



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA
TOXICIDAD DEL PÉPTIDO BETA-
AMILOIDE, DURANTE EL DESAJUSTE DEL
METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL.
PROTECCIÓN POR ANTIOXIDANTES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I O L O G A

P R E S E N T A :

TERESA MONTIEL MONTES

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Jurado

Tutora Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Propietario

Propietario Dra. María de Lourdes Masieu Trigo

Propietario Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Suplente Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Suplente M. en C. Karla Hernández Fonseca

AGRADECIMIENTOS

Como hay que comenzar por el principio, quiero dar las gracias a mis padres (Carmen y Otilio), por haberme dado la oportunidad de existir y haber nacido con el alma jarocho. A mi madre por su ejemplo, apoyo y por respetar las decisiones que he tomado en mi vida. A mi padre (donde quiera que se encuentre), y que le hubiera gustado ver terminada esta fase, porque si no hubiera sido por llevarle la contraria, simplemente no habría llegado hasta aquí.

A ambos, por darme esa familia numerosa, guapachosa y dicharachera.

A Pavel, porque sin él la vida no tendría sentido. Gracias por haberme dado la oportunidad de tener el cariño de Lea y de experimentar esta nueva faceta de la vida, porque al tener a Luna entre mis brazos, todo se torna en armonía y tranquilidad.

A Carmen por su cariño, solidaridad y generosidad.

A Clorinda Arias y a Lourdes Massieu, por su ayuda y apoyo, para concluir este trabajo. Mil gracias por creer en mí y alentarme siempre. Porque es invaluable el cariño y la amistad que me han brindado durante muchos años.

Gracias a Maru Gonsebatt, por sus consejos de antes y de ahora, por darme la oportunidad de contar con su amistad y por su entusiasmo al compartir conmigo mi faceta de abuela.

Gracias al Dr. Ignacio Camacho, por su cariño y por molestarme cada vez que nos veíamos, para que este trámite llegara a su fin.

Tener la fortuna de coincidir en el camino de la vida con personas que me han dado su amistad y cariño, ha sido lo mejor que me ha ocurrido. Si alguien de la lista que anotaré se encuentra exento, le pido una disculpa, pero el tema del trabajo lo puede justificar, mi memoria puede estar fallando un poco.

A Ceci, por su gran corazón y ser mi acompañante de tantos años de trabajo.

Gracias a los cuates del laboratorio, por acompañarme y apapacharme en los momentos de alegría y tristeza: Perla, Karla, María Luisa, Ana, Alberto y Octavio.

Al grupo de cuates con los que he compartido muy buenos momentos y seguiremos compartiendo recuerdos y añorando a Simón: Sergio, César, Eduardo, Óscar, Paz y Angélica.

A los cuates de la facultad, con quienes compartí momentos inolvidables. Todos ellos siguen presentes, aunque la distancia y los rumbos de la vida nos hayan llevado por caminos distintos.

A Rosendo, por compartir conmigo más de la mitad de mi vida.

Agradezco a esta casa de estudios, la UNAM. Por la inversión en mi educación y desarrollo profesional.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMEN	ii
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, UNA PROBLEMÁTICA SOCIAL	iii
I. INTRODUCCION	1
1.1.Enfermedad de Alzheimer (EA).....	1
1.1.1.Toxicidad del péptido β -amiloide (β A).....	2
1.1.2.Estrés oxidativo asociado a la toxicidad del β A	6
1.1.3.Relación entre el metabolismo cerebral, estrés oxidativo y EA.....	10
1.2.Metabolismo energético cerebral.....	12
1.2.1.Glucólisis.....	14
1.2.2.Ciclo de Krebs y metabolismo mitocondrial.....	16
1.3.Alteraciones metabólicas y EA.....	19
1.3.1.Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y EA.....	19
1.3.2.Disfunción mitochondrial y EA.....	20
II. HIPOTESIS	22
III. OBJETIVO	22
3.1.Objetivos particulares.....	22
IV. MATERIALES Y METODOS	24
4.1.Modelos experimentales.....	24
4.1.1.Inhibición glucolítica y toxicidad del péptido β A25-35.....	24
4.1.1.2.Protocolo de agentes antioxidantes.....	25
4.1.1.2.1.Tratamiento con vitamina E (α -tocoferol).....	25
4.1.1.2.2.Tratamiento con PBN (α -phenyl-N-tert-butyl nitrona).....	25
4.1.2.Inhibición mitocondrial y toxicidad del péptido β A 25-35.....	26
4.2.Histología y volumen de lesión.....	27
4.3.Actividad de la GAPDH.....	28
4.4.Actividad de la SDH.....	28

4.5.Determinación de ATP.....	29
4.6.Lipoperoxidación.....	30
V. RESULTADOS.....	32
5.1.DAÑO NEURONAL	
5.1.1.Toxicidad del péptido β A25-35 en la inhibición glucolítica...32	
5.1.1.2.Efecto de agentes antioxidantes y daño neuronal....33	
5.1.2. Toxicidad del péptido β A25-35 y deficiencia mitocondrial...36	
5.2.LIPOPEROXIDACIÓN.....	38
5.2.1.Efecto de la inhibición glucolítica y del péptido β A25-35.....38	
5.2.1.2.Efecto del tratamiento con antioxidantes.....38	
5.2.2.1.Efecto del tratamiento sistémico de yodoacetato y antioxidantes en estriado y corteza cerebral.....40	
5.2.2.Efecto de la inhibición mitocondrial y del péptido β A25-35.42	
VI. DISCUSION.....	44
VII. CONCLUSION.....	48
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

3-NP	ácido 3-nitropropiónico
Acetil-CoA	acetil-Coenzima A
ADN	ácido deoxiribonucleico
ADP	adenosine difosfato
AMP	adenosine monofosfato
APOE	apolipoproteína E
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosin trifosfato
Cu	cobre
EA	enfermedad de Alzheimer
EAL	esclerosis amiotrófica lateral
EH	enfermedad de Huntington
EP	enfermedad de Parkinson
ERO	especies reactivas de oxígeno
Fe	hierro
GAPDH	gliceraldehído fosfato deshidrogenada
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HNE	hidroxinonanal
IOA	ácido yodoacético
LPO	lipoperoxidación
MDA	malondialdehído
NADH	nicotinamida adenin dinucleótido reducido
NO	óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	superóxido
OH [•]	radical hidroxilo
ONOO [•]	peroxinitrito
PBN	α-fenil-N-ter-butyl nitrona
PPA	proteína precursora amiloide
SDH	succinato deshidrogenada
TBARS	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
βA	beta amiloide

RESUMEN

El estrés oxidativo ha sido implicado en el daño neuronal ligado a la Enfermedad de Alzheimer (EA). La toxicidad del péptido β -amiloide (β A), la reducción del metabolismo oxidativo de la glucosa y la disminución de la actividad oxidoreductora mitocondrial han sido factores asociados a la generación del estrés oxidativo en la EA. Sin embargo, la relación entre la neurotoxicidad del péptido β A, el desajuste del metabolismo energético cerebral y el estrés oxidativo aún no ha sido totalmente esclarecida. La toxicidad del péptido β A *in vivo* no se conoce claramente, generando diversas controversias al respecto. En estudios previos se ha demostrado que el péptido β A₂₅₋₃₅ tiene efectos tóxicos en las neuronas del hipocampo *in vivo*, cuando éste es administrado durante un estado moderado de inhibición glucolítica ó mitocondrial. En el presente trabajo se muestra que durante condiciones energéticas deficientes, la toxicidad del β A genera estrés oxidativo, ya que se incrementan los niveles de lipoperoxidación cuando el péptido β A es administrado en el hipocampo de ratas tratadas con yodoacetato (inhibidor de la glicólisis). Tanto el daño neuronal como la lipoperoxidación son totalmente prevenidos por la vitamina E, y parcialmente por el PBN (α -fenil-N-ter-butyl nitrona), agentes antioxidantes. Estos resultados sugieren la interacción entre el estrés oxidativo, el desajuste del metabolismo energético y la cascada de eventos neurotóxicos que ocurren en la enfermedad de EA.

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, UNA PROBLEMÁTICA SOCIAL

A lo largo de la historia de la humanidad, el promedio de vida del hombre se ha venido incrementando, una razón de este comportamiento esta dada por los avances en la investigación biomédica y su aplicación. El desarrollo de vacunas, antibióticos y tratamientos en la prevención de enfermedades vasculares son uno de los logros del último siglo. Hacia 1900 el promedio de vida en la población de Estados Unidos era de 50 años, ahora en este siglo el promedio se ha incrementado hasta los 75 años en hombres y 78 en mujeres. En México, hacia el año de 1930 el promedio de vida era de 34 años, y para el año 2003 era de 77 años en mujeres y 72 años en hombres. Sin embargo, el promedio de longevidad se rige por factores sociales, geográficos y económicos. El incremento en la longevidad ha llevado a un problema de salud en la población mayor de 65 años: la aparición de desórdenes mentales característicos del envejecimiento, como son la demencia senil y la Enfermedad de Alzheimer (EA). La frecuencia de casos de demencia con un componente patológico degenerativo ha ido en aumento. Hasta hace un siglo, sólo eran casos esporádicos, pero ahora constituyen un problema de salud pública, social y familiar. La EA es una enfermedad neurodegenerativa que progresa lentamente, deteriorando la capacidad cognoscitiva de la persona y menguando la independencia de valerse por sí misma. Es un proceso de evolución lenta que puede durar varios años, hasta que llega la muerte.

Conocer los mecanismos de muerte neuronal en esta patología y los procesos que en ella intervienen, permitirán desarrollar herramientas farmacológicas que con lleven a mejorar la vida de las personas que la padecen. Es por ello que constituye un problema muy importante para abordar. El diseño de modelos experimentales en animales, permiten conocer más sobre la etiología

de la patología. En el presente trabajo se abordaran 3 aspectos que se han analizado individualmente, pero que están estrechamente relacionados y su conjunción puede agravar la patología: 1) la deficiencia energética celular, 2) la toxicidad del péptido β -Amiloide (βA), y 3) el daño neuronal mediado por estrés oxidativo.

Ante este último aspecto, analizaremos la eficiencia de agentes antioxidantes como la vitamina E y el PBN (α -phenyl-N-tert-butyl nitrona), en la prevención del daño oxidativo y de la muerte neuronal.

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, UNA PROBLEMÁTICA SOCIAL

A lo largo de la historia de la humanidad, el promedio de vida del hombre se ha venido incrementando, una razón de este comportamiento esta dada por los avances en la investigación biomédica y su aplicación. El desarrollo de vacunas, antibióticos y tratamientos en la prevención de enfermedades vasculares son uno de los logros del último siglo. Hacia 1900 el promedio de vida en la población de Estados Unidos era de 50 años, ahora en este siglo el promedio se ha incrementado hasta los 75 años en hombres y 78 en mujeres. En México, hacia el año de 1930 el promedio de vida era de 34 años, y para el año 2003 era de 77 años en mujeres y 72 años en hombres. Sin embargo, el promedio de longevidad se rige por factores sociales, geográficos y económicos. El incremento en la longevidad ha llevado a un problema de salud en la población mayor de 65 años: la aparición de desórdenes mentales característicos del envejecimiento, como son la demencia senil y la Enfermedad de Alzheimer (EA). La frecuencia de casos de demencia con un componente patológico degenerativo ha ido en aumento. Hasta hace un siglo, sólo eran casos esporádicos, pero ahora constituyen un problema de salud pública, social y familiar. La EA es una enfermedad neurodegenerativa que progresa lentamente, deteriorando la capacidad cognoscitiva de la persona y menguando la independencia de valerse por sí misma. Es un proceso de evolución lenta que puede durar varios años, hasta que llega la muerte.

Conocer los mecanismos de muerte neuronal en esta patología y los procesos que en ella intervienen, permitirán desarrollar herramientas farmacológicas que con lleven a mejorar la vida de las personas que la padecen. Es por ello que constituye un problema muy importante para abordar. El diseño de modelos experimentales en animales, permiten conocer más sobre la etiología

de la patología. En el presente trabajo se abordaran 3 aspectos que se han analizado individualmente, pero que están estrechamente relacionados y su conjunción puede agravar la patología: 1) la deficiencia energética celular, 2) la toxicidad del péptido β -Amiloide (βA), y 3) el daño neuronal mediado por estrés oxidativo.

Ante este último aspecto, analizaremos la eficiencia de agentes antioxidantes como la vitamina E y el PBN (α -phenyl-N-tert-butyl nitrona), en la prevención del daño oxidativo y de la muerte neuronal.

INTRODUCCION

1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

La enfermedad de Alzheimer fue descrita por el neuropsiquiatra Alois Alzheimer, en 1907. Alzheimer describió el caso de August una mujer de 51 años y las alteraciones cognitivas básicas de esta enfermedad. La pérdida de memoria a corto plazo, el deterioro para reconocer caras y personas, alucinaciones auditivas, estados de delirio, que en un principio duran unas horas y después varios días. Conforme avanza la enfermedad las habilidades cognoscitivas se van deteriorando (Smith, 1996).

Fue en los años 60's con el trabajo de los neuropatólogos Blessed, Thomlinson y Roth, que se profundizó en las características neuropatológicas, bioquímicas y clínicas de la enfermedad (Selkoe Dennis J, 1994).

Las características histopatológicas de la EA incluyen atrofia en corteza cerebral, en el hipocampo, y otras estructuras del sistema límbico (principalmente las cortezas de asociación), así como hinchamiento de los ventrículos laterales. A nivel celular, hay pérdida neuronal y de terminales sinápticas, daño en el citoesqueleto, y presencia de placas neurofibrilares interneuronales con depósitos extraneuronales de filamentos amiloideos y un gran número de placas neuríticas (placas seniles).

Las placas neuríticas están compuestas por depósitos de agregados insolubles de la proteína β -amiloide (βA), compuestos por residuos que van de 39 a 43 en su forma beta plegada, adquiriendo a lo largo del tiempo una forma de placa, denominadas "placas amiloideas". Estas placas también están presentes en individuos viejos "normales", pero en menor cantidad y complejidad. La densidad de las placas está en función directa con el deterioro cognoscitivo y el grado de la enfermedad que presentan los pacientes.

La patogénesis de la EA es muy compleja, y aún más heterogénea su etiología, sin embargo, se pueden identificar dos formas: a) Alzheimer esporádico y b) Alzheimer

hereditario, en cuyo caso el componente genético es un factor determinante (Eckert, 2003). Sin embargo, existe un factor común, la presencia del péptido β -Amiloide (β A) soluble, asociado con el papel de iniciador en la cascada de eventos que prenden las señales de neurodegeneración finalizando en la muerte neuronal.

1.1.1. TOXICIDAD DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE (β A).

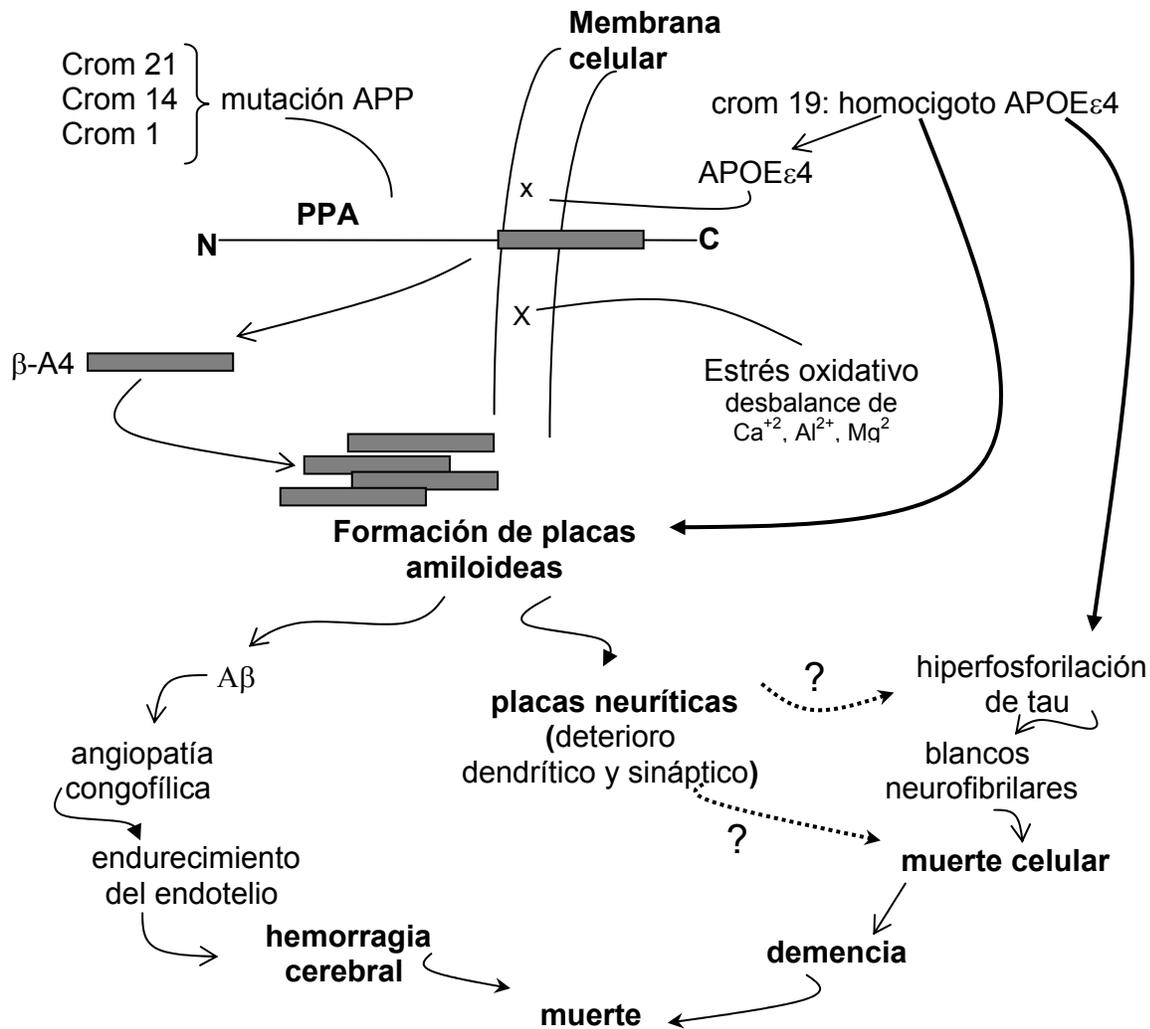
El β A es un péptido hidrofóbico de 4kD denominado β /A4 ó β A, el cual se ensambla en fibrillas extracelulares. La neurotoxicidad del β /A4 inicia por inducir la formación de placas neurítica, con destrucción del neuropilo, distrofia de neuritas, formación de blancos neurofibrilares y finalmente la muerte celular (Selkoe DJ , 1994).

El β A se forma a partir de la glicoproteína transmembranal, la proteína precursora amiloide (PPA), con un peso de 110-130 kDA, que se encuentra codificada en el cromosoma 21 (Sisodia y Price, 1992). La función de ésta proteína no es totalmente conocida; se expresa en varios tipos celulares, incluyendo neuronas y glía, y participa en diversos procesos: como la regulación de la división celular, modulación de la adhesión y en el crecimiento celular (Hoyer, 1994). El rompimiento anormal de esta proteína da lugar al péptido β A. Se han caracterizado cuatro distintos ARN mensajeros que dan origen a cuatro isoformas de la proteína precursora amiloidea (PPA).

En pacientes con EA se han localizado mutaciones en el cromosoma 21, en el gen codificante de la PPA, siendo un factor directamente asociado a los casos hereditarios de la patología. Pacientes con síndrome de Down's presentan 3 copias del gene codificador de PPA, y muestran la sintomatología de EA a edad promedio de 40 años, con las mismas características patológicas de los pacientes con EA, (Murrell y col., 1991).

Los cromosomas 1 y 14 también se encuentran implicados en el Alzheimer. Existen registros de una población en Estados Unidos descendientes de una colonia alemana que habitaba en el Volga, y todos ellos portan una mutación en el cromosoma 1 relacionado con alteraciones en la PPA con alto riesgo de desarrollar la patología. Se han localizado cinco formas mutantes en el cromosoma 14 asociadas con EA, denominadas S182, son formas similares a la mutante del cromosoma 1 STM2, sin que hasta el momento se hayan descrito funciones biológicas para ellas. Sin embargo, tanto las formas S182 como la STM2, están asociadas con el incremento de amiloidosis y las proteínas alteradas se conocen como Presenilinas 1 y 2 (Smith, 1996).

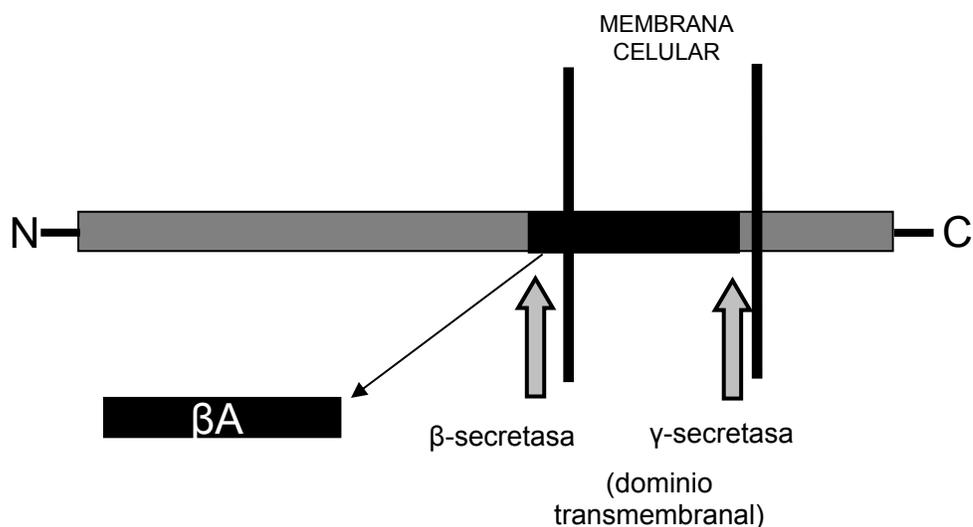
Otro de los factores hereditarios de riesgo lo constituye la Apolipoproteína E (APOE), localizada en el cromosoma 19 conformada por tres alelos: el APOE ϵ 2, APOE ϵ 3 y APOE ϵ 4, siendo mínimas las diferencias entre las isoformas (solamente posición de aminoácidos como la cisteína y la arginina); hasta el momento, el alelo de la APOE ϵ 4 ha sido identificado como factor de riesgo de EA esporádico ó hereditario. Las personas con resultados positivos a APOE ϵ 4 mayores de 68 años, presentan un factor de riesgo del 20 al 90% a desarrollar la enfermedad, dependiendo del número de copias de APOE ϵ 4 (Smith, 1996). Ver Esquema 1.



Esquema 1. Posible cascada de eventos en Alzheimer. La proteína PPA está insertada en la membrana neuronal o glial. El fragmento βA4 mostrado con el rectángulo que cruza la membrana celular quedando la parte del amino terminal hacia el espacio extracelular hacia donde es liberado. Tomado de Smith C. U. M.

El péptido βA está compuesto por una secuencia de 40 a 43 aminoácidos: de 11 a 15 aminoácidos conforman el dominio transmembranal y 28 aminoácidos se encuentran en el dominio extracelular acoplado a la PPA (Esquema 2). La forma más común del péptido βA contiene de 40 a 42 aminoácidos (βA 1-40 ó 1-42), siendo el fragmento

25-35 quien posee las propiedades neurotóxicas y neurotróficas (Kowall y col., 1992; Giovannelli y col., 1995). El fragmento 25-35 contiene el residuo de metionina 35, el cual juega un papel crítico en las propiedades pro-oxidativas del péptido (Butterfield y Bush, 2004). La sustitución del residuo de metionina 35 del péptido β A1-42 por norleucina 35 ó por aspártico o glicina, anularon los efectos neurotóxicos y la generación de estrés oxidativo *in vitro* (cultivos de hipocampo) e *in vivo* (en una mutante de *Caenorhabditis elegans*, donde se sobre expresó el péptido BA1-42). En ambas preparaciones, el incremento de carbonilos inducido por el péptido BA1-42, disminuyó y se observan niveles como en el control, cuando se aplicó BA modificado en la metionina 35. (Yatin y col., 1999; Butterfield, 2002; 2004).



ESQUEMA 2. Esquema del anclaje de la proteína precursora amiloidea (PPA) en la membrana celular, el corte de la γ -secretasa en el dominio transmembranal produce el péptido β A, liberado al espacio extracelular.

El análisis de la secuencia del péptido ha permitido su síntesis y su aplicación en diversos modelos experimentales: en células cultivadas ó en modelos animales (ratones transgénicos de la PPA), y analizar los mecanismos de la muerte celular en esta enfermedad. Diversos estudios experimentales *in vitro* han demostrado que el

péptido βA requiere de exposiciones prolongadas para generar los efectos tóxicos. El tiempo de agregación del péptido y su composición en número de aminoácidos, son propiedades estrechamente relacionadas con la citotoxicidad y la generación de radicales libres (Howlett, 1995; Monji 2001). Una condición relevante del péptido es la formación de agregados insolubles, o que se combine con otros factores que faciliten su acción tóxica (Butterfield, 2002). Existen diversas controversias sobre la toxicidad del péptido βA , en los modelos experimentales *in vivo*. Algunos modelos no han encontrado daño neuronal, aún cuando el péptido βA es aplicado directamente en las regiones cerebrales blanco de la patología, como el hipocampo ó la corteza parietal (Emre y col., 1992). Hasta el momento los resultados sobre la toxicidad del βA por sí solo no son contundentes. Sapolsky y col. en 1992, encontraron que solamente el 10% de animales presentaron lesión en la hoja dorsal del giro dentado después aplicar el fragmento βA_{25-35} en el hipocampo. Sin embargo, si el péptido es agregado hasta por 7 días, los efectos neurotóxicos son evidentes, como lo observaron Giovanelli y col. (1995) al administrar el péptido 25-35 ó el 1-40 en el núcleo basalis de la rata.

1.1.2. Estrés oxidativo asociado a la toxicidad del βA

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) en las estructuras cerebrales afectadas por el EA, son generadas en los sitios de inflamación y daño neuronal. Las ERO, incluyendo superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicales hidroxilo (OH^{\cdot}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y óxido nítrico (NO), son bioproductos fisiológicos. Su función fisiológica esta modulada por la activación de los mecanismos de defensa antioxidantes neuronales, o modulando mensajes de transducción (como el NO, identificado como segundo mensajero). El cerebro cuenta con las herramientas bioquímicas para controlar y mantener el balance entre la generación de ERO y la activación de los sistemas de

desintoxicación. Sin embargo, bajo condiciones patológicas, la sobreproducción de ERO inducida por factores endógenos o exógenos sobrepasa la capacidad de las defensas antioxidantes, generando un estado de estrés oxidativo (determinantes en el control de estos productos). En concentraciones bajas, funcionan como señales intermedias en la regulación de la actividad celular normal, tales como el crecimiento o en respuestas de adaptación. Sin embargo, en altas concentraciones, los niveles de ERO desencadenan cascadas de señales que inducen daño y/o muerte celular.

En el cerebro, el estrés oxidativo contribuye al envejecimiento vascular, asociado con los cambios estructurales del endotelio y los vasos sanguíneos, reduciendo la vasodilatación y ocasionando el endurecimiento de las arterias. Esta disfunción endotelial provoca alteraciones en el equilibrio de vasorelajación, factor característico de envejecimiento (Gjumrakch y col., 2002).

El estrés oxidativo ha sido implicado en diversas patologías del sistema nervioso, incluyendo esclerosis amiotrófica lateral (EAL), desmielinización, enfermedad de Huntington (EH), enfermedad de Parkinson (EP), isquemia cerebral, enfermedad priónica, y enfermedad de Alzheimer (EA). El daño oxidativo a biomoléculas de las células nerviosas puede tener diferentes blancos en cada patología. En pacientes con EA, existe una estrecha relación entre el estado de oxidación y el daño cerebral, aportándose datos experimentales que refuerzan la importancia del estrés oxidativo en la patogénesis de esta enfermedad (esquema 3).

Algunas de estas observaciones son:

- a) Incremento de los niveles de oxidación de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos en el cerebro de pacientes con EA (Behl y Moosmann, 2002; Butterfield, 2002)
- b) Elevadas concentraciones de Fe (III) y Cu (II), en las placas amiloideas. Ambos metales interactúan con el péptido A β promoviendo su agregación y contribuyendo a la formación de H₂O₂. El incremento en los niveles de

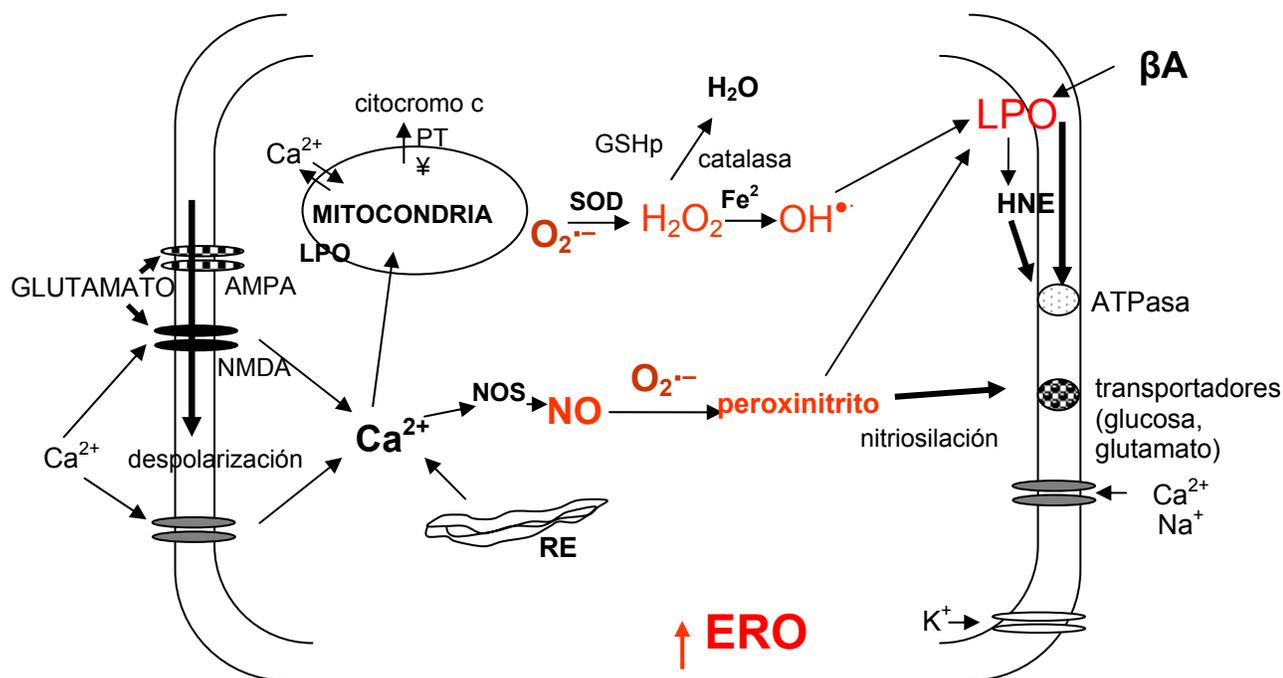
radicales, esta asociado con la formación de placas amiloideas (Huang y col., 1999).

- c) Aumento de depósitos intracelulares de productos terminales de la glicosilación, los cuales se co-localizan en las marañas neurofibrilares junto con la proteína TAU. Un posible papel de estos productos es su participación en la fosforilación de la TAU, la forma insoluble de esta proteína constituye un blanco neurofibrilares, afectando la estructura del citoesqueleto (Lüth y col. 2005).
- d) Inducción de estrés oxidativo celular por el péptido β A en modelos animales y en cultivos neuronales (Butterfield, 2002).

En la patogénesis de la EA la alteración de los procesos proteolíticos del péptido β A, incrementan su producción, la agregación y la formación de placas. Estudios *in vitro*, sugieren que la generación de ERO por los agregados del β A o en su forma soluble, inducen la lipoperoxidación, dando como resultado la alteración de proteínas insertadas en la membrana, incluyendo las ATPasas Na^+/K^+ , los transportadores de glutamato y de glucosa, ocasionando un disturbio en la homeostasis iónica y en el metabolismo energético, incrementando la generación de 4-Hidroxinonal (HNE, producto de la lipoperoxidación) y la lipoperoxidación (esquema 3, Mattson y col., 2002).

Un gran número de estudios y de evidencias indirectas han demostrado la presencia de estrés oxidativo en los tejidos de los pacientes que padecen o padecieron la EA. El incremento de productos de oxidación de lípidos como los isoprostanos, han sido detectados en orina, en sangre, en plasma y en el cerebro de los pacientes con EA, y en modelos animales de ratones transgénicos que sobre expresan la proteína β APP de humano (Pratico, 2000, 2001). La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) están directamente asociadas a la localización de las placas neuríticas (McLellan y col. 2003). La mutación en PPA y en presenilina-1 están asociadas al incremento de los

niveles de carbonilos, HNE y proteínas nitrosiladas, estos resultados fueron observados en cultivos neuronales al péptido BA1-42 (Abdul y col, 2006).



Esquema 3. Origen del estrés oxidativo en neuronas, durante el envejecimiento, eventos incrementados durante el Alzheimer. Ejemplo de moléculas dañadas por procesos mediados por radicales libres. El principal origen de radicales de oxígeno es producido en la mitocondria, generando el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) como producto de la fosforilación oxidativa. El superóxido es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la acción de la enzima manganeso superóxido dismutasa (MnSO) y por la superóxido dismutasa cobre-zinc (Cu/Zn-SOD). El peróxido es eliminado de la célula, al formar agua por la acción catalizada por la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSHp). Otra ruta que sigue el H_2O_2 es dar origen al radical hidroxilo (OH^{\cdot}) que es formado por la reacción de Fenton dependiente de Fe^{2+} o de Cu^{2+} . El OH^{\cdot} es un potente inductor de la lipoperoxidación (LPO) de los lípidos de la membrana celular. Los radicales de oxígeno pueden ser generados por los influjos de Ca^{2+} vía la activación del óxido nítrico sintetasa (NOS), produciendo óxido nítrico (NO), este puede reaccionar con el superóxido, para formar peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Esta molécula puede dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Productos como el 4-hidroxinonal (4-HNE), pueden modificar y alterar la función de proteínas insertadas en la membrana. Tomado y modificado de Mattson y col. 2002.

Diversas evidencias atribuyen el papel central del βA en la patología del Alzheimer (Butterfield y col. 2001; Ikezu y col. 2003; Kanski y col. 2002), y a la generación del

daño oxidativo a las neuronas *in vitro* (Kanski y col, 2002; Varadarajan y col. 2000), así como *in vivo* (Drake y col. 2003; Varadarajan y col. 2000; Yatin y col. 1999).

En la cepa de ratones con envejecimiento acelerado (senescence-accelerated mouse, SAMP8), que desarrollan déficit de aprendizaje y de la memoria desde los 12 meses de la edad (Morley y col. 2002), tanto los niveles de la PPA, como del péptido β A soluble en el hipocampo se encuentran incrementados (Kumar y col. 2000). Los ratones viejos SAMP8 (de 24 meses de edad), presentan niveles muy elevados de lipoperoxidación (determinados por TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) y de la oxidación de proteínas (carbonilos, un índice de la oxidación de proteínas) en el tejido cerebral (Farr y col. 2003; Poon y col. 2004).

El tratamiento de estos ratones con el ácido α -lipoico (un antioxidante), disminuye los niveles de carbonilos, de TBARS, y revierte el déficit de memoria (Farr y col. 2003; Poon y col. 2004).

La administración del oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la región del $A\beta$ en el gene de la PPA en éstos ratones, disminuye los niveles del péptido β A soluble en el cerebro (Kumar y col. 2000), así como los niveles de carbonilos, de lipoperoxidación y del déficit cognitivo (Poon 2004, 2005). Estos estudios apoyan la hipótesis del papel que juega el estrés oxidativo en la patología del Alzheimer.

1.1.3. Relación entre el metabolismo cerebral, estrés oxidativo y EA

En los pacientes con EA se ha demostrado una marcada reducción del flujo sanguíneo cerebral regionalizado, disminuyendo la oxigenación cerebral y la función neuronal (Hock y col. 1997). Existe una disminución del metabolismo de la glucosa especialmente en el lóbulo temporal y parietal, alteración observada por tomografía de emisión de positrones en pacientes con alta probabilidad de padecer la

enfermedad. El decremento en la actividad metabólica ha sido observado a nivel de subregiones celulares (como el aparato de Golgi). Los cambios en el metabolismo de la glucosa correlacionan con las alteraciones del estado mínimo mental, sugiriendo que el deterioro clínico y el desbalance metabólico están estrechamente relacionados (Mielke y col. 1994).

En pacientes con demencias, la tasa del metabolismo cerebral presenta una disminución del 19 al 40%, con reducción en la capacidad de utilización de la glucosa, pero no del oxígeno. Este resultado correlaciona con la disminución de algunas enzimas que participan en la degradación de la glucosa y en la formación del ATP (Hoyer, 1995). En microvasos sanguíneos aislados de la corteza temporal de pacientes con EA, Marcus y col. observaron disminución del metabolismo de glucosa, sugiriendo un déficit en el metabolismo energético cerebral de estos pacientes (Marcus y col. 1989).

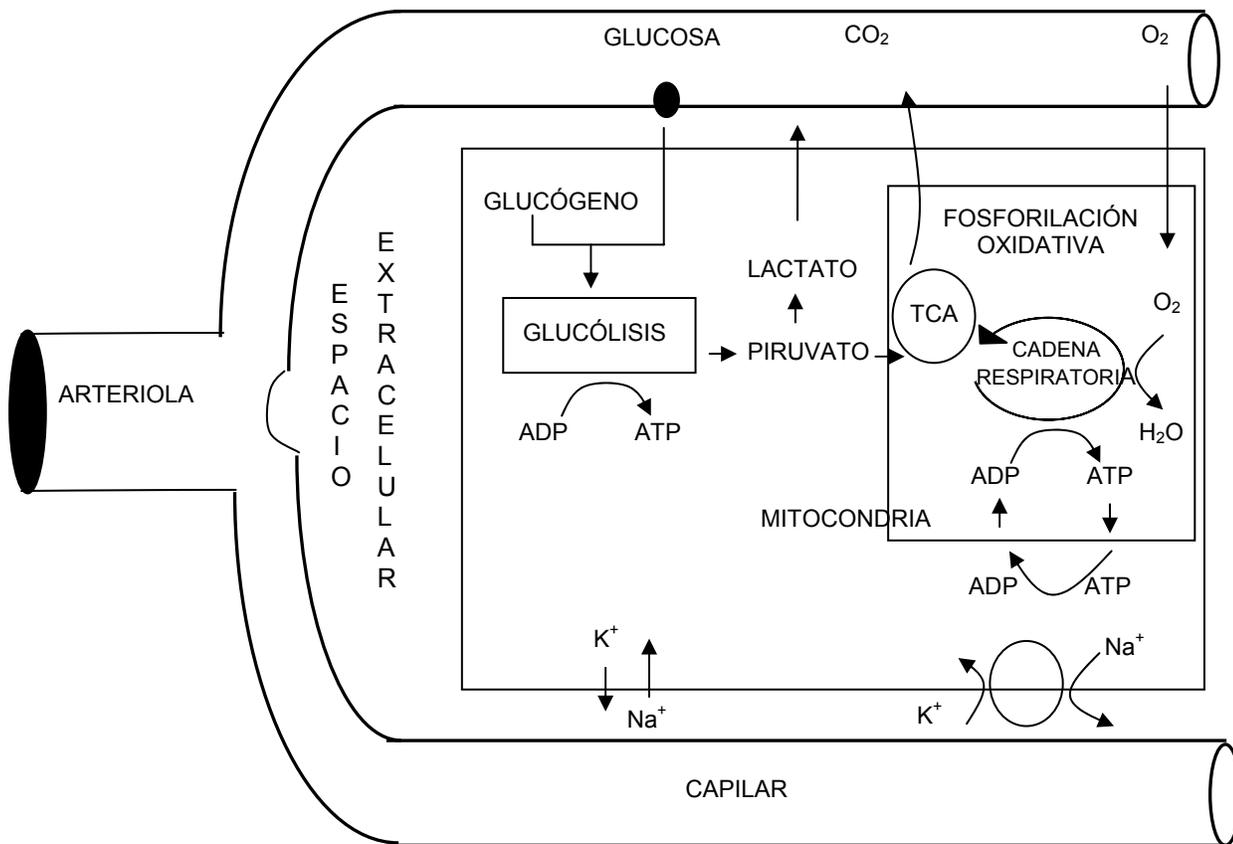
Foster y colaboradores (1984), reportaron que el decremento en el metabolismo cerebral puede preceder a la falla cognitiva, esto fue comprobado en sujetos cognitivamente normales, pero con genotipo homocigoto para el alelo APOE ϵ 4 (factor de riesgo para EA), los pacientes presentaron disminución de la tasa metabólica en la región temporal (relacionada con el procesamiento cognitivo), pero un incremento en el consumo de glucosa en la región frontal. La reducción regional del metabolismo de glucosa cerebral y el estado de avance de la patología, está estrechamente relacionada con la disfunción neuropsicológica (Haxby y col. 1986, 1988). Esto sugiere que antes que se desarrolle la enfermedad, se presenta un desorden hipometabólico regionalizado. En pacientes con Parkinson, que presentan estados de demencia, se observa un acentuado decremento del metabolismo de glucosa especialmente en la región temporo-parietal, similar a los pacientes con EA (Peppard y col. 1992).

Estas evidencias, sugieren que el mantenimiento del estado energético cerebral constituye uno de los factores relevantes en los procesos de toxicidad y evolución de

la patología. La alteración de la vía de transformación de la glucosa o del metabolismo oxidativo, pueden generar un estado energético vulnerable con circunstancias propicias para facilitar la disfunción de otros sistemas celulares, lo cual pone en riesgo la viabilidad neuronal, facilitando el inicio de diversas cascadas que conlleven a la muerte celular por excitotoxicidad.

1.2.METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL

El sistema nervioso central tiene como fuente principal de energía a la glucosa, el metabolismo de esta molécula constituye la parte esencial proveedora de energía para la funcionalidad celular del cerebro. La glucosa se metaboliza a través de la glicólisis, produciendo piruvato, este producto puede tomar dos vías: la vía aeróbica, produciendo acetil-Coenzima A (acetil-CoA) y entrar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos ó ciclo de Krebs, aportando los requerimientos necesarios para la cadena respiratoria mitocondrial y generando finalmente 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. En la vía anaeróbica, el piruvato se transforma en lactato, produciendo únicamente 2 moléculas de ATP, lo cual es insuficiente para mantener todas las funciones celulares. El cerebro obtiene la glucosa a través del flujo sanguíneo y cualquier alteración en el mismo constituye un grave problema en el funcionamiento cerebral (Bazan, 1992).



Esquema 4. Homeostasis energética cerebral. La glucosa llega a través de los capilares de donde es tomada por las células nerviosas (neuronales o gliales), para ser metabolizada por la vía glucolítica. El piruvato como producto final de la glucólisis es a su vez el recurso energético primordial del metabolismo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) que se desarrolla en la mitocondria. Tomado de Bazan, 1992. Voet/Voet, 1995.

1.2.1. GLUCÓLISIS

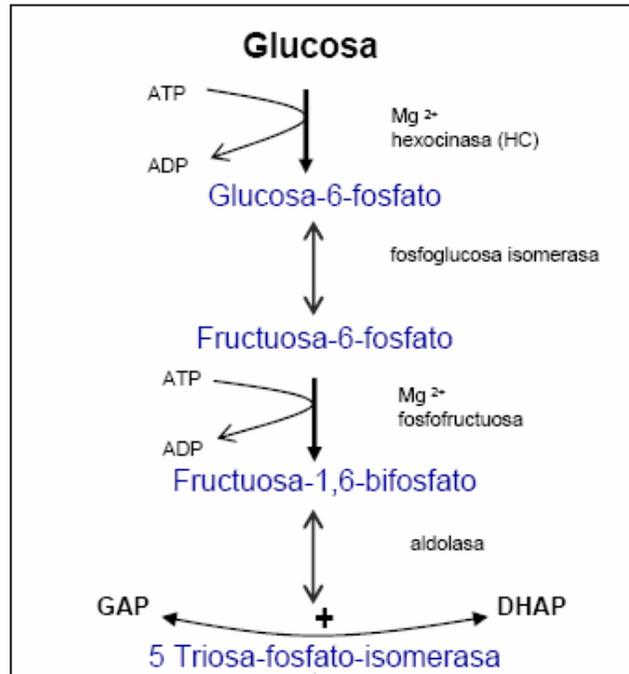
La glucosa se obtiene a partir de la descomposición de polisacáridos ingeridos a través de la dieta. El cerebro depende esencialmente de ésta molécula para generar su propia energía, la glucólisis es la vía principal de degradación de la glucosa, y este proceso ocurre en el citosol. La glucosa es transportada a la célula, a través proteínas acarreadoras específicas localizadas en la membrana celular (transportadores de glucosa, esquema 4), es aquí cuando empieza su degradación a través de la glucólisis (esquema 5), para formar el piruvato que constituye la fuente esencial del ciclo de Krebs de la cadena respiratoria. La formación de ATP es esencial para la célula, de ello depende el funcionamiento de las bombas ATPasas de Na^+/K^+ para mantener la homeostasis de los gradientes iónicos celulares y el equilibrio del potencial de membrana.

La glucólisis se compone de 2 etapas, la primera que es la fase preparatoria y consta de 4 reacciones que consumen 2 moléculas de ATP, aumentando la energía libre contenida. En esta etapa tiene como enzimas limitantes la hexocinasa y la fosfofructocinasa-1, su modulación depende del producto fructuosa 1,6-bifosfato, y de los niveles de AMP y de ADP.

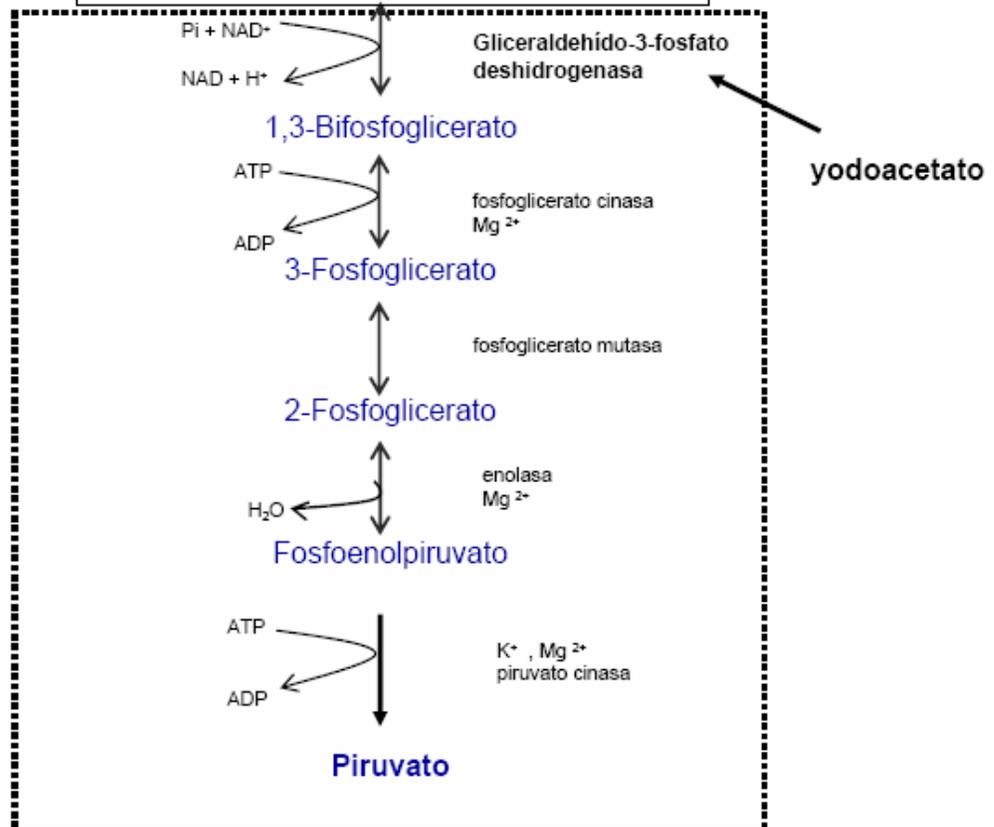
La segunda etapa es la fase de ganancia, en ella las moléculas de gliceraldehído 3-fosfato son oxidadas y dan como resultado 2 moléculas de piruvato. La energía liberada se recupera en 4 moléculas de ATP y 4 moléculas de NADH. Habiendo en total una ganancia de solo 2 moléculas de ATP, ya se invirtieron 2 en la primera etapa. En el primer paso de la etapa II es donde la vía puede ser interrumpida, por el yodoacetato, ya que se une irreversiblemente a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

GLUCÓLISIS

ETAPA I



ETAPA II



ESQUEMA 5. GLUCÓLISIS. La vía de la glucólisis se divide en 2 etapas, la primera es la fase de preparación, donde se invierten 2 moléculas de ATP. En la etapa II, la ganancia es de 4 moléculas de ATP. El yodoacetato interrumpe la glucólisis al inhibir a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada (GAPDH).

1.2.2. CICLO DE KREBS Y METABOLISMO MITOCONDRIAL

Las moléculas orgánicas combustibles (carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos) se oxidan para formar los grupos acetilo de la acetil-coenzima A (acetil-CoA), esta molécula se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que la degrada enzimáticamente para formar átomos de hidrógeno ricos en energía y liberar CO_2 , que es el producto final de la oxidación de estos combustibles. Los átomos de hidrógeno se separan dando protones (H^+) y electrones ricos en energía, los cuales son transferidos a las moléculas transportadoras de los electrones (cadena respiratoria) hasta reducirse y formar H_2O , durante este proceso la energía liberada se conserva en forma de ATP, este proceso es denominado fosforilación oxidativa.

La mitocondria es el organelo celular considerado como la fábrica generadora de energía, ya que en ella se encuentra toda la maquinaria para realizar la fosforilación oxidativa.

El ciclo de Krebs consta de ocho etapas (Esquema 6), el piruvato (producto final de la glucólisis) es el precursor inmediato de la acetil-CoA el cual es transportado a la mitocondria a través de un cotransportador de piruvato- H^+ específico, y es oxidado por complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa. Los productos intermedios formados en el ciclo de Krebs también son precursores para la síntesis de aminoácidos. Al finalizar el ciclo, la oxidación completa de cada molécula de glucosa por esta ruta genera 38 moléculas de ATP, esto constituye la fuente más importante de energía en la célula.

La energía producida en las mitocondrias de las células nerviosas, tanto en las neuronas como en la glía, se reparte en diferentes funciones: la primera se refiere al mantenimiento homeostático celular, incluyendo el metabolismo de carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, con el cual se consume cerca de la mitad de energía. Otro tanto de energía se invierte en mantener la función especializada, transmisión,

comunicación y mantenimiento de las bombas ATPasas de Na^+/K^+ que permiten regular los gradientes iónicos celulares (Clarke y Sokoloff, 1999).

El ATP hidrolizado por esta función produce ADP causando una aceleración en la fosforilación oxidativa, promoviendo a su vez su consumo en la cadena respiratoria (esquema 6).

1.3. ALTERACIONES METABÓLICAS Y EA

1.3.1. Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y EA

Como se mencionó anteriormente, la glucólisis es la fuente de producción del piruvato, esta vía metabólica puede verse interrumpida al bloquear la ruta de la segunda etapa (Esquema 5), inhibiendo la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). El ácido yodoacético tiene una acción directa sobre esta enzima, ya que se une irreversiblemente a la cisteína del sitio activo, afectando la unión de la enzima por su sustrato (el 1,3-difosfoglicerato), interrumpiendo así la glucólisis.

Se han encontrado diversas evidencias que asocian la disfunción de la GAPDH con algunas enfermedades neurodegenerativas. Burke y colaboradores (1996) reportaron que la proteína Huntingtina (la cual está involucrada con la enfermedad de Huntington), en su extensión de poliglutaminas, se une a la GAPDH, produciendo la inhibición de la enzima.

En la EA, la GAPDH interactúa con el dominio citoplásmico (fragmento C-terminal) de la PPA (Schulze y col. 1993; Mazzola y Sirover, 2004), formando complejos proteicos aberrantes que modifican la actividad de la enzima. La disminución de la actividad enzimática de la GAPDH ha sido reportada en la fracción postnuclear y nuclear en fibroblastos de pacientes con Huntington y Alzheimer (Mazzola y Sirover, 2003, 2004), afectando la producción energética y produciendo un hipometabolismo, característico en el EA. La formación del complejo GAPDH-RNA y la localización de proteínas de alto peso molecular-GAPDH en la fracción postnuclear, encontrado exclusivamente en células de pacientes con EA, proveen la evidencia que existe en la interacción de la GAPDH con otras proteínas (Mazzola y Sirover, 2003).

Recientemente la atención sobre la GAPDH nuclear y su papel en la enfermedades neurodegenerativas, es de gran interés, ya que puede estar relacionada con

desencadenar las señales de muerte apoptótica, siendo un blanco selectivo en el diseño de fármacos, como el Deprenyl en los pacientes con EA (Tsuchiya, 2004; Mazzola y Sirover, 2004), retardando la evolución de la enfermedad.

1.3.2. Disfunción mitocondrial y EA.

La disfunción mitocondrial y el daño oxidativo han sido relacionados en la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EAL, el Parkinson, el Huntington y el EA. Se ha propuesto que durante el envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo el EA; existen alteraciones mitocondriales que pueden alterar la formación de radicales libres e inducir la interrupción de la fosforilación oxidativa, ocasionando un decremento de los niveles de ATP (Shults y col., 1997).

Estudios recientes, sugieren que la deficiencia energética por alteración del metabolismo mitocondrial ó glucolítico, genera un estado vulnerable cerebral que facilita la toxicidad del péptido β A en el hipocampo de la rata (Arias y col, 2002). El daño neuronal es prevenido al suministrar piruvato intravenoso, previo a la administración del péptido β A, lo cual sugiere, que si las condiciones energéticas son restablecidas, el tejido es capaz de mantener en buen funcionamiento la maquinaria celular para amortiguar la cascada de toxicidad (Arias y col., 2002).

Recientemente se ha dado énfasis al estudio de las posibles alteraciones en el metabolismo energético, particularmente el mitocondrial, como posible condicionante de la muerte neuronal. Algunos estudios proveen datos de la disminución de los complejos enzimáticos mitocondriales, así como glucolíticos en el tejido de pacientes con EA, Parkinson ó Huntington. En el tejido cerebral de pacientes con Alzheimer se ha encontrado una disminución de la actividad del complejo IV del transporte de

electrones de la cadena mitocondrial (Parker y col. 1994), mientras que en pacientes con Parkinson se ha encontrado una disminución en la actividad del complejo I (Parker y col. 1989; Shults y col. 1997), y de los complejos II y III en pacientes con Huntington (Browne y col. 1997). Además, muchas de las características de la enfermedad de Parkinson se mimetizan con la administración del MPP⁺ que es un inhibidor reversible el complejo I, y a su vez, la administración del 3-nitropropiónico (3-NP), que inhibe irreversiblemente el complejo II mitocondrial, reproduciendo varias de las características de la enfermedad de Huntington (Brouillet y col., 1999). Aunque no se conocen las causas del daño mitocondrial asociado a estos desórdenes, es posible que deriven del daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN mitocondriales causado por la acumulación de ERO a lo largo de la vida del individuo. La acumulación de mutaciones o deleciones en el ADN mitocondrial inducida por la exposición continua a radicales libres, produciría errores en las proteínas codificadas por el ADN mitocondrial afectando el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. A su vez, defectos en la cadena respiratoria darían lugar a una mayor producción de radicales libres mitocondriales produciéndose un círculo vicioso. Numerosos estudios han demostrado la presencia de productos de oxidación en tejido cerebral proveniente de pacientes con la EA (Good y col., 1996; Smith y col., 1996), Huntington (Browne y col., 1997) y Parkinson (Sánchez y col., 1994). Además, en diversos modelos *in vitro* se ha mostrado que el estrés oxidativo está asociado a la muerte de tipo apoptótica (Ratan y col., 1994), la cual también se presenta en los tejidos de pacientes con EA y otras enfermedades neurodegenerativas (Stefanis y col., 1997). Estas evidencias sugieren una estrecha relación entre el envejecimiento, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la neurodegeneración, y favorecen la hipótesis del estrés oxidativo, sino como agente causal de muerte en el sistema nervioso, posiblemente como un factor condicionante o facilitador de la neurodegeneración (Lenaz, 1998; Beal, 1995).

HIPOTESIS.

Si nivel energético es esencial para mantener el funcionamiento neuronal y regular la formación de radicales libres generados por el péptido βA en el hipocampo; entonces, si existe falla energética (glucolítica ó mitocondrial), se incrementarán los niveles de radicales libres y la toxicidad del βA .

¿Podrá este efecto ser prevenido por agentes antioxidantes?

OBJETIVO

- Analizar el papel que juega el metabolismo energético en la toxicidad del βA_{25-35} y en la generación de estrés oxidativo, valorando los niveles de lipoperoxidación.
- Evaluar el efecto de los tratamientos con agentes antioxidantes: vitamina E (α -tocoferol) y α -phenyl-N-tert-butyl nitrona (PBN) sobre la lipoperoxidación y la muerte neuronal inducida por el péptido βA_{25-35} en el hipocampo de la rata.

Se desarrollarán dos modelos *in vivo* de deficiencia energética:

- 1) inhibición glucolítica, tratamiento con yodoacetato (inhibiendo la actividad de la enzima GAPDH)
- 2) intoxicación mitocondrial, por el tratamiento con el ácido 3-Nitropropiónico (inhibidor irreversible de la enzima succinato deshidrogenada del complejo II mitocondrial).

3.1. Objetivos particulares:

- 1) Analizar el efecto de los tratamientos crónicos con los inhibidores metabólicos, sobre los niveles de ATP, la actividad de las enzimas Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada (GAPDH) y succinato deshidrogenada (SDH).

- 2) Analizar si el estado energético contribuye a la generación del estrés oxidativo, y si este incrementa en presencia del β A25-35. Determinando los niveles de lipoperoxidación por el método de TBARS.
- 3) Determinar si el tratamiento con la Vitamina E ó PBN previenen el daño neuronal y la lipoperoxidación.

MATERIALES Y METODOS

4.1. MODELOS EXPERIMENTALES

Para realizar el presente estudio utilizamos ratas macho de la cepa Wistar entre 250-320 gramos de peso corporal, los animales fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Fisiología Celular.

4.1.1. Inhibición glucolítica y toxicidad del péptido β A25-35

Para inhibir la glicólisis, los animales fueron tratados durante 3 días con una inyección diaria de yodoacetato 15 mg/kg vía intraperitoneal (i.p.) disuelto en buffer fosfatos 10 mM. Cuatro horas después de la última dosis del yodoacetato, se realizó la microinyección del péptido β A25-35 (1 μ g/ μ l), en el giro dentado del hipocampo, con un flujo de 0.5 μ l/min, dejando un retardo de dos minutos al finalizar la inyección para permitir la difusión del péptido.

Para realizar la cirugía, las ratas fueron anestesiadas con 2% de halotano en una mezcla de O₂-95%/CO₂-5%, manteniendo constante el flujo entre 1-1.5% de la mezcla de carbógeno. La microcirugía se realizó en un equipo estereotáxico, utilizando las siguientes coordenadas: antero-posterior (AP) -3.6mm, lateral (L) 2.0 mm y profundidad (V) de -2.7 mm desde la dura madre, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1986).

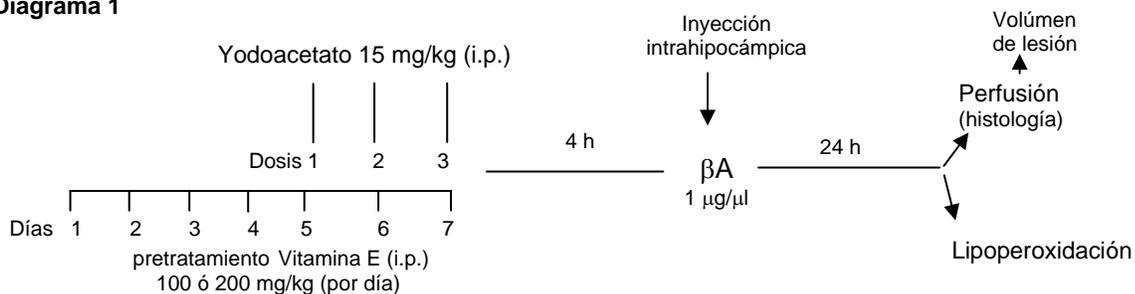
El péptido β A25-35 ó el péptido con secuencia revuelta (NH₂-IMLKNGASIG-COOH, β A35-25), empleado como control de la especificidad tóxica del β A25-35. Los péptidos fueron microinyectados en el hipocampo de ratas intactas o tratadas con yodoacetato. Los péptidos, fueron disueltos en H₂O des-ionizada estéril, la solución fue almacenada a -20 °C y dos horas antes de su inyección se mantuvieron a temperatura ambiente para facilitar su agregación.

4.1.1.2. Protocolo de agentes antioxidantes

Tratamiento con vitamina E (α -tocoferol)

Los animales fueron sometidos al tratamiento semi-crónico de vitamina E vía intraperitoneal (i.p.) en dosis de 100 mg/kg por día durante siete días (diagrama 1). Simultáneamente se trató un grupo de ratas con el vehículo de la Vitamina E (aceite de cártamo). Al quinto día del tratamiento se inició el protocolo del yodoacetato (como previamente ya se describió). Al séptimo día del tratamiento, la vitamina E fué administrada una hora antes de la microinyección del β A25-35. Cuando la dosis de vitamina E se incrementó a 200 mg/kg/día, los animales fueron sometidos a 2 inyecciones diarias (de la solución de 100 mg/kg), con un intervalo entre 8 y 12 horas. Veinticuatro horas después de la administración del β A25-35, los animales fueron perfundidos por vía intracardiáca (para evaluar el daño neuronal), o sacrificados por decapitación para el ensayo de lipoperoxidación por el método de TBARS (diagrama 1).

Diagrama 1

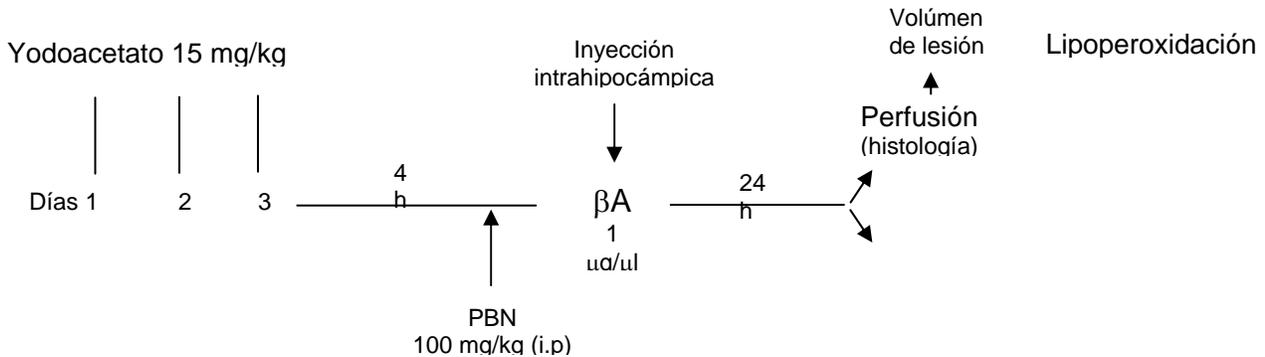


IV.1.1.2.2. Tratamiento con PBN (α -phenyl-N-tert-butyl nitrona)

En este protocolo las ratas fueron sometidas al tratamiento con yodoacetato (descripción anterior), treinta minutos antes de la microinyección del péptido β A25-35 se aplicó una dosis de 100 mg/kg de PBN i.p. ó del vehículo (DMSO al 50% en

solución salina, diagrama 2). En este protocolo se realizaron dos grupos experimentales uno para determinar el daño neurotóxico y en el otro para evaluar los niveles de lipoperoxidación por el método de TBARS (se describirá más adelante con detalle).

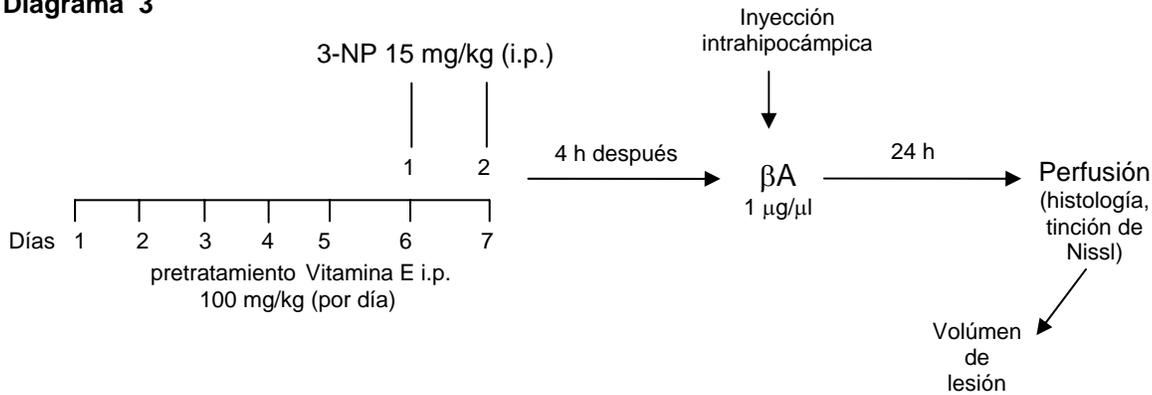
Diagrama 2



4.1.2. Inhibición mitocondrial y toxicidad del péptido β A25-35

Los animales fueron tratados con una toxina mitocondrial, el ácido 3-nitropropiónico (3-NP), el cual inhibe irreversiblemente a la enzima succinato deshidrogenasa impidiendo la funcionalidad del complejo II de la cadena del transporte de electrones mitocondrial. En este protocolo las ratas fueron tratadas con 15 mg/kg/día i.p. de 3-NP (disuelto en buffer fosfatos 10 mM y ajustado a pH 7.0-7.5 con NaOH) durante dos días. Cuatro horas después de la segunda administración del 3-NP se inyectó el péptido β A25-35 o el péptido de secuencia revuelta β A35-25 como ya se describió anteriormente. El tratamiento con vitamina E 100 mg/kg/día (diagrama 3) fue realizado igual que para el yodoacetato. El daño neurotóxico ó la lipoperoxidación inducida por el péptido β A25-35 fue evaluado veinticuatro horas después de la inyección intracerebral.

Diagrama 3



4.2. Histología y volumen de lesión

Veinticuatro horas después de la inyección intrahipocámpica del péptido βA_{25-35} ó del péptido inactivo βA_{35-25} , las ratas fueron anestesiadas con una sobre dosis de pentobarbital sódico y perfundidas por vía cardiaca con 200-250 ml de solución salina (NaCl 0.9%), seguido de 200 ml de formaldehído al 5% en buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.4. Los cerebros fueron removidos y preservados por una noche en el fijador, posteriormente transferidos a un gradiente de sacarosa del 20 y 30% en buffer fosfatos 0.1 M (24 y 48 horas respectivamente). Los cerebros fueron congelados, cortados en criostato en secciones coronales de 40 μm y posteriormente teñidos con violeta de cresilo (tinción de Nissl).

Todos los cortes de cada cerebro fueron examinados bajo microscopio óptico, seleccionando todas las láminas con daño neuronal. El daño fue considerado cuando se observaron núcleos pignóticos en la hoja dorsal y ocasionalmente en la hoja ventral del giro dentado del hipocampo. El área dañada fue manualmente delimitada y cuantificada con un analizador de imágenes (NIH, Macintosh 1.6). El volumen de la lesión fue calculado considerando la sumatoria total de las áreas de todos los cortes por 40 μm (grosor de cada corte), desde la primera y hasta la última sección dañada, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de lesión (mm}^3\text{)} = \sum \text{área (del \# total de cortes)} * 40 \mu\text{m}$$

Los resultados están expresados en mm^3 , graficando el promedio \pm error estándar de cada grupo experimental.

Para el análisis estadístico se aplicó una anova seguida de una prueba post-hoc de Fisher de comparación múltiple.

4.3. Actividad de la GAPDH.

Los animales que recibieron el tratamiento con yodoacetato (15mg/kg) o el vehículo, durante 3 días, fueron sacrificados por decapitación 4 horas después de la última dosis, los cerebros fueron removidos y el hipocampo fue disectado. La actividad de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue determinada por el método reportado por Ikemoto (2003), con modificaciones menores. Los tejidos fueron homogenizados en una proporción 1:10 volúmenes de buffer Tris-HCl 0.1 mM pH 8.5 y la actividad de la enzima se determinó en 1 ml de la mezcla de reacción, conteniendo: (en concentración mM) 1.7 arsenate de sodio, 20 fluorida de sodio, 1.0 NAD^+ y 5 de KH_2PO_4 . La reacción fue iniciada al agregar 1.0 mM del gliceraldehído-3-fosfato (el sustrato). La actividad enzimática se evaluó por espectrofotometría a 340 nm durante los primeros 30 segundos (durante la fase lineal), determinando la formación de NADH. El coeficiente de extinción de 2.07 del NAD^+ fue empleado para calcular la formación de NADH. Los datos están expresados como $\mu\text{mol NADH}/\text{min}/\text{mg}$ proteína. Los valores representan el promedio \pm error estándar.

4.4. Actividad de la SDH

La determinación de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), se realizó por el método de histoquímico en cortes de tejido cerebral en presencia de succinato

(sustrato de la enzima) y azul de tetrasolium (NBT, aceptor de electrones). La densidad óptica de la coloración azul-oscuro producida por la formación de la sal de formazán, fue cuantificada para determinar la actividad de la enzima (Brouillet y col., 1998; Massieu y col., 2001). Cuatro horas después de la última inyección del 3-NP (15 mg/kg) o del vehículo, los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital y perfundidos por vía intracardiaca con 100 ml de solución salina (0.9%) fría, seguida de buffer de fosfatos-salina conteniendo 10% de glicerol (PBS-glicerol). Los cerebros fueron removidos y congelados en isopentano, e inmediatamente después cortados por congelación a -20 °C. Se extrajeron secciones de 16 µm las cuales fueron montadas en portaobjetos. Los cortes fueron almacenados a -20 °C, por 2 días. Las secciones se incubaron a 37 °C durante 10 minutos con PBS, posteriormente se agregaron 100 µl de la mezcla de reacción a 4 °C, conteniendo: NBT 0.3 mM, buffer fosfatos 0.05 mM pH 7.6, succinato de sodio 0.05 mM. La reacción fué iniciada al transferir las láminas a una cámara húmeda e incubadas por 30 minutos en la oscuridad a 37 °C, terminada esta incubación, los cortes fueron lavados durante 5 min con PBS y sumergidos por unos segundos en agua destilada a temperatura ambiente. La coloración azul fue cuantificada por densidad óptica en un analizador de imágenes (NIH, Macintosh 1.6). La reacción no específica fue evaluada en secciones en las cuales se omitió el succinato en la mezcla de reacción. Los datos están expresados en valores porcentuales con respecto al control.

4.5. Determinación de ATP

Los niveles de ATP fueron determinados en homogenados de hipocampo, por el método luminométrico, empleando la técnica de luciferin-luciferasa (kit de Molecular Probe). La reacción fué monitoreada durante 45 segundos en un luminómetro (Massieu y col., 2003). Cuatro horas después de la última dosis del tratamiento con 3-

NP o con yodoacetato, los animales fueron anestesiados con halotano al 4% en un estereotáxico, el hueso del cerebro fué expuesto y congelado por aplicación de nitrógeno líquido en forma directa, durante 3-5 minutos, hasta haberse congelado el tallo cerebral (Delaney y Geiger, 1996). Los cerebros fueron removidos y permanecieron durante 10 minutos en nitrógeno líquido, inmediatamente después fueron almacenados a -70°C . El hipocampo fue disectado en hielo seco a 4°C , homogenizado en ácido perclórico a 0.8M (10 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de tejido congelado), el homogenado se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C . Se recuperó el sobrenadante y se neutralizó con una solución de K_2CO_3 2M (9% del volúmen total), centrifugado y almacenado a 4°C por 24 horas (Matthews y col., 1997). Las muestras fueron diluídas en un factor de 8 con agua desionizada, para la determinación de ATP se emplearon 500 μl finales, 200 μl de la muestra (diluida) y 300 μl de la mezcla de reacción (luciferin-luciferasa). El ATP fué determinado durante 20 segundos, tomando el valor del pico durante los 5 segundos después de agregar la mezcla de reacción.

La concentración de ATP en cada muestra se calculó con una curva del nucleótido (de 6.5-125 pmol de ATP). Los datos son expresados en pmol/ μg por gramo de tejido congelado. Los valores representan el promedio \pm error estándar.

4.6. Lipoperoxidación

Para evaluar el daño oxidativo generado por el péptido $\beta\text{A25-35}$, realizamos el ensayo del TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) de acuerdo a la descripción de Gluck y col. 2000. Esta técnica está basada en la formación de malondialdehído (MDA) por la oxidación de lípidos.

Veinticuatro horas después de la inyección intrahipocámpica del $\beta\text{A25-35}$, los animales fueron decapitados, disecando el hipocampo ipsi y contralateral. El tejido

fue homogenizado en 500 μ l de KCl 1.15%-Azida de sodio 0.4 mM e incubado a 37°C durante 15 min, se agregaron 500 μ l de ácido tricloracético al 20% (para precipitar proteínas), se centrifugó a 14,000 g durante 10 min a 4°C . Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 500 μ l de ácido tiobarbitúrico al 0.8%, la mezcla se incubó durante 20 min a 50 °C. La reacción fue determinada por espectrofotometría a una absorbancia de 532 nm. Los datos fueron calculados con una curva de acetal dimetil-Malondialdehido-bis y expresados en nmolas TBARS/mg proteína.

La concentración de la proteína total del homogenado fue determinado por el método de Bradford (1976).

En el hipocampo del hemisferio contralateral al inyectado, se evaluó la lipoperoxidación inducida por el tratamiento sistémico de: a) buffer fosfatos (en los controles), b) yodoacetato, c) 3-NP, d) pretratamiento con vitamina E y e) tratamiento con PBN. Esta evaluación también fue realizada en otras estructuras cerebrales como: el cuerpo estriado y la corteza cerebral.

1. Los datos están expresados en nmolas de TBARS/mg proteína (promedio \pm error estándar). Para el análisis estadístico se aplicó un análisis de anova de comparación múltiple seguida de una prueba post-hoc de Fisher.

RESULTADOS

5.1. DAÑO NEURONAL

5.1.1. Toxicidad del péptido β A25-35 en la inhibición glucolítica.

La administración del péptido β A25-35 en el giro dentado del hipocampo en animales intactos, produce un daño mínimo. La lesión se circunscribe alrededor del tracto de la aguja de inyección (0.012 mm^3 , Fig. 1A y Fig. 2). La secuencia inactiva (péptido β A35-25) presentó un daño menor que el péptido β A25-35, sin embargo, no hubo diferencia estadística en el daño de ambos péptidos (0.007 mm^3 , Fig. 2). Cuando el péptido β A25-35 fue administrado en el hipocampo de las ratas con deficiencia glucolítica, el daño en el giro dentado incremento más de 6.5 veces ($.078 \text{ mm}^3$, Fig. 1C, Fig. 2), mientras que el β A35-25 no mostró ningún efecto tóxico (Fig. 1B y Fig. 2).

Como se mencionó en la introducción, el yodoacetato inhibe directamente a la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*GAPDH*). Teniendo presente esta observación, se determinó la actividad de esta enzima en el hipocampo de los animales tratados con yodoacetato (Ikemoto, y col 2003), encontrando una inhibición del 52% de la *GAPDH* (Tabla 1), de 0.128 en el control a $0.061 \mu\text{mol}$ de $\text{NADH}/\text{min}/\text{mg}$ proteína en ratas tratadas con IOA, cuatro horas después de la última dosis (tiempo en el que se aplica el β A25-35). La *GAPDH* permanece inhibida en un 35% después de 24 horas de concluido el tratamiento, momento en el que se evalúa el daño neuronal y la lipoperoxidación.

TABLA 1. Actividad de GAPDH y SDH, niveles de ATP en el hipocampo de ratas tratadas con los inhibidores metabólicos.

	CONTROL	YODOACETATO	3-NP
Actividad GAPDH (μmol of NADH/min/mg proteina)	0.128 \pm 0.02	0.061 \pm 0.01*	-----
Actividad SDH (% of control)	100.0 \pm 6.71	-----	43.43 \pm 6.29*
ATP (pmol/ μg peso de tejido congelado)	2.810 \pm 0.26	2.330 \pm 0.42	2.790 \pm 0.61

Actividad de las enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), y de la succinato deshidrogenasa (SDH). La actividad de ambas enzimas así como los niveles de ATP, fueron determinados en el hipocampo de las ratas sacrificadas 4 horas después de la última administración de IOA ó 3-NP. Los niveles de glucosa fueron determinados 30 minutos antes y después de la primera y de la última administración de cada inhibidor metabólico. * $p < 0.05$ respecto al control.

5.1.1.2.Efecto de agentes antioxidantes y daño neuronal.

El pretratamiento de siete días con la vitamina E 100 mg/kg/día resultó muy eficiente en la prevención del daño inducido por el $\beta\text{A25-35}$, disminuyéndolo en un 65%, de 0.078 mm^3 a 0.028 mm^3 (Fig. 1E y Fig. 2). Esta protección fue mayor cuando los animales recibieron 200 mg/kg/día (Fig. 1F y Fig. 2), en este caso el daño fue prevenido al 90%, de 0.078 mm^3 a 0.028 mm^3 , lesión aún menor que la producida únicamente por el $\beta\text{A25-35}$. La protección del daño neuronal por una sola aplicación de PBN 100 mg/kg, fue del 57% de 0.078 mm^3 a 0.034 mm^3 (Fig. 1D y Fig. 2).

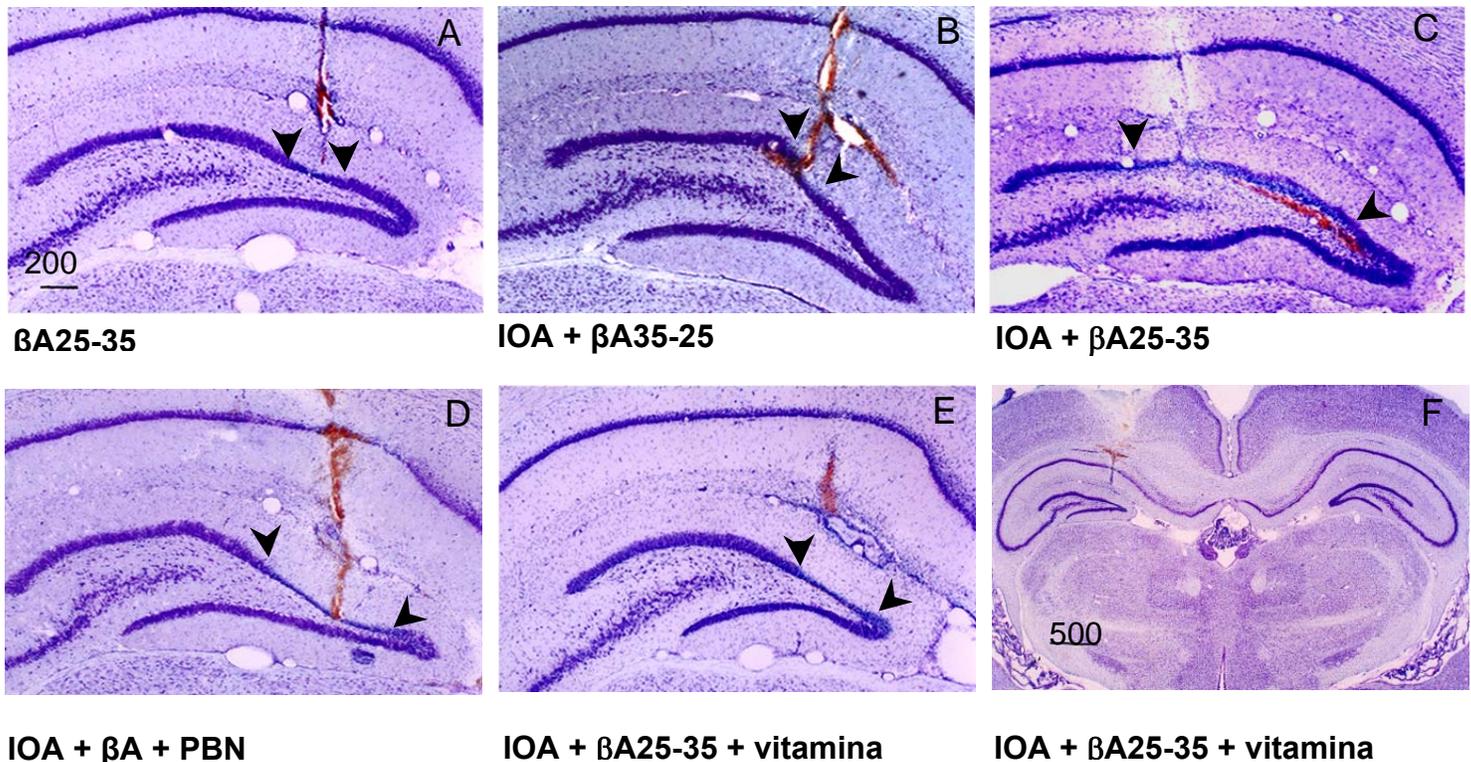


Figura 1. Microfotografías representativas del efecto protector de la vitamina E y del PBN sobre el daño inducido por el péptido $A\beta_{25-35}$ en el hipocampo, en ratas tratadas crónicamente con yodoacetato (IOA).

Las ratas recibieron 15 mg/kg/día de yodoacetato o del vehículo (buffer fosfatos 10 mM) durante 3 días. Cuatro horas después de la última dosis se administró $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del péptido βA_{25-35} o del péptido inactivo en giro dentado del hipocampo. En el caso de los animales tratados con PBN, estos recibieron una sola inyección i.p. de 100 mg/kg, 30 min antes del péptido $A\beta$.

Los animales sometidos al tratamiento con vitamina E, recibieron dosis diarias de 100 ó 200 mg/kg/día por 7 días, previo a la microinyección del péptido $A\beta$.

(A) Efecto neurotóxico del péptido βA_{25-35} en animales control, (B) muestra el efecto de la secuencia inactiva (péptido βA_{35-25}) en animales tratados con yodoacetato, (C) muestra la lesión inducida por el péptido βA_{25-35} en animales tratados con yodoacetato, (D) muestra el efecto de protección del tratamiento con PBN en animales tratados con yodoacetato y el βA_{25-35} . En E y F se muestra la reducción del daño generado por el péptido βA_{25-35} en los animales tratados con yodoacetato y vitamina E 100 o 200 mg/kg (respectivamente). Barra de escala = 200 μm (A-E) y 500 μm en F. Las flechas indican la extensión de la lesión.

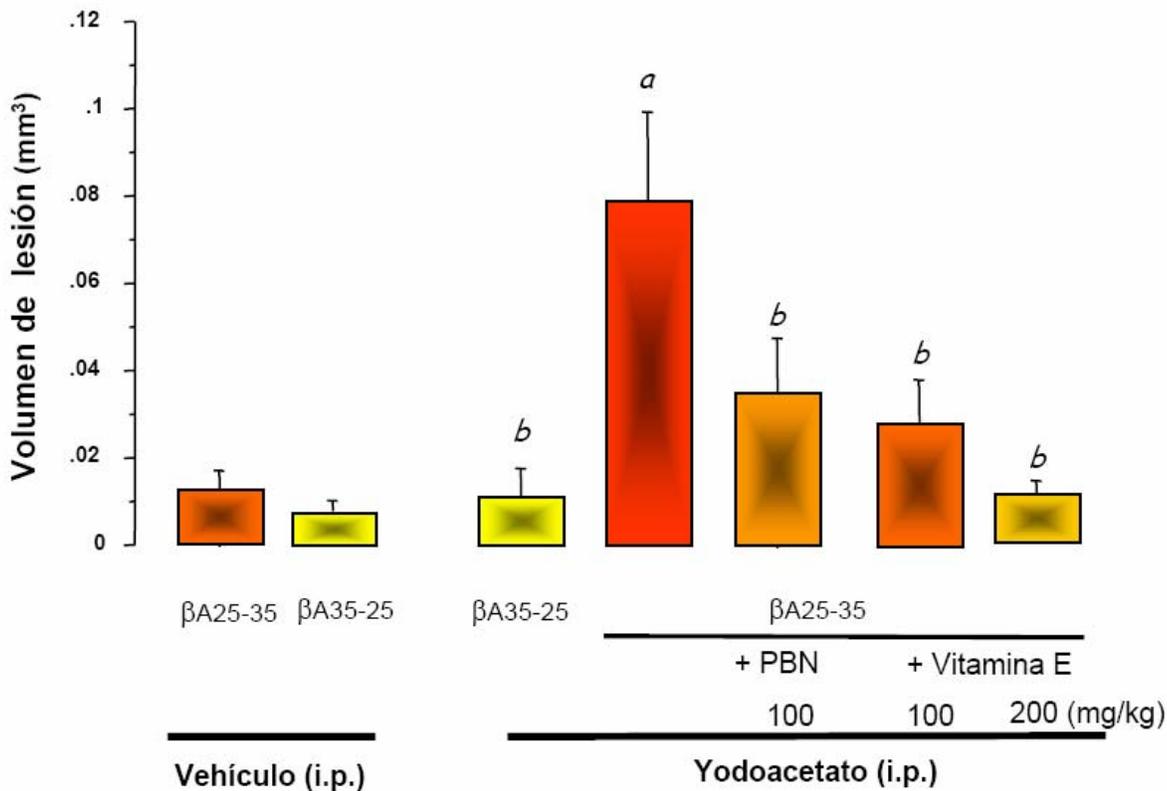


Figura 2. La gráfica muestra el volumen de lesión en el giro dentado del hipocampo, inducido por el péptido Aβ25-35 en ratas tratadas con el inhibidor glucolítico (yodoacetato) y los diferentes tratamientos con antioxidantes. Los animales tratados con PBN recibieron una sola dosis i.p. de 100 mg/kg 30 minutos antes del péptido βA. En los grupos tratados con vitamina E, los animales recibieron 100 o 200 mg/kg/día durante 7 días antes del péptido βA25-35. En cada grupo se representa el valor promedio ± error estándar de 5-8 animales. *a* = $p < 0.05$ con respecto al péptido βA (tratamiento con el vehículo i.p.), *b* = $p < 0.05$ con respecto al grupo tratado con yodoacetato + péptido βA.

5.1.2. Toxicidad del péptido β A25-35 y deficiencia mitocondrial.

En estudios previos hemos reportado que la actividad de la SDH disminuye un 40% cuatro horas después de la última administración, en el cuerpo estriado de los animales tratados con 3-NP (20 mg/kg) durante 2 días (Massieu y col., 2001). Esta inhibición no induce alteraciones morfológicas neuronales aparentes y se presenta en el 75% de los animales. Sin embargo, el 25% restante, presenta signos clínicos (postratamiento). Las ratas presentan una distonía severa ventral y de las extremidades, con rigidez en la fase aguda. Se observa el daño morfológico bilateral y muerte neuronal tanto en el estriado como en el hipocampo. En el presente trabajo, encontramos que la inhibición de la SDH en el hipocampo es del 57% (cuatro horas después de la segunda dosis del 3-NP) al momento de aplicar el péptido β A25-35 (Tabla 1).

Cuando las ratas manifestaron alteraciones conductuales inducidas por el 3-NP (ratas postradas, 25% del grupo), el tejido fue procesado para el ensayo de lipoperoxidación, 2 ó 3 horas después de la aparición de los signos conductuales, ya que pasado este periodo los animales mueren. El 75% restante de los animales tratados con 3-NP, aun cuando la capacidad mitocondrial está abatida y la enzima SDH se encuentra inhibida por debajo del 50% (Tabla 1), no existen manifestaciones conductuales, ni alteraciones morfológicas en el tejido cerebral.

En la deficiencia metabólica mitocondrial en las ratas tratadas con 3-NP, la toxicidad del β A25-35 se potenció e incrementó la lesión en 3 veces el volumen de lesión de 0.014 a 0.046 mm³, (Fig. 3B, 3D). Mientras que el péptido β A35-25 no produjo ningún efecto tóxico en esta condición (0.003 mm³, Fig. 3A, 3D).

Los efectos tóxicos del β A25-35 en el giro dentado de los animales con deficiencia mitocondrial, fueron prevenidos por el pretratamiento con vitamina E 100 mg/kg/día, disminuyendo el daño en un 50%, de 0.046 a 0.019 mm³ (Fig. 3C, 3D).

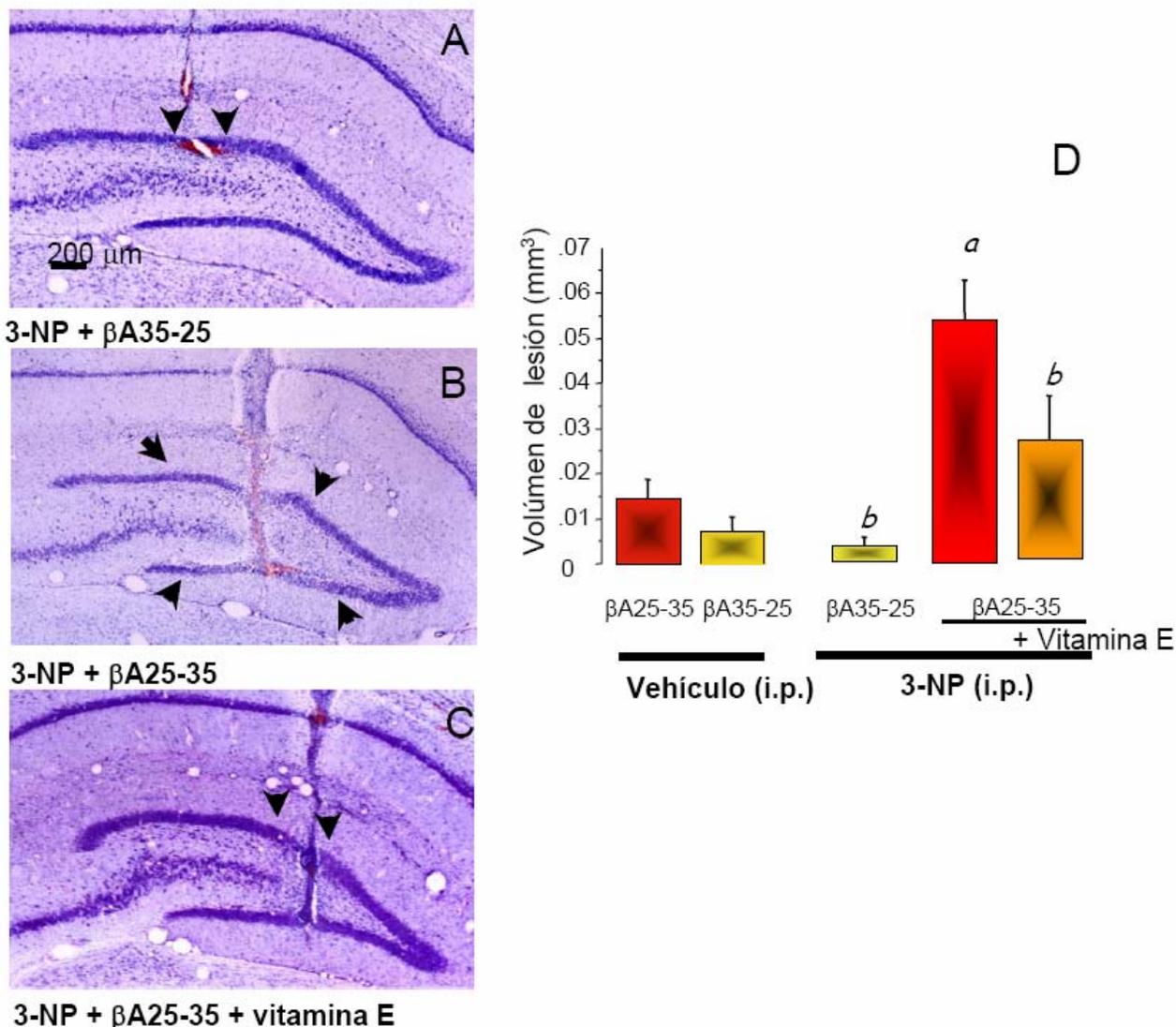


Figura 3. Microfotografías representativas del efecto protector de la vitamina E sobre el daño inducido por el péptido β A25-35 o del péptido β A35-25 en el hipocampo, en ratas tratadas con 3-NP. Los animales fueron tratados durante 2 días con 3-NP (15 mg/kg/día i.p.), cuatro horas después de la segunda dosis, recibieron una microinyección de 1 μ g/ μ l del péptido β A25-35 o del péptido inactivo en el giro dentado del hipocampo. El grupo de vitamina E recibió durante 7 días una dosis i.p. diaria de 100 mg/kg previo a la aplicación del péptido β A. (A) muestra la inyección del péptido β A35-25 en animales tratados con 3-NP, (B) muestra el daño neuronal inducido por el péptido β A25-35 en animales tratados con 3-NP, (C) muestra la protección del tratamiento con vitamina E en presencia de 3-NP + el péptido β A25-35. La gráfica (D), muestra el volumen de lesión (mm^3) con los diferentes tratamientos. Las flechas indican la extensión de la lesión. Barra de escala = 200 μ m. Cada grupo representa el valor promedio \pm error estándar de 5 a 10 animales.

$a = p < 0.05$ con respecto al péptido β A, $b = p < 0.05$ con respecto al grupo con 3-NP + péptido β A.

5.2.LIPOPEROXIDACIÓN

5.2.1.Efecto de la inhibición glucolítica y del péptido β A25-35.

El estado de lipoperoxidación en el hipocampo evaluado por el método de TBARS, veinticuatro horas después del tratamiento con yodoacetato, presenta un incremento del 26% con respecto al control (0.189 ± 0.019 , 0.149 ± 0.011), valores estadísticamente no significativo. Niveles muy semejantes fueron inducidos únicamente por el β A25-35 (0.177 ± 0.021 , Fig. 4). Sin embargo, la combinación de la deficiencia energética y el agente tóxico, incrementó los niveles de lipoperoxidación en un 56% con respecto al control (0.233 ± 0.17 , $p \leq 0.0011$) y de 32% con respecto al β A25-35 ($p \leq 0.02$), Fig. 4.

5.2.1.2.Efecto del tratamiento con antioxidantes.

La dosis única de PBN 100 mg/kg disminuyó discretamente los niveles de TBARS producida por el β A25-35 y la deficiencia glucolítica (0.198 ± 0.013 vs $0.233 \pm .017$, Fig. 4), sin efecto sobre el tratamiento sistémico del yodoacetato (0.175 ± 0.018 vs 0.189 ± 0.019). En ningún caso encontramos diferencias estadísticamente significativas del tratamiento con este antioxidante.

Contrario a los efectos del PBN, el tratamiento con vitamina E 100 mg/kg previene totalmente la lipoperoxidación producida por el péptido β A25-35 en el hipocampo en estado de deficiencia glucolítica (0.140 ± 0.013 vs 0.215 ± 0.021 , $p \leq 0.017$), e incluso mejora el estado de oxidación producido únicamente por el tratamiento del yodoacetato, disminuyendo los niveles por debajo del control (Fig. 4).

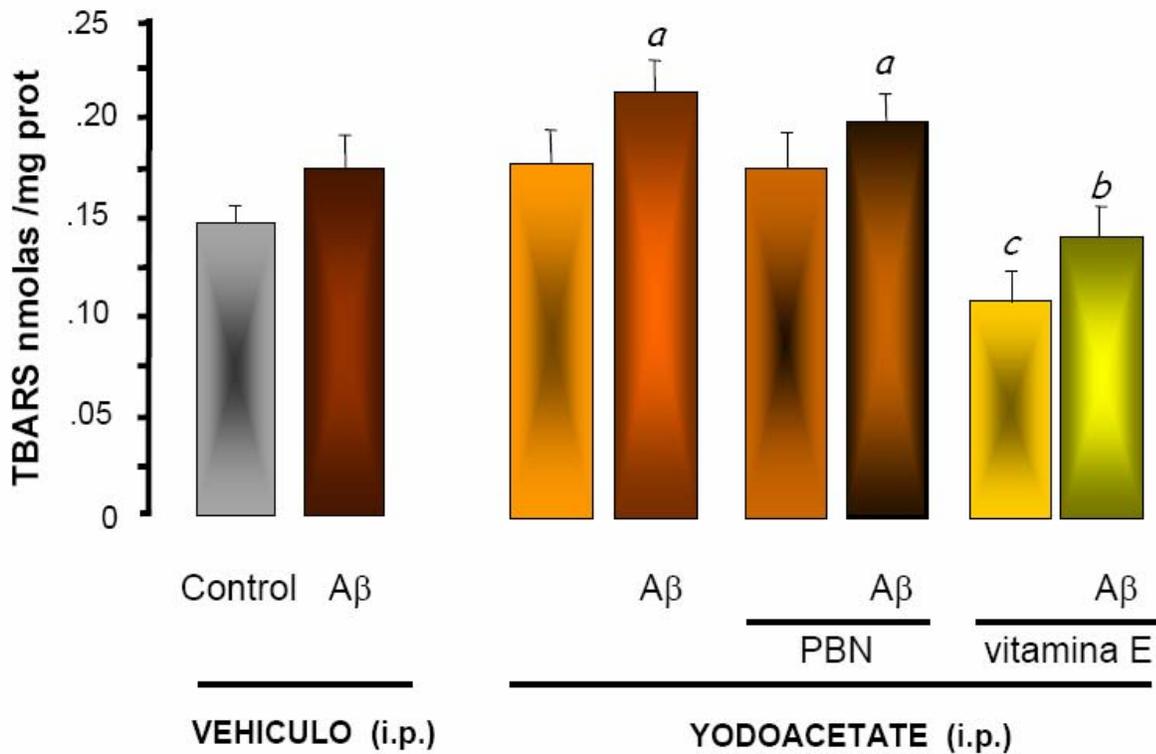
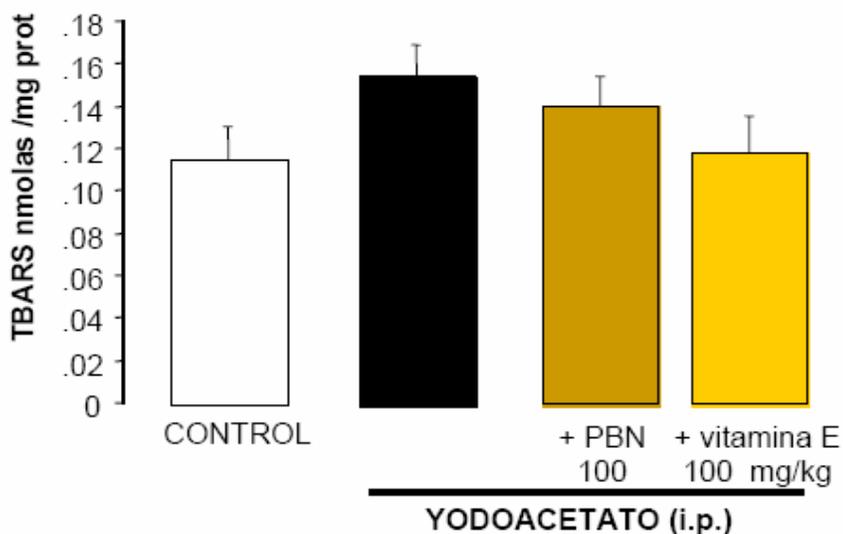


Figura 4. Ensayo de TBARS en hipocampo en animales tratados con yodoacetato. Efecto de la administración intrahipocampal del βA en animales con deficiencia glucolítica (tratados con yodoacetato). La lipoperoxidación se determinó 24 horas después de la inyección del péptido βA_{25-35} . El péptido βA incrementa los niveles de TBARS, siendo mayor este incremento en estado de deficiencia glucolítica. El incremento en la lipoperoxidación fue eficientemente prevenido por vitamina E (100 mg/kg/día, pretratamiento de 7 días), pero no por el PBN (100 mg/kg, aplicado 30 min antes del βA). El tratamiento sistémico de vitamina E evita la lipoperoxidación del tejido cerebral a valores aún menores de los niveles control y previene los efectos del péptido βA .
a = $p \leq 0.005$ respecto al control, b = $p \leq 0.05$ respecto al βA + yodoacetato, c = $p \leq 0.05$ respecto tratamiento sistémico del yodoacetato.
 Los resultados muestran el promedio de 5 a 9 datos \pm error estándar.

5.2.2.1. Efecto del tratamiento sistémico de yodoacetato y antioxidantes en estriado y corteza cerebral.

Al igual que en hipocampo, el estriado y la corteza cerebral, muestran incremento en la lipoperoxidación por efecto de la inhibición glucolítica (del 35 y 45%, respectivamente), aunque la diferencia estadística solo se encontró en la corteza cerebral. Como ya se describió anteriormente, el tratamiento sistémico con el atrapador de radicales libres (PBN), no tuvo efecto sobre la lipoperoxidación (Fig. 5). Sin embargo, la vitamina E disminuyó el daño oxidativo generado por el tratamiento sistémico del yodoacetato, tanto en estriado como en la corteza cerebral, manteniendo los niveles de lipoperoxidación igual que el control (Fig. 5).

ESTRIADO



CORTEZA

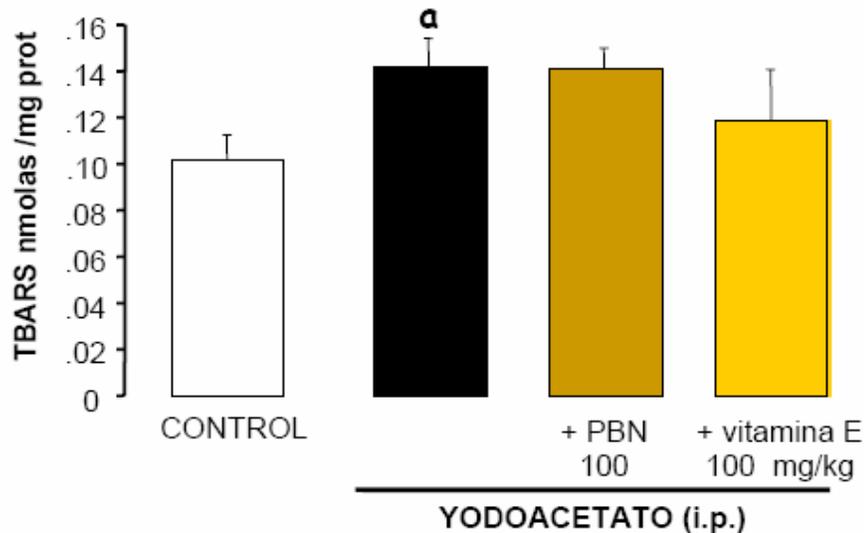


Figura 5. Ensayo de TBARS en homogenados de estriado y corteza parietal.

La lipoperoxidación se determinó entre 26 y 28 horas después la última inyección de yodoacetato. El tratamiento sistémico del yodoacetato (15 mg/kg/día durante 3 días), induce un pequeño incremento en la lipoperoxidación con respecto al control, tanto en el estriado como en la corteza. El incremento en los niveles de TBARS fue estadísticamente significativo solo en la corteza. El pretratamiento con vitamina E (100 mg/kg/día, durante 7 días) evita la lipoperoxidación producida por el tratamiento sistémico del yodoacetato, en ambas estructuras. Sin embargo, el PBN (100 mg/kg) no tuvo efecto.

$a = p < 0.005$ respecto al control. Los resultados muestran el promedio de 5 a 9 datos \pm error estándar, valores expresados en nmolas TBARS/mg de proteína.

5.2.2.Efecto de la inhibición mitocondrial y del péptido β A25-35.

Contrario a los efectos producidos por el β A25-35 cuando el estado energético es vulnerado por la inhibición de la vía glucolítica, el tratamiento con el 3-NP, presentó un discreto incremento (no significativo) de la lipoperoxidación en presencia del péptido β A25-35 (Fig. 6). Al parecer la alteración mitocondrial requiere de un estímulo más severo, como sucede en las ratas postradas. Las cuales presentan tanto signos conductuales como daño neuronal bilateral en el estriado y en el hipocampo (Massieu y col., 2001). El daño oxidativo en el hipocampo de éstos animales incrementó el 78% con respecto al control y 57% con respecto a los animales tratados con 3-NP que no manifestaron alteraciones conductuales.

La lipoperoxidación en el estriado y en la corteza de las ratas postradas, incrementó en ambas estructuras. En el estriado incrementó de 0.13 ± 0.02 (controles) a 0.41 ± 0.043 (ratas postradas) y en la corteza de 0.12 ± 0.025 (controles) a 0.23 ± 0.046 nmolas TBARS/mg de proteína (ratas postradas). Los incrementos de lipoperoxidación en estas estructuras, fueron mayores que en hipocampo, posiblemente estos incrementos se deben a que tanto la corteza como el estriado son estructuras blanco de la toxina mitocondrial y son más vulnerables al 3-NP.

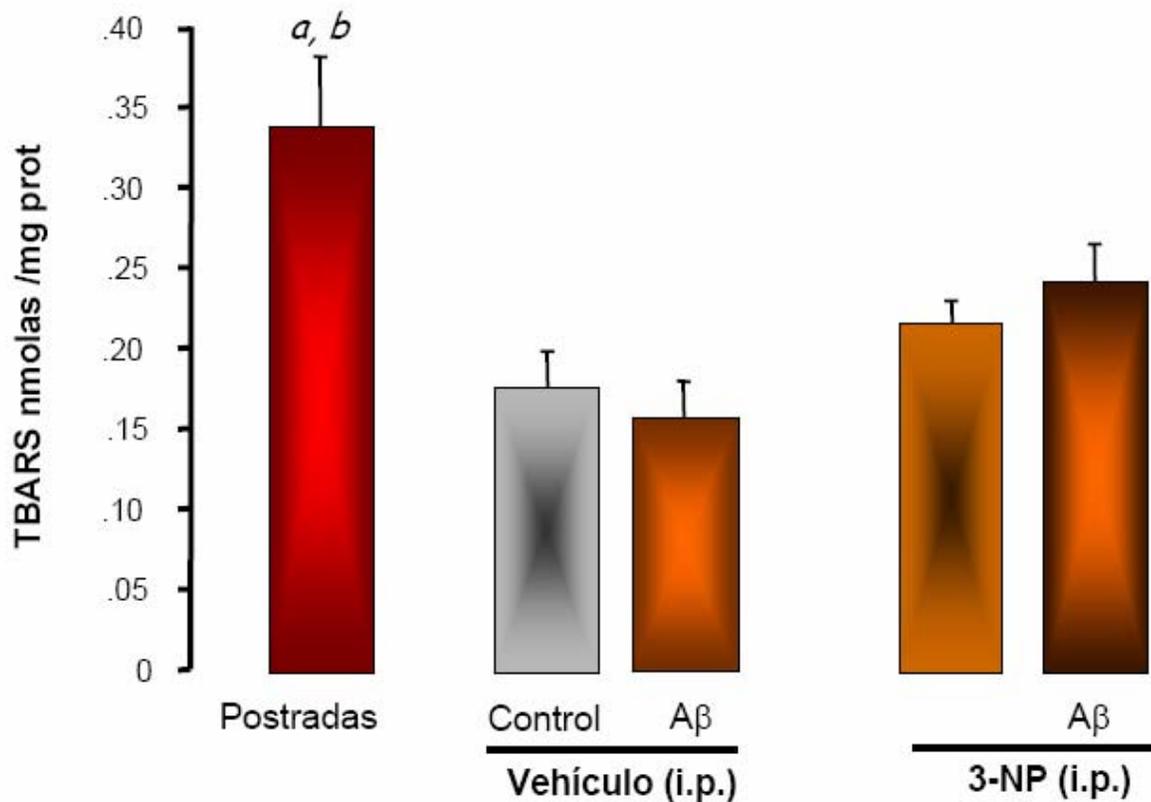


Figura 6. Ensayo de TBARS en hipocampo de ratas tratadas con 3-NP.

Efecto de la administración intrahipocampal del péptido β A25-35 en animales con deficiencia mitocondrial (tratados con 3-NP). La lipoperoxidación se determinó 24 horas después de la microinyección del péptido β A. Los niveles de TBARS no se modificaron en presencia del péptido β A, solo induce un ligero incremento de los niveles de TBARS en los animales tratados con 3-NP (estadísticamente no significativo). Únicamente en los animales tratados con 3-NP que presentaron alteraciones conductuales (ratas postradas), los niveles de TBARS incrementaron en 78% con respecto al control y en 58% con respecto a los animales sin manifestación conductual.

a = $p \leq 0.001$ con referencia al control, b = $p \leq 0.01$ con referencia a 3-NP sistémico (sin conducta).

Los resultados muestran el promedio de 5-9 datos \pm error estándar, valores expresados en nmolas TBARS/mg de proteína.

DISCUSION

El péptido 25-35 por sí mismo, no genera daño neuronal en el hipocampo de la rata, como lo demostraron Arias y col (2002), sin embargo la inhibición metabólica genera un estado vulnerable del tejido cerebral a la toxicidad de diversos agentes, incluyendo el péptido β A25-35 ó el glutamato como lo reportado en un trabajo previo (Arias y col., 2002; Massieu y col., 2000), la administración de piruvato para abastecer el metabolismo mitocondrial en presencia de yodoacetato, puede posiblemente restablecer las condiciones energéticas y de prevenir el daño neuronal inducido por el péptido β A25-35.

El tratamiento con 3-NP, por sí mismo no generó un incremento en la lipoperoxidación, sugiriendo que la inhibición del metabolismo energético mitocondrial en este modelo, no es suficiente para inducir una condición de estrés oxidativo. El incremento de lipoperoxidación fue observado únicamente en los animales que mostraron alteración conductual que de acuerdo a estudios previos (Massieu y col., 2003), muestran daño neuronal y presentan daño morfológico en el estriado y el hipocampo (Kim y col. 2000; Kim y Chang, 2002), sugiriendo una relación entre el estrés oxidativo y un severo desacoplamiento de la función mitocondrial. Sin embargo, el pequeño incremento en la lipoperoxidación que se observó en presencia del β A25-35, y la prevención del daño neuronal por el pretratamiento con vitamina E, sugieren la participación del estrés oxidativo mitocondrial en la cascada de eventos neurotóxicos del β A.

La alteración del metabolismo glucolítico en el hipocampo, aún cuando la enzima GAPDH está inhibida en un 50%, no modifica los niveles de lipoperoxidación. Sin embargo, cuando el yodoacetato es aplicado directamente en el estriado, se ha reportado incremento de radicales OH^\bullet (Matthews y col. 1997). Esto sugiere que solo la inhibición glucolítica aguda en el cerebro, empleando dosis altas de yodoacetato (mayores a 50 nmolas), induce estrés oxidativo. A diferencia de lo observado con el

3-NP, los animales tratados con el yodoacetato, presentaron un incremento en la lipoperoxidación en presencia del β A25-35, esta respuesta sugiere que el cerebro es altamente dependiente de la oxidación de la glucosa por la ruta glucolítica, para suministrar los productos a la cadena respiratoria y contener ante los efectos tóxicos del β -amiloide.

La inhibición sostenida del metabolismo glucolítico desajusta la homeostasis de calcio dependiente de ATP, alterando los sistemas de extrusión y almacenamiento de calcio intracelulares y favoreciendo la producción de especies reactivas de oxígeno, evidencias mostradas por Hernández-Fonseca y Massieu (2005), en cultivos neuronales de hipocampo. Recientemente se ha demostrado que la muerte neuronal inducida por la exposición a yodoacetato, está relacionada con la disminución en los niveles de ATP y el incremento en la concentración de calcio intracelular (Hernández-Fonseca y Massieu, 2005).

La diferencia entre los efectos del 3-NP y el yodoacetato posiblemente se deban a que en el tratamiento con 3-NP, el metabolismo mitocondrial está parcialmente inhibido ya que solo se afecta el complejo II, permitiendo que los otros complejos mitocondriales sigan funcionando. En estas condiciones hemos demostrado que la administración de piruvato y acetoacetato pueden reducir el daño producido por el glutamato y por el β A, sugiriendo que pueden incorporarse a la cadena respiratoria (Massieu y col., 2000; Arias y col., 2002). Por lo tanto, el incremento en la lipoperoxidación inducido por el β A25-35 en los animales tratados con yodoacetato puede estar relacionado con la desregulación de los gradientes iónicos y con la pérdida de la homeostasis de calcio. Estos eventos ocurren posiblemente porque las bombas Na^+/K^+ disminuyen o pierden su actividad por la falta de ATP; simultáneamente el retículo endoplásmico pierde su capacidad de captura y extrusión de calcio, afectando el gradiente e incrementando la concentración

intracelular de este catión. Además, estudios previos sugieren que el incremento de calcio intracelular participa en la cascada neurotóxica del β A (Mattson y col., 1994). Behl y col. (1999) han sugerido que la generación del estrés oxidativo y la neurotoxicidad del BA, incluyen la pérdida de la homeostasis de calcio, la viabilidad energética y la disfunción mitocondrial. Aunque los mecanismos responsables de la interacción entre éstos 3 factores no se han esclarecido totalmente. Se ha demostrado que el 3-NP induce un incremento en la concentración de calcio intracelular *in vitro* (Lee y col., 2002). Sin embargo, se ha sugerido que el amortiguamiento de calcio por las pozas intracelulares puede ser regulado principalmente por la vía glucolítica y no por la vía mitocondrial (Kahlert y Reiser, 2000).

La vitamina E es un eficiente neuroprotector de los efectos tóxicos de BA, ya que fue capaz de evitar tanto el daño oxidativo como la muerte neuronal en las ratas tratadas con los inhibidores metabólicos, apoyando la hipótesis del papel que juega el estrés oxidativo en la toxicidad del BA, durante un estado energético vulnerable. Estos resultados correlacionan con un estudio reciente en terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) donde la vitamina E presentó una prevención total de la lipoperoxidación generada por la exposición al β A en presencia de los inhibidores metabólicos (Montiel y col., 2006), apoyando la hipótesis de que las terminales nerviosas pueden ser el blanco del daño oxidativo en el Alzheimer (Castegna y col., 2002).

El incremento del estrés oxidativo asociado a la edad puede ser un preconditionamiento de la EA (Behl, 1999; Mecocci, 1994), de aquí que el uso de antioxidantes como terapia en el tratamiento de esta patología, así como para combatir los efectos del envejecimiento, constituyen una alternativa terapéutica importante. Diversos estudios han demostrado las propiedades antioxidantes de la vitamina E y debido a sus características químicas de ser una molécula liposoluble, y

se incorpora principalmente a las membranas celulares, previniendo la oxidación de los lípidos membranales (Floyd, 1999). Sin embargo, se le han encontrado otras funciones biológicas, que aún no son esclarecidas (Parks y Traber, 2000). Aunque diversas evidencias han demostrado la potencialidad de los antioxidantes, incluyendo la vitamina E, en la prevención de la neurotoxicidad y en la reducción de los niveles de lipoperoxidación en modelos *in vivo* en ratones transgénicos de la EA (Pratico, 2001), los estudios realizados en humanos han sido limitados (Laurin, 2004; Doraiswamy y Xiong, 2006). Sin embargo, el tratamiento con la vitamina E puede proporcionar una disminución de la incidencia y los riesgos a padecer esta enfermedad (Sano, 1997; Zandi, 2004).

Otros resultados han mostrado que el tratamiento con α -tocoferol mejora el déficit de memoria y aprendizaje inducidos por el péptido BA1-42 en modelos animales (Yamada y col., 1999).

El tratamiento con vitamina E en el inicio de los síntomas clínicos (alteraciones cognitivas moderadas) del Alzheimer puede prevenir su progresión (Sano, 1997) y proporciona mayor eficiencia en la prevención del daño neuronal como se demostró en ratones transgénicos (Sung, 2004). Estos datos son reforzados por los resultados del presente trabajo, donde el tratamiento durante 7 días con vitamina E previo a la exposición del péptido BA, en condiciones de deficiencia energética, previno la cascada neurodegenerativa iniciada o propagada por el estrés oxidativo.

El presente estudio contribuye a proporcionar más elementos sobre los beneficios de la vitamina E para proteger las neuronas del hipocampo, contra la muerte y reducir la lipoperoxidación generada por el péptido BA, preservar la función mitocondrial y mantener la integridad de los lípidos membranales. Estos resultados correlacionan con las evidencias del grupo de Wang y Quinn (1999), donde demostraron que la vitamina E puede preservar la estabilidad de la membrana celular.

Por otra parte, el PBN ha demostrado una eficiencia neuroprotectora del daño neuronal, previniendo la extensión del mismo en modelos de isquemia (Folbergrova, 1995; Phillis 1990; Zhao, 1994), o de la excitotoxicidad inducida por toxinas mitocondriales (Schulz, 1995). Sin embargo, en el presente modelo se observó solo una protección parcial del daño neuronal, y no se encontró efecto alguno sobre la lipoperoxidación. Estos resultados pueden deberse a que la dosis empleada fue insuficiente, y posiblemente se requieran dosis de refuerzo del PBN para mantener su capacidad de atrapador de radicales libres. Probablemente un tratamiento más prolongado o dosis mayores de este atrapador permitan obtener mejores resultados en este modelo.

CONCLUSION

La toxicidad del péptido B-amiloide *in vivo*, se relaciona con el incremento del daño oxidativo, el cual se facilita durante un estado de deficiencia energética, estos eventos tóxicos pueden prevenirse con vitamina E, sugiriendo la potencialidad terapéutica de este antioxidante en la prevención o el desarrollo del Alzheimer.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdul H, Sultana R, Keller JN, Clair DK, Markesbery WR, Butterfield DA (2006) Mutations in amyloid precursor protein and presenilin-1 genes increase the basal oxidative stress in murine neuronal cells and lead to increased sensitivity to oxidative stress mediated by amyloid β -peptide (1-42), H₂O₂ and kainic acid: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 96:1322-35
2. Arias, C., Montiel, T., Quiroz-Baez, R., Massieu, L., (2002) β -Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.*, 176, 163-174
3. Bazan NG, Braquet P & ginberg MD (1992) Neurochemical correlates of cerebral Ischemia advances in Neurochemistry). Ed. B.W. y A. AGRANOFF, MH. Plenum Press. New York.
4. Beal FM. (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.*, 38:357-366.
5. Behl C. (1999) Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog Neurobiol.*, 57(3):301-23. Review.
6. Behl C., Moosmann B. (2002) Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med.*, 33(2):182-91
7. Bradford, MM., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
8. Brouillet E., Condé F., Beal MF., Hantraye P. (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.*, 59:427-468.

9. Brouillet, E., Guyot, M.C., Mittoux, V., Altairae, S., Condé, F., Palfi, S., Hantraye, P. (1998) Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J. Neurochem.* 70:794-805.
10. Browne SE., Bowling C., MacGarvey U., Baik MJ., Berger SC, Muqit MMK, et al (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol.*, 41:646-653.
11. Burke JR., Enghild JJ., Martin ME., Jou Y-S, Myers RM., Roses AD, et al. (1996). Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GADPH. *Nat. Med.*, 2:347-350.
12. Butterfield D.A. (2002) Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res.*, 36:1307-13.
13. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med*, 7:548-54.
14. Butterfield, D.A., Bush, A.I., (2004) Alzheimer's amyloid β -peptide(1-42) involvement of methionine residue 35 in the oxidative stress and neurotoxicity of this peptide. *Neurobiol. Aging* 25:563-568.
15. Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR, Butterfield DA. (2002) Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med.*, 33(4):562-71.
16. Clarke D and Sokoloff L. (1999) Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. Siegel G, Agranoff BW, Alberts RW, Fisher AK, Uhler MD, Lippincott-Raven.

17. Delaney, SM, Geiger, JD (1996) Brain regional levels of adenosine and adenosine nucleotides in rats killed by high-energy focused microwave irradiation. *J. Neurosci. Methods* 64, 151-156.
18. Doraiswamy PM, Xiong GL. (2006) Pharmacological strategies for the prevention of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother*, 7(1):1-10.
19. Drake J, Link CD, Butterfield DA. (2003) Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid β -peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiol Aging*, 24:415-20.
20. Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schussel K, Muller WE. (2003) Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.*, 66(8):1627-34. Review.
21. Emre M, Geula C, Ransil BJ, Mesulam MM., (1992). The acute neurotoxicity and effects upon cholinergic axons of intracerebrally injected beta-amyloid in the rat brain. *Neurobiol Aging*, 13(5):553-9
22. Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, et al. (2003) The antioxidants α -lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J Neurochem.*; 84(5):1173-83.
23. Floyd RA.(1999) Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 222(3):236-45. Review.
24. Folbergrova J, Zhao Q, Katsura K, Siesjo BK. (1995) N-tert-butyl-alpha-phenylnitron improves recovery of brain energy state in rats following transient focal ischemia. *Proc Natl Acad Sci.*, 92(11):5057-61.
25. Foster NL, Chase TN, Mansi L, Brooks R, Fedio P, Patronas NJ, Di Chiro G. (1984) Cortical abnormalities in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 16(6):649-54.

26. Giovannelli L, Casamenti F, Scali C, Bartolini L, Pepeu G. (1995) Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis. *Neuroscience*, 66:781-92.
27. Gjumrakch A., Smith MA., Seyidova D., Neal ML, Lamb BT., Nunomura A., Gasimov E., Vinters HV., Perry G., LaManna J., Friedland P. (2002), The Role of Oxidative Stress in the Pathophysiology of Cerebrovascular Lesions in Alzheimer's Disease. *Brain pathology*, 12(1):21-35
28. Gluck, MR., Jayatilleke, E., Shaw, S., Rowan AJ., Haroustunian V. (2000) CNS oxidative stress with the kainic acid model of experimental epilepsy. *Epilepsy Res.*, 39:63-71.
29. Good PF., Werner P., Hsu A., Olanow CW., Perl DP. (1996) Evidence for neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, 149:21-28.
30. Haxby JV, Grady CL, Duara R, Schlageter N, Berg G, Rapoport SI. (1986) Neocortical metabolic abnormalities precede nonmemory cognitive defects in early Alzheimer's-type dementia. *Arch Neurol.*, 43(9):882-5.
31. Haxby JV, Grady CL, Koss E, Horwitz B, Schapiro M, Friedland RP, Rapoport SI. (1988) Heterogeneous anterior-posterior metabolic patterns in dementia of the Alzheimer type. *Neurology*, 38(12):1853-63.
32. Hernández-Fonseca, K., Massieu, L., 2005. Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 82:196-205.
33. Hock C, Villringer K, Muller-Spahn F, Wenzel R, Heekeren H, Schuh-Hofer S, Hofmann M, Minoshima S, Schwaiger M, Dirnagl U, Villringer A. (1997) Decrease in parietal cerebral hemoglobin oxygenation during performance of a verbal fluency task in patients with Alzheimer's disease monitored by means of near-infrared spectroscopy (NIRS) correlation with simultaneous rCBF-PET measurements. *Brain Res.*, 755(2):293-303.

34. Howlett DR, Jennings KH, Lee DC, Clark M, Brown F, Wetzel R, Wood SJ, Camilleri P, Roberts GW (1995) Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-Amyloid peptide. *Neurodegeneration*, 4:23-32.
35. Hoyer S. (1994) Neurodegeneration, Alzheimer's disease, and beta-amyloid toxicity. *Life Sci.*, 55:1977-1983.
36. Hoyer S., (1995) Age-related changes in cerebral oxidative metabolism. Implications for drug therapy. *Drugs Aging*, 6(3):210-8. Review.
37. Huang X, Cuajungco MP, Atwood CS, Hartshorn MA, Tyndall JD, Hanson GR, Stokes KC, Leopold M, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Saunders AJ, Lim J, Moir RD, Glabe C, Bowden EF, Masters CL, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI. (1999) Cu(II) potentiation of Alzheimer's amyloid neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J Biol Chem.*, 274(52):37111-6.
38. Ikemoto, A., Bole, D.G., Ueda, T., (2003) Glycolysis and glutamate accumulation into synaptic vesicles. Role of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *J. Biol. Chem.*, 278:5929-5940.
39. Ikezu T, Luo X, Weber GA, Zhao J, McCabe L, Buescher JL, et al. (2003) Amyloid precursor protein-processing products affect mononuclear phagocyte activation: pathways for sAPP- and Aβ-mediated neurotoxicity. *J Neurochem.*, 85:925-34.
40. Kahlert, S., Reiser, G., (2000) Requirement of glycolytic and mitochondrial energy supply for loading of Ca²⁺ stores and InsP₃-mediated Ca²⁺ signaling in rat hippocampus astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 61:409-420.
41. Kanski J, Aksenova M, Schöoneich C, Butterfield DA (2002) Substitution of isoleucine-31 by helical-breaking proline abolishes oxidative stress and neurotoxic properties of Alzheimer's amyloid β-peptide (1-42). *Free Radic Biol Med*, 32:1205-11

42. Kim G., Copin C., Kawase M., Chen F., Sato S., Gobbel T., and Chan P.(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.
43. Kim G.W., Chan PH, (2002) Involvement of superoxide in excitotoxicity in striatal vulnerability in mice after treatment with the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 22:798-809.
44. Kowall NW, McKee AC, Yankner BA, Beal MF. (1992) In vivo neurotoxicity of beta-amyloid (beta 1-40) and the beta(25-35) fragment. *Neurobiol Aging*, 13(5):537-42.
45. Kumar VB, Farr SA, Flood JF, Kamlesh V, Franco M, Banks WA, et al. (2000) Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides*, 21:1769-75.
46. Laurin D, Masaki KH, Foley DJ, White LR, Launer LJ. (2004) Midlife dietary intake of antioxidants and risk of late-life incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Am J Epidemiol.*, 159(10):959-67.
47. Lee, W., Yin, H., Shen, Z., 2002. The mechanisms of neuronal death produced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: the roles of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and mitochondrial calcium overload. *Neuroscience* 112:707-716.
48. Lenaz G. (1998) Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochem. Biophys. Acta*, 1366:53-67.
49. Lüth HJ, Ogunlade V, Kuhla B, Kientsch-Engel R, Stahl P, Webster J, Arendt T, Munch G. (2005) Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cereb Cortex*, 15(2):211-20.

50. Marcus DL, de Leon MJ, Goldman J, Logan J, Christman DR, Wolf AP, Fowler JS, Hunter K, Tsai J, Pearson J, et al. (1989) Altered glucose metabolism in microvessels from patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 26(1):91-4.
51. Massieu L., Gómez-Román N., Montiel T (2000). In vivo potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Experimental Neurology* 165, 257-267.
52. Massieu L., Montiel T., del Río P., Hernández K., Haces Ma. Luisa, García O., Camacho A., Mejía J. (2003) Role of energy metabolism in neuronal death associated with cerebral ischemia and neurodegenerative diseases, and its prevention by energy substrates. *Research Signpost, Recent Res. Dev. Neurochem.* 6:1-24.
53. 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* 106:669-677
54. Matthews R.T, Ferrante R.J., Bruce J.G., Browne S.E., Goetz K., Berger S., Chen I.Y-C, Beal M.F., (1997) Iodoacetate produces striatal excitotoxic lesions. *J. Neurochem.*, 69:285-289.
55. Mattson MP, Chan SL, Duan W, (2002) Modification of Brain Aging and Neurodegenerative disorders by genes, diet and behavior. *Physiol. Rev.* 82:637-672.
56. Mattson, MP, 1994. Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contributions of beta-amyloid precursor protein mismetabolism, free radicals, and metabolic compromise. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 747, 50-76. Maurice, T., Lockhart, B.P., Su, T.-P., Privat, A., 1996. Reversion of $\beta(25-35)$ -amyloid peptide-induced amnesia by NMDA-receptor-associated glycine site antagonists. *Brain Res.* 731:253-259.

57. Mazzola JL, Sirover MA. (2003) Subcellular alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in Alzheimer's disease fibroblasts. *J Neurosci Res.*, 71(2):279-85.
58. Mazzola JL, Sirover MA. (2004) Subcellular analysis of aberrant protein structure in age-related neurodegenerative disorders. *J Neurosci Methods.*, 137(2):241-6.
59. McLellan ME, Kajdasz ST, Hyman BT, Bacskai BJ (2003) In vivo imaging of reactive oxygen species specifically associated with thioflavine S-positive amyloid plaques by multiphoton microscopy. *J Neurosci.*, 23(6):2212-7.
60. Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. (1994) Oxidative damage to mitochondrial ADN is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 36(5):747-51.
61. Mielke R, Herholz K, Grond M, Kessler J, Heiss WD. (1994) Clinical deterioration in probable Alzheimer's disease correlates with progressive metabolic impairment of association areas. *Dementia*, 5(1):36-41.
62. Monji A, Utsumi H, Ueda T, Imoto T, Yoshida I, Hashioka S, Tashiro K, Tashiro N. (2001) The relationship between the aggregational state of the amyloid-beta peptides and free radical generation by the peptides.. *J Neurochem.*, 77(6):1425-32.
63. Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L, Arias C. (2006) Role of oxidative stress on beta-amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: protection by antioxidants. *Exp Neurol.* 200(2):496-508.
64. Morley JE, Farr SA, Flood JE. (2002) Antibody to amyloid beta protein alleviates impaired acquisition, retention, and memory processing in SAMP8 mice. *Neurobiol Learn Membr.* 78:125-38.
65. Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science*, 254(5028):97-9.

66. Mutisya EM., Bowling AC, Beal MF (1994). Cortical cytochrome oxidase activity in reduced in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 63:2179-2184.
67. Parker WD Jr., Boyson SJ., Parks JK. (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 26:719-723.
68. Parker WD Jr., Parks J., Filley CM., Kleinschmidt-De Masters BK. (1994) Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology*, 44:1090-1096.
69. Parks E, Traber MG. (2000) Mechanisms of vitamin E regulation: research over the past decade and focus on the future. *Antioxid Redox Signal*, 2(3):405-12. Review.
70. Paxinos G. & Watson C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney.
71. Peppard RF, Martin WR, Carr GD, Grochowski E, Schulzer M, Guttman M, McGeer PL, Phillips AG, Tsui JK, Calne DB. (1992) Cerebral glucose metabolism in Parkinson's disease with and without dementia. *Arch Neurol.*, 49(12):1262-8.
72. Phillis JW, Clough-Helfman C. (1990) Protection from cerebral ischemic injury in gerbils with the spin trap agent N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone (PBN). *Neurosci Lett.*, 116(3):315-9.
73. Poon HF, Farr SA, Banks WA, Pierce WM, Klein JB, Morley JE, Butterfield DA. (2005) Proteomic identification of less oxidized brain proteins in aged senescence-accelerated mice following administration of antisense oligonucleotide directed at the A β region of amyloid precursor protein. *Brain Res Mol Brain Res*. 138(1):8-16.
74. Poon HF, Joshi G, Sultana R, Farr SA, Banks WA, Morley JE, et al. (2004) Antisense directed at the A β region of APP decreases brain oxidative markers in aged senescence accelerated mice. *Brain Res* 1018:86-96.

75. Pratico D, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ, Rokach J, FitzGerald GA. (2000) Increased 8,12-iso-iPF₂α-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Ann Neurol.*, 48(5):809-12.
76. Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. (2001) Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci.*, 21(12):4183-7.
77. Ratan RR., Murphy TH., Baraban JM (1994) Oxidative stress induces apoptosis in cortical neurons. *J. Neurochem.* 62:376-379.
78. Sánchez-Ramos JR., Overvik E., Ames BN (1994) A marker of oxyradical-mediated DNA damage (8-hydroxy-2'deoxyguanosine) is increased in nigrostriatum of Parkinson's disease brain. *Neurodegeneration*, 3:197-204.
79. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ. (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med.*, 336(17):1216-22.
80. Sapolsky R, Stein-Behrens B, Adams K, Yeh M. (1992) Failure of beta-amyloid protein fragment 25-35 to cause hippocampal damage in the rat. *Neurobiol Aging*, 13:577-579.
81. Schulz JB, Henshaw DR, Siwek D, Jenkins BG, Ferrante RJ, Cipolloni PB, Kowall NW, Rosen BR, Beal MF. (1995) Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem.*, 64(5):2239-47.
82. Schulz JB, Matthews RT, Klockgether T, Dichgans J, Beal MF.(1997) The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Cell Biochem.*, 174:193-7. Review.

83. Schulze H, Schuler A, Stuber D, Dobeli H, Langen H, Huber G. (1993) Rat brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with the recombinant cytoplasmic domain of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem.*, 60(5):1915-22.
84. Selkoe Dennis J. (1994) *Biochemistry of Alzheimer's disease*, capítulo 45, (Basic neurochemistry, G.J. Siegel.) ed. Raven press, New York, 919-933.
85. Selkoe DJ. (1994) Amyloid beta-protein precursor: new clues to the genesis of Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol.*, 4(5):708-16. Review.
86. Shults CW, Haas RH., Passov D., Beal, MF. (1997) Coenzyme Q₁₀ is reduced in mitochondria from parkinsonian patients. *Ann. Neurol.*, 42:261-264.
87. Sisodia SS, Price DL. (1992) Amyloidogenesis in Alzheimer's disease: basic biology and animal models. *Curr Opin Neurobiol.*, 2(5):648-52. Review.
88. Smith MA., Perry G., Richey PL., Sayre LM., Anderson VE., Beal MF, et al. (1996) Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*, 382:120-121.
89. Smith, C.U.M. (1996). *Elements of Molecular Neurobiology. Some pathologies*, Cap.20. John Wiley & Sons, second edition, 460-470.
90. Stefanis L., Burke R.E., Greene L.A. (1997) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr. Op. Neurol.*, 10:299-305.
91. Sung S, Yao Y, Uryu K, Yang H, Lee VM, Trojanowski JQ, Pratico D.(2004) Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces A β levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *FASEB J.*, 18(2):323-5.
92. Tsuchiya K, Tajima H, Yamada M, Takahashi H, Kuwae T, Sunaga K, Katsube N, Ishitani R. (2004) Disclosure of a pro-apoptotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: antimentia drugs depress its activation in apoptosis. *Life Sci.*, 74(26):3245-58.

93. Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA. (2000) Review: Alzheimer's amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol*, 130:184-208.
94. Wang X, Quinn PJ. (1999) Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res*, 38(4):309-36. Review.
95. Yamada K, Tanaka T, Han D, Senzaki K, Kameyama T, Nabeshima T. (1999) Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci.*, 11(1):83-90.
96. Yatin SM, Varadarajan S, Link CD, Butterfield DA (1999) In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid β -peptide (1-42). *Neurobiol Aging*, 20:325-30.
97. Zandi PP, Anthony JC, Khachaturian AS, Stone SV, Gustafson D, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC; Cache County Study Group. (2004) Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch Neurol.*, 61(1):82-8.
98. Zhao Q, Pahlmark K, Smith ML, Siesjo BK. (1994) Delayed treatment with the spin trap alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Physiol Scand.*, 152(3):349-50.