materia de salud (Secretaría de Salud, México), con la aprobación del Comité Local de Ética para el Manejo de Animales.

La purificación de la fracción sinaptosomal se realizó mediante el método descrito por Löscher (Löscher W, 1985). Las ratas se decapitaron y el cerebro fue removido, la corteza y el hipocampo se disecaron sobre hielo (4° C). A continuación los tejidos fueron homogenizados por separado en una solución (1g/ml) de sacarosa 0.32 M pH 7.2 con HEPES 5 mM (10% p/v). Los homogenizados se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 min, al término de los cuales se separó el sobrenadante. Este se colocó sobre 1 ml de sacarosa 1.2 M y se centrifugó a 50000 rpm durante 15 min en un rotor de ángulo fijo modelo 80Ti. Tras ésta centrifugación se obtuvo un pellet (que contiene la fracción mitocondrial), un sobrenadante (que posee la mayor parte de la fracción microsomal) y una interfase (en donde se encuentran la fracción sinaptosomal, mielina y una mínima parte de la fracción microsomal). Esta última fue diluída en sacarosa 0.32M para obtener un volumen final de 2 ml. La fracción se colocó sobre 1 ml de sacarosa 0.8 M para ser centrifugada nuevamente a 50000 rpm durante 15 min. El pellet que se obtuvo corresponde a la fracción sinaptosomal la cual fue resuspendida en 3 ml de buffer Locke pH 7.2: NaCl 154mM, KCl 5.6mM, CaCl₂ 2.3mM, MgCl₂ 1mM, NaHCO₃ 3.6mM, glucosa 5mM, HEPES 5mM, para el caso de la corteza cerebral y 2ml para el del hipocampo.

Se tomaron alícuotas y se determinó una concentración de 50 μg de proteína sinaptosomal por cada 200 μl . Dichas concentraciones se incubaron a 37° C en un baño con agitación durante 3 horas bajo los distintos tratamientos: A β (50 μM) en presencia o ausencia de IA (5 μM), 3NP (10 μM) y de las diferentes combinaciones con piruvato (1 mM), Vitamina E (250 μM) y PBN (10 μM).

XII.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL POR EL ENSAYO DE REDUCCIÓN DEL MTT.

La actividad mitocondrial, que a su vez es una medida de integridad celular y en este caso también sinaptosomal, se evaluó mediante una técnica colorimétrica, la cual cuantifica la actividad óxido-reductora de la cadena respiratoria mitocondrial. Esta técnica se basa en la cuantificación de las sales de formazán, un producto insoluble de color morado, generadas a partir de la reducción del 3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazodio (MTT), un compuesto soluble capaz de incorporarse a las mitocondria, por la acción de deshidrogenasas en presencia de NADH (Mossman T, 1983).

Transcurrido el periodo de incubación de los sinaptosomas o los cultivos de neuroblastoma humano con las diferentes condiciones que se mencionarán mas adelante, se agrega el MTT (2% v/v) para obtener una concentración final de 10mM, tanto los sinaptosomas como las neuronas se incubaron durante una hora más. Al término de esta incubación, las muestras obtenidas de sinaptosomas se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 min. A los sinaptosomas sedimentados se les agregaron 500 μl de isopropanol ácido (una mezcla de 2-isopropanol y HCl 1N) para así solubilizar las sales de formazán. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Para las células de neuroblastoma, el procedimiento es el mismo excepto que el isopropanol ácido se agrega directamente a las neuronas.

XII.3 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN LOS SINAPTOSOMAS.

La generación de radicales libres y el subsecuente daño oxidativo en los sinaptosomas de ratas jóvenes, se evaluó al determinar la concentración de lípidos oxidados presentes en las membranas sinaptosomales. El ensayo seleccionado cuantifica la concentración de malondialdehído generado durante el proceso de peroxidación, el cual reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) (Knight J., 1988). Transcurrido el tiempo de incubación con los diferentes tratamientos a los sinaptosomas se les agregaron 400µl del reactivo de TBA (0.375 g de TBA, 15 g de ácido tricloroacético, 2.5 ml de HCl concentrado en 100 ml de agua) y posteriormente se calentaron en una baño con agua hirviendo por 20 min. Trascurrido este tiempo, las muestras se enfriaron en hielo y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm.

XII.4 CULTIVOS DE NEUROBLASTOMA HUMANO.

Los cultivos de células de neuroblastoma humano MSN se crecieron en cajas de 12 pozos hasta que alcanzaron una confluencia de 1×10^6 células por pozo. Se utilizó el medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% v/v (inactivado previamente, al calentarlo durante 1 hora a 60° C), aminoácidos no esenciales: 1mM glutamina, 4.7mM serina y 3.8mM asparagina. Los cultivos se incubaron a 37° C en una atmósfera húmeda al 95% de aire y 5% de CO₂. Tras 4 horas con los distintos tratamientos, se les cambió el medio. Después de 20 horas más de incubación se evaluó la viabilidad celular de los cultivos mediante el ensayo de MTT o se cosecharon para ser analizado el contenido y características de la APP por la técnica de inmumoblot.

XII.5 ELECTROFORESIS E INMUMOBLOT.

Electroforesis

Transcurrido el periodo de tratamiento, las células de neuroblastoma fueron cosechadas usando un buffer de lisis (tris-HCL 50mM pH 7.5, NaCl 150mM, NP-40 1%, desoxicolato 0.5%, cocktail de inhibidores de proteasas (Complete™, Boehringer Mannheim). Las muestras se sometieron a 3 ciclos de sonicado. Cada ciclo consistió de 15 segundos de descargas a 40 kHz y 2 min de reposo, esto se realizó en hielo (4° C). Una vez sonicadas las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min. Se tomo el sobrenadante y posteriormente se cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry modificado (Lowry, 1951).

Para la detección de la A β se utilizó un gel de gradiente del 20-10% acrilamida-SDS y para la detección de la APP se utilizó un gel al 10% acrilamida-SDS. En ambos casos se cargaron 25 μ g de proteína total, por condición, disuelta en un buffer de muestra en condiciones reductoras con 2- β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.05% y SDS (10% p/v). Las muestras se hirvieron durante 8 min a 95° C. El gel se corrió a corriente constante, a 25 mA, en un buffer de corrida (tris-base, glicina y SDS pH 8.3).

Transferencia

El gel se lavó en PBS durante 5 min y posteriormente se equilibró en el buffer de transferencia (25mM tris-base, 192mM glicina, metanol 20%) durante 5 min al igual que la membrana de transferencia (Hybond ECL Nitrocellulose, Amersham Pharmacia Biotech, IL). La transferencia se llevó a cabo en un sistema de cámara húmeda durante 8-16 horas a 250 mA.

Inmunoblots

Posterior a la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución PBS-leche descremada al 5%. Entonces la membrana se incubó en presencia del anticuerpo primario con una dilución 1:500. Se utilizaron los anticuerpos policlonales (Santa Cruz Biotechnology, Inc.): A4 (I-17): sc-7497, que reconoce a la A β y el β -Amyloid (D17): sc-5399, que reconoce a la APP. Después de 3 lavados de 5 min con PBS-albúmina 5%-tween 20 0.1%, la membrana se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo biotinilado. Se lavó nuevamente 3 veces por 5min y se hizo una última incubación con la mezcla AB (Avidina-Estreptavidina). La membrana se lavó 3 veces por 5min, se reveló por un método de quimioluminiscencia con el reactivo ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) y se detectó por medio de un film Kodak Biomax Light.

XII.6 ESTADÍSTICA.

Los resultados mostrados representan el promedio de 5-10 experimentos independientes \pm error standard (ES). Las diferencias significativas se obtuvieron al analizar los datos con la prueba de *t* de student de forma no pareada en el programa Origin 5.0.

XIII. RESULTADOS

Se realizó un curso temporal con el fin de valorar la actividad mitocondrial de la terminal sináptica a lo largo del tiempo. Los sinaptosomas se incubaron durante 2, 3 y 4 horas bajo condiciones control o en presencia de algunos de los tratamientos (datos no mostrados), y posteriormente se evaluó su actividad mitocondrial, a través del uso de la técnica de reducción del MTT. A partir de estos resultados se determinó que el periodo de incubación durante el cual la actividad mitocondrial permanecía sin cambios en los sinaptosomas bajo condiciones controles es de 3 horas, y por esa razón se decidió realizar los diferentes tratamientos por no más de ese tiempo.

Con el fin de determinar el efecto de la A β sobre la viabilidad de las terminales sinápticas y si existe una susceptibilidad tejido-específica, se aislaron de forma independiente sinaptosomas de corteza cerebral e hipocampo. Estos fueron incubados en presencia o ausencia del fragmento activo 25-35 de la A β , además de ser sometidos a distintos tratamientos (inhibidores del metabolismo energético y algunos agentes protectores, como antioxidantes y atrapadores de radicales libres), para así determinar algunas condiciones que potencien o reduzcan los efectos tóxicos de esta proteína.

En la primera serie experimental, que se muestra en la Figura 1, se utilizaron ratas de 250 gr (aproximadamente 3 meses de edad). Los sinaptosomas del hipocampo que fueron expuestos al fragmento 25-35 de la A β mostraron tan solo una disminución del 6.8% en la actividad reductora mitocondrial respecto a los sinaptosomas control, el mismo efecto se presentó al incubar a los sinaptosomas con el atrapador de radicales, PBN (disminución del 6.4%). Las incubaciones con el piruvato y la vitamina E indujeron un incremento en la actividad mitocondrial del 40.5% y 103.3% respectivamente, en relación con los controles. Este incremento

podría deberse a un efecto protector sobre el proceso propio de reducción de la viabilidad de la preparación in vitro a lo largo del tiempo.

Al incubar a los sinaptosomas con el inhibidor glucolítico, IA, la actividad mitocondrial cayó un 25.3%. El PBN no mostró un efecto protector (76.6%), mientras que el piruvato tuvo un efecto mínimo (84.5%) pero significativo estadísticamente al coincubarlos con el IA. La vitamina E fue capaz de revertir el efecto del IA, cuantificándose una actividad mitocondrial 45.6% por arriba de los niveles control.

EL tratamiento conjunto de la A β con el IA redujo la actividad mitocondrial en un 44.6%. Bajo estas condiciones el PBN y el piruvato fueron incapaces de proteger del daño (57.5% y 61.3% respectivamente). Contrariamente a estas dos últimas drogas, la coincubación con la vitamina E, revirtió los efectos tóxicos de la A β mas el IA, e incluso, incrementó la actividad mitocondrial 56.8% por encima de los niveles controles.

En el caso de los sinaptosomas corticales (ver Figura 1), la sola presencia del péptido 25-35 de la A β redujo la actividad mitocondrial del 4.2% el cual no fue estadísticamente significativo. El piruvato y la vitamina E indujeron un incremento en la actividad mitocondrial del 46% y 66.2% respectivamente en relación a los niveles basales. Bajo condiciones control la adición del PBN tuvo un efecto adverso al disminuir la actividad mitocondria en 10%.

En presencia del IA, la actividad mitocondrial cayó un 23.2%. El PBN no mostró un efecto protector significativo (79.6%). Así mismo, la adición de piruvato y Vitamina E fue capaz de revertir el efecto del IA, con lo que la actividad mitocondrial alcanzó los niveles control, 98.1% para el caso del piruvato y 106.4% para el de la Vitamina E.

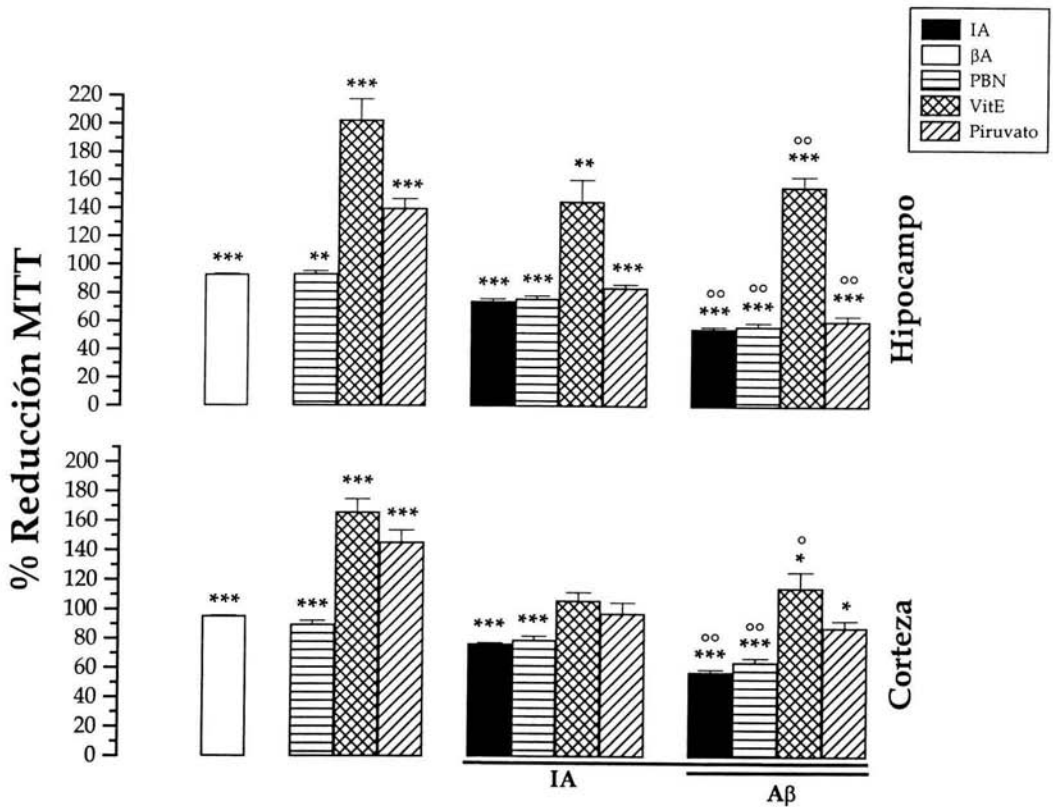


Figura 1. Efecto del IA sobre la función mitocondrial de sinaptosomas aislados a partir de ratas jóvenes en presencia y ausencia del péptido 25-35 del β A y papel protector del piruvato y agentes antioxidantes. Los datos representan el porcentaje en relación al control \pm SEM de 6-8 determinaciones independientes hechas por duplicado. Control * $p < 0.01$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$. β A \circ $p < 0.05$; $\circ\circ$ $p < 0.001$.

EL tratamiento conjunto de la A β y el IA redujo la actividad mitocondrial en un 42.1%, bajo estas condiciones el PBN fue incapaz de proteger del daño (64.6%). En presencia de piruvato se logra una protección parcial que alcanza un 88.6% de la actividad mitocondrial en relación al control. La vitamina E revirtió el daño incrementando la actividad mitocondria 15.4% por encima de los niveles control.

Para confirmar la relevancia de los niveles energéticos sinápticos en la susceptibilidad hacia la A β , decidimos utilizar la toxina mitocondrial, 3NP, que, a través de la inhibición de la cadena del transporte de electrones, puede disminuir la generación de ATP, y demostrar así la importancia de un mantenimiento adecuado de la función mitocondrial en la resistencia a la toxicidad de la A β .

Los sinaptosomas aislados a partir de la región del hipocampo fueron incubados en presencia de 3NP y se observó que la actividad mitocondrial cayó un 20.9% en comparación con los niveles basales(ver Figura 2). El PBN mostró un efecto protector mínimo pero estadísticamente significativo (89.5%), mientras que el piruvato y la vitamina E fueron capaces de revertir el efecto del 3NP, presentado una actividad mitocondrial del 24.4% y el 73.4%, respectivamente, por arriba de los niveles control.

EL tratamiento conjunto de la A β y el 3NP redujo la actividad mitocondrial en un 35.5%. En estas condiciones el PBN fue incapaz de proteger del daño (61.3%). El piruvato logró una protección muy importante que elevó la actividad mitocondrial a niveles cercanos al control (90.6%). En el caso de la vitamina E, esta fue capaz de revertir el efecto sobre la actividad reductora mitocondrial, incrementando la actividad 85.2% por encima de los niveles control.

Al incubar los sinaptosomas corticales en presencia de 3NP la actividad mitocondrial decayó un 15.1%. En cambio la adición de piruvato y Vitamina E, condujo la actividad mitocondrial a niveles 15.9% y 29.6% superiores al control respectivamente, revirtiendo el efecto del 3NP. El PBN no mostró un efecto protector (85.9%).

EL tratamiento conjunto de la A β y el 3NP redujo la actividad mitocondrial en un 28.8%. Bajo estas condiciones el PBN no mostró ningún efector protector (73%). La vitamina E revirtió el daño incrementando la actividad mitocondrial 39.2% por encima de los niveles basales. Con la adición del piruvato la actividad mitocondrial alcanzó niveles próximos al control (98.1%).

La actividad mitocondrial obtenida de los sinaptosomas bajo condiciones control y en presencia de PBN, piruvato o vitamina E ya fueron reportados arriba. La estadística para estas condiciones tanto para los sinaptosomas corticales como para los hipocampales se realizó de forma conjunta.

Los resultados anteriores nos indican que la inhibición parcial del metabolismo energético en las terminales nerviosas, propicia el aumento de toxicidad de la A β .

Con el fin de analizar el efecto del envejecimiento sobre la susceptibilidad sináptica hacia la A β , se aislaron terminales nerviosas a partir de ratas de entre 18-20 meses de edad. Los sinaptosomas obtenidos de esto animales fueron sometidos a las mismas condiciones que los provenientes de las ratas jóvenes.

Para el caso de los sinaptosomas hipocampales obtenidos a partir de ratas viejas, la exposición al fragmento 25-35 de la A β indujo una inhibición de la actividad mitocondrial del 37.9% en comparación con los sinaptosomas control

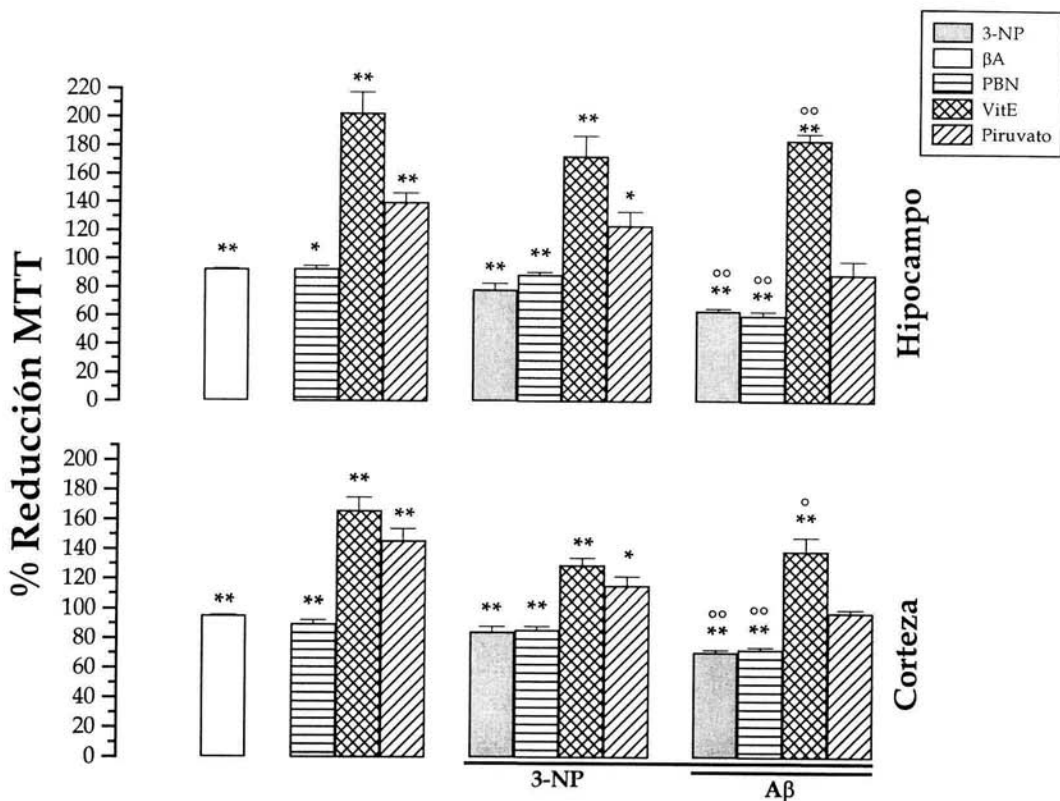


Figura 2. Efecto del 3NP sobre la función mitocondrial de sinaptosomas aislados a partir de ratas jóvenes en presencia y ausencia del péptido 25-35 del βA y papel protector del piruvato y agentes antioxidantes. Los datos representan el porcentaje en relación al control ± SEM de 6-8 determinaciones independientes hechas por duplicado. Control * p < 0.005; ** p < 0.001. βA ° p < 0.01; °° p < 0.001.

(ver Figura 3). El PBN redujo la actividad mitocondrial en un 7.7%, en tanto el piruvato la mantuvo alrededor de los niveles control (105.9%). La vitamina E indujo un incremento en la actividad mitocondrial del 132.1% en relación a los niveles basales del control.

Al incubar en presencia de IA la actividad mitocondrial cayó un 21.5%. Mientras que el PBN y el piruvato, no presentaron un efecto protector (80.6% y 86.9% respectivamente), la vitamina E fue capaz de revertir el efecto del IA, con lo que la actividad mitocondrial alcanzó niveles del 67.5% por encima del control.

EL tratamiento conjunto de la A β y el IA no indujo un efecto sinérgico sobre la toxicidad de la A β , por lo que la inhibición de la actividad mitocondrial, bajo estas condiciones fue del 37%, mismo porcentaje que el inducido por la A β por si misma. Bajo estas condiciones el PBN (61%) y el piruvato (65.2%) fueron incapaces de proteger del daño. Para el caso de la vitamina E, esta fue capaz de revertir los efectos deletéreos del tratamiento conjunto mencionado, incrementando la actividad mitocondrial en un 14% por arriba de los niveles controles.

Los sinaptosomas de corteza cerebral obtenidos a partir de ratas viejas se incubaron en presencia del fragmento 25-35 de la A β , esto llevo a una inhibición de la actividad mitocondrial del 22.8%. Bajo condiciones control la adición del PBN disminuyó la actividad mitocondrial un 8.3%, mientras el piruvato permitió alcanzar los niveles energéticos basales (99.3%). Al igual que en los casos anteriores la vitamina E indujo un incremento en la actividad mitocondrial del 39% (ver Figura 3). Cuando estos sinaptosomas se incubaron en presencia de IA la actividad mitocondrial disminuyó un 22.5% respecto al control. De la misma forma que en los sinaptosomas del hipocampo, tampoco se presento una potenciación en el daño inducido por la A β . La vitamina E fue capaz de recuperar la actividad mitocondrial control (108.5%), en tanto el piruvato consiguió una protección parcial (86.2%)

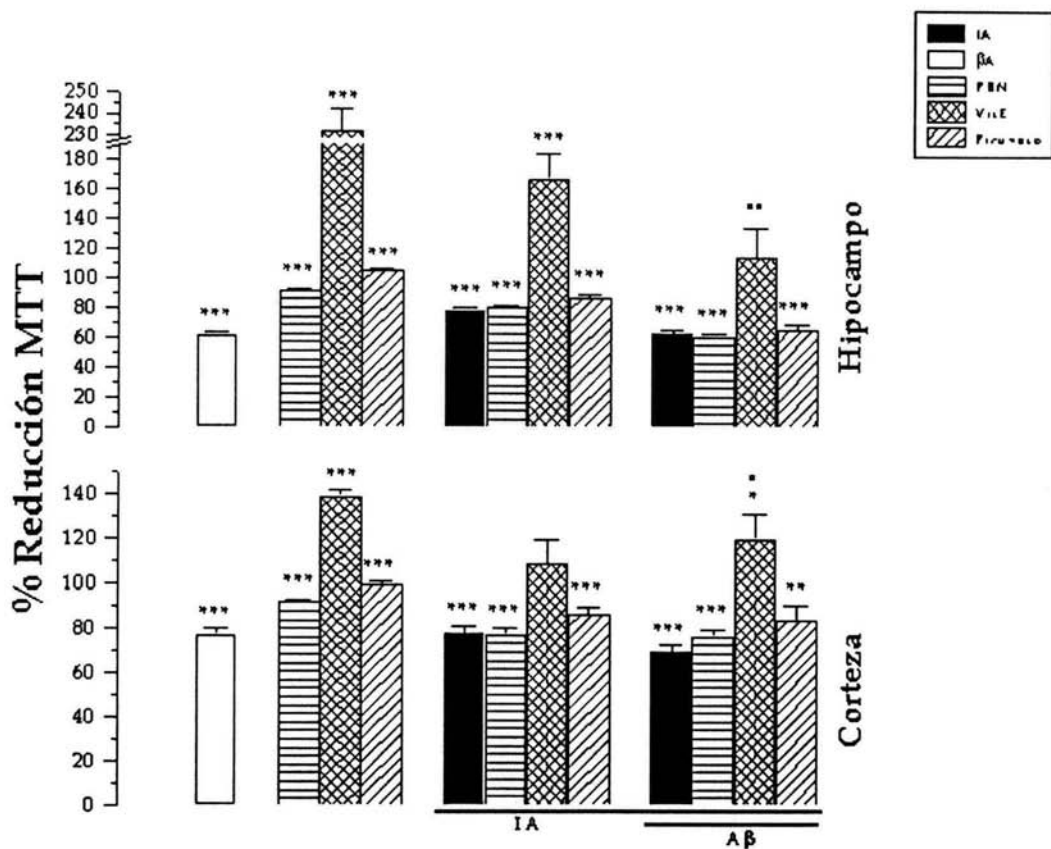


Figura 3. Efecto del IA sobre la función mitocondrial de sinaptosomas aislados a partir de ratas viejas en presencia y ausencia del péptido 25-35 del β A y papel protector del piruvato y agentes antioxidantes. Los datos representan el porcentaje en relación al control \pm SEM de 6-8 determinaciones independientes hechas por duplicado. Control * p < 0.05; ** p < 0.005; *** p < 0.001. β A ° p < 0.005; °° p < 0.001.

mínima aunque significativa estadísticamente. El PBN no mostró ningún efecto (77.2%).

El tratamiento conjunto de la A β y el IA redujo la actividad mitocondrial en un 30.5%. Aunque esta reducción fue significativa en relación con la sola exposición a la A β , la potenciación de su toxicidad no fue tan importante en comparación con los experimentos realizados en ratas jóvenes. Así mismo, tanto el PBN como el piruvato fueron incapaces de proteger del daño (76.3% y 83.6% respectivamente). La presencia de la vitamina E llevó la actividad mitocondria 19.7% por encima de los niveles control.

De la misma manera que en los experimentos realizados en ratas jóvenes, la actividad mitocondrial obtenida de los sinaptosomas bajo condiciones control y en presencia de PBN, piruvato o vitamina E ya fueron reportados arriba. La estadística para estas condiciones tanto para los sinaptosomas corticales como para los hipocampales se realizo de forma conjunta.

Los sinaptosomas aislados a partir del hipocampo de ratas viejas, también fueron incubados en presencia de 3NP (lo cual se muestra en la Figura 4) y se observó que la actividad mitocondrial decae un 15.5%. El PBN no fue capaz de proteger bajo estas condiciones (82.3%). En este caso, la vitamina E comprobó sus efectos benéficos al incrementar la actividad mitocondrial en un 39.9% por arriba de los valores control, mientras el piruvato demostró poseer un efecto protector (90.7%) el cual fue significativo estadísticamente.

EL tratamiento conjunto de la A β y el 3NP redujo la actividad mitocondrial en un 27%. En este caso tanto el PBN (71.3%) como el piruvato (79%) fueron incapaces de proteger del daño. La vitamina E, en cambio, revirtió sus efectos

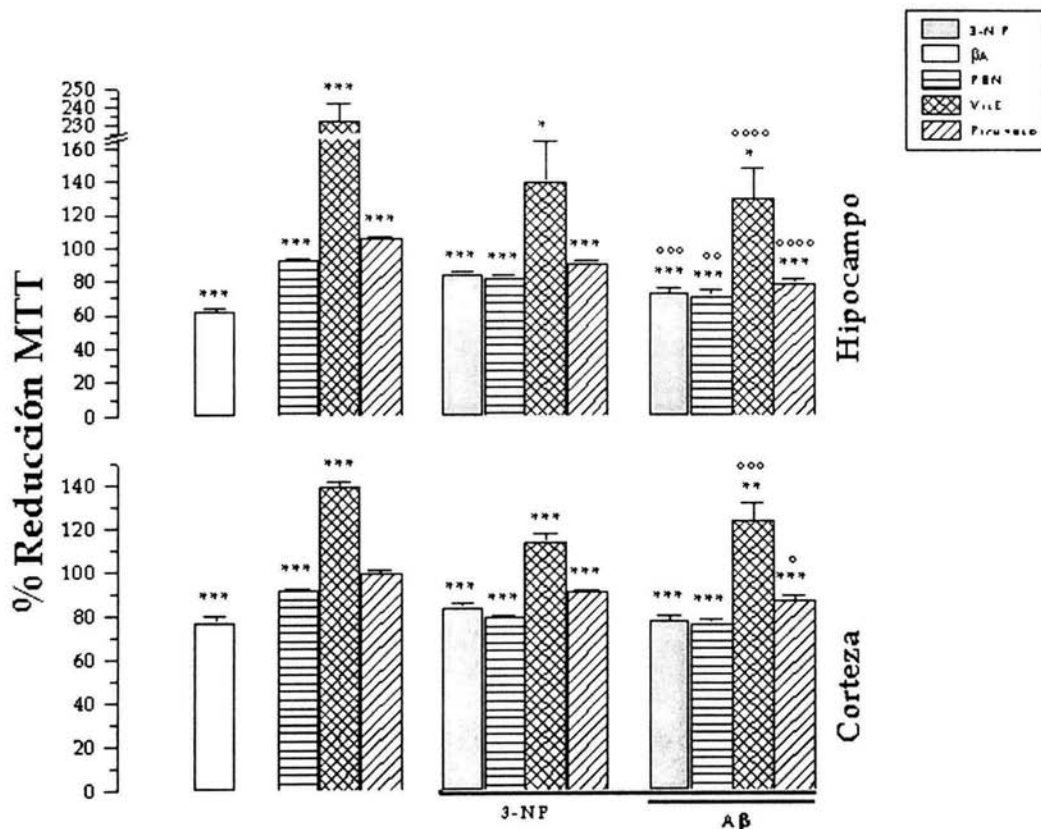


Figura 4. Efecto del 3NP sobre la función mitocondrial de sinaptosomas aislados a partir de ratas viejas en presencia y ausencia del péptido 25-35 del β A y papel protector del piruvato y agentes antioxidantes. Los datos representan el porcentaje en relación al control \pm SEM de 6-8 determinaciones independientes hechas por duplicado. Control * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$. β A ° $p < 0.05$; °° $p < 0.01$; °°° $p < 0.005$; °°°° $p < 0.001$

además de incrementar la actividad mitocondrial un 29.4% por encima de los niveles control.

También en la figura 4 se muestra el efecto del 3NP sobre los sinaptosomas obtenidos de la corteza de ratas viejas, al reducir su actividad mitocondrial un 16.3%. La adición de PBN no mostró ningún efecto (79.3%). Con la presencia de piruvato se consiguió una protección parcial mínima (91.1%), la cual fue significativa estadísticamente. La vitamina E (113.7%) fue capaz de revertir el efecto del 3NP.

EL tratamiento conjunto de A β y el 3NP redujo la actividad mitocondrial en un 22.6%. Bajo estas condiciones el PBN no mostró ningún efector protector (76.3%). La vitamina E fue capaz de revertir el daño incrementando la actividad mitocondria 23.1% por encima de los niveles control, en tanto el piruvato presentó una protección parcial bajo dichas condiciones (86.7%).

Los datos anteriores indican que los sinaptosomas obtenidos de cerebros de ratas viejas presentan una gran susceptibilidad hacia la A β , posiblemente resultado del daño acumulado durante la vida (estrés oxidante, alteraciones en la carga de calcio, ¿mutaciones del ADN mitocondrial?), lo que trae como consecuencia una disminución en la actividad mitocondrial. Este déficit energético producto del envejecimiento, induce un manejo inadecuado de los insultos metabólicos, tales como la generación de radicales libres, lo cual puede llevar a un estado de estrés oxidante. En la tabla 1 se muestran los porcentajes de actividad mitocondrial bajo distintos tratamientos, de acuerdo con las condiciones control respectivas. Los porcentajes que muestra el grupo de ratas jóvenes en relación con el de las ratas viejas no son muy distintos, pero al comparar la actividad real de estos, se puede observar que la actividad mitocondrial se encuentra reducida en algunos casos más

Hipocampo	Jóvenes	Viejas	In Ac V/J
Control*	388.4	217.2	0.559
PBN*	363.4	200.3	0.551
Vit E*	789.5	500.4	0.634
Piruvato*	545.6	230.1	0.422
A β *	361.9	134.9	0.373
IA	289.9	171	0.59
IA+PBN	296.7	175.6	0.592
IA+VitE	565.4	361	0.638
IA+Piruv	328	189.4	0.577
A β +IA	215.2	137.8	0.64
A β +IA+PBN	223.2	133.2	0.597
A β +IA+VitE	609	242.4	0.398
A β +IA+Piruv	238.1	142.6	0.599
3-NP	307.1	182.8	0.595
3-NP+PBN	347.7	177.6	0.511
3-NP+VitE	673.4	294.4	0.437
3-NP+Piruv	483.2	195.8	0.405
A β +3-NP	250.4	158	0.631
A β +3-NP+PBN	238	154.6	0.650
A β +3-NP+VitE	719.4	273.8	0.381
A β +3-NP+Piruv	351.7	171	0.486

Corteza	Jóvenes	Viejas	In Ac V/J
Control*	499.6	337.2	0.675
PBN*	449.9	309	0.687
Vit E*	830.1	467.3	0.563
Piruvato*	729.5	333.1	0.457
A β *	478.4	258.7	0.541
IA	383.5	260	0.678
IA+PBN	397.6	260	0.654
IA+VitE	531.5	363.4	0.684
IA+Piruv	490	289.4	0.591
A β +IA	289.4	234.2	0.809
A β +IA+PBN	322.9	256.8	0.795
A β +IA+VitE	576.5	397.4	0.689
A β +IA+Piruv	442.4	279	0.631
3-NP	423.9	280.6	0.662
3-NP+PBN	429.3	266	0.620
3-NP+VitE	647.6	383.4	0.592
3-NP+Piruv	578.8	306.2	0.529
A β +3-NP	355.8	258.4	0.726
A β +3-NP+PBN	364.9	255.6	0.700
A β +3-NP+VitE	695.4	409.2	0.588
A β +3-NP+Piruv	490	290.6	0.593

Tabla 1. En esta tabla se muestra la actividad reductora mitocondrial real. El índice de actividad V/J compara la actividad entre las ratas jóvenes y viejas

del 50%. Esto último se expresa a través de un índice (mostrado en la Tabla 1 como In.Ac. V/J), el cual compara la actividad real que presentan los sinaptosomas obtenidos a partir de ratas viejas en relación a los obtenidos de rata jóvenes.

De manera interesante, la presencia de los inhibidores metabólicos en el caso de los sinaptosomas obtenidos de ratas viejas, no fue capaz de producir un efecto sinérgico sobre la toxicidad de la A β como se observó en los sinaptosomas jóvenes.

A partir de los datos anteriores, decidimos estudiar si parte de los efectos tóxicos de la A β sobre las terminales sinápticas era debido a la elevación de los niveles oxidantes. Con este propósito, cuantificamos la generación de radicales libres y el subsecuente daño oxidativo en los sinaptosomas de ratas jóvenes. Esto se evaluó mediante la determinación del porcentaje de lípidos oxidados presentes en las membranas sinaptosomales, a través de la cuantificación del malondialdehído generado durante el proceso de lipoperoxidación. Para esta serie de experimentos tanto los sinaptosomas de hipocampo como los de corteza, fueron tratados bajo las mismas condiciones que en los experimentos anteriores.

En la Figura 5 se muestra el efecto de los distintos tratamientos sobre los niveles de lipoperoxidación. Los sinaptosomas obtenidos de la región del hipocampo que fueron expuestos al fragmento 25-35 de la A β mostraron un incremento del 25.7% en los niveles oxidantes en comparación al control. Al incubar en presencia de IA los niveles se incrementaron en un 10%. El PBN no fue utilizado para estos últimos experimentos debido a que no mostró ningún efecto protector en las series anteriores. El piruvato (-2.9%) mantuvo los niveles cercanos al control, mientras que la vitamina E revirtió los efectos al disminuir los niveles oxidantes en un 18.2%.

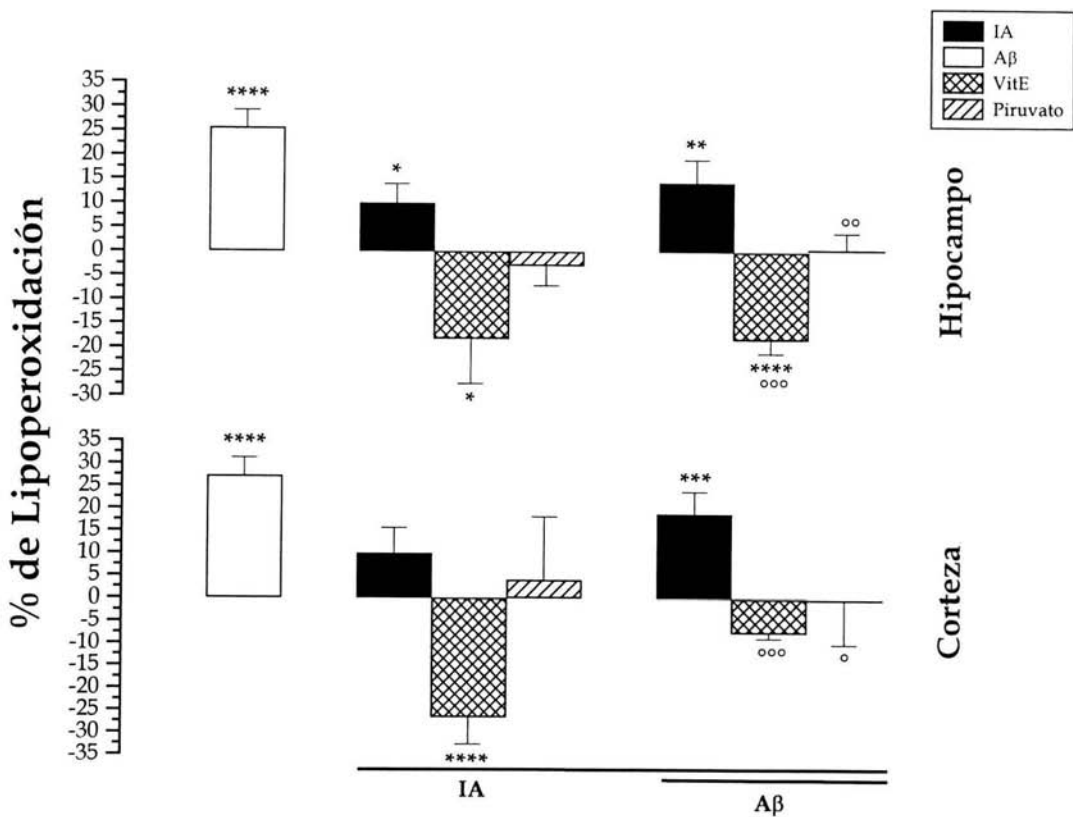


Figura 5. Efecto del IA en la inducción de lipoperoxidación de las membranas sinaptosomales en presencia y ausencia del péptido 25-35 del β A y papel protector del piruvato y agentes antioxidantes sobre sinaptosomas obtenidos a partir de ratas jóvenes. Los datos representan el porcentaje en relación al control \pm SEM de 6-8 determinaciones independientes hechas por duplicado. Control * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$. β A ° $p < 0.01$; oo $p < 0.005$; ooo $p < 0.001$.

La incubación conjunta de la A β y IA incrementó los niveles oxidantes en un 14.3%, es importante señalar que bajo esta condición, no solo no fue posible potenciar el efecto que presenta el A β por sí mismo, sino que los niveles oxidantes incluso se redujeron. Al igual que en la condición anterior, el piruvato mantuvo los niveles control (0.7%) y la vitamina E revirtió el daño, llevando los niveles un 18.4% por abajo del control.

En el caso de los sinaptosomas corticales (mostrados también en la Figura 5), la exposición al fragmento 25-35 de la A β conduce a un incremento en los niveles de lípidos oxidados del 27.3% en relación al control. La incubación en presencia de IA incrementó los niveles un 9.9%. El piruvato presentó niveles 4% superiores pero estos no fueron significativos estadísticamente, en tanto la vitamina E mantuvo los niveles de oxidación 26.7% por debajo del control.

Al incubar los sinaptosomas en presencia de la A β y el IA, los niveles oxidantes se incrementaron un 18.7% (no hay diferencias significativas entre esta condición y la aplicación única de la A β , aunque al igual que en los sinaptosomas hipocampales se observa una tendencia a la baja). El piruvato mantuvo los niveles cercanos al control (-0.7%), por otro lado la incubación con vitamina E redujo los niveles un 7.6%.

También decidimos evaluar el efecto sobre los niveles oxidantes promovidos por el 3NP, lo cual se muestra en la Figura 6. Bajo esta condición, los sinaptosomas del hipocampo mostraron un incremento del 13.7% en el porcentaje de lipoperoxidación. El piruvato mantuvo los niveles cercanos al control (-0.3%) y la vitamina E revirtió los efectos al disminuir los niveles oxidantes en un 23.7%.

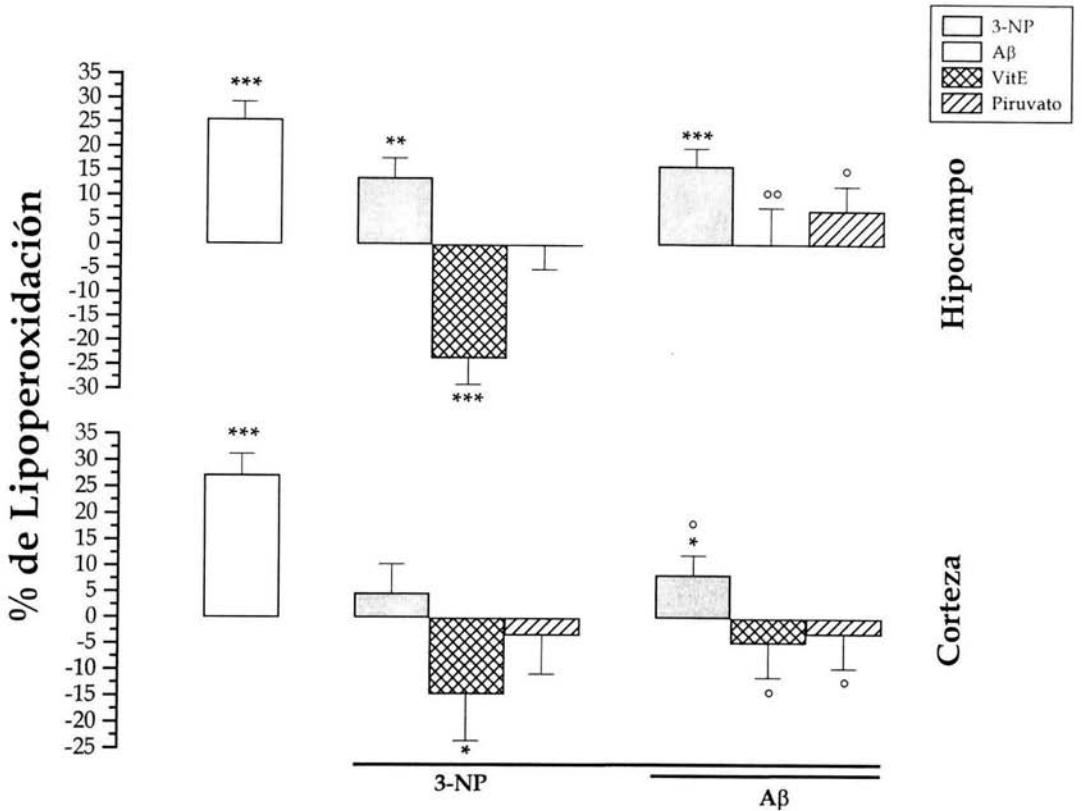


Figura 6. Efecto del 3NP en la inducción de lipoperoxidación de las membranas sinaptosomales en presencia y ausencia del péptido 25-35 del βA y papel protector del piruvato y agentes antioxidantes sobre sinaptosomas obtenidos a partir de ratas jóvenes. Los datos representan el porcentaje en relación al control \pm SEM de 6-8 determinaciones independientes hechas por duplicado. Control * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$. βA ° $p < 0.005$; °° $p < 0.001$.

La incubación conjunta de la A β y el 3NP incrementó los niveles oxidantes en un 16.2%. La adición de piruvato y vitamina E mantuvo los niveles cercanos al control, 7.1% y 0.2% respectivamente.

En los sinaptosomas corticales incubados en presencia de 3NP al igual que con la adición de piruvato se observaron niveles cercanos al control, 4.8% y -3.4% respectivamente. La vitamina E mantuvo los niveles de oxidación 14.7% por debajo del control.

Al incubar los sinaptosomas en presencia de la A β y el 3NP, los niveles oxidantes tuvieron un incremento significativo del 8.4%. El piruvato (-3.1%) y la vitamina E (-4.8%) mantuvieron los niveles oxidantes cercanos al control.

Debido a que la A β se origina a partir del procesamiento de la APP, decidimos encontrar algunas condiciones que fueran capaces de alterar este procesamiento ya sea elevando su producción o disminuyéndola. Para realizar este estudio, utilizamos cultivos de neuroblastoma humano. Los cultivos fueron expuestos durante 4 horas a los distintos tratamientos, 24 horas después, se determinó su actividad mitocondrial usando la técnica de MTT (ver Figura 7), con la finalidad de valorar sus efecto sobre la viabilidad celular. La actividad de los cultivos expuestos sólo al medio de cultivo fue considerada como la actividad basal. La exposición a cafeína a una concentración 5mM redujo la actividad mitocondrial un 17.2%, la presencia de ZnCl₂ 100 μ M mostró una reducción del 12.2%. La adición de H₂O₂ 50 μ M redujo la actividad un 28.5% respecto al control.

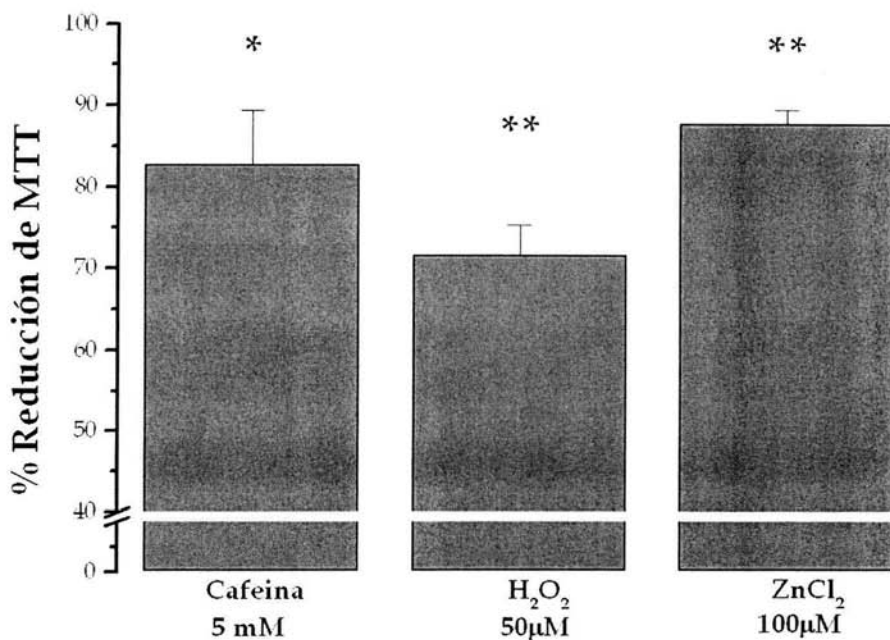


Figura 7. Efecto de distintos tratamientos sobre la reducción de MTT en cultivos de neuroblastoma humano MSN. Las células fueron expuestas durante 4 horas a distintas condiciones. Los datos representan el porcentaje en relación al control \pm SEM de 4 determinaciones independientes hechas por triplicado. Control * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

Como lo indican los resultados anteriores, bajo las condiciones experimentales analizadas, se observa una disminución en la actividad reductora mitocondrial, sin embargo estos efectos demuestran que más del 70% de las células siguen presentando una función respiratoria normal. Para evaluar los niveles de APP y β A se utilizaron cultivos de MSN que se incubaron con las mismas concentraciones de H_2O_2 y de $ZnCl_2$ y cafeína que para los estudios con MTT. La Figura 8 muestra un Western blot representativo de 3 experimentos, en donde se observa que los niveles de la APP aumentan en los cultivos incubados con cafeína. Por otro lado, los niveles de APP en los cultivos expuestos a H_2O_2 disminuye considerablemente mientras que los expuestos al $ZnCl_2$ no muestran cambios en el contenido de esta proteína comparados con los controles. Debido a los bajos niveles de expresión, la β A no pudo ser detectada excepto en presencia de H_2O_2 , esto debido a que las condiciones prooxidantes, podrían favorecer la vía amiloidoigénica.

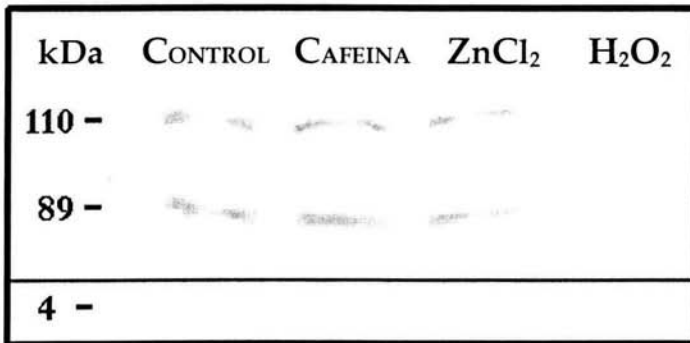


Figura 8. Western Blot representativo que muestra los niveles de la APP y la β A bajo distintos tratamientos. Se utilizó el anticuerpo β -Amyloid (D17): sc-5399, el cual reconoce a la APP (110 kDa) y al fragmento α -APP (90 kDa), producto de la acción de la α -secretasa; y el anticuerpo A4 (I-17): sc-7497, capaz de reconocer a la β A (4 kDa).

XIV. DISCUSIÓN

El presente trabajo se desarrolló a partir de un modelo *in vitro*, el cual permite estudiar los efectos nocivos de la A β de forma directa sobre las terminales nerviosas, bajo condiciones metabólicas normales o al inducir el desacoplamiento del metabolismo energético. Estos resultados pueden ser relevantes para la etiología de la EA, ya que se ha propuesto que las alteraciones primarias en la EA pueden ocurrir en las terminales sinápticas y ser de esta manera, uno de los eventos tempranos en la EA (DeKosky, 1996; Terry, 1994).

Reportes previos indican que la administración del fragmento 25-35 de la A β en el hipocampo de la rata, no es capaz de generar un daño que sea estadísticamente significativo (Stein-Behrens, 1992). Sin embargo, la administración de la A β en la región del hipocampo, conduce a severas alteraciones conductuales y bioquímicas, así como a la disminución de las capacidades cognitivas a largo plazo (Alvarez, 1997), probablemente asociadas en un inicio con el bloqueo en la inducción de LTP en rebanadas de hipocampo de rata (Chen, 2000). El análisis conjunto de estos resultados sugiere que la administración de la A β es capaz de inducir cambios en la función sináptica, mientras que la neurodegeneración inducida por A β aparentemente requiere de factores adicionales, como la coadministración de excitotoxinas (Morimoto, 1998) o de drogas que alteren el metabolismo glucolítico (Copani, 1991; Smyth, 1993). La participación de factores asociados al daño neuronal que exacerba la toxicidad del A β ha sido encontrada también en neuronas en cultivos primarios (Mattson, 1992). Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en sinaptosomas, existen reportes que señalan la toxicidad del A β directamente en neuronas (Stein-Behrens, 1992).

Nuestros datos indican que, como resultado de la coadministración del fragmento 25-35 de la A β junto con concentraciones subtóxicas de 3NP y de IA, se

produce una inhibición drástica en la función reductora sinaptosomal. En contraste, la exposición a la A β *per se*, sólo induce una ligera inhibición en la reducción de MTT.

De manera interesante, la administración del fragmento 25-35 de la A β en terminales nerviosas de ratas viejas tiene un gran efecto por si misma sobre la disminución de la capacidad reductora mitocondrial, esto posiblemente refleja cambios asociados al envejecimiento que generan condiciones que favorecen la toxicidad de la A β . Entre estas condiciones pueden considerarse algunas como el incremento en la acumulación de ROS, disminución de la función mitocondrial debido a la acumulación de mutaciones en el ADNmt (Yakes y Houten, 1997) un aumento en la carga de calcio interno (Sheehan, 1997) e, incluso, alteraciones en los mecanismos que regulan el metabolismo de neurotransmisores excitadores como el glutamato (Arias, 1995).

Nuestros resultados señalan que los sinaptosomas aislados a partir del hipocampo, parecen ser más sensibles a los efectos de la A β en presencia de inhibidores metabólicos en comparación a los obtenidos de la corteza cerebral. Esto apoyaría el hecho de una mayor vulnerabilidad del hipocampo bajo las condiciones anteriormente descritas que concuerda bien con el hecho de que el hipocampo es de las regiones que más tempranamente y con mayor intensidad se dañan en la EA. Adicionalmente, la toxina glucolítica, IA, parece incrementar de forma mas potente la vulnerabilidad hacia el A β en comparación de la 3NP. Estos resultados concuerdan con reportes previos, los cuales indican que en sinaptosomas, la glucosa es usada como la principal fuente energética, y adicionalmente, que el IA efectivamente reduce los niveles de ATP en sinaptosomas (Kauppinen 1986).

Estos resultados señalan que durante la inhibición metabólica ocurre una potenciación en la vulnerabilidad de los sinaptosomas hacia la toxicidad de la A β , la cual es probablemente el resultado del decremento en el metabolismo glucolítico y en la producción mitocondrial de ATP. Si algunas alteraciones en la producción energética son capaces de exacerbar la toxicidad inducida por la A β como algunos otros estudios *in vitro* sugieren (Copani, 1991), entonces, aquellos mecanismos que involucren alteraciones en la función mitocondrial dependiente de la edad, como serían una baja perfusión sanguínea cerebral, la acumulación de la A β , y mutaciones del ADN mitocondrial, pudieran contribuir a la patología de la EA.

De acuerdo con nuestros resultados, la administración de piruvato protege del daño inducido por la A β en sinaptosomas tratados con IA o 3NP. Estos efectos son probablemente el resultado de la restauración (parcial) de los niveles energéticos al actuar como sustrato del ciclo de los ácido tricarboxílicos (TCA) después de su conversión a ACoA. También se ha reportado que el piruvato es capaz de incrementar la respiración sinaptosomal incluso en presencia de glucosa (Rafalowska, 1980). Aunque el piruvato formado a partir de la glucosa es suficiente, la adición de IA promueve condiciones de inhibición glucolítica, bajo las cuales, la adición de piruvato puede estimular de manera importante la respiración y con ello incrementar los niveles sinaptosomales de ATP hasta los niveles previamente observados (Kauppinen, 1986). Nuestras observaciones confirman que el piruvato es un excelente sustrato, capaz de restaurar las funciones oxidativas de las mitocondrias sinaptosomales, alteradas por la inhibición glucolítica y la toxicidad de la A β . Esto puede ser concebible durante la inhibición glucolítica (incubación con IA), ya que el metabolismo mitocondrial no se ve alterado.

Cuando los sinaptosomas fueron incubados con la toxina mitocondrial 3NP y la A β , el efecto protector del piruvato podría darse a través de la estimulación anaeróbica. La generación de lactato a partir del piruvato, incrementa la

producción de ATP a un nivel suficiente para suplir las demandas energéticas sinaptosomales, como ya ha sido reportado durante condiciones anóxicas (Gleitz, 1993). Por otro lado, el papel protector del piruvato durante la intoxicación con 3NP, puede deberse también a su entrada en el TCA en vista de que la SDH no fue totalmente inhibida a las dosis usadas. El tratamiento a estas dosis de 3NP induce una inhibición del 40% en la actividad de la SDH, por lo que el piruvato podría también estar actuando como sustrato dentro de las mitocondrias no inhibidas (Massieu, 2001). Este resultado concuerda con reportes previos, tanto *in vivo* como *in vitro*, los cuales sugieren un efecto neuroprotector del piruvato en contra del daño neuronal inducido por hipoglucemia y excitotoxicidad (García, 2001; Izumi, 1997; Massieu, 2000 y 2001).

Se ha propuesto que la pérdida de la regulación del Ca^{2+} participa en la neurotoxicidad de la $\text{A}\beta$ (Mattson, 1992). En experimentos *in vitro*, la adición de la $\text{A}\beta$ resulta en un gran incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ después de una despolarización neuronal (Hartmann, 1993) y la liberación de aminoácidos excitadores dependiente de Ca^{2+} (Arias, 1995). Además, la exposición a la $\text{A}\beta$ potencia el influjo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, en sinaptosomas corticales de rata (MacManus, 2000). La exposición a la $\text{A}\beta$ puede inducir también la liberación de aminoácidos excitadores en células gliales a través de un transportador de glutamato dependiente de Na^+ (Noda, 1999), y exacerbar así, la muerte neuronal inducida por glutamato (Mattson, 1992).

Otras evidencias señalan que el estrés oxidante podría jugar un papel en la patogénesis de la EA y que la neurotoxicidad de la $\text{A}\beta$ es mediada por ROS, pudiendo alterar de forma severa la función neuronal (Keller, 1997; Keller, 1998; Mark, 1997). Tanto la pérdida de la homeostásis del Ca^{2+} como la producción excesiva de ROS inducida por la $\text{A}\beta$ pueden potenciar los efectos nocivos de la disfunción mitocondrial. Durante los últimos años un número creciente de evidencias apoyan esta hipótesis, mostrando que la disfunción mitocondrial podría

culminar con la desregulación de la homeostasis y la muerte neuronal después de una prolongada activación de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA (Ankarcrona, 1995; Schinder, 1996). Adicionalmente, la disfunción mitocondrial podría potenciar la producción de ROS (Kim, 2000; Schulz, 1996; Zeevalk, 2000), la cual, se exacerbaría en presencia de la A β . Teniendo esto en cuenta, el efecto protector del piruvato también podría ser el resultado de su capacidad como atrapador de radicales, específicamente sobre H₂O₂, a través de la descarboxilación no enzimática del piruvato mediada por el H₂O₂, lo cual ha sido demostrado previamente en cultivos neuronales (Desagher, 1997). Bajo nuestras condiciones experimentales, se podría esperar un incremento en la concentración de H₂O₂, ya que ha sido observada la generación de O₂^{*} después de la administración sistémica de 3NP (Kim, 2000), el cual puede dismutarse a H₂O₂ en presencia de la superóxido dismutasa. Por otro lado, se ha reportado un incremento en las ROS *in vivo*, después de la administración de IA en el estriado de la rata (Matthews, 1997).

El uso de antioxidantes, tales como la vitamina E, ha sido reportado en varios modelos de muerte neuronal, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Cardoso SM, 1998; Muller, 1983). Así, la aplicación de vitamina E es capaz de proteger del daño neuronal inducido por el IA (Uto, 1995). Actualmente, se le utiliza de manera frecuente en el tratamiento de distintas enfermedades (por ejemplo las neurodegenerativas) ya sea con la intención de retrasar su desarrollo o con fines preventivos. Nuestros resultados confirman que la vitamina E protege ante el daño inducido por la A β *per se* (en ratas viejas), al igual que por el de los inhibidores metabólicos. Interesantemente, bajo condiciones control la vitamina E fue capaz de estimular la actividad reductora mitocondrial. Este efecto podría ser explicado debido a su acción protectora sobre el proceso normal de envejecimiento de la preparación sinaptosomal directamente relacionado con su actividad antioxidante, o a través de un efecto directo al estimular la actividad mitocondrial. En el ciclo de óxido-reducción de la vitamina E, cuando ésta se encuentra en un

estado oxidado (radical tocoperoxil), parte de las formas reducidas de la coenzima Q se encargan de reducirla regenerando nuevamente a la vitamina E, en consecuencia, se estimularía a la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. Sin embargo, para apoyar esta interpretación sería necesario valorar, a través de la tasa de respiración mitocondrial, este efecto positivo de la vitamina E.

Diversos reportes confirman la eficiencia del PBN como un atrapador de radicales libres. Esto ha sido demostrado tanto en sistemas químicos como biológicos (Janzen y Blackburn 1969; Harbour y Bolton, 1975). A mediados de los 80s se demostró por primera vez su efectividad *in vivo* (Novelli, 1985) y posteriormente se confirmó su actividad como neuroprotector (Floyd, 1990). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la aplicación de PBN no tuvo efectos benéficos sobre la preparación sinaptosomal, al inducir incluso una inhibición en la actividad reductora mitocondrial, al tratarse de una preparación que, a pesar de contener todos los componentes necesario para el estudio del funcionamiento sináptico, carece del resto de la maquinaria molecular de la neurona, posiblemente los sitios más sensibles a la protección por PBN requieran la maquinaria celular completa. Algunos autores señalan que en los mecanismos de protección del PBN, también están involucradas otras vías celulares, como son la regulación de señales de transducción (Idecola, 1997) o efectos directos sobre la expresión genética (Floyd, 1997). Lo anterior apoya el hecho de que es necesaria la presencia de todos los componentes celulares para que se puedan dar los efectos protectores del PBN. Esto es confirmado en un sistema que utiliza extractos de fracciones microsomales obtenidas de hígados de rata, los cuales sufren una rápida lipoperoxidación, en este sistema el PBN es poco efectivo en comparación de otros atrapadores, ya que para alcanzar el 50% de inhibición en la lipoperoxidación requiere de concentraciones mM, las cuales son 1000 veces mayores a las requeridas por el hidroxitolueno butilado (BHT) y el Trolox y (Janzen, 1994).

Estos resultados sugieren que la terminal sináptica puede ser particularmente sensible a perturbaciones metabólicas, las cuales pueden exacerbar la toxicidad de la A β . Interesantemente, algunos datos sugieren que la sinapsis puede ser un sitio en donde inicie la cascada neurodegenerativa en la EA, y de hecho, la pérdida de sinaptofisina, una proteína asociada a la terminal sináptica, ha sido tomada como un marcador temprano de la neurodegeneración (Masliah, 1991). A pesar de que los mecanismos patogénicos que subyacen a la EA no se conocen del todo, estos datos dan un sustento experimental a la hipótesis de que ciertos factores de riesgo, como disfunciones metabólicas y la acumulación de la A β podrían interactuar de manera exacerbada en la EA, y que sustratos metabólicos como el piruvato y compuestos antioxidantes podrían funcionar como una herramienta terapéutica.

Si bien las terminales nerviosas pueden ser un blanco importante de los efectos tóxicos de la A β , una pregunta que sigue aun en discusión es bajo qué condiciones en el SNC se generan cantidades grandes de esta proteína. Los estudios sobre el metabolismo de la APP han mostrado hasta el momento la participación de algunas mutaciones como causa de la sobreproducción del fragmento amiloidogénico A β (Duff, 1996; Games, 1995; Hsiao, 1996).

En la presente tesis nos propusimos estudiar algunas condiciones que pudieran favorecer la producción de la A β . Para ello estudiamos el papel del estrés oxidante, así como la presencia de Zn²⁺. Algunos trabajos reportan que la elevación crónica de AMPc así como la activación de receptores β -adrenérgicos promueve la síntesis de APP (Lee, 1999), lo cual apoya los resultados obtenidos con la exposición de los cultivos a cafeína. Los cultivos expuestos a H₂O₂ presentaron una disminución en los niveles de APP, debido a la generación de condiciones prooxidantes que promueven su procesamiento hacia el fragmento amiloidogénico A β (Yankner, 1996). Sólo en presencia de H₂O₂ se logró observar la generación de

A β . Aunque algunos reportes indican que el Zn²⁺ es capaz de promover la síntesis de presenilina (componente de la γ -secretasa), con lo que aumentaría la actividad en la vía amiloidogénica (Park, 2001). Los cultivos incubados en presencia de ZnCl₂ no mostraron ningún cambio en relación con los niveles de APP controles.

Estos resultados en conjunto sugieren que varias condiciones relacionadas con el estrés oxidante, la presencia de metales o condiciones que propicien la elevación del AMPc pueden tener un impacto significativo en la producción de la A β .

XV. CONCLUSIONES GENERALES

- Los sinaptosomas mostraron ser un buen modelo para estudiar el efecto tóxico de la A β sobre la terminal sináptica.
- Los sinaptosomas de ratas viejas son mucho más susceptibles a la toxicidad de la A β *per se*, comparados con los obtenidos de ratas jóvenes.
- De manera general, tanto en los sinaptosomas obtenidos a partir de ratas jóvenes, como en el de viejas, la inhibición del metabolismo energético potencia los efectos tóxicos de la A β .
- La presencia de la A β induce un estado de estrés oxidante, que bajo niveles energéticos normales el sistema es capaz de manejar.
- La toxicidad de la A β , en condiciones de estrés energético, se revierte con vitamina E y piruvato, mientras que el PBN no mostró ningún efecto protector.
- La vitamina E y el piruvato, son capaces de revertir el estado de estrés oxidante, y posiblemente actuar como estimuladores del metabolismo energético.
- El metabolismo de la APP puede ser regulado por el estado oxidativo celular, así como por condiciones que propicien la elevación del AMPc.

XVI. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham CR., SelkoeDJ., Potter H. (1988) Immunochemical identification of the serine protease inhibitor α_1 -antitrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell*. 52:487-501.
- Alvarez XA., Miguel-Hidalgo JJ., Fernández-Novoa L., Cacabelos R. (1997) Intrahippocampal injections of the betaamyloid1-28 fragment induces behavioral deficits in rats. *Methods Exp. Clin. Pharmacol.* 19: 471-479.
- Alonso AC., Zaidi T., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:5562-6.
- Alonso AC., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.* 2:783-7.
- Alonso AC., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. (1995) Increase in tubulin levels in Chinese hamster ovary cells stably transfected with human tau. *FEBS Lett.* 360, 132-136.
- Alzheimer's disease and related disorders: etiology, pathogenesis and therapeutics. New York: Wiley & Sons. p. 363-369.
- Ankarcrona M., Dypbukt J., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Lipton SA., Nicotera P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961-973.
- Arias C., Arrieta I., Tapia R. (1995) β -Amyloid peptide fragment 25-35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices. *J. Neurosci. Res.* 1: 561-6.
- Arias C. (1999) Enfermedad de Alzheimer. En: *Enfermedades neurodegenerativas, Mecanismos celulares y Moleculares.* FCE, México D.F. p.p. 133-160.
- Arendt (2001) Alzheimer's disease as a disorder of mechanisms underlying structural brain self-organization. *Neuroscience.* 102:723-765.
- Behl C., Davis J., Cole GM., Schubert D. (1992) Vitamin E protects nerve cells from amyloid β protein toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 944-950.
- Behl C., Davis J. B., Lesley R., Schubert D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* 77:817-827.
- Behl C., Trapp T., Skutella T., Holsboer F. (1997) Protection against oxidative stress-induced neuronal cell death-a novel role for RU486. *Eur. J. Neurosci.* 9:912-920.
- Bernstein BW. and Bamberg RJ. (1997) Depolarization of brain synaptosomes activates opposing factors involved in regulating levels of cytoskeletal actin. *Neurochem. Res.* 15(10): 929-35.
- Binder LI., Frankfurter A., Rebhun LI. (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* 101:1371-8.
- Bohm F., Edge R., McGarrey DJ., Truscott TG. (1998) Beta-carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against Nox. *FEBS Lett.* 436(3):387-9.
- Busciglio J., Lorenzo A., Yeh J., Yankner BA. (1995) Beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron.* 4:879-88.
- Butterfield DA., Hensley K., Harris M., Mattson M., Carney J. (1994) β -amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:710-715.
- Caceres A., Kosik KS. (1991) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature.* 341:461-3.

- Caceres A., Potrebic S., Kosik KS. (1991) The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J. Neurosci.* 6:1515-23.
- Cardoso SM., Pereira C., Oliveira CR. (1998) The protective effect of vitamin E, idebenone and reduced glutathione on free radicals mediated injury in rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 246: 703-10.
- Carter J y Liapp CF (2001) Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr. Mol. Med.* 1:733-737.
- Cataldo AM., Nixon RA. (1990) Enzymatically active lysosomal protease are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:3861-5.
- Chen QS., Kagan BL., Hirakura Y., Xie CW. (2000) Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. *J. Neurosci. Res.* 60: 65-72
- Cleveland DW., Hwo SY., Kirschner MW. (1977) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* 116:227-47.
- Cole GM., Yang F., Chen PP., Frautchy SA and Hsiao K. (1999) Caspase activation in dystrophic neuritis in Alzheimer's disease and aged HuAPPsw transgenic mice. In: Iqbal K, Swaab DF, Winbland B, Wisniewski HM, editors.
- Constantinescu A., Plan D., Packer L. (1993) Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes *J. Biol. Chem.* 268: 10906-13.
- Copani A., Koh JY., Cotman CW. (1991) β -Amyloid increases neuronal susceptibility to injury by glucose deprivation. *Neuroreport.* 2:763-765.
- Coulson EJ., Paliga K., beyreuther K., Masters CL. (2000) What the evolution of the amyloid protein precursor supergen family tells us about its function. *Neurochem. Int.* 36:175-84.
- Davies M. (1994) Strategies for the development of therapeutics for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 15:53-4.
- DeKosky ST., Scheff SW., Styren SD. (1996) Structural correlates of cognition in dementia: Quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration* 5: 417-21.
- Delacourte A., Defossez A. (1986) Alzheimer's Disease: tau protein, the promoting factors of microtubule assembly are major components of paired helical filaments. *J. Neurosci.* 76:173.
- Desagher S., Glowinski J., Prémont J. (1997) Pyruvate protects neurons against intracellular Ca^{2+} in cultured astrocytes by reverse operation of the Na^+-Ca^{2+} exchanger. *Exp. Neurol.* 145: 38-45.
- Floyd RA. (1990) Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 4:2587-97
- Floyd RA. (1997) Protective action of nitro-nitro-based free radical traps against oxidative damage to central nervous system. *Adv. Pharmacol.* 38: 361-78.
- Freir DB, Holscher C, Herron CE. (2001) Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo. *J. Neurophysiol.* 85:708-13.
- García O., Massieu L. (2001) Strategies of neuroprotection against L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment in vitro. *J. Neurosci. Res.* 64: 418-28.
- Gleitz J., Beile A., Khan S., Wilffert B., Tegtmeier F. (1993) Anaerobic glycolysis and postanoxic recovery of respiration of rat cortical synaptosomes are reduced by synaptosomal sodium load. *Brain Res.* 611: 286-294.
- Ghiso J., Rostagno A., Gardella JE., Liem L., Gorevic PD., Frangione B. (1992) A 109-amino acid C-terminal fragment of Alzheimer's disease amyloid precursor protein contains a sequence, -RDSH-, that promotes cell adhesion. *Biochem. J.* 288:1053-9
- Goedert M., Spillantini M.G., Potier M.C., Ulrich J., Crowther R.A. (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing

four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8:393-9.

Harbour JR. and Bolton JR. (1975) Superoxide formation in spinach chloroplasts: Electron spin resonance detection by spin trapping. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64: 803-07.

Hartmann H., Eckert A. And Muller W. E. (1993) β -amyloid protein amplifies calcium signaling in central neurons from the adult mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194:1216-20.

Hebb CO. and Whittaker VP. (1956) Intracellular distributions of acetylcholine acetylase. *J. Physiology.* 142: 187-96.

Hensley K., Maitt L., Stewart CA. (1999) Mitochondrial alterations in aging and inflammation: a possible site of action of nitron-based free radical traps. *Understanding the Process of Aging: The Roles of mitochondria, Free Radicals and Antioxidants.* E Cadenas and L Packer, Eds. 311-25

Ingold KU., Bowry VW., Stocker R., Walling C. (1993) Autoxidation of lipids and antioxidantation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:45-9.

Iqbal K., Grundke-Iqbal. (1991) Alzheimer's Disease: from cytoskeletal protein pathology to neuronal degeneration. In *Alzheimer's Disease: basic Mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies.* (Iqbal K., McLachlan DCR., Winblad B., Wisniewski HE ed) Wile, England. Pag. 173

Idecolla C., Zhang F., Casey R. (1997) Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficit s in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Neurosci.* 17: 9157-64.

Izumi Y., Kirby CO., Benz AM., Olney JW., Zorumski CF. (1999) Müller cell swelling, glutamate uptake and excitotoxic neurodegeneration in the isolated rat retina. *Glia.* 25: 379-89.

Izumi Y., Benz AM., Katsuki H., Zorumski CF. (1997) Endogenous monocarboxylates sustain hippocampal synaptic function and morphological integrity during energy deprivation. *J. Neurosci.* 17: 9448-9457.

Janzen EG., West MS., Poyer JL. (1994) Comparison of antioxidant activity of PBN with hindered phenols in initiated rat liver microsomal lipid peroxidation. *Frontiers of ROS in Biology and Medicine.* K. Asada & T. Tshikawa, Eds. 431-46. Elsevier Science.

Janzen EG. and Blackburn BJ. (1969) Detection and identification of short-lived free radicals by electron spin resonance trapping techniques (spin trapping): photolysis of organolead -tin and -mercury compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 91: 4481-90.

Kang DE., Lemaire HG., UnterbeckA., Salbaum JM., Masters CL., grzeschik KH. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. *Nature* 325:733-6.

Kauppinen RA., Nicholls DG. (1986) Synaptosomal bioenergetics. The role of glycolysis, pyruvate oxidation and response to hypoglycaemia. *Eur. J. Biochem.* 158: 159-165.

Keller JN., Pang Z., Geddes JW., Begley JG., Germeyer A., Waeg G., Mattson MP. (1997) Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by β A peptide: Role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J. Neurochem.* 69: 273-84.

Keller JN., Kindy MS., Holtsberg FW., St. Clair DK., Yen H-Ch., Germeyer A., Steiner SM., Bruce-Keller AJ., Hutchins JB., Mattson MP. (1998) Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neuronal apoptosis and reduces ischemic brain injury: Suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* 18: 687-697.

Kidd M. (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature.* 197:192-3.

Kim GW., Copin JC., Kawase M., Chen SF., Sato S., Gobbel GT., Chan PH. (2000) Excitotoxicity is

required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20: 119-129.

Knight J. A., Pieper R. K., McClellan L. (1988) Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin. Chem.* 34:2433-2438.

Knops J., Kosik KS., Lee G., Pardee J., Cohen-Gould L., McConologue L. (1991) Overexpression of tau in non-neuronal cell induces long cellular processes. *J. Cell. Biol.* 114:725-33.

Ksiezak-Reding H., Liu WK., Yen Sh. (1992) Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments *Brain Res.* 597(2):209-19.

Lee RK. (1999) Prostaglandin E2 stimulates amyloid precursor protein gene expression: inhibition by immunosuppressants. *J. Neurosci.* 19:940-7.

Lichtenthaler SF., Wang R., Grimm H., Uljon SN., Masters CL., Beyreuther K. (1999) Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease gamma-secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:3053-8.

Lockhart BP., Benicourt C., Junien JL., Privat A. (1994) Inhibitors of free radical formation fail to attenuate direct β -Amyloid 25-35 peptide-mediated neurotoxicity in rat hippocampal cultures. *J. Neurosci. Res.* 39, 494-505.

Löscher W. (1985) Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain: Electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effect on nerve terminal gamma-aminobutyric acid *in vivo*. *J. Neurochem.* 45:879-889.

Lowry OH., Rosenbrough NJ., Farr AL., Randal RJ. (1951) Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75.

MacManus A., Ramsden M., Murray M., Henderson Z., Pearson HA., Campbell VA.

(2000) Enhancement of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx and voltage-dependent Ca^{2+} channel activity by β -amyloid-(1-40) in rat cortical synaptosomes and cultured cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 275: 4713-8.

Mark RJ., Geddes JW., Uchida K., Mattson MP. (1997) Amyloid β -peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: Involvement of membrane lipid peroxidation. *J. Neurosci.* 17: 1046-1054.

Masliah E., Terry R. D., Alford M., De Teresa R. and Hansen L. A. (1991) Cortical and subcortical patterns of synaptophysin-like immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 138:235-46.

Massieu L., Gómez-Román N., Montiel T. (2000) In vivo potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp. Neurol.* 165: 257-67.

Massieu L., Del Río P., Montiel T. (2001) Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition *in vivo*. Correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. *Neuroscience* 106: 669-77.

Matthews RT., Ferrante RJ., Jenkins BG., Browne SE., Goetz K., Berger S., Chen IY-C., Beal MF. (1997) Iodoacetate produces striatal excitotoxic Lesions. *J. Neurochem.* 69: 285-9.

Mattson MP., Cheng B., Davis D., Bryant K., Lieberburg I. and Rydel RE. (1992) β -amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12:376-89.

Mattson MP., Partin J., Begley JG. (1998^a) Amyloid β -peptide induced apoptosis related events in synapses and dendrites. *Brain Res.* 807 (1-2): 167-76.

Mattson MP., Keller JN., Begley JG. (1998^b) Evidence for Synaptic Apoptosis. *Exp. Neurology.* 153: 35-48.

Miller DL., Papayannopoulos IA., Styles J., BobinSA., Lin YY., Bieman K., Iqbal K. (1993) Peptide composition of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of

- Alzheimer's disease. *Arch. Biochem Biophys.* 301:40-52.
- Minopoli G., de Candia P., Bonetti A., Faraonio R., Zambrano N., Russo T. (2001) The β -amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* 276:6545-50.
- Morimoto K., Yoshimi K., Tonohiro T., Yamada N., Oda T., Kaneko I. (1998) Co-injections of β -amyloid with ibotenic acid induces synergistic loss of rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 84: 479-487.
- Mossman T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods.* 65:55-63
- Muller DPR., Loyd JK. Wolff OH. (1983) Vitamin E and neurological function. *Lancet.* 1: 225-8.
- Mungarro-Menchaca X., Ferrera P., Moran J., Arias C. (2002) β -Amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine. *J Neurosci Res.* 68(1):89-96.
- NambaY., Tomonaga M., Kawasaki H., Otomo E., Ikeda K. (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jahob disease. *Brain res.* 541:163-6
- NeveRL., Harris P., Kosik KS., Kurnit DM., Donlon TA. (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule associated protein, tau, and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule associated protein 2. *Mol. Brain Res.* 1:271-80.
- Ninimiya H., Roch JM., Sundsmo MP., otero DA., Saitoh T. (1993) Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid β /A4 protein precursor that promotes fibroblast growth. *J. Cell Biol.* 121:1213-21
- Nishimoto I., Okamoto T., Matsuura Y., Takahashi S., Okamoto T., Murayama Y. (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G0. *Nature* 362:75-9.
- Noda M., Nakanishi H., Akaike N. (1999) Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-beta peptide. *Neuroscience* 92: 1465-74.
- Nordstedt C., Caporaso GL., Thyberg J., Gandy SE., Greengard P. (1993) Identification of the Alzheimer β /A4-amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *J Biol. Chem.* 268:608-12.
- Novelli GP., Angiolini P., Tani P. (1985) Phenyl-t-butyl-nitron is active against traumatic shock in rats. *Free Radic. Res. Commun* 1: 321-7.
- Pappolla MA., Omar RA., Kim KS., Robakis NK. (1992) Immunohistochemical evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 140:621-7.
- Park IH., jung MW., Mori H., Mook-Jung I. (2001) Zinc enhances synthesis of presenilin 1 in mouse primary cortical culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285: 680-8.
- Pike CJ., Burdick D., Walencewicz AJ., Glabe CG., Cotman CW. (1993) Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides in vitro: the role of peptid assembly satte. *J. Neurosci.* 13: 1676-87.
- Rafalowska U., Erecinska M., Wilson DF. (1980) The effect of acute hypoxia on synaptosomes from rat brain. *J. Neurochem.* 34: 1160-5.
- Rossi DJ., Oshima T., Attwell D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403: 316-21.
- Rossonjohn J., CaAPPI R., Feli SC, Henry A., McKinstry WJ., Galatis D. (1999) Crystal structure of the N-terminal growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat. Struct. Biol.* 6:327-31.
- Sandberg M., Nystrom B., Hamberg A. (1985) Metabolically derived aspartate-elevated extracellular levels in vivo in iodoacetate poisoning. *J. Neurosci. Res.* 13: 489-95.
- Schinder AF., Olson EC., Spitzer NC., Montal M. (1996) Mitochondrial Dysfunction is a

primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 16: 6125-33.

Schulz J., Matthews RY., Henshaw DR., Beal MF. (1996) Neuroprotective strategies for treatment of lesions produced by mitochondrial toxins: Implications for neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 71: 1043-8.

Seubert P., Oltersdorf T., Lee MG, Barbour R., Blomquist C., Davis DL., (1993) Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino-terminus of the β -amyloid peptide. *Nature* 361:260-3.

Sheehan JP., Swerdlow RH., Miller SW., Robert ED., Parks JK., Parker WD., Tuttle JB. (1997) Calcium homeostasis and reactive oxygen species in cells transformed by mitochondria from individuals with sporadic Alzheimer's Disease. *17 (12): 4612-22.*

Silver IA., Deas J., Erecinska M. (1997) Ion homeostasis in brain cells: Differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cell. *Neuroscience* 78: 589-601.

Smith-Swintosky VL., Zimmer S., Fenton JW., Mattson M. (1995) Opposing actions of thrombin and protease nexin-1 on amyloid β -peptide toxicity and on accumulation of peroxides and calcium in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 65:1415-8.

Smyth MD., Kesslack JP., Cummings BJ., Cotman CW. (1993) Analysis of brain injury following intrahippocampal administration of β -amyloid in streptozotocin-treated rats. *Neurobiol. Aging* 15: 153-159.

Snow AD., Henderson M., Nochlin D., Sekiguchi RT., Kimata K., Koike Y., Wight TN. (1990) Early accumulation of heparin sulfate in neurons and in the beta-amyloid protein containing lesions of Alzheimer disease and Down's syndrome. *Am. J. Pathol.* 137:1253-67.

Stein-Behrens B., Adams K., Yeh M., Sapolsky R. (1992) Failure of beta-amyloid protein fragment 25-35 to cause hippocampal damage in the rat. *Neurobiol. Aging* 13: 577-9.

Stéphan A., Davis S., Salin H., S., Mallet J., Laroche S. (2002) Age-Dependent Differential

Regulation of Genes Encoding APP and α -Synuclein in Hippocampal Synaptic Plasticity. *Hippocampus* 12: 55-62

Strausak D (2001) Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases *Brain. Research Bulletin*, 55:175-85.

Subramaniam R., Koppal T., Green M., Yatin S., Jordan B., Drake J., Butterfield A. (1998) The free radical antioxidant vitamin E protects cortical synaptosomal membrane from amyloid β -peptide (25-35) toxicity but not from hydroxynonenal toxicity: relevance to the free radical hypothesis of Alzheimer's Disease.

Terry RD., Masliah E., Hansen AH. (1994) Structural basis of the cognitive alterations in Alzheimer Disease. In *Alzheimer Disease* (Terry DR., Katzman R. and Bick KL., Eds.), pp. 179-96. Raven Press, New York.

Terry RD., Katzman R. (2000) Life span synapses will there be a primary senile dementia?. *Neurobiol of aging.* 22:347-348.

Tienari PJ., Ida N., Ikonen E., Simons M., Weidemann A., Multhaup G. (1997) Intracellular and secreted Alzheimer β -amyloid species are generated by distinct mechanisms in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:4125-30.

Uto A., Dux E., Kusumoto M., Hossmann K-A. (1995) Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia in vitro *J. Neurochem.* 64: 2185-91.

Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, Viola KL, Klein WL, Stine WB, Krafft GA, Trommer BL. (2002) Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain. Res.* 924:133-40

Weingarten, Lockwood AH., Hwo SY., Kirschner MW. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:1858-62.

Wisniewski HM., Narang HK., Terry RD. (1976) Neurofibrillary tangles of helical paired filaments. *J. Neurol. Sci.* 27:173-81.

Wischik CM., Novark M., Edwards PC., Klug A., Tichelaar W., Crowther RA. (1988) Structure and characterization of the core of the helical paired filaments of Alzheimer Disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:4884-8.

Wischik CM., Novark M., Thogersen HC. (1988) Isolation of a fragment of tau derived from de core of the helical paired filaments of Alzheimer Disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:4506-10.

Yakes FM. and Houten BV. (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:514-9.

Yankner BA. (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's Disease. Neuron. 16: 921-32.

Zeevalk GD., Nicklas WJ. (1992) Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg^{2+} block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlines receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. J. Neurochem. 59: 1211-20.

Zeevalk GD., Bernard LP., Nicklas WJ. (2000) Oxidative stress during energy impairment in mesencephalic cultures is not a downstream consequence of a secondary excitotoxicity. Neuroscience 96: 309-31.

Somos la memoria que tenemos y la responsabilidad que asumimos. Sin la memoria no existimos, sin la responsabilidad quizá no debemos existir.

- José Saramago -