



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DE LA LONGITUD DEL TELÓMERO EN LA PROGRESIÓN DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN UN MODELO MURINO 3xTg-AD**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARTÍNEZ GONZÁLEZ KATIA LETICIA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PAOLA GARCÍA DE LA TORRE
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ANÁLISIS DE LA LONGITUD DEL TELÓMERO EN LA
PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN UN
MODELO MURINO 3xTg-AD**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARTÍNEZ GONZÁLEZ KATIA LETICIA

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PAOLA GARCÍA DE LA TORRE
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2016



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de noviembre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MARTÍNEZ GONZÁLEZ KATIA LETICIA** con número de cuenta **304157105**, con la tesis titulada **"ANÁLISIS DE LA LONGITUD DEL TELÓMERO EN LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN UN MODELO MURINO 3xTg-AD"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. PAOLA GARCÍA DE LA TORRE**:

Presidente: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
Vocal: DR. ROBERTO CORIA ORTEGA
Secretario: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA DE LEÓN MÉNDEZ
Suplente: DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de enero de 2016

Adelcis Ariz

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM** por brindarme el apoyo para continuar con mi formación académica y otorgarme las herramientas reforzar mis conocimientos y experiencias.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por otorgarme la beca de posgrado para apoyar mi permanencia y conclusión de la maestría (número de becario **536810**). Así como sustentar la realización de este trabajo mediante los recursos otorgados al proyecto de investigación básica con el número de registro 179594.

Al **Programa para Formación de Investigadores de la División de Desarrollo de la Investigación** de la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por el apoyo recibido para la realización de este trabajo con número de registro 2012-785-049.

A los miembros de mi comité tutor:

- Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por sus propuestas y observaciones para mejorar mi trabajo, así como las críticas al mismo que ayudaron a su conclusión.
- Dr. Christian Humberto Guerra Araiza, por brindarme su apoyo en el seguimiento de este trabajo y por sus contribuciones para la conclusión del mismo.

Agradecimientos a título personal:

A la Dra. Paola García de la Torre por dirigir este proyecto y transmitirme todos sus conocimientos para mi óptimo desarrollo durante la Maestría, además de la ayuda en la búsqueda de herramientas para mejorar este proyecto. Gracias Paola por tolerarme y brindarme tu apoyo y comprensión en todo momento y en cada una de las circunstancias que experimenté durante estos años, gracias por brindarme la confianza para ser parte de tu equipo de trabajo.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni por sus consejos, cuestionamientos y sugerencias para mejorar y finalizar este trabajo.

Al Dr. Christian Guerra por sus comentarios y aportaciones para el enriquecimiento de este trabajo.

A la Dra. Selva Rivas a la que tuve el privilegio de tener como profesora de asignatura durante la Maestría y de la cual obtuve además de conocimientos académicos una filosofía de vida distinta por lo cual la admiro y la respeto.

Al Dr. Roberto Coria por sus apreciables comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

A la Dra. Ma. Del Carmen García de León que fue mi maestra durante la maestría, por sus enseñanzas académicas y valiosas aportaciones a este trabajo escrito.

A Azul Islas por su ayuda en la manipulación y el mantenimiento de la colonia de ratones para mis experimentos y por todos los momentos divertidos que pasamos juntas.

A mis compañeros de laboratorio, Vinni, Mónica y al Químico David por sus consejos y apoyo en la realización de este trabajo, además de los amenos momentos que me hicieron pasar durante mi estancia en el laboratorio.

DEDICATORIAS

A mi madre por ser un ejemplo de fortaleza e inteligencia, porque siempre esta cerca cuando la necesito y evita que cree una tragedia de cada evento desafortunado que vivo, por sus consejos, amor, paciencia y por ser mi maestra de vida, te amo mamá.

A mi padre por todo el apoyo que me ha brindado para llegar hasta donde estoy, por ser un ejemplo de trabajo, responsabilidad y perseverancia.

A mi hermano Manuel por todo el apoyo, consejos, motivación y todos los momentos divertidos que compartimos, porque eres un ejemplo a seguir para mi, me transmites paz y seguridad cuando estamos juntos.

A mi hermano Daniel, mi compañero de aventuras, por las discusiones, la peleas y todos los buenos momentos, porque todo eso nos hace crecer y aprender juntos y sin ti mi vida sería muy solitaria y aburrida.

A Adrián Alcalá por tu infinita paciencia y amor, gracias por ser mi compañero de viaje durante estos años y ayudar a convertirme en una mejor versión de mi misma.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
1. Enfermedad de Alzheimer	3
1.1 Definición.....	3
1.2 Antecedentes históricos	5
1.3 Cuadro clínico	6
1.4 Patología de la enfermedad	6
1.4.1 Placas neuríticas	7
1.4.2 Ovillos neurofibrilares	9
2 Modelo murino de la enfermedad de Alzheimer 3xTgAD	10
3 Estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer	11
4 Telómero	15
4.1 Medición del telómero	18
4.2 Métodos de cuantificación en qPCR	20
4.2.1 Curvas de calibración	20
4.2.2.1 Cuantificación absoluta de la expresión de un gen	20
5. Acortamiento telomérico en envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas	20
6. Planteamiento del problema	21
7. Hipótesis	22
8. Objetivo general	22
8.1 Objetivos particulares	22
9. Método	22
9.1 Animales	22
9.2 Determinación del tamaño del telómero	22
9.3 Método de cuantificación absoluta con curva estándar	25

9.4 Reconocimiento de objetos en contexto	26
9.5 Genotipificación	28
9.6 Evaluación del estrés oxidativo en Plasma, Hipocampo y Estriado de ratones transgénicos 3xTg-AD y controles	29
10. Resultados	32
10.1 Reconocimiento de objetos en contexto	32
10.2 Determinación del tamaño del telómero.....	33
10.3 Evaluación del estrés oxidativo en Plasma, Hipocampo y Estriado.....	44
10.4 Genotipificación.....	52
11. Discusión	54
12. Conclusiones.....	59
13. Perspectivas	59
14. Literatura citada	60

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad con un impacto mundial debido al incremento en su incidencia; se ha convertido en un problema creciente en los sectores médico, psiquiátrico, neurológico, epidemiológico, social y económico. Es por eso que se han realizado varias investigaciones con el fin de encontrar marcadores biológicos para el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad. Con el fin de determinar si existe alguna relación entre la longitud del telómero y la progresión de esta enfermedad, realizamos un estudio longitudinal para evaluar estos cambios durante la progresión de la EA en un modelo murino 3xTgAD para la enfermedad de Alzheimer mediante el método de qPCR. Se midió la longitud telomérica, en células de sangre periférica total y tejido (hipocampo y estriado) en ratones de 5, 9 y 13 meses de edad. Además evaluamos el estrés oxidativo para determinar si esto contribuía a los cambios en la longitud telomérica. Encontramos una disminución de la longitud telomérica en células de sangre periférica pero no en el tejido de ratones 3xTgAD comparado con los controles. El acortamiento del telómero en células de sangre periférica coincide con el incremento del estrés oxidativo en sangre, estas diferencias parecen estar relacionadas con la progresión de la enfermedad en este modelo murino 3xTgAD, por lo cual podemos sugerir que existe acortamiento de los telómeros de células sanguíneas durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo podría probarse si esto sucede en otros modelos de la EA para establecerlo como un marcador biológico de la progresión de esta enfermedad. La presencia de alteraciones estructurales o funcionales en células de sangre periférica de este modelo murino sugieren que la EA afecta de manera sistémica al individuo. Este acortamiento telomérico podría estar relacionado con la patogénesis de la EA a través del estrés oxidativo y la inflamación.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is disease of global importance due to an increased incidence; it has become a problem for the medical, psychiatric, neurological, epidemiological, social and economic sectors. There has been continuous research in order to find biological markers for the diagnosis and progression of this disease. To investigate whether there is any relationship between telomere length and progression of this disease we performed a longitudinal study using qPCR in a mouse model for AD (3xTgAD). Telomere length was measured in mice's peripheral blood and tissue (hippocampus and striatum) at 5, 9 and 13 months of age. In addition, we measured the oxidative stress levels to determine if this had any contribution to telomere length changes. We found a decrease in telomere length in peripheral blood but not in tissue of 3xTgAD mice compared to controls. The telomere shortening in peripheral blood cells coincides with the increased oxidative stress in the blood , these differences appear to be related to progression of the disease in this murine model 3xTgAD , so we can suggest that there telomere shortening blood cell in the progression of Alzheimer's disease . However it could prove if this happens in other models to establish it as a biological marker for the progression of this disease. The presence of structural or functional changes in peripheral blood cells of this mouse model suggest that AD affects the individual systemically . This telomere shortening could be related to the pathogenesis of AD through oxidative stress and inflammation.

Introducción

1. Enfermedad de Alzheimer

1.1 Definición

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad multifactorial, definida por la neurodegeneración progresiva e irreversible del sistema nervioso central que eventualmente lleva al declive gradual de la función cognitiva; es la causa más común de demencia en la población de edad avanzada (Czech *et al.*, 2000; Oddo *et al.*, 2003). La EA se divide en esporádica o familiar, la familiar está asociada a herencia por una transmisión autosómica dominante y EA esporádica si no existen antecedentes familiares. De acuerdo a la edad de comienzo puede ser: presenil o de inicio precoz si ésta aparece antes de los 65 años de edad y senil o de inicio tardío si ésta aparece después de los 65 años de edad (Czech *et al.*, 2000; Oddo *et al.*, 2003).

Entre los factores de riesgo de la EA se encuentra la vulnerabilidad genética debida a polimorfismos entre determinados grupos de sujetos (Maccioni *et al.*, 2009). También existen antecedentes como traumatismos cráneo-encefálicos, una dieta rica en grasas, alteraciones en la homeostasis del colesterol, deficiencias de vitamina B12, cambios en la respuesta inmune (infecciones recurrentes) (Rojo *et al.*, 2006), un incremento del estrés oxidativo (sobrecarga de hierro redox en el cerebro), activación de las células gliales, anormalidades proteicas, alteraciones sinápticas y factores neurotóxicos (Lavados *et al.*, 2008).

La enfermedad de Alzheimer (EA) se ha convertido en un problema creciente en los sectores médico, psiquiátrico, neurológico, epidemiológico, social y económico, que atañe principalmente a países con una expectativa de vida y longevidad larga. Es la forma más común de demencia y probablemente contribuye a un 60-70% de los casos a nivel mundial.

En 2011, se calculó que, a nivel mundial, 35.6 millones de personas vivían con demencia. Se estima que la cifra se duplicará cada 20 años, 65.7 millones en 2030 y 115.4 millones en 2050. Gran parte de este crecimiento puede ser atribuido al incremento en el número de personas con demencia en países en vías de desarrollo como se muestra en la figura 1. En México, esta enfermedad afecta a 1 de cada 20 adultos mayores de 60 años, 1 de cada 3 mayores de 80 años y 1 de cada 2 mayores de 90 años (Secretaría de Salud Pública 2011).

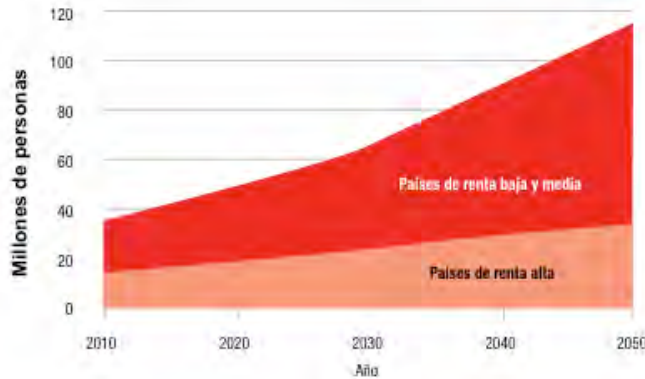


Fig. 1 Representación del crecimiento de personas con demencia en países de ingreso bajo medio y alto a través de los años. Modificado de Report Alzheimer's Disease International.

Además la EA tiene una importancia global debido a que no tiene cura y mantener los gastos médicos de un paciente que la padece implica una inversión de grandes cantidades de dinero por parte del sector salud. Una persona con demencia necesita cuidados que varían dependiendo de la intensidad de cada caso; dentro de estos cuidados necesarios se encuentran desde la supervisión y ayuda con las actividades diarias, hasta el cuidado permanente por la dependencia que el paciente con demencia desarrolla en los estadios finales de la enfermedad (Acosta *et al.*, 2012).

En 2010, el costo total estimado de la demencia fue de \$ 604 mil millones de dólares estadounidenses. En los países de ingresos altos la mayor parte del gasto está representado por la atención médica informal (45%) y la formal (40%), mientras que la contribución proporcional del costo médico directo (15%) es mucho menor. En los países de ingresos bajos y medios, el costo social directo es bajo y predomina el gasto en los cuidados informales (v.g. cuidados no remunerados provistos por familiares). En la figura 2 se puede observar el costo social mundial directo e indirecto (miles de millones de dólares) que generan los pacientes con enfermedad de Alzheimer y otras demencias, calculado en el 2005 (Ferri *et al.*, 2009).

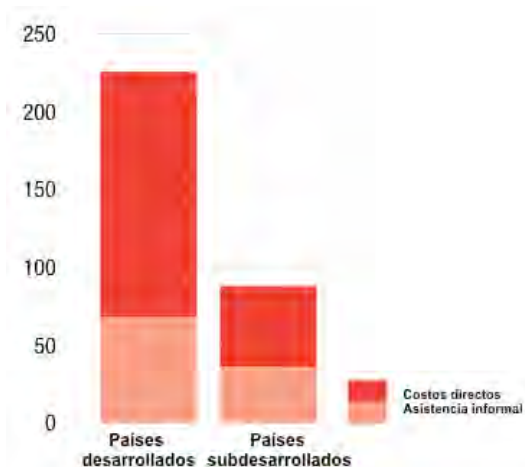


Fig. 2 Costo social mundial directo e indirecto en miles de millones de dólares que generan los pacientes con enfermedad de Alzheimer y otras demencias, calculado en el 2005. Modificado de Wimo et al. 2007.

En el 2010 el Instituto de Geriátría estipuló que en México, la EA, afecta a 1 de cada 20 personas mayores de 60 años, 1 de cada 3 personas mayores de 80 años y 1 de cada 2 mayores de 90 años. Por otra parte, se ha reportado que en México más de 350,000 personas padecen Alzheimer, se estima que un 10% de los adultos mayores de 65 años y el 47% de los adultos mayores de 85 años pueden llegar a padecerlo (Dirección de Información en Salud, 2015). Por otra parte en un estudio en la Ciudad de Durango se reportó que el 72% de 280 pacientes a los que se les aplicó el test de minimal, padecían la EA (Alvarado-Esquivel, *et al.*, 2004).

1. 2 Antecedentes históricos

Identificada por primera vez en 1886 por el neuropsiquiatra y neuropatólogo Bernhard von Gudden, en el rey de Bavaria Ludwig II. Bernhard escribió un reporte del caso mientras se hacía cargo del cuidado del rey, dicho reporte posteriormente influyó en el trabajo de Alois Alzheimer. El psiquiatra alemán Alois Alzheimer describió nuevos marcadores patológicos (ovillos neurofibrilares y placas neuríticas) de un concepto de demencia viejo y en 1907 publicó la descripción clínico patológica de la paciente Auguste D., una mujer de 50 años de edad. Alzheimer realizó el estudio histológico del cerebro de esta paciente y puntualizó las características neuropatológicas de esta enfermedad por primera vez, describiendo las placas neuríticas y ovillos neurofibrilares (Sisodia, S.S. y Tanzi R.E., 2010).

Existe controversia al respecto de las descripciones que algunos autores establecen se hicieron antes que las del doctor Alzheimer. Cinco meses antes que Alzheimer Fuller relacionó la demencia senil con la presencia de neurofibrillas. Desde 1887 ya existían reportes en los que se relacionaba a estas placas con demencia. También en 1907, Fisher realizó un estudio clínico-patológico de 12 pacientes en el que relacionó también las placas neuríticas con la demencia. Sin embargo, se atribuyó a Alois Alzheimer esta primera descripción y de ahí el nombre de la enfermedad.

En la actualidad, la mayoría de los casos con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer corresponden a pacientes de más de 70 años de edad, con lo cual se crea una dicotomía común en las enfermedades neurodegenerativas que engloba una forma familiar de la enfermedad (EAF) y una no familiar o esporádica (EAE) (Sisodia, S.S. y Tanzi R.E., 2010) esta última, asociada principalmente al envejecimiento (Zhu H., *et al.*, 2011).

1.3 Cuadro clínico

Esta enfermedad pasa por tres etapas clínicas:

- Inicial: la sintomatología es leve o ligera, el enfermo mantiene su autonomía y sólo necesita supervisión cuando se trata de tareas complejas.
- Intermedia: con síntomas de gravedad moderada, el enfermo depende de un cuidador para realizar tareas cotidianas.
- Terminal: estado avanzado cuando el enfermo es completamente dependiente.

Los síntomas más comunes de la enfermedad son alteraciones del estado de ánimo y de la conducta, pérdida de la memoria, dificultades de orientación, problemas del lenguaje y alteraciones cognitivas, pérdida de la memoria y cambios en el comportamiento (arrebatos de violencia). Además en las fases finales se deteriora la musculatura y la movilidad (Hawkins DB y Graff-Radford NR *et al.* 2007).

Por último, las alteraciones neuropsicológicas reciben el nombre de Triple A o Triada afasia-apraxia-agnosia y son:

- Apraxia: deterioro de la memoria reciente, remota, inmediata, verbal, visual, episódica, y semántica.
- Afasia: deterioro de las funciones de comprensión denominación fluencia y lecto-escritura.
- Agnosia: alteración perceptiva y espacial

1.4 Patología de la enfermedad

Se han identificado tres genes autosómicos dominantes de la EAF; el precursor de la proteína β -amiloide (APP) en el brazo largo del cromosoma 21, el gen de la presenilina 1 (PSEN1) en el brazo largo del cromosoma 14 y el de la presenilina 2 (PSEN2) en el cromosoma 1 (Sisodia, S.S. y Tanzi R.E. 2010). Además, se han asociado mutaciones en el cromosoma 17 relacionados a la proteína TAU, mientras que los polimorfismos en los cromosomas 12 y 19 son asociados a un inicio tardío de la enfermedad.

La EA (familiar y esporádica) conduce a un déficit cognitivo, que se manifiesta mediante el deterioro de la memoria; en una fase inicial de la enfermedad se observa una disminución de la

memoria episódica. Los enfermos presentan un déficit en el reconocimiento de imágenes, palabras, objetos y nombres; así como una disminución de la activación de áreas del lóbulo temporal (Johnson *et al.*, 2006; Ries *et al.*, 2009; Grönholm *et al.*, 2010).

La principal característica celular es la desregulación sináptica que inicia en el hipocampo y lleva eventualmente a la pérdida de neuronas (Querfurth y La Ferla, 2010). La pérdida neuronal y cognitiva, se debe principalmente a cambios estructurales que implican la acumulación de placas neuríticas del péptido fibrilar β -amiloide y ovillos neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada (Selkoe, 2001). Las placas neuríticas se derivan del rompimiento proteolítico de la proteína precursora amiloide por la acción de las secretasas beta y gama y se encuentran principalmente en las cortezas del sistema límbico y cortezas asociadas. Mientras que los ovillos de fibras anormales ocupan gran parte del citoplasma perinuclear de las neuronas de regiones como el hipocampo, la amígdala o la corteza entorrinal (Selkoe, 2001).

La histopatología de esta enfermedad se ha establecido con la presencia de placas neuríticas (complejos proteínicos que contienen agregados de $A\beta$), marañas neuríticas de Tau hiperfosforilada, pérdida de neuronas, daño en conexiones sinápticas y gliosis reactiva. La gliosis reactiva involucra a la microglía con ataque a las placas seniles y la astrogliosis la cual rodea el complejo proteínico de placas como medida de protección. El patrón mediante el cual la microglía reactiva se distribuye en la enfermedad de Alzheimer es específico y sugiere un importante papel de la respuesta inflamatoria en el cerebro en esta etiología. (Giulian, 1999).

Además de estas lesiones neuronales características, también se han encontrado elevados algunos biomarcadores de inestabilidad genómica en pacientes con la EA incluyendo micronúcleos (marcadores de pérdida y rompimiento de cromosomas), aneuploidías del cromosoma 21, acortamiento de los telómeros en linfocitos y fibroblastos (Thomas P., *et al.*, 2008) y marcadores elevados de estrés oxidativo (Butterfield D.A. y Sultana R. 2011).

1.4.1 Placas neuríticas

Los monómeros de β -amiloide ($A\beta_{40}$) prevalecen sobre los fragmentos de β -amiloide₄₂ ($A\beta_{42}$) que son dañinos y propensos a agregarse. Los péptidos de $A\beta$ son producto de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP) como resultado de los cortes secuenciales realizados por la enzima de escisión 1 (BACE1) o β -secretasa, seguida de la γ -secretasa constituida por un complejo de proteínas con presenilina 1 como su núcleo catalítico. Un desbalance entre la producción, degradación y agregación de los péptidos causa la acumulación de $A\beta$ y este exceso podría considerarse como un factor para la iniciación de la EA.

La APP puede fragmentarse por acción de la α -secretasa, seguida de la acción de la γ -secretasa, generándose fragmentos solubles de APP, como el ectodominio largo de la APP sPPA- α que es liberado y tiene funciones neuroprotectoras, dejando detrás de sí un fragmento de 83 péptidos

(C83 carboxilo terminal) que es degradado por la γ -secretasa, liberando p3 y el dominio intracelular amiloide (AICD), al espacio extracelular. AICD es un fragmento corto (50 aminoácidos aproximadamente) que es liberado al citoplasma, en donde es marcado para ser dirigido al núcleo en donde sirve de señalizador para iniciar la transcripción. Los fragmentos resultantes se pueden reinternalizar para degradación lisosomal o endosomal. Esta vía se conoce como la vía no amiloidogénica.

Sin embargo, cuando en primer lugar actúa la β -secretasa (BACE1) seguido de la acción de la γ -secretasa, se liberan los fragmentos de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$, poniéndose en marcha la vía amiloidogénica. Cuando la primera en cortar es la β -secretasa, se libera un ectodominio corto sPPA- α , enseguida corta la γ -secretasa, generando un fragmento C99 (carboxilo terminal) retenido, que a su vez genera $A\beta$ y AICD. El corte de γ -secretasa ocurre dentro de la membrana celular en un proceso llamado proteólisis intramembranosa regulada (Querfurth y La Ferla, 2010) (Fig.3)

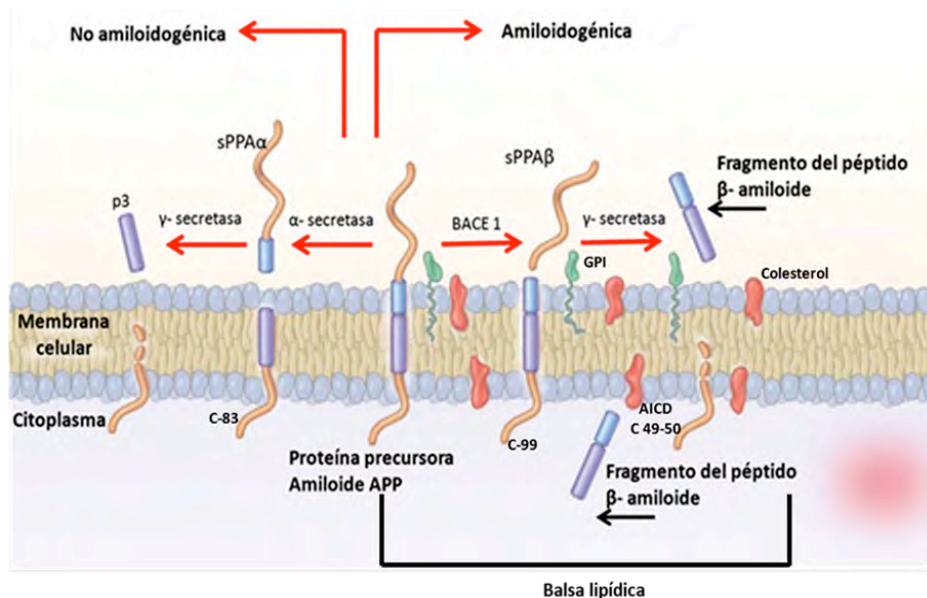


Fig. 3 Procesamiento de la proteína precursora amiloide. El corte por la α -secretasa al péptido β -amiloide ($A\beta$) inicia el proceso no amiloidogénico. Un ectodominio de la proteína precursora amiloide es liberado, dejando tras de sí un residuo de 83 aa que posee un fragmento carboxilo terminal. C83 es digerido por la γ -secretasa, liberando un dominio p3 extracelular y un dominio amiloide intracelular (AICD). El proceso amiloidogénico es iniciado por la β -secretasa que corta en el sitio beta de la proteína precursora amiloide este corte lo efectúa la enzima 1 (BACE-1), liberando un sAPP α corto. El fragmento C99 retenido es un sustrato de la γ -secretasa, generando $A\beta$ y AICD. El corte por γ -secretasa ocurre dentro de la membrana celular en un proceso llamado "proteólisis intramembranosa regulada" sAPP α y aAPP β son fragmentos APP secretados después del corte de α -secretasa y β -secretasa respectivamente. AICD es un fragmento corto (50 aa) que es liberado dentro del citoplasma después del corte progresivo de ϵ y γ por la γ -secretasa. Las balsas lipídicas son microambientes empaquetados dentro de la membrana ricos en esfingomielina, colesterol y proteínas glicosfosfatidilinositol ancladas (GPI). El β amiloide soluble es propenso a agregarse en estas balsas lipídicas. Modificado de Querfurth y La Ferla, 2010.

El fragmento $A\beta_{1-42}$ puede aumentar su tamaño dentro de fibrillas que a su vez se organizan en láminas de β -plegadas para formar las fibras insolubles de placas amiloides. El oligómero $A\beta$ soluble es el más neurotóxico y sus niveles se han correlacionado con la gravedad del déficit cognitivo de esta enfermedad.

1.4.2 Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares son inclusiones filamentosas en neuronas piramidales, que ocurren en la enfermedad de Alzheimer. El grado de severidad en esta enfermedad está determinado por el número de estos ovillos neurofibrilares. El componente principal de estas marañas es la proteína hiperfosforilada llamada tau.

La estabilidad y dinámica de los microtúbulos depende de las proteínas asociadas a microtúbulos (MPAs). Tau es una de estas proteínas, su participación radica principalmente en inducir la asociación y disociación de los microtúbulos. De manera normal, Tau se encuentra en los axones promoviendo el ensamblaje y estabilidad de los microtúbulos que son el principal componente del citoesqueleto, estructura celular encargada de mantener la morfología neuronal; éste último importante para la formación de axones y dendritas, los cuales están implicados en el transporte y la neurotransmisión (Fig.4) (Querfurth y La Ferla, 2010).

Tau está codificada en el cromosoma 17q21 y tiene aproximadamente 100kb. Esta proteína también está sujeta a diferentes modificaciones post-transcripcionales como la fosforilación, glicosilación, desamidación, ubiquitinación, oxidación, tirosina nitración, entrecruzamiento y glicación. Tau tiene dos dominios, uno de proyección y uno de unión a microtúbulos (MTBD). El dominio de proyección es el responsable de la interacción con otras proteínas plasmáticas y del citoesqueleto. El dominio MTBD contiene dos regiones, la región MTBD y una región ácida, en la porción terminal de la proteína.

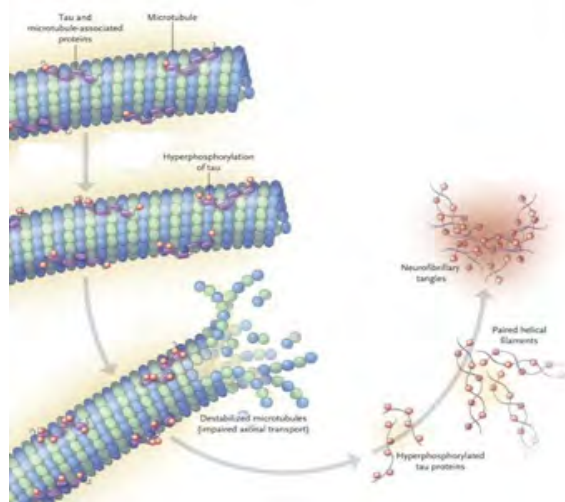


Fig. 4 Tau estructura y función. La fosforilación normal de Tau ocurre en los residuos de serina y treonina. Cuando estos residuos están seguidos de prolina estos aminoácidos son fosforilados por la cinasa sintasa glicógeno, una cinasa dependiente de ciclina (cdk5) y su subunidad activadora p25 o la proteína cinasa activadora de mitogeno (MAPK). Sitios específicos hiperfosforilados de filamentos helicoidales apareados de la proteína Tau en la enfermedad de Alzheimer tienden a estar flanqueados por el dominio de unión a microtúbulos (MTBD) de Tau. La unión de Tau promueve el ensamblaje de los microtúbulos y su estabilidad. Actividad excesiva de las cinasas, así como actividad reducida de las fosfatasas o ambas causa hiperfosforilación de Tau pérdida del ensamblaje y auto-agregación, además de desestabilizar los microtúbulos. Modificado de Querfurth y LaFerla, 2010.

Tau generalmente es una proteína altamente soluble, con una estructura secundaria pobre y contiene dos motivos que tienen una tendencia regional para formar estructuras laminares β , flanqueados, en el segundo por los aminoácidos 275-280 y en el tercero por los aminoácidos 306-311, repeticiones de MTBD. Cuando su estructura se altera debido a modificaciones tales como la hiperfosforilación como es el caso de la enfermedad de Alzheimer, Tau pierde la afinidad por los microtúbulos y se comienza a auto-ensamblar, lo que da por resultado la formación de filamentos helicoidales pareados (PHFs) (Meraz-Ríos, *et al.*, 2010). Estos agregados son citotóxicos y provocan déficit cognitivo. Se ha correlacionado un incremento en los niveles de Tau fosforilada en líquido cerebrospinal, con la reducción del puntaje de pruebas cognitivas. (Querfurth y La Ferla, 2010).

2. Modelo murino de la enfermedad de Alzheimer 3xTgAD

Utilizando la técnica de microinyección pronuclear, Oddo y colaboradores transfectaron dos transgenes humanos independientes APP_{Swe} y tau_{P301L} (4R/0N) bajo el promotor Thy 1.2 para asegurar que estas proteínas sólo se expresaran en el sistema nervioso central en un embrión obtenido de la cruce de ratones transfectados previamente con el gen PS1 (Fig.5). Además, determinaron cuáles eran las regiones del sistema nervioso central en las cuales se expresaban las proteínas humanas APP y Tau mediante la técnica de inmunoblot utilizando anticuerpos específicos; las regiones analizadas fueron hipocampo, corteza, cerebelo. Encontraron niveles elevados de las proteínas APP y Tau en el hipocampo y la corteza cerebral. La acumulación de A β en este modelo precede a la acumulación de la proteína Tau; la acumulación de A β se observó de manera intracelular en la corteza e hipocampo a la edad de 6 meses y extracelular a la edad de 12 meses, mientras que Tau se observó hasta los 12 meses primero en hipocampo y posteriormente en estructuras corticales. Estos ratones 3xTg-AD presentan déficit cognitivo desde los 6 meses de edad en retención a largo plazo en tareas espaciales dependientes de hipocampo como la tarea de Water Mize. Este déficit ha sido relacionado con la acumulación de depósitos de A β intracelulares en HC y extracelulares en corteza, aunque se han visto estos depósitos intracelulares en hipocampo desde los 4 meses de edad en estos ratones (Oddo *et al.* 2003; Billings *et al.* 2005).

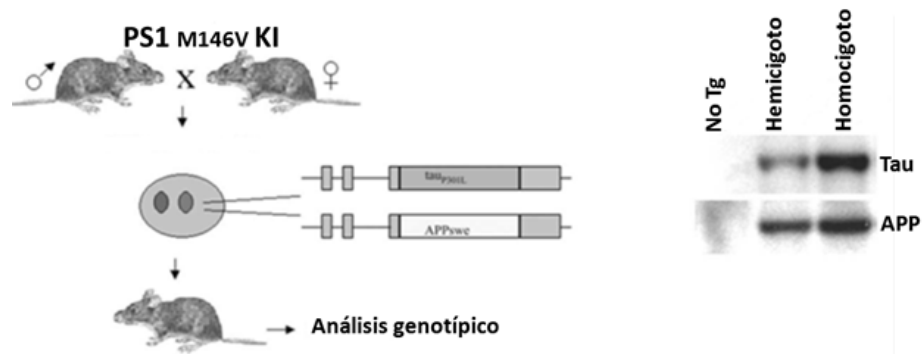


Fig. 5 Ratones previamente transfectados con el gen PS1 fueron cruzados y el embrión obtenido fue transfectado con los genes APPSwe y tauP301L y el promotor Thy 1.2, para asegurar que estas proteínas sólo se expresaran en SNC. Modificado de Oddo et al. 2003.

3. Estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer

Los radicales libres tienen un papel importante en la fisiología celular, están implicados en mecanismos tales como renovación de membranas, plasticidad sináptica, migración celular, síntesis y liberación de hormonas, incremento en la transcripción de citocinas durante los procesos inflamatorios, participación en señalización celular y en el mecanismo de segundos mensajeros. Los radicales libres son especies químicas que contienen un electrón no apareado y se comportan como moléculas altamente reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS) (Beckman y Ames, 1998).

Las ROS poseen un mecanismo dual, el cual depende del estado de óxido reducción (REDOX) del organismo. Cuando existe un balance entre la oxidación y la reducción, las ROS están involucradas en vías de señalización o también participan como mecanismo de defensa contra infecciones. Sin embargo, cuando este equilibrio se pierde, las ROS comienzan a generar daños al sistema, ya que al producirse aumento en la generación de las mismas el organismo no las puede manejar, entonces comienzan a acumularse y a dañar a la célula e incluso pueden inducirla a morir por apoptosis. Entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se considera desempeñan un papel perjudicial para la célula destacan fundamentalmente el radical súper óxido (O_2^-), el hidróxilo ($OH\cdot$) y el peróxido de hidrógeno (Nogushi y Niké, 1999).

Las ROS pueden causar daño por reaccionar con diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad (Nogushi y Niki, 1999). Los sustratos moleculares que constituyen los blancos más frecuentes de las ROS incluyen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, nucleótidos del ADN, proteínas y carbohidratos (Machlin y Bendich, 1987; Beckman y Ames, 1998).

Debido a que forman parte de la membrana celular, los lípidos son las moléculas más susceptibles al ataque de las ROS. Este proceso da inicio cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso y arranca un átomo de hidrógeno, formando un radical alquilico (Frei, 1994; Halliwell, 1994). Esta reacción se produce en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, debido a que, los radicales formados pueden estabilizarse por resonancia con el enlace doble. Este radical reacciona con el O₂ y forma un radical peróxido, R-COO. El radical peróxido puede reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes formando un grupo alquilo (R'-CH) y un peróxido lipídico (R-COOH), con lo que se propaga la reacción en cadena (Halliwell, 1994). Cuando se produce este proceso, los ácidos grasos, que son esenciales para dar a la membrana la fluidez que necesita, se pierden y la permeabilidad se altera, lo que puede conducir a la célula a un proceso de muerte celular (Halliwell y Whiteman, 2004).

Una importante fuente de producción de ROS es la mitocondria, esto se debe a que esta estructura es un importante productor de energía (ATP), además de mantener los niveles intracelulares de Ca²⁺, (Fig.6, Fig.7) lo que contribuye a la señalización celular, al control de la excitabilidad neuronal y a la función sináptica. La mitocondria produce ROS como resultado de la fosforilación oxidativa (Rivas *et al.*, 2011). Si estas ROS no son controladas pueden causar estrés oxidativo (EO) el cual se define por la pérdida del balance REDOX causado por un exceso de oxidantes o un déficit en el sistema antioxidante. El EO puede alterar los procesos de plasticidad cerebral, ya que produce daño oxidativo en proteínas, DNA y RNA, peroxidación de lípidos, muerte sináptica y alteración en la formación de nuevas células (Halliwell y Whiteman, 2004).

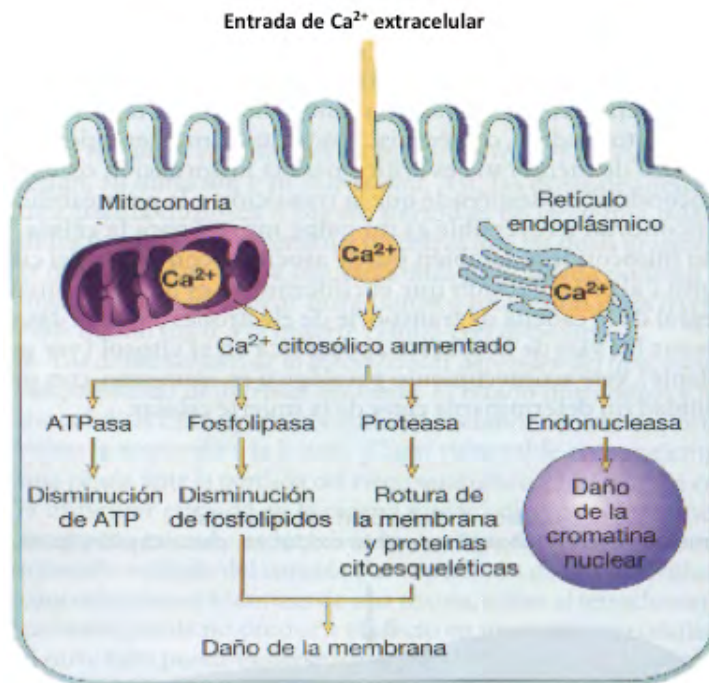


Fig. 6 Fuentes de producción de Ca²⁺, efectos de la entrada excesiva de calcio sobre proteasas, fosfolipasas y endonucleasas.

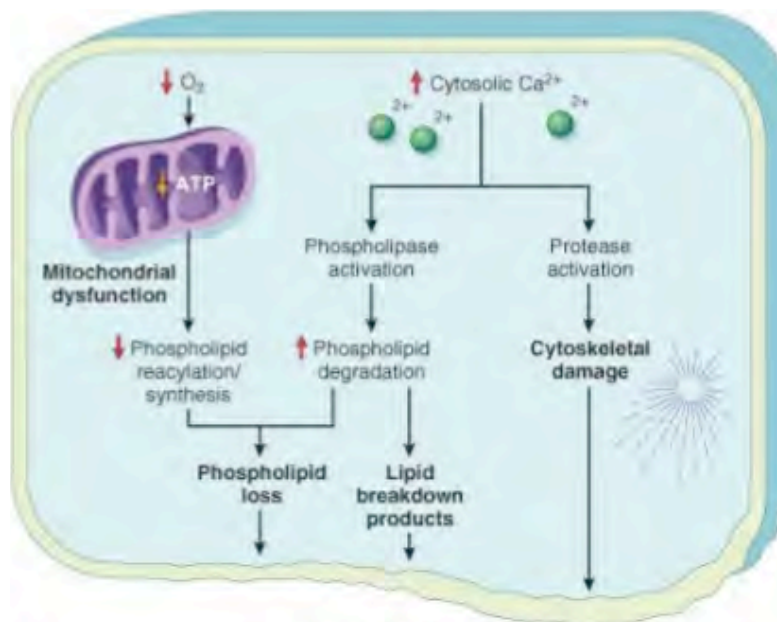


Fig 7. El estrés oxidativo aumenta la entrada de calcio a la célula lo cual provoca alteración estructural del aparato sintético de proteínas, existe activación de fosfolipasas y proteasas, degradación de fosfolípidos, daño al citoesqueleto y por consiguiente reducción de la síntesis proteica.

El estrés oxidativo afecta directamente la integridad del ADN, induciendo modificaciones en las bases, deleciones, cambio de marco de lectura, entrecruzamientos de la cromatina, fragmentación

oxidación de bases nitrogenadas, recolocación cromosómica y rupturas de las cadenas de DNA, que pueden ser mutagénicas o letales para la célula (Olenick *et al.*, 1986).

En la enfermedad de Alzheimer, se ha reportado un incremento del estrés oxidativo, en esta enfermedad los electrones que llegan al complejo IV se vuelven ROS debido a que este complejo se encuentra inhibido por la presencia de placas de β -amiloide, los complejos I, II y III a su vez presentan una disminución en su actividad y existe fuga de electrones que no pueden entrar al complejo IV para concluir con la cadena respiratoria que además presenta una disminución en su actividad y así, estos electrones son generadores de más ROS (Halliwell y Whiteman, 2004).

La pérdida de la homeostasis REDOX produce un estado crónico de EO, el cual incrementa la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS), causando a su vez una reducción de la actividad del sistema antioxidante, acelerando el envejecimiento y participando en la patogénesis y el curso de la enfermedad de Alzheimer mediante la alteración de la señalización de rutas metabólicas en la célula, promoviendo mutaciones y alterando los mecanismos post-traduccionales. Este estrés oxidativo esta asociado a la progresión del Alzheimer debido a que se ha visto que contribuye al mal plegamiento de las proteínas y además oxida a los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que están involucrados en la recaptura del péptido o de la APP (Rivas *et al.*, 2011).

La acumulación del péptido β -amiloide se ha relacionado con el EO, la disfunción mitocondrial, falla de energía, bloqueo de canales iónicos, disfunción sináptica y pérdida neuronal. Se ha encontrado en el cerebro de pacientes con Alzheimer, un incremento de ROS en el ADN nuclear y daño al ADN mitocondrial. Además, se ha visto que la β -amiloide interrumpe el proceso dinámico de división y fusión mitocondrial e induce fragmentación mitocondrial y aumento en la producción de ROS.

Los agregados de β -amiloide pueden promover la producción de ROS y la disfunción mitocondrial, a su vez las ROS también puede causar la acumulación de este agregado neurotóxico. Esto, junto con la observación de que el aumento de la producción de ROS antecede a la aparición patológica de las placas de β -amiloide sugiere que la disfunción mitocondrial puede ser un evento temprano que precede a la agregación de proteínas. La disfunción mitocondrial puede ser secundaria a alteraciones en otras vías que pueden afectar tanto la función mitocondrial como la acumulación de proteínas tóxicas. Cuando la homeostasis del calcio está desregulada en la EA, existe generación de ROS, agregación de $A\beta$, y daño a la mitocondria; los oligómeros de $A\beta$ promueven más entrada de calcio intracelular y esto se vuelve un circuito de retroalimentación positiva deletérea (Fig.8). (Patten *et al.*, 2010).

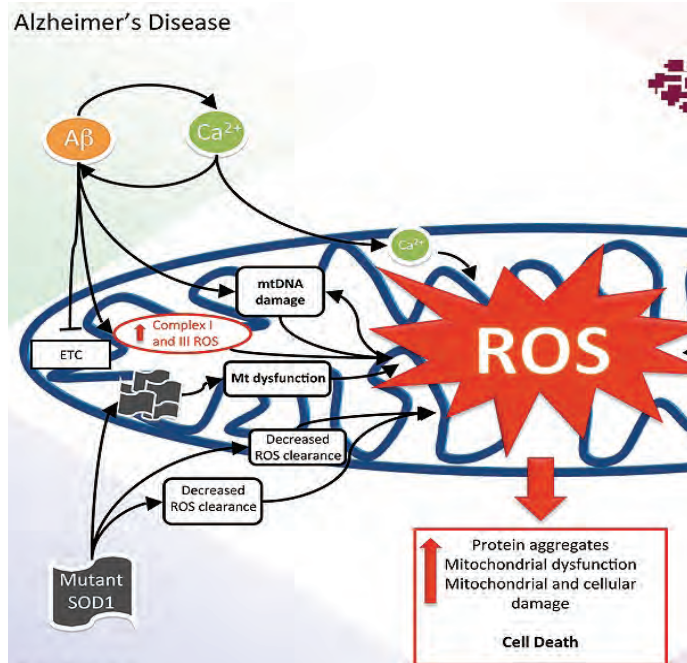


Fig 8. En la enfermedad de Alzheimer, la acumulación de A β es tóxica para la respiración mitocondrial e incrementa al daño al DNA mitocondrial (mtDNA) y las ROS mitocondriales (mtROS). Además desregulación de los niveles de calcio también afectan la función mitocondrial normal. Estos dos fenómenos no son mutuamente excluyentes la acumulación de A β puede desregular los niveles de calcio y viceversa. Modificado de Patten et al. 2010.

El péptido A β no es tóxico en ausencia de iones de metálicos REDOX. Estudios recientes implican a los biometales en el desarrollo o la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Se ha demostrado una sobreacumulación de cobre, hierro y zinc dentro de las placas de A β ya que éstas tienen alta afinidad a metales con actividad REDOX, siendo capaz de reducirlos y en consecuencia conducir a la formación de peróxido de hidrógeno y amiloide oxidado.

4.- Telómeros

Los organismos eucariontes resolvieron el problema de la replicación de la hebra rezagada formando secuencias nucleotídicas especiales en las terminaciones cromosómicas a las cuales en la actualidad nombramos telómeros. El telómero son complejos esenciales de proteínas (asociadas al DNA telomérico de doble y una cadena) y DNA no codificante que se encuentra en los extremos de los cromosomas lineales, para proteger a estos de fusiones y degradación (Blackburn, 1991). Las secuencias repetidas, junto con las regiones vecinas, forman estructuras que protegen la terminación y evitan que sean reconocidas como DNA dañado. La secuencias teloméricas son similares en diversos organismos como protozoarios, hongos, plantas y mamíferos (Alberts, 2002). Sin embargo la longitud del telómero varía según la especie y el cromosoma. Son secuencias repetidas en tándem de 6 pares de bases y en vertebrados esta secuencia es TTAGGG. En los

humanos, los telómeros son extensiones de 10 000 nucleótidos de esta secuencia y va de aproximadamente 8,000 pares de bases al nacer, 3,000 al envejecer y 1,500 pares en el adulto mayor (en total, un cromosoma tiene alrededor de 150 millones de pares de bases). Cabe resaltar que son secuencias de ADN especializado. Cada vez que una célula se divide, una persona promedio pierde de 30 a 200 pares de bases de los extremos de los telómeros de esa célula. Una célula se divide entre 50 y 70 veces en toda su vida y sus telómeros se acortan de manera progresiva. En ausencia de mecanismos especiales de manutención del telómero, el cromosoma lineal se acorta progresivamente en cada replicación del DNA, si el acortamiento alcanza un nivel crítico la célula eventualmente se vuelve senescente, muere, o mantiene daño genético, los eventos de inestabilidad genética propiciados por la presencia de telómeros disfuncionales están asociados con la transición de lesiones benignas a cáncer maligno. Si el daño es irreparable, la célula detiene el ciclo celular y es dirigida a apoptosis o a senescencia celular (Gillson, 2007). La longitud de los telómeros varía entre especies de mamíferos e incluso entre células de diferentes tejidos u órganos en un mismo individuo. La longitud del telómero de *Mus musculus* es relativamente larga, aproximadamente >20kb (Callicot *et al.* 1998).

Los telómeros mantienen la estabilidad genómica con funciones tales como el mantenimiento de la estabilidad cromosómica, formando estructuras que evitan la fusión de cromosomas o la actuación de mecanismos degradativos, evitando así la muerte celular y la pérdida de genes importantes para la vida de la célula. En la mitosis, la longitud de los telómeros es un parámetro que determina el número de divisiones de cada célula y como consecuencia la duración de su vida. Mientras que en la meiosis facilita el reconocimiento de cromosomas homólogos. Protegen los extremos de los cromosomas del daño causado al ADN y previenen que haya fusiones entre extremos de diferentes cromosomas.

En los cromosomas lineales la ADN polimerasa no puede copiar las últimas bases del extremo 3' del telómero ya que necesita espacio en la hebra molde para introducir el cebador. Como consecuencia de este impedimento, en cada ciclo de replicación del ADN los cromosomas lineales sufren un pequeño acortamiento (Barbara *et al.*,2003). La enzima telomerasa lleva a cabo la elongación de los telómeros que permite la conservación de su tamaño tras los ciclos de replicación. La activación o desactivación de la telomerasa influye en el desarrollo y el envejecimiento de los tejidos de un organismo (Moon IK., Jarstfer MB. 2007).

La telomerasa es una ribozima compleja formada por varias subunidades. Su núcleo principal está compuesto por una subunidad catalítica llamada hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase; transcriptasa reversa de telomerasa humana) o mTERT en el caso de ratones (m por *mus musculus*), de naturaleza proteica y con actividad de transcriptasa inversa; y por la subunidad de ARN llamada hTR (human Telomerase RNA; RNA telomerasa humana) que tiene

una estructura secundaria específica y hace de molde para la síntesis del DNA telomérico. La actividad de la telomerasa está determinada por el tipo de tejido y el momento del desarrollo.

Al ADN telomérico se asocian de forma específica un conjunto de proteínas, además de las histonas. Algunas de estas proteínas conectan el estado del telómero con la regulación de rutas metabólicas. La pérdida funcional de estas proteínas puede causar graves trastornos. Los factores TRF1 y TRF2 (Telomeric Repeat binding Factor 1 and 2) se asocian a la zona de doble hebra del telómero y están implicados en el control de la longitud del telómero y en la formación y mantenimiento de estructuras protectoras de los telómeros. Hay además proteínas de protección telomérica (POT1) que se asocian a la región monohebra; la proteína POT1 además de proteger la monohebra, puede mediar la acción de TRF1 sobre la longitud del telómero.

Se ha demostrado que las proteínas que se asocian al telómero son capaces de formar estructuras protectoras en el telómero como el "t-loop" o los "G-cuadrupletes". El "t-loop" es un lazo en el extremo final del telómero que se forma al introducirse el extremo monohebra 3' en la región de doble hebra del telómero. Los G-cuadrupletes son pliegues que permiten la interacción de varias guaninas de la propia hebra y que se estabilizan gracias a la interacción con un catión monovalente como el K⁺ o el Na⁺. La topoisomerasa I es la enzima que forma estas estructuras de G-cuadruplete en humanos (Fig.9).

La longitud del telómero está relacionada con el tiempo de vida y depende de varios factores como la velocidad de degradación de los telómeros y la velocidad y el tiempo de actuación de la telomerasa en cada cromosoma. Esta longitud entonces, disminuye con la edad en todos los tejidos mitóticos a excepción de las líneas germinales. Se ha encontrado una relación entre el acortamiento telomérico en personas mayores a 60 años y la mortalidad en enfermedades relacionadas al envejecimiento tales como enfermedades cardíacas o infecciosas. Sin embargo, el acortamiento telomérico parece ser un indicador de progresión de un proceso de senescencia que incrementa la mortalidad por otros mecanismos (Cawthon R.M., *et al.*, 2003; Jasekelioff M., *et al.*, 2011).

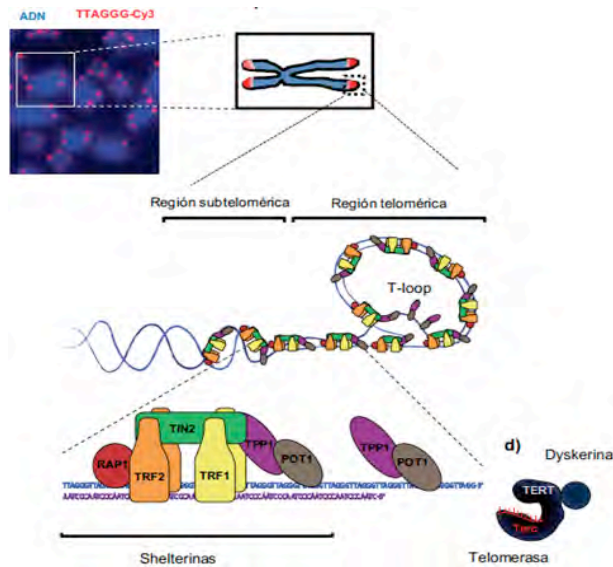


Fig 9. Telómero y telomerasa. La telomerasa complejo de ribonucleoproteína con un componente ARN (cadena molde de ARN) que sirve para la síntesis del ARN telomérico y en una subunidad proteica con funciones catalíticas que actúa como transcriptasa inversa. El hTERT posee dos dominios funcionales: la región molde y la región de doble horquilla y un tercer dominio que permite que estas dos regiones puedan plegarse correctamente para interactuar cada una con un dominio distinto de hTERT.. Grupo de proteínas involucradas en la formación y protección del telómero: Rap1, TRF1 y TRF2. Rap1, controla la longitud del telómero a través de su interacción con TRF2. TRF2 y TRF1 son proteínas estructurales que se unen a las secuencias repetidas en tándem teloméricas TTAGGG. La TRF1 se encuentra en la región de doble cadena del telómero, mientras que TRF2 está asociada a la región de cadena simple u “overhang”. TRF1 y TRF2 se encuentran relacionadas en el dominio de unión al ADN . TRF1 actúa en cis sobre la regulación de la longitud del telómero, bloqueando así el acceso de la telomerasa al extremo 3'-terminal de la cadena sencilla del cromosoma, mientras que TRF2 participa en homeostasis del telómero, TRF1 y TRF2 participan en la formación de la estructura telomérica llamada “T-Loop que juega un papel determinante en la organización de la cromatina en las regiones teloméricas y subteloméricas.

4.1 Medición de telómero

El principal objetivo de los métodos de medición de longitud telomérica es detectar pequeñas variaciones en la longitud telomérica entre muestras de diferentes individuos o del mismo individuo a través del tiempo (longitudinales).

Los estudios para determinar la longitud telomérica comenzaron en los años ochentas y se basaban en la cuantificación mediante Southern Blot de fragmentos teloméricos de restricción, llamado análisis de restricción de fragmentos terminales (TRF). Este método se basa en la digestión diferencial de DNA genómico usando enzimas que cortan en sitios específicos dejando fragmentos que contienen repetidos teloméricos. Estos fragmentos son separados en un gel mediante electroforesis, son hibridados con una sonda telomérica radiactiva mediante Southern Blot. El análisis TRF proporciona una estimación aproximada del número de repeticiones teloméricas por muestra. El uso de éste análisis permitió las primeras asociaciones entre la longitud del telómero, el envejecimiento y algunas enfermedades humanas, aún en la actualidad es empleado.

A principios de 1990 se desarrollaron métodos para la medición de telómero basados en la fluorescencia de hibridación in situ (FISH), lo cual resolvió el problema de precisión. Este método de FISH consiste en el marcaje específico de telómeros con un ácido núcleo peptídico fluorescente (PNA), cada sonda de PNA reconoce tres repetidos teloméricos. Permite medir la longitud del telómero de una sola célula o los telómeros de un cromosoma, ya que la intensidad de la señal de fluorescencia de la sonda PNA telomérica que hibrida con un telómero es directamente proporcional a la longitud telomérica.

El primer método desarrollado de FISH telómero fue llamado FISH cuantitativo de telómero ó Q-FISH en metafases (también conocido como Q-FISH convencional), el cual permite la cuantificación de la longitud del telómero de cromosomas individuales a nivel de células, lo cual provee además la cuantificación de los telómeros muy cortos e indetectables y la media de la longitud telomérica por célula. Es cuantificado mediante imágenes digitales de microscopía de fluorescencia. Este método requiere células proliferativas activas. Provee alta sensibilidad con bajo límite de detección, permite cuantificar en cromosomas con menos de 0.15kb de repetidos teloméricos. Se emplean plásmidos ó líneas celulares con longitud de telómero (Bruno Bernardes *et al.*, 2012). Se pueden emplear secciones de tejido, células no proliferativas, post-mitóticas, no diferenciadas o senescentes.

Posteriormente se desarrolló otro método en el citómetro de flujo basado en el Q-FISH, conocido como Flow-FISH, ésta metodología sólo proveía valores de la longitud media telomérica por célula, por lo tanto era menos precisa que el Q-FISH convencional.

Recientemente el grupo de la Dra. Blasco y colaboradores en 2007 desarrolló un método al que llamaron HT-FISH cuantitativa (HT Q-FISH), que permite la cuantificación de la longitud de telómeros y el porcentaje de telómeros cortos por célula en estudios de población humana con una cantidad grande de muestras.

Además de éstos métodos basados en la FISH existe el método de PCR cuantitativa (qPCR), el cual no requiere de células vivas, es rápido y es empleado en muestras poblacionales grandes. Este método sólo proporciona la longitud media telomérica por muestra y no permite la cuantificación de telómeros cortos. Estas limitaciones se resolvieron con la nueva técnica basada en PCR llamada análisis individual de telómeros (STELA), la cual permite la cuantificación de cromosomas específicos, pero tiene la desventaja de que no es aplicable a grandes muestras poblacionales (Blasco *et al.*, 2012).

4.2 Métodos de cuantificación en qPCR

4.2.1 Curvas de calibración

Las curvas de calibración son altamente reproducibles y permiten la generación de datos específicos y sensibles. La cuantificación absoluta en la técnica de PCR tiempo real depende completamente de la exactitud del estándar elegido así como de su diseño, producción, determinación de la concentración exacta para realizar la diluciones. Estas curvas deben ser validadas rigurosamente ya que la expresión genética en la PCR tiempo real depende exclusivamente de la precisión de los estándares empleados.

Las curvas de calibración usadas en la cuantificación absoluta están basadas en concentraciones conocidas de moléculas de DNA, por ejemplo DNA recombinante de un plásmido, DNA genómico, oligonucleótidos sintetizados de una concentración y longitud determinada.

4.2.2.1 Cuantificación absoluta de la expresión de un gen

La cuantificación absoluta relaciona la señal obtenida con la PCR en tiempo real al número de copias fijo de una secuencia estándar utilizando una curva de calibración obtenida de la amplificación de un gen control o calibrador externo. Permite la determinación precisa del número de copias por célula (Rodríguez y Rodríguez 2006).

5. Acortamiento telomérico en envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas.

La medición de la longitud de telómero comenzó en los años ochentas con el empleo de la técnica de análisis de restricción de fragmentos por Southern blot, desde entonces se han implementado, incluso mejorado diferentes técnicas para medir los telómeros, la mayoría de éstas técnicas es empleada para medir longitud telomérica en humanos, el primero en adecuar una de éstas técnicas para medir el telómero de ratones fue Callicot en 2006, de cuyo trabajo obtuvimos las secuencias de primers para realizar este trabajo, Callicot y colaboradores diseñaron primers específicos para evitar la formación de dímeros, éstos primers fueron a su vez obtenidos del protocolo de Cawthon 2002.

En envejecimiento se ha visto una acumulación de telómeros cortos o dañados, lo que se considera uno de los principales factores responsables de daño al ADN y que a su vez conduce a la pérdida del potencial regenerativo en tejidos (Bernardes de Jesus, B. y Blasco, M. 2011). La pérdida progresiva del ADN telomérico durante el envejecimiento en células somáticas podría actuar como un mecanismo de supresión tumoral que limita la proliferación clonal. Aunque este fenómeno en células somáticas también puede conducir a pérdida de la función telomérica permitiendo a su vez fusión y rotura de cromosomas, puentes de fisión fusión y translocaciones, lo

cual conduciría a inestabilidad genética, esta inestabilidad genética permite el desarrollo de células con crecimiento anormal y facilita la adquisición de alteraciones genéticas (Aubert y Landsdorp. 2008). El papel de los telómeros en el envejecimiento aún no parece claro, ya que no se sabe con exactitud si los telómeros se acortan por el envejecimiento o el acortamiento telomérico provoca el envejecimiento.

Se ha asociado el envejecimiento a la acumulación de daño genético por estrés oxidativo y disfunción mitocondrial relacionados con toxicidad neuronal y evolución de enfermedades neurodegenerativas como la EA. Además, se ha visto neurodegeneración en humanos y ratones con defectos genéticos en proteínas asociadas a la elongación del telómero (De Souza Pinto *et al.*, 2008, Panossian L.A., *et al.*, 2003). Tanto la senescencia celular, el estrés oxidativo como el envejecimiento son factores importantes en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Zhang *et al.*, 2007).

En pacientes con la enfermedad de Alzheimer se ha reportado disminución de longitud telomérica en células PBMC (mononucleares de sangre periférica), monocitos (M), células T y células B (Panossian *et al.* 2003). De acuerdo con esto en otro trabajo se reportó una reducción de la longitud telomérica en células bucales de pacientes con la EA comparados con adultos mayores control, así como en leucocitos de pacientes con EA y células. Sin embargo, este mismo grupo observó un incremento en la longitud del telómero en el hipocampo de pacientes con la EA (Thomas *et al.*, 2008).

Sin embargo existe un trabajo que contradice los datos obtenidos por Thomas ya que, de acuerdo a sus resultados, sí hay una disminución de la longitud telomérica en neuronas hipocampales de pacientes con la EA. En este mismo trabajo también se analizó la longitud telomérica de ratones transgénicos A β PP los cuales presentan depósitos de β amiloide parecidos a la EA pero no tienen degeneración neuronal y no se obtuvieron diferencias significativas en la longitud telomérica de células hipocampales (Franco *et al.* 2006).

6. Planteamiento del problema

Aunque la asociación de la Enfermedad de Alzheimer a la acumulación de β amiloide y la hiperfosforilación de Tau ha permitido un acercamiento a esta enfermedad, no ha sido posible relacionarlo por completo con su progresión.

El estudio de los cambios en la longitud del telómero en células de sangre periférica y en el hipocampo de los ratones transgénicos para la EA 3xTg-AD, nos permitirá establecer un parámetro más dentro de la Enfermedad de Alzheimer y determinar si puede o no ser usado como marcador de progresión aunado al déficit cognitivo ya reportado en tareas espaciales en estos ratones.

7. Hipótesis

La longitud del telómero en células de sangre periférica se reducirá de manera gradual mientras que la del hipocampo se mantendrá constante a medida que la enfermedad de Alzheimer avanza en el modelo murino 3xTgAD.

8. Objetivo general

Determinar el cambio en la longitud del telómero y desempeño en una tarea de memoria espacial a diferentes edades (5, 9 y 13 meses de edad) en un modelo murino triple transgénico de la enfermedad de Alzheimer (3xTgAD).

8.1 Objetivos particulares

Examinar los cambios durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer en ratones 3xTg-AD y sus controles no transgénicos (WT) a los 5, 9 y 13 meses de edad, mediante los siguientes parámetros.

1. Longitud del telómero en células de sangre periférica total.
2. Longitud del telómero en el hipocampo (HC) y estriado (ES)
3. Determinar estrés oxidativo en tejido (HC y ES) y plasma.
4. Evaluación del déficit cognitivo por medio de la tarea de Reconocimiento de objetos en contexto.

9. Método

9.1 Animales

Se utilizaron ratones machos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD), adquiridos en Jackson Laboratories. Como animales control se utilizaron ratones no transgénicos (WT), sin modificaciones genéticas, obtenidos del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Todos los animales se mantuvieron en el bioterio del Hospital de Especialidades CMN SXXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

9.2 Determinación del tamaño del telómero

Se determinó la longitud del telómero en células de sangre periférica y tejido (hipocampo y estriado) mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa o qPCR. Se realizó una extracción mensual de sangre de los ratones 3xTg-AD y WT de la vena mandibular (0.2ml) hasta que alcanzaron la edad determinada por el grupo al que pertenecían. La muestra de

sangre fue primero tratada con buffer de lisis de eritrocitos y posteriormente se procesó con un kit de extracción de DNA marca Thermo Scientific (#K0512) siguiendo el protocolo del kit.

El ADN genómico extraído se sometió a qPCR para determinar la longitud del telómero tanto en células sanguíneas como en cerebro. Los oligos para la medición de telómeros fueron los mismos empleados por O' Callaghan y Fenech en 2011, sometidos a un tratamiento adicional mediante HPLC:

Forward

5' CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT 3'

Reverse

3' GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT 5'

Los oligos del gen control 36B4 fueron:

Forward

5' ACT GGT CTA GGA CCC GAG AAG 3'

Reverse

3' TCA ATG GTG CCT CTG GAG ATT 5'

Las reacciones en el termociclador fueron:

Desnaturalización

95° 10 min

40 ciclos

95° 15 seg

60° 60 seg

Seguidos de la curva de disociación.

Se evaluaron los oligos en el programa Primer-Blast para determinar T_m, formación de dímeros y hairpin. Posteriormente se estandarizó la PCR punto final para saber la cantidad correcta de reactivos, la temperatura de hibridación adecuada y corroborar la calidad de los oligos. Se realizó además una matriz de oligos para determinar la concentración adecuada de oligos FW y RV. Se realizaron curvas de calibración para determinar las diluciones correctas de los oligos estándar. Las temperaturas para los oligos del telómero así como las cantidades fueron las mismas empleadas por O' Callaghan y Fenech en 2011.

En el presente trabajo se decidió emplear la técnica de qPCR tomando en cuenta el número de muestras con el que se contaba para la cuantificación de la longitud del telómero en ratones 3xTgAD de 5, 9 y 13 meses de edad y WT de las mismas edades, debido a que ésta técnica presenta ciertas ventajas como son que posee un amplio rango dinámico de cuantificación de ácidos nucleicos (al menos 5 unidades logarítmicas), mayor sensibilidad, permitiendo la detección de menos de 5 copias de una secuencia blanco. Con una correcta elección del gen control se puede obtener un coeficiente de variación que oscila entre 1-2%, permitiendo análisis reproducibles de cambios sutiles de la expresión génica incluso en bajos niveles de expresión.

El objetivo principal de ésta técnica es distinguir y cuantificar de manera específica una secuencia de ácido nucleico en una muestra, sin importar la cantidad de la misma. Esta reacción de manera inicial amplifica el ADN de manera eficiente y existe una correlación entre el ADN de partida y el ADN formado durante la fase exponencial, por esto es posible cuantificar la cantidad de DNA generado. (Stock Silberman. 2006).

En el qPCR para coleccionar los datos a largo del proceso se emplea un reportero fluorescente para de esta manera monitorear la amplificación de productos durante cada ciclo de reacción. Esta tecnología está basada en la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación del ADN blanco; en nuestro trabajo nosotros empleamos SYBR Green Master Mix que es un fluoróforo general de unión no específica al DNA, el cual interacciona con el surco menor del ADN de doble cadena, emitiendo 1000 veces más fluorescencia que cuando está libre en solución (Fig.10). El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. El SYBR Green I absorbe luz en una longitud de onda de 480 nm y la emite a 520 nm (Valesek M. Y Repa J. 2005).

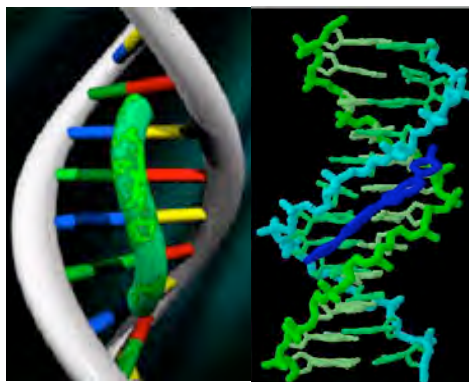


Fig. 10 Mecanismo de Sybr Green. Interacción del Sybr Green con el surco menor del DNA de doble cadena, emisión de fluorescencia 1000 veces mayor cuando interactua con el DNA que cuando esta libre en la solución. Modificado de Stock-Silberman, 2006

Durante la amplificación la velocidad en la que se llega a un nivel determinado de fluorescencia (umbral) correlaciona con la cantidad de ADN que se tiene en un inicio. El producto final puede ser caracterizado al someterse a incrementos en la temperatura para determinar en qué momento la doble cadena se separó. Este punto de fusión es una propiedad única que depende de la longitud y de la secuencia nucleotídica del producto.

9.3 Método de cuantificación absoluta con curva estándar

Es la comparación del ácido nucleico blanco con respecto a una muestra de referencia o calibrador, los resultados se expresan como un cambio en el número de veces que un ARNm se expresa en una muestra con respecto al calibrador. Este cambio puede ser positivo o negativo, ya que el calibrador por definición tiene un valor de 1 o bien de 100%.

Este método requiere el uso de dos genes para analizar. Uno de ellos es el blanco experimental, mientras que el segundo es un gen de expresión constitutiva (se le conoce también como “housekeeping” o endógeno). Este gen constitutivo debe tener un patrón de expresión constante en las condiciones experimentales que se estén analizando.

En este trabajo empleamos el gen calibrador 36B4 de expresión constitutiva, llamado “Housekeeping” o calibrador endógeno. El gen 36B4 codifica para la fosfoproteína RPLP0, la cual participa en la translocación de la síntesis de proteínas, cuando se compara con los niveles de transcripción de otros genes de referencia comunes, tales como beta-actina y la ciclofilina, 36B4 resulta ser un estándar muy fiable y consistente para su uso en análisis de expresión génica entre varios tejidos, incluyendo: cerebro, corazón, hígado, riñón, músculo y pulmón.

36B4 tiene 8 pseudo-genes relacionados con el genoma humano, que se encuentran en los cromosomas 1 a 3, 11, 14, 15 y 18.

Presenta homología de secuencia de nucleótidos entre especies notablemente alta, por ejemplo:

Canis familiaris (perro) la homología con la secuencia humana es 94%

Pan troglodytes (chimpancé), 99%;

Bos taurus (bovina), el 94%.

Mus musculus (ratón) homología con el gen humano de 88%

Rattus norvegicus (rata) 36B4 homología con el gen humano de 89%

Por lo anterior en la actualidad se emplea con más frecuencia y por esto mismo nosotros decidimos emplearlo como calibrador externo.

Determinamos la longitud absoluta del telómero y el gen 36B4 mediante el método de longitud absoluta con curva estándar en la cual se emplea un oligo estándar de longitud conocida. Para

esto empleamos una curva estándar mediante diluciones 1:10 de cantidades conocidas del oligonucleótido sintetizado que contenía 14 repetidos de la secuencia (TTAGGG), el número de repetidos de cada dilución se calculó mediante la siguiente técnica estándar:

El oligomero estándar del telómero tiene 84pb en 14 repetidos de la secuencias (TTAGGG), con un peso molecular (MW) de 26667.2.

El peso de una molécula es MW/número de Avogadro. Entonces el peso de la secuencia de telómero estándar es $2.6667 \times 10.6667 \times 10^4 / 6.02 \times 10^{23} = 0.44 \times 10^{-19} \text{g}$.

La concentración más alta del telómero estándar es de 60pg ($60 \times 10^{-12} \text{g}$) por reacción.

$(60 \times 10^{-12} \text{g}) / 0.44 \times 10^{-19} = 1.36 \times 10^9$ moléculas del oligómero estándar en 60pg.

La cantidad de la secuencia del telómero estándar es calculada como: $1.36 \times 10^9 \times 84$ (longitud del oligómero) = $1.18 \times 10^8 \text{ kb}$ de la secuencia del telómero estándar a una concentración de 60pg.

La curva estándar fue realizada mediante diluciones seriales (1:10) ($10^{-1} [1.18 \times 10^8]$ hasta $10^{-6} [1.18 \times 10^3]$).

Se realizaron los mismos cálculos para la curva del gen 36B4, con un peso molecular de 22963.9 pero la concentración más alta de la curva fue de 233.33pg.

9.4 Reconocimiento de objetos en contexto.

Para esta tarea se emplearon dos arenas con diferentes características, con paredes de diferente color (negro y madera) y piso cubierto de aserrín ó arena para gato inodora, una cilíndrica con un diámetro de 30cm, y altura de 30cm y una cuadrada (30x30x30) en ambas se colocaron objetos diferentes, que los animales reconocieron como novedosos o como familiares, los objetos fueron fijados al piso de la arena con velcro para evitar que se movieran de lugar a una distancia aproximada de 5cm de las paredes de la arena (Fig.11).

Se colocaron cámaras de video sobre las arenas para grabar la conducta de los animales. Antes de que otro animal ingresara a la arena los objetos se limpiaron con etanol al 70% para quitar los olores del animal anterior y evitar pistas olfatorias y se cambió el aserrín también entre cada animal.

Se habitó a los animales a los dos contextos, durante cinco 5 días exponiéndolos a las arenas sin objetos durante 10 minutos el contexto 1 y 90 min después 10 min el contexto 2, el sexto día se dejó al animal explorar libremente el contexto 1 durante 10 minutos en el cual estaban dos objetos iguales el séptimo día se dejó explorar al animal libremente el contexto 2 ahora con dos objetos diferentes, se midió memoria de largo plazo 24 horas después. El octavo día se realizó la prueba de memoria en la que se dejó al animal explorar libremente el contexto 2 con dos objetos

diferentes, uno que ya había visto previamente y otro nuevo (copias de un objeto al que se expuso al animal previamente) durante 10 minutos.

Durante la prueba de memoria los ratones fueron reintroducidos al contexto 2 y se les permitió explorar libremente durante 10 minutos la arena en la cual se colocó uno de los objetos que fue presentado al animal en el contexto 1 pero no fue presentado en el contexto 2 y otro objeto que fue presentado en el contexto 2. Se consideró una conducta de exploración cuando el animal dirigió su nariz hacia el objeto a una distancia menor a 1cm o lo tocó con la nariz.

Posteriormente se sacrificó al animal mediante decapitación utilizando una guillotina para roedores. Se extrajo el cerebro para la extracción del hipocampo y estriado; el tejido fue homogenizado para extracción de ADN genómico, que fue sometido posteriormente a qPCR.

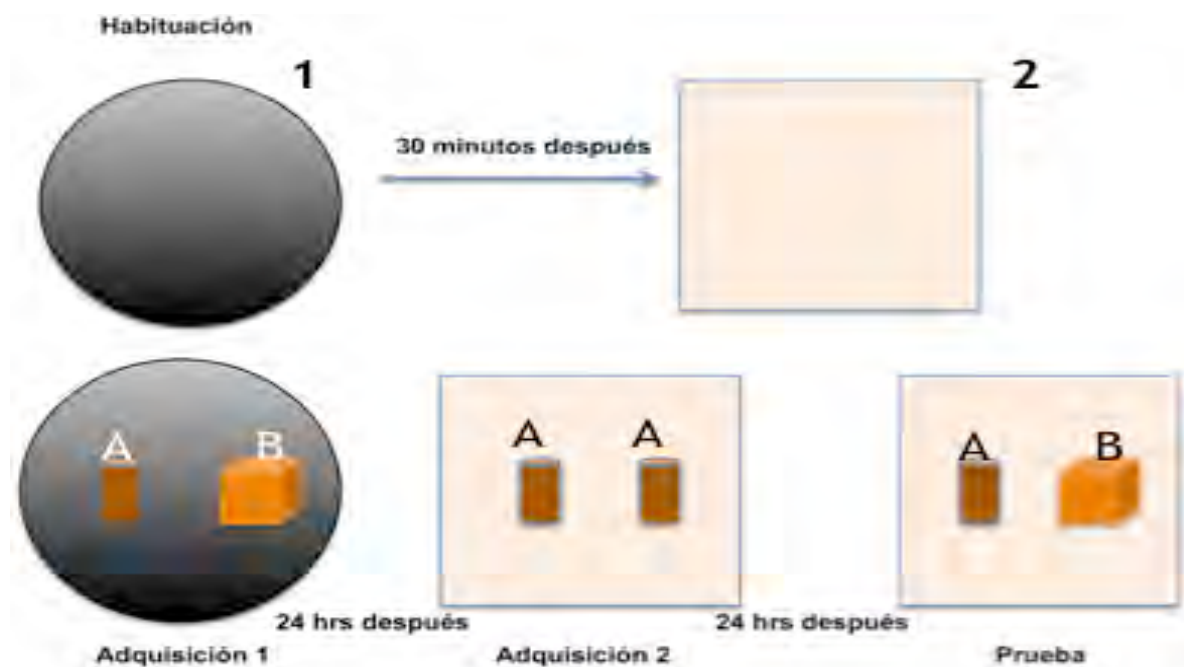


Fig. 11 Tarea de reconocimiento de objetos en contexto. Representación esquemática del protocolo empleado, dos arenas de diferente forma geométrica durante la habituación el animal es expuesto a ambos contextos sin objetos dentro, posteriormente se colocaron dos objetos iguales durante la adquisición 1 o un objeto previamente conocido (familiar) y un objeto nuevo durante la adquisición 2. El día de la prueba el animal es expuesto al mismo contexto de la adquisición 1 pero con un objeto familiar y uno novedoso que tiene que identificar.

9.5 Genotipificación

Con el fin de corroborar el genotipo de los animales utilizados se tomó un fragmento de la cola de cada animal después de su sacrificio, y se realizó el genotipado, el cual constó de 3 pasos:

- 1) Extracción de ADN, mediante el método de "hot shot" se cortó un fragmento de la cola del animal, el cual se sometió a desnatularización, mediante trituración de la cola en tubos eppendorf de 1.5ml con 75µl de buffer de lisis alcalino (250µl de NaOH, 40 µl de EDTA 0.5 M en 100ml de agua desionizada), se incubaron durante una hora a 96°C. Posteriormente se dejaron enfriar y se les adicionaron 75µl de buffer de neutralización (Tris HCL 40mM en 100ml de agua desionizada), se mezcló y centrifugó a 12000 rpm durante 2 min a 4°C. se tomó el sobrenadante y se almaceno en un ultracongelador a -50°C (Rudbeck y Dissing, 1998).
- 2) Reacción en cadena de la taq polimerasa para amplificación de fragmentos de DNA, se colocaron 2.5µl de "Coral load" (CL) (buffer de PCR 1x, MgCl₂, y Glicerina), 0.5µl de dNTP's, 0.125µl de Taq polimerasa, 21.875µl de H₂O, 1.5µl de la mezcla de los primers APP, Tau y el regulador Thy 12.4 más el DNA extraído; esto se realizó para la amplificación de los fragmentos APP y Tau. Los ciclos de PCR para esta amplificación fueron:

25 ciclos

94°C 5min

94°C 3 seg

53°C 30seg

72°C 1 min

72°C 3 min

4°C ∞

Para la amplificación de los fragmentos de PS1 se agregó 2.5µl de CL, 0.5 µl de dNTP's, 0.125µl de Taq polimerasa, 21.875µl de H₂O, 1.5µl de la mezcla de primers (PS1-k13, PS1-k15) y 3µl del DNA extraído. Los ciclos en el termociclador fueron:

35 ciclos

94°C

94°C 40 seg

62°C 40 seg

72°C 1 min

72°C 3 min

4°C ∞

Estos fragmentos amplificados de PS1 se sometieron a un corte por medio de la enzima BstII y el buffer NEB 1x más 20µl del resultado del PCR, se incubó durante 2 horas a

37°C, al final se obtuvieron dos fragmentos que identificaron la presencia o ausencia de la mutación de PS1.

- 3) Separación de los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (37ml de TAE, 0.7g de agarosa). La migración se efectuó en una cámara de Southern Bloth y una fuente de poder a 75V durante una hora. Se cargaron 5µl de marcador de peso molecular, 10µl de muestras obtenidas del PCR y 5 µl de Midori. Finalmente se capturó la imagen del gel con Midori en un transiluminador UV.

9.6 Evaluación del estrés oxidativo en Plasma, Hipocampo y Estriado de ratones transgénicos 3xTgAD y controles WT.

Preparación de homogenados

Para preparar los homogenados del tejido obtenido se empleó un buffer fisiológico PBS 1x, el cual contiene 8 g (137 mM) NaCl, 0.2 g (2.7 mM) KCl, 1.44 g (10 mM) NaHPO, 0.24 g (2mM) KHHPO, 800 mL agua BD, con pH de 7.4 y aforado a 1 L.

El tejido se homogenizó con 300 µL de PBS 1x y de ahí se tomaron los volúmenes necesarios para cada una de las pruebas.

Obtención del plasma

Para la obtención de plasma se obtuvo sangre en un tubo con anticoagulante (EDTA). Una vez obtenida la sangre se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos se separó el sobrenadante en un nuevo tubo (plasma sanguíneo).

El plasma obtenido se diluyó en PBS 1x a un volumen determinado dependiendo de la prueba para el cual fue empleado.

Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Es un método que consta de la oxidación de la 2-7-diclorofluoresceína (DCFH) al compuesto fluorescente 2-7- diclorofluoresceína oxidada (DCF) por la presencia de peróxido de hidrógeno, la célula es permeable al DCFH>DA y este, en presencia de los ROS se convierte en 2-7- diclorofluoresceína (DCF), producto que no puede atravesar la membrana celular, esto permite utilizar esta reacción como indicador específico de la formación de especies reactivas. Este método se utiliza en la detección de peróxido de hidrógeno en neutrófilos. La fluorescencia producida por la DCF se mide a 498 nm de excitación y 522 nm de emisión. El DCFH>DA puede ser oxidado por varios intermediarios reactivos, por lo que no puede ser utilizado para determinar la presencia de una especie reactiva específica.

Para evaluar la formación de ROS por fluorimetría se emplearon homogenados de las regiones a evaluar o plasma sanguíneo, se empleó 60µl de muestra y se llevó a un volumen final de 200µl con buffer PBS 1x, se agregaron 10µL de una solución de diclorofluoresceína-diacetato (DCF₂DA) a 75 µM, para lograr esta concentración de DCF se pesaron 2.44mg en 1 ml de metanol, de esa primera solución se tomaron 15µl y se llevó nuevamente a 1 ml con metanol es decir se le agregaron 985µl de metanol para tener la solución a la concentración correcta de DCF₂DA, una vez agregados los 10µl de la DCF₂DA se dejaron incubar en oscuridad durante 30 minutos a 37°C, una vez terminada la incubación las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min, se colectó el sobrenadante y finalmente se leyeron las muestras en un fluorómetro a una longitud de onda de excitación de 480nm y emisión de 532. También se detectó la señal fluorescente de la DCF de los sobrenadantes en un lector de placas de fluorescencia Biotek con 480 nm de excitación y 528 de emisión, para comparar las diferencias obtenidas entre un método de lectura y otro.

Determinación de la peroxidación de lípidos

Cuando el estado oxidativo de la célula está aumentado, se producen reacciones que involucran la acción de los radicales libres sobre los ácidos grasos de las membranas formando, entre otros subproductos, el malondialdehído (MDA). De esta forma, se puede estudiar el grado de peroxidación lipídica a través de la determinación del malondialdehído formado. Este último reacciona con el ácido tiobarbitúrico produciendo especies que absorben a 535 nm (Buege y Aust, 1979). Por definición los TBARS, son especies reactivas de oxígeno que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico.

Esta determinación se fundamenta en la suposición de que el malonaldehído es uno de los productos formados durante la oxidación de lípidos. El ácido tiobarbitúrico reacciona con el malonaldehído formando una red cromófora, la intensidad de ésta será proporcional al grado de oxidación de los aceites y grasas. Este método mide un producto secundario de la oxidación de los lípidos: el malondialdehído. Involucra la reacción del malondialdehído con el TBA para proporcionar un producto coloreado. (Marnette, 1999). El malondialdehído se forma por la peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados y es un marcador de la degradación oxidativa de la membrana celular. Esta determinación se fundamenta en la suposición de que el malonaldehído es uno de los productos formados durante la oxidación de lípidos.

El método espectrofotométrico del TBA es el más comúnmente utilizado para la cuantificación de MDA. La reacción ocurre por ataque del MDA sobre el grupo metileno activo del TBA. Un mol de MDA reacciona con dos moles de TBA en medio ácido y a alta temperatura. La velocidad de esta reacción depende de la concentración de TBA, la temperatura y el pH. El pigmento generado posee un pico máximo de absorbancia a 532-535 nm y otro secundario a 245-305 nm.

Para esta técnica se debe preparar TBA

<u>Preparación del TBA</u>	<u>para 100ml</u>	<u>para 50ml</u>
<u>Acido tiobarbiturico (TBA)</u>	<u>0.375g</u>	<u>0.1875g</u>
<u>Acido tricloroacético</u>	<u>15g</u>	<u>7.5g</u>
<u>Acido clorhídrico</u>	<u>2.5ml</u>	<u>1.25ml</u>

Todos los componentes de la solución se disolvieron en agua restando el volumen que ocupó el ácido clorhídrico.

La peroxidación de lípidos se evaluó por la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), se tomaron 120µL del homogenado de las diferentes regiones o del plasma en un tubo endendorff al cual previamente con una aguja se le hicieron pequeños orificios en la tapa y se adicionaron 60µL de PBS 1x y 120µL del reactivo TBA (0.375g de TBA + 15 g de ácido tricloroacético + 2.54ml de HCl concentrado). Las muestras se colocaron en un baño de ebullición (94°C) durante 20 min (un indicativo de que las muestras estaban listas es que comenzaron a tener una coloración rosada). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas 10,500 rpm durante 15 min y la densidad óptica del sobrenadante se determinó con un lector de placas Biotek a una longitud de onda de 532nm.

Evaluación de la Funcionalidad mitocondrial

El metabolismo energético es la base de las funciones celulares. Una adecuada transferencia de electrones a través de una serie de reacciones REDOX garantiza la obtención de sustratos energéticos necesarios para el óptimo funcionamiento de las células.

En la membrana interna mitocondrial se encuentran la cadena respiratoria, que está formada por proteínas que se ensamblan en complejos multiprotéicos denominados I, II, III y IV.

Un método indirecto el cual se utiliza ampliamente para evaluar la funcionalidad mitocondrial es el desarrollado por Mosmann en 1983, el cual se basa en la reducción de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) por las deshidrogenasas mitocondriales. En términos generales, las sales de tetrazolio al reducirse pasan al estado formazán, el cual es un compuesto de color azul e insoluble en agua. El empleo de esta técnica nos permite evaluar la actividad de los complejos de la cadena respiratoria bajo diferentes condiciones experimentales.

Para evaluar la actividad mitocondrial se emplearon 100µL de homogenado de tejido al cual se le agregaron 10µL de una solución de MTT (5mg/ml), estas se incubaron durante 30 minutos a 37°C en oscuridad, una vez transcurrido el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 3 minutos.

Se eliminó el sobrenadante y se le agregó al botón o pellet 500 μ L de isopropanol-ácido (192ml de isopropanol y 8 ml de ácido clorhídrico). El botón se resuspendió en el isopropanol tomando un color morado. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 560nm en un lector de placas.

10. Resultados

10.1 Reconocimiento de objetos en contexto

Se realizó la tarea conductual de memoria de reconocimiento de objetos en contexto, en la cual los animales fueron habituados durante 5 días a dos arenas diferentes, colocando al animal 10 min en cada una con un intervalo de 30 min entre contextos. El sexto día se colocó al animal en el contexto 1 pero esta vez se colocaron dos objetos iguales y se dejó explorar libremente al animal durante 10 minutos. El séptimo día se colocó al animal en el contexto 2 con dos objetos diferentes (uno familiar y uno novedoso) y se dejó explorar libremente al animal durante 10 min. El octavo día se realizó una prueba de memoria en la que se colocó al animal en la arena y se expuso a un objeto familiar y un objeto novedoso durante 10 min. Se realizó una prueba 24hrs después de la habituación para medir memoria a largo plazo de esta tarea.

Para todos los datos obtenidos se calculó el índice de reconocimiento del objeto novedoso en el día de la prueba. Se realizó una ANOVA de una vía para la prueba de memoria a largo plazo y se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos 3xTg-AD y WT $P < 0.05$. Se realizó además una prueba post-hoc de Tukey la cuál reveló diferencias significativas en las edades entre los grupos WT y 3xTg-AD de 5 meses, $P < 0.001$; WT de 5 meses y 3xTg-AD de 9 meses $P < 0.01$; entre los grupos WT de 5 meses y 3xTg-AD de 13 meses $P < 0.05$; entre los grupos 3xTg-AD de 5 meses y WT de 9 meses; entre los grupos WT de 9 meses y 3xTg-AD de 9 meses $P < 0.01$; entre los grupos WT de 9 meses y 3xTg-AD de 13 meses $P < 0.01$; entre los grupos WT de 13 meses y 3xTg-AD de 9 meses $P < 0.01$; diferencias significativas en las edades entre los grupos WT de 13 meses y 3xTg-AD de 13 meses $P < 0.001$.

Se realizó además una prueba estadística de Dunnett's para ver que tan alejados estaban los grupos por edades del valor 0.5 correspondiente al índice de reconocimiento del objeto novedoso. Se obtuvieron diferencias significativas para las diferentes edades del grupo de animales WT, $P < 0.01$; pero no así para las diferentes edades del grupo 3xTg-AD, $P > 0.05$ (Fig.12).

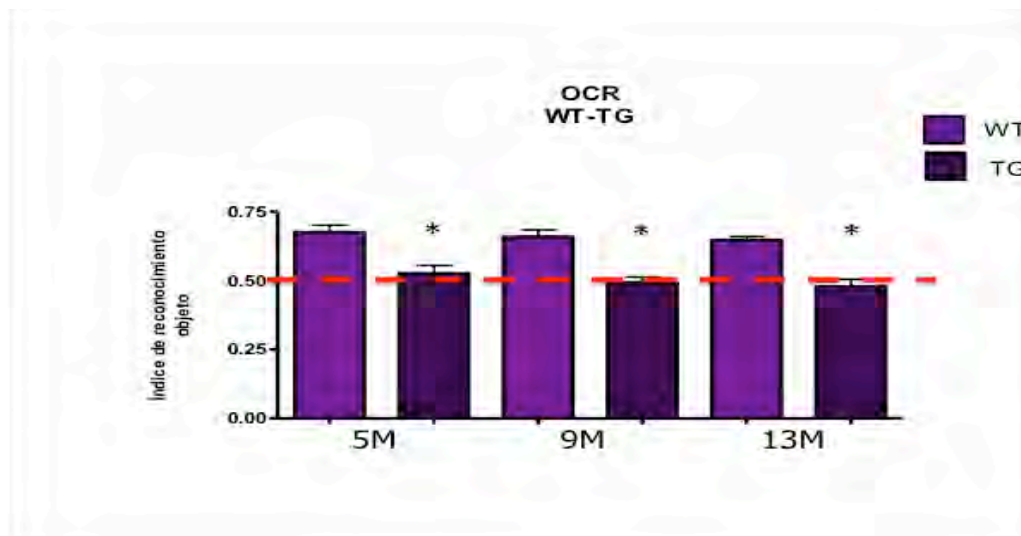


Fig. 12 Índice de reconocimiento de objeto novedoso. Los animales que presentaron un índice de reconocimiento mayor a 0.5 reconocen el objeto novedoso, en ese contexto, los animales con un índice de reconocimiento menor a 0.5 no están reconociendo el objeto como nuevo en ese contexto, lo cual indica un déficit cognitivo. Ratones controles no transgénicos WT valor de $P < 0.05$, ratones transgénicos TG valor de $P > 0.05$. *Índice de reconocimiento $P \leq 0.05$

Estos resultados indican que los animales WT de 5, 9 y 13 meses de edad tienen un índice de reconocimiento del objeto novedoso mayor a 0.5, lo cual indica que reconocen el objeto novedoso el día de la prueba presentando una buena memoria a largo plazo. En cambio, los animales 3xTgAD de 5, 9 y 13 meses tiene un índice de reconocimiento del objeto novedoso menor o igual a 0.5, es decir exploran el mismo tiempo ambos objetos tanto el novedoso como el familiar, lo cual indica que no reconocen el objeto novedoso y por lo tanto presentan un déficit de memoria espacial a largo plazo.

10.2 Determinación del tamaño del telómero

Como primer paso para la medición de la longitud del telómero, se extrajo el ADN de muestras de células de sangre periférica y de tejido de los animales de todas las edades y grupos. En la tabla 1 se muestra el número total de muestras de ADN que se obtuvieron de células sanguíneas y tejido cerebral de los tres grupos de edades (5, 9 y 13 meses) tanto de ratones mutantes 3xTgAD como de sus controles no transgénicos WT para un posterior análisis de la longitud del telómero.

Meses	Número de muestras de DNA de 3xTgAD	Número de muestras de DNA de WT
5 meses	12	12
9 meses	12	12
13 meses	12	12

Tabla 1. Número de muestras total de ADN obtenidas de los animales a tres diferentes edades (5, 9 y 13 meses) de ratones transgénicos 3xTg-AD y controles WT.

Como siguiente paso, se corroboraron las temperaturas y cantidad ideales para la hibridación de los oligonucleótidos (de telómero y gen control) que se usarían para la qPCR mediante un PCR de punto final. Se determinó que las empleadas por Callaghan y Fenech en 2011 eran las ideales en nuestro protocolo. Se muestra en la figura 13 un ejemplo de los geles con ambos oligonucleótidos.

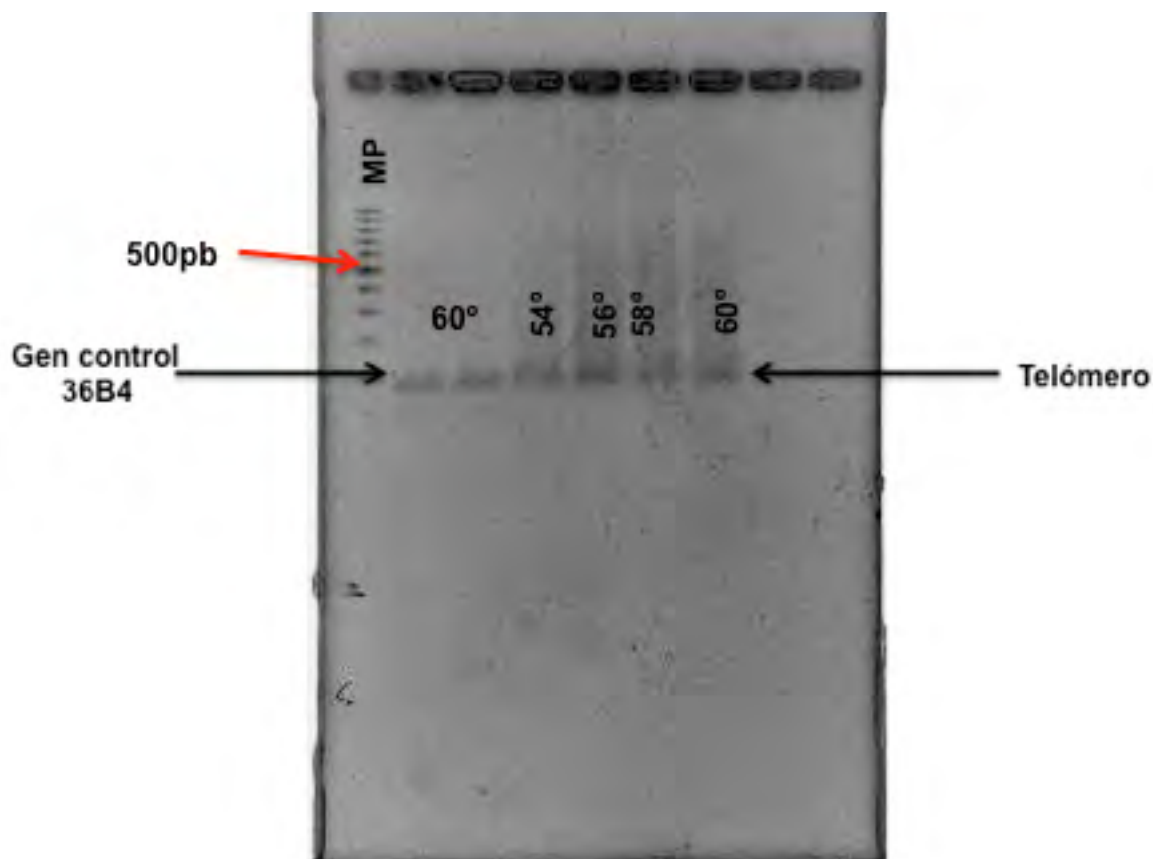


Fig. 13 Imagen de un gel de agarosa al 2% en el cual se observan los fragmentos correspondientes a la secuencia de telómero y la secuencia del gen control 36B4 de aproximadamente 100pb para ambos; como lo indica el marcador de peso molecular en el primer pozo a la izquierda.

Se hizo la elección del gen de referencia mediante la evaluación de cuatro genes diferentes en un programa llamado NormFinder y se llegó a la conclusión con ayuda de este programa que el mejor gen de referencia para nuestras muestras era el gen 36B4 que codifica para la fosfoproteína (RPLP0), la cual participa en la translocación de la síntesis de proteínas como se puede observar en la figura 14, el gen 36B4 en la tabla es el gen de referencia 2 que tiene un valor de estabilidad de 0.005, lo cual indica menor variabilidad, esta es la razón por la cual decidimos emplearlo.

Gene name	Stability value	Best gene	Gen de referencia 2
Gen de referencia 1	0.028	Stability value	0.005
Gen de referencia 2	0.005		
Gen de referencia 3	0.048	Best combination of two genes	Gen de referencia 2 and Gen de referencia 4
Gen de referencia 4	0.024	Stability value for best combination of two genes	0.014

Fig. 14 El valor de estabilidad se basa en la desviación estándar de los valores en el mismo grupo, el gen con menor valor de estabilidad en realidad es el que tiene menor variabilidad, es el mejor.

Finalmente se realizó el qPCR para medir la longitud de los telómeros. Primero se determinó la longitud absoluta del telómero y el gen 36B4 mediante el método de longitud absoluta con curva estándar en la cual se emplea un oligo estándar de longitud conocida. Se empleó una curva estándar mediante diluciones 1:10 de cantidades conocidas del oligonucleótido sintetizado que contenía 14 repetidos de la secuencia (TTAGGG), el número de repetidos de cada dilución se calculó mediante la siguiente técnica estándar:

El oligómero estándar del telómero tiene 84pb en 14 repetidos de las secuencias (TTAGGG) con un peso molecular (MW) de 26667.2. La curva estándar fue realizada mediante diluciones seriales (1:10) 10^{-1} [1.18×10^8] hasta 10^{-6} [1.18×10^3], como se puede observar en la tabla 2.

OLIGO TELÓMERO	ESTÁNDAR DILUCIONES	KB	LOG copias	#
0.0006		1180	3.071882007	
0.006		11800	4.071882007	
0.06		118000	5.071882007	
0.6		1180000	6.071882007	
6		11800000	7.071882007	
60		118000000	8.071882007	

Tabla 2 Diluciones 1:10 del estándar de telómero con una concentración de 60 picomoles.

Se realizaron los mismos cálculos para la curva del gen 36B4, con un peso molecular de 22963.9 pero la concentración más alta de la curva fue de 233.33pg, como se puede observar en la tabla 3

OLIGO ESTÁNDAR	número de copias	LOG # copias
36B4		
DILUCIONES		
0.0023333	0.911690196	-0.040152715
0.0233333	9.116901966	0.959847285
0.2333333	91.16901966	1.959847285
2.3333333	911.6901966	2.959847285
23.3333333	9116.901966	3.959847285
233.3333333	91169.01966	4.959847285

Tabla 3. Diluciones 1:10 del estándar del 36B4 comenzando con una concentración de 233.33 picomoles.

Para cada reacción de qPCR se realizó una curva estándar para el cálculo de la longitud del telómero. Las curvas que se obtuvieron fueron como las siguientes (Fig.15 y 16). Se utilizaron los datos de las reacciones en las que la curva mostrara una $R^2 > 0.9$.

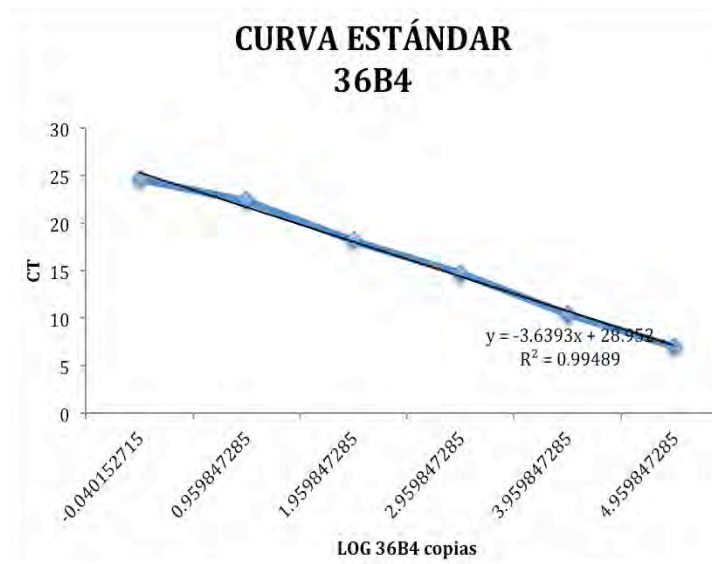


Fig. 15 Curva estándar del gen control empleada para calcular longitud telomérica absoluta (logaritmo de número de copias) del gen 36B4.

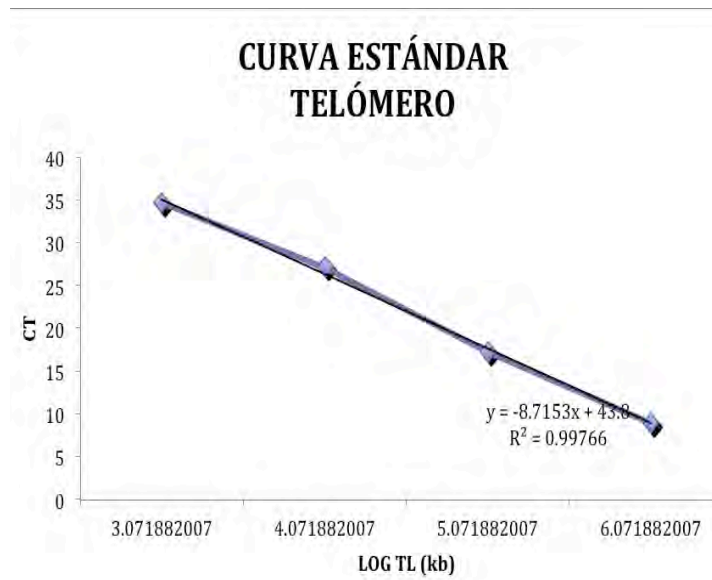


Fig. 16 Curva estándar del telómero empleada para calcular longitud telomérica absoluta (logaritmo de número de copias) del telómero.

Se midió la longitud absoluta del telómero y del gen 36B4 en células de sangre periférica de ratones transgénicos 3xTgAD (TG) y controles WT de 5, 9 y 13 meses de edad así como del hipocampo (HC) y estriado (ES) mediante qPCR. Pudimos observar una disminución de la longitud del telómero en células sanguíneas respecto a la edad, siendo la edad de 13 meses en las que se observa una disminución abrupta de la longitud telomérica en los animales transgénicos; se realizó una prueba estadística de Kruskal Wallis para determinar diferencias entre edades y se obtuvieron diferencias significativas ($p = 0.0008$) entre las medianas de las edades y posteriormente se realizó una prueba post-hoc de Dunn's para determinar entre que edades había diferencia, mostró diferencia significativa sólo entre el grupo de 13 meses y los de 5 y 9 meses como se puede observar en la figura 16 $P < 0.05$. (Fig.17). En la figura 18, en el grupo de animales WT, se puede observar un decremento en la longitud telomérica en los animales de 13 meses; sin embargo, al realizar una prueba estadística de Kruskal Wallis no se obtuvieron diferencias significativas en las medianas de los grupos $P = 0.7024$.

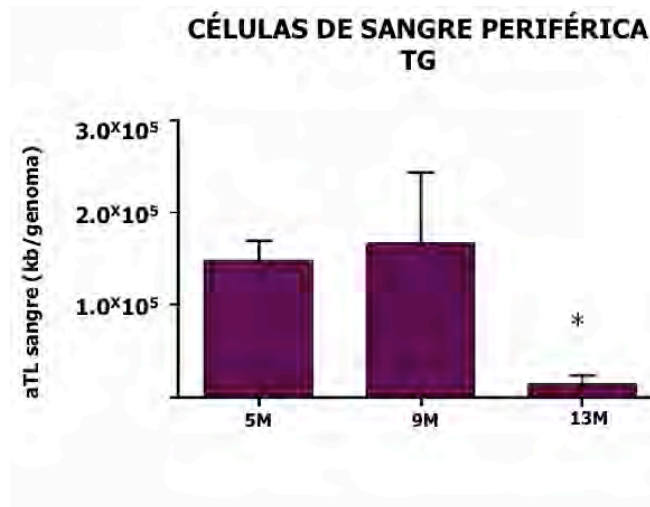


Fig. 17 Longitud del telómero en células de sangre periférica en ratones transgénicos TG de 5, 9 y 13 meses de edad. Sólo se observan diferencias significativas en la disminución de la longitud telomérica en el grupo de 13 meses de edad $P= 0.0008$ $N= 12$.

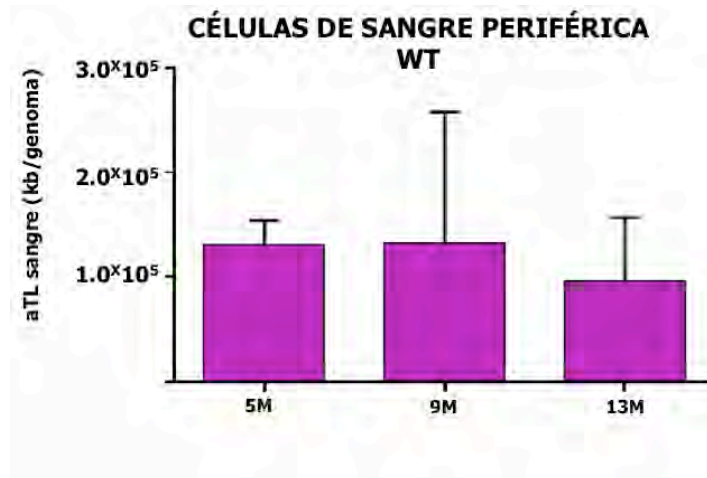


Fig. 18 Longitud del telómero en células de sangre periférica en ratones controles WT de 5, 9 y 13 meses de edad. No se encontraron diferencias significativas en la longitud telomérica entre los tres grupos de edades $P= 0.7024$. $N= 12$.

Finalmente, se compararon las longitudes teloméricas de células de sangre periférica entre los grupos de ratones TG y WT. Se realizó una prueba estadística de Kruskal Wallis para determinar diferencias entre grupos y se obtuvo una $P= 0.0025$, lo cual indica diferencias significativas entre las medianas de los grupos; posteriormente se realizó una prueba post-hoc de Dunn's para determinar diferencias entre edades y sólo se obtuvo diferencias significativas entre edades de 5 y 13 meses de los animales TG, entre los grupos WT de 5 meses de edad y TG de 13 meses de edad, entre los grupos de 9 y 13 meses de edad de los TG y entre los grupos WT de 13 meses de edad y TG de 9 meses de edad. Además se realizó una prueba de Mann Whitney entre los grupos

TG y WT de 13 meses de edad y se obtuvo un valor de $p= 0.0012$ el cual indica diferencias significativas entre los grupos como se observa en la figura 19.

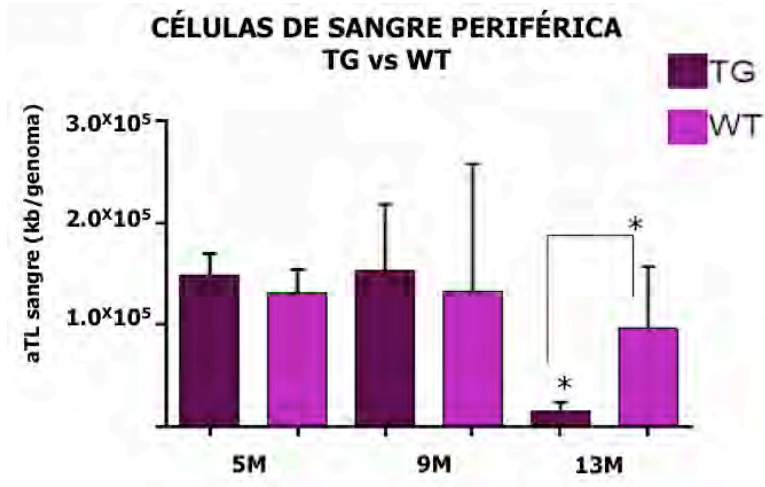


Fig. 19 Longitud del telómero en células de sangre periférica en ratones TG y WT de 5, 9 y 13 meses de edad. Se observan diferencias significativas en el grupo TG de 13 meses de edad y todos los demás grupos y entre el TG y WT de 13 meses de edad * $P < 0.05$. $N=12$.

Se midió la longitud telomérica en HC de ratones mutantes TG a tres edades distintas de los animales, a los 5, 9 y 13 meses de edad, se observó una disminución de la longitud telomérica a los 13 meses de edad; sin embargo cuando se realizó una prueba estadística de Kruskal-Wallis no se obtuvieron diferencias significativas en las medianas de los grupos. $P=0.2925$. No hay entonces diferencias en la longitud del telómero en el HC de los ratones TG en las diferentes edades. Los resultados se muestran en la figura 20.

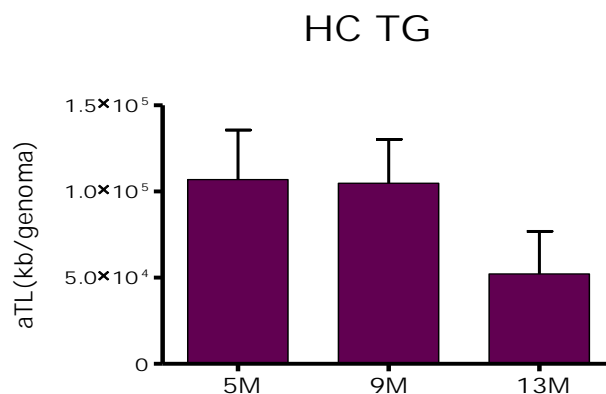


Fig. 20 Longitud del telómero en HC de ratones transgénicos TG de 5, 9 y 13 meses de edad. No existen diferencias significativas en la longitud telomérica de los ratones 3xTgAD en las diferentes edades P= 0.2925. N=6

Para los animales WT la medición de la longitud del telómero del HC parece mostrar una disminución en la longitud telomérica a la edad de 9 meses, con un posterior aumento a la edad de 13 meses. Sin embargo, nuevamente al realizar la prueba estadística de Kruskal Wallis para determinar diferencias entre edades P=0.3629 se obtuvo que no existen diferencias significativas entre las medianas de los grupos. Por lo tanto, en el grupo de animales WT tampoco hay cambios en la longitud del telómero en las diferentes edades que se analizaron como se observa en la figura 21.

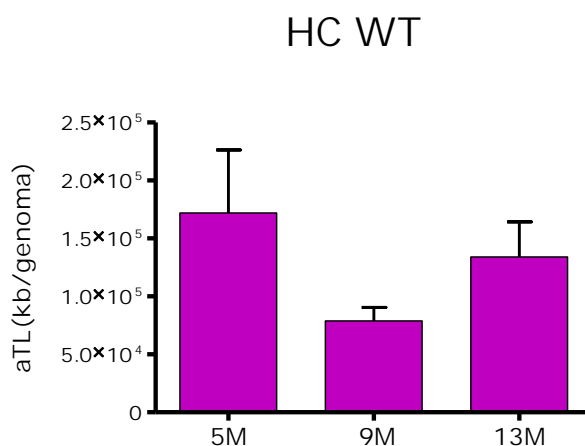


Fig. 21 Longitud del telómero en HC de ratones controles WT de 5, 9 y 13 meses de edad. No existen diferencias significativas en la longitud telomérica de los ratones WT en las diferentes edades P= 0.3629. N= 6.

En las figuras 20 y 21 de la longitud del telómero en HC tanto de ratones TG como WT se observan algunos cambios aunque no son estadísticamente significativos, para corroborar esto realizamos una comparación del hipocampo a los 5, 9 y 13 meses de edad de ambos grupos TG y

WT (Fig. 22), obtuvimos un valor de $P= 0.3482$ en la prueba estadística de Kruskal Wallis, lo cual indica que no existen diferencias significativas entre los grupos TG y WT en las diferentes edades.

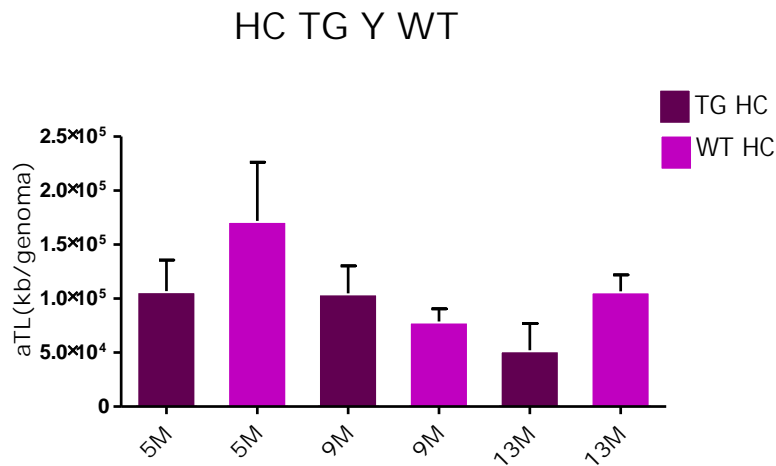


Fig. 22 Longitud del telómero en HC de ratones TG y controles WT de 5, 9 y 13 meses de edad. No existen diferencias significativas en la longitud telomérica de ambos grupos en las diferentes edades $P= 0.3482$. $N=24$.

Se midió la longitud telomérica en estriado de ratones de ambos grupos en todas las edades. Esta medición se realizó como un control de estructura. En la figura 23 se muestran los resultados de los animales TG a los 5, 9 y 13 meses de edad. Al realizar la prueba estadística de Kruskal Wallis para determinar diferencias entre grupos se pudo observar que no existen diferencias significativas entre las medianas de los grupos $P=0.2715$.

En la figura 24 se muestran los resultados del grupo de ratones WT. Para este grupo se realizó una prueba estadística de Kruskal Wallis $P=0.3979$ que mostró que existen diferencias significativas entre las medianas de los grupos. Es decir, no hay diferencias en la longitud del telómero entre los tres grupos de edades de los animales WT.

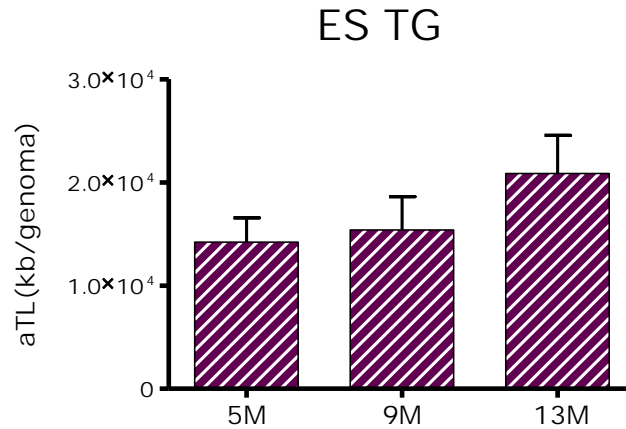


Fig. 23 Longitud del telómero en ES de ratones transgénicos TG de 5, 9 y 13 meses de edad. No existen diferencias significativas en la longitud telomérica de los ratones TG en las diferentes edades $P= 0.2715$. $N=6$.

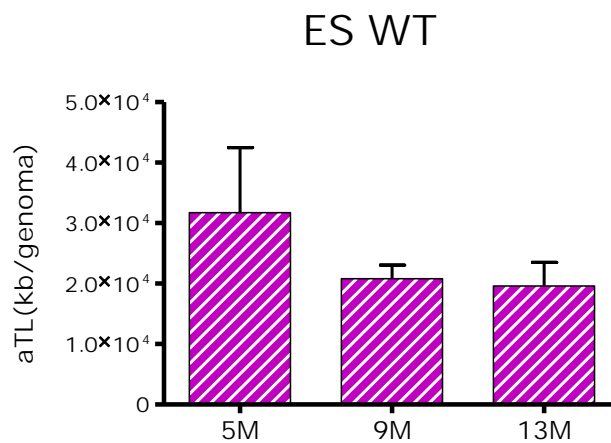


Fig. 24 Longitud del telómero en ES de ratones controles WT de 5, 9 y 13 meses de edad. No existen diferencias significativas en la longitud telomérica de los ratones WT en las diferentes edades $P= 0.3979$. $N=6$.

Se realizaron comparaciones de la longitud del telómero entre HC y ES de los animales TG y WT por edades. En la figura 25 se muestran los datos de la comparación entre los grupos de 5 meses de edad. Una prueba estadística de Kruskal Wallis estableció que hay diferencias significativas entre las medianas de los grupos $P=0.0091$. La prueba post-hoc de Dunn's determinó que hay diferencias significativas en la longitud del telómero entre el HC y ES de los animales TG y entre el HC y ES de los animales WT. $P<0.05$. Sin embargo no existen diferencias en el HC entre los grupos TG y WT ni en el ES entre los mismos grupos.

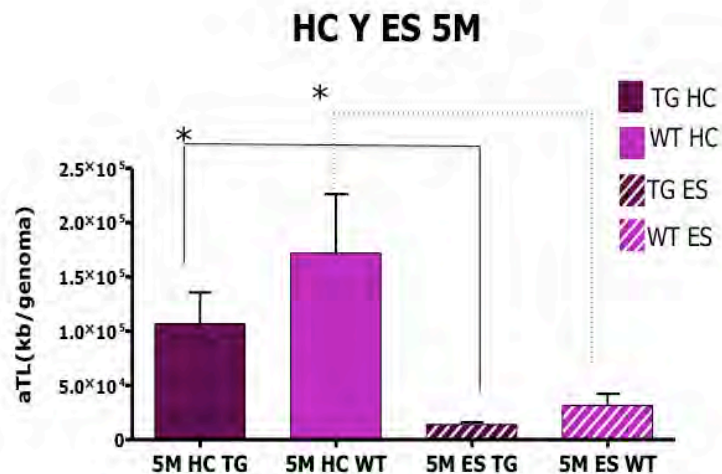


Fig. 25 Comparación de la longitud del telómero en HC y ES de ratones transgénicos TG y controles WT de 5 meses de edad. Existen diferencias significativas en HC y ES de ratones TG y WT de 5 meses de edad $P < 0.05$. No existe diferencias significativas entre HC de animales TG y WT ni en el ES de los mismos grupos. $N = 12$.

En la gráfica 26 se muestran los datos de la comparación entre los grupos de 9 meses de edad. Como lo mostró la prueba estadística de Kruskal Wallis $P = 0.0002$, sí existen diferencias significativas entre las medianas de los grupos; posteriormente se realizó una prueba post-hoc de Dunn's para determinar diferencias entre edades y grupos; existen diferencias significativas entre HC y ES de animales TG y WT de meses de edad $P < 0.05$. No existen diferencias significativas entre HC de ambos grupos TG y WT ni entre el ES de los mismos grupos.

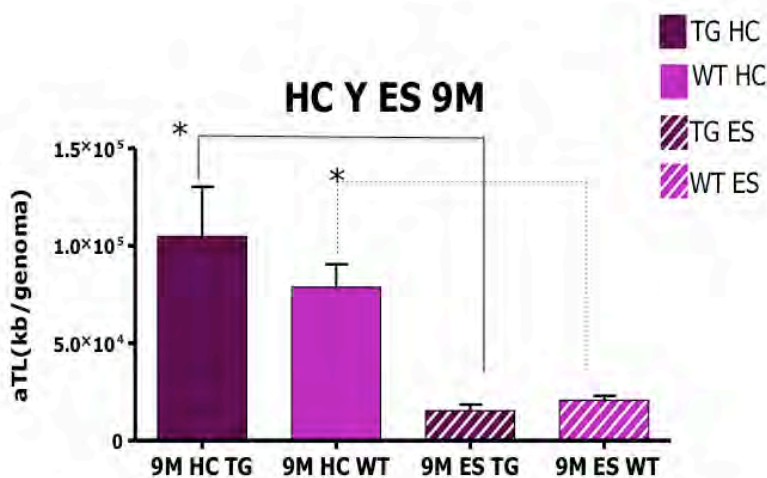


Fig. 26 Comparación de la longitud del telómero en HC y ES de ratones transgénicos TG y controles WT de 9 meses de edad. Existen diferencias significativas en la longitud telomérica del ES del grupo TG comparado con ES de los WT y el HC de ambos TG y WT $P < 0.05$, diferencias significativas en HC de TG y WT $P < 0.05$. $N = 12$

En la figura 27 se puede observar claramente una disminución de la longitud del telómero del hipocampo de animales TG comparados con su control WT; respecto al estriado no se observan cambios en la longitud telomérica; para corroborar estos datos obtenidos, se aplicó una prueba estadística de Kruskal Wallis para determinar diferencias entre grupos y se obtuvo una $p= 0.0026$; lo cual indica diferencias significativas entre las medianas de los grupos; posteriormente se realizó una prueba post-hoc de Dunn's para determinar diferencias entre edades y grupos; se obtuvieron diferencias significativas sólo entre HC y ES de animales TG y WT $P<0.05$. A pesar de lo que se puede observar en la gráfica, no existen diferencias significativas entre HC de TG y WT.

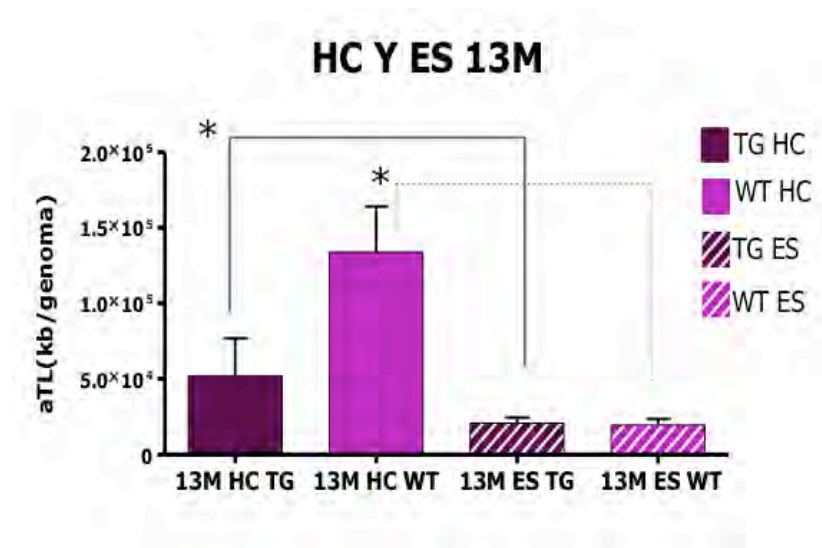


Fig. 27 Comparación de la longitud del telómero en HC y ES de ratones transgénicos TG y controles WT de 13 meses de edad. Se observan diferencias significativas entre HC y ES de los ratones TG y WT $P< 0.05$. No existen diferencias significativas en HC de animales TG y WT así como tampoco en ES de ambos grupos. $N=12$.

10.3 Evaluación del estrés oxidativo en Plasma, Hipocampo y Estriado

Para determinar si existía alguna relación de la longitud del telómero con el estrés oxidativo y la progresión de la enfermedad en los animales TG y WT hicimos una serie de pruebas para medir producción de ROS, peroxidación de lípidos TBA y funcionalidad mitocondrial MTT. Estas tres pruebas se realizaron simultáneamente en alícuotas de la misma muestra de tejido o plasma que se extrajo de cada animal.

- Evaluación de la producción de ROS.

Para evaluar la formación de ROS por fluorimetría en tejido se utilizaron homogenados de hipocampo y estriado de ratones TG y WT de 5 y 9 meses de edad y se obtuvo plasma de los mismos ratones para evaluar la formación de ROS en plasma sanguíneo, del cuál se emplearon 30 μL y se llevó a un volumen final de 100 μL con PBS 1x, se agregaron 5 μL de la solución de diclorofluoresceína-diacetato (DCF₂DA) a 75 μM ; se incubaron las muestras a 37°C en oscuridad, una vez terminada la incubación la formación de RSO se detectó por fluorescencia de

la diclorofluoresceína (DCF) en un fluorómetro a una longitud de onda de excitación de 480nm y emisión de 532.

En la figura 28 no se observan diferencias entre la producción de ROS en ES de ratones TG de 5 y 9 meses de edad; para asegurar que estas diferencias no fueran significativas se realizó una prueba estadística de Kruskal-Wallis $P= 0.2382$, lo cual indica que no existen diferencias significativas; es decir que la producción de ROS es muy similar en el estriado de ratones TG y WT a estas dos edades.

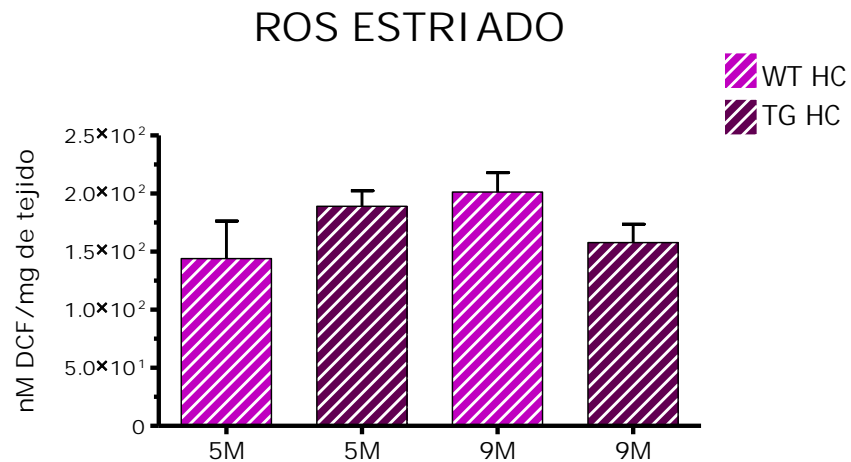


Fig. 28 Producción de ROS en Estriado de ratones transgénicos TG y controles WT de 5 y 9 meses de edad. No existen diferencias significativas en la producción de ROS en estriado de ratones TG y WT de 5 y 9 meses de edad $P > 0.05$. $N=12$

Realizamos además medición de ROS en HC de animales TG y WT de 5 y 9 meses de edad, para determinar diferencias significativas en la producción de ROS entre los grupos a diferentes edades, como se puede observar en la figura 29 existe diferencia en la producción de ROS entre grupos y edades; se realizó una prueba estadística de Kruskal-Wallis y se corroboró que existen diferencias significativas en las medianas de los grupos $P=0.0008$. Realizamos además una prueba estadística post-hoc de Dunn's para ver diferencias entre cada grupo; existen diferencias significativas entre grupos WT y TG de 5 meses de edad, WT de 5 meses y TG de 9 meses, WT de 9 meses y TG de 9 meses $P < 0.05$.

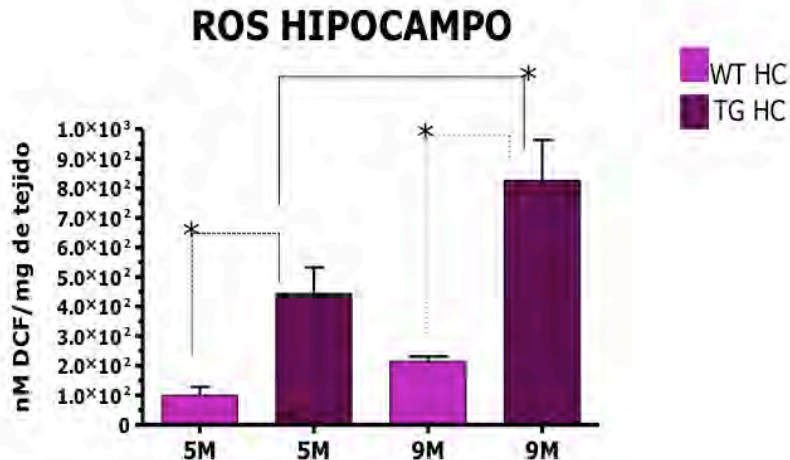


Fig. 29 Producción de ROS en Hipocampo de ratones transgénicos TG y controles WT de 5 y 9 meses de edad. Se observa aumento significativo en la producción de ROS en los animales TG de 9 meses de edad comparado con el mismo grupo pero de 5 meses de edad $P < 0.05$. No existen diferencias significativas en la producción de ROS en los animales WT de 5 y 9 meses de edad $P > 0.05$. $N=12$

Determinamos producción de ROS en plasma de animales TG y WT de 5 y 9 meses de edad, como se observa en la figura 30 existe un incremento en la producción de ROS en los animales TG de 9 meses de edad; realizamos una prueba estadística de Kruskal-Wallis y comprobamos que existen diferencias en las medianas de los grupos $P=0.0003$. Se realizó una prueba estadística post-hoc de Dunn's para ver diferencias entre cada grupo, de la cual obtuvimos un valor de $P < 0.05$, lo cual indica que existen diferencias significativas entre grupos WT y TG 5 de meses y WT de 5 y TG de 9 meses de edad.

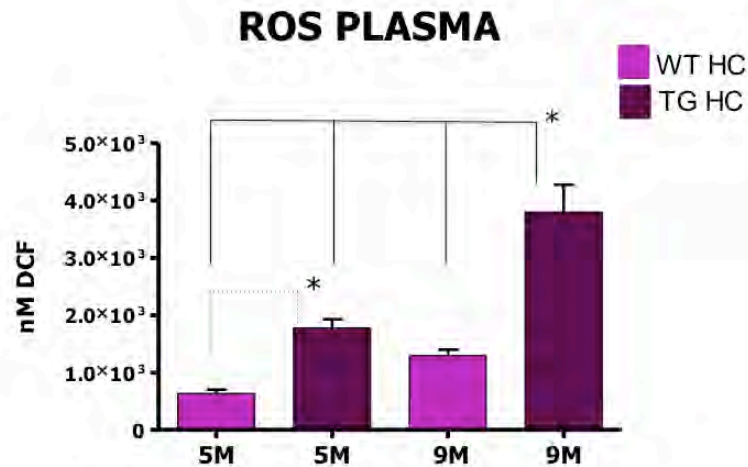


Fig. 30 Producción de ROS en plasma de ratones transgénicos TG y controles WT de 5 y 9 meses de edad. Aumento significativo en la producción de ROS en animales TG a los 9 meses de edad comparado con los de 5 meses y con los animales WT de 5 y 9 meses de edad $P < 0.05$. $N=12$.

- Determinación de peroxidación de lípidos.

La peroxidación de lípidos se evaluó por la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en HC, ES y plasma de animales TG y WT de 5 y 9 meses de edad, se tomaron 120 μ L del homogenado de hipocampo y estriado y se adicionaron 60 μ L de buffer PBS 1x y 120 μ L del reactivo TBA (0.75g de TBA + 15 g de ácido tricloroacético +2.54 de HCl concentrado). La solución final se colocó en un baño de ebullición (94°C) durante 20 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10, 500 rpm por 10 min y la densidad óptica del sobrenadante se determinó con un lector de placas Epc a una longitud de onda de 532nm. Los datos fueron expresados como absorbancia por mg de tejido. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por mg de tejido. Del mismo modo se evaluó la peroxidación de lípidos en plasma, se tomaron 60 μ L de plasma y se le adicionaron 30 μ L de PBS 1x y 120 μ L del reactivo TBA (0.75g de TBA + 15 g de ácido tricloroacético +2.54 de HCl concentrado). La solución final se colocó en un baño de ebullición (94°C) durante 20 min. La densidad óptica se determinó con un lector de placas Biotek a una longitud de onda de 532nm.

Encontramos diferencias entre la producción de TBA del HC y del ES de ratones TG y WT.

Como se observa en la figura 31 existe un incremento de MDA en los ratones TG de 9 meses de edad, para saber si este aumento era significativo estadísticamente realizamos una prueba de Kruskal-Wallis; la cual corroboró que existen diferencias en las medianas de los grupos $P=0.0048$. Posteriormente realizamos una prueba estadística post-hoc de Dunn's para ver diferencias entre cada grupo, existen diferencias significativas entre el grupo TG de 9 meses de edad y los demás grupos.

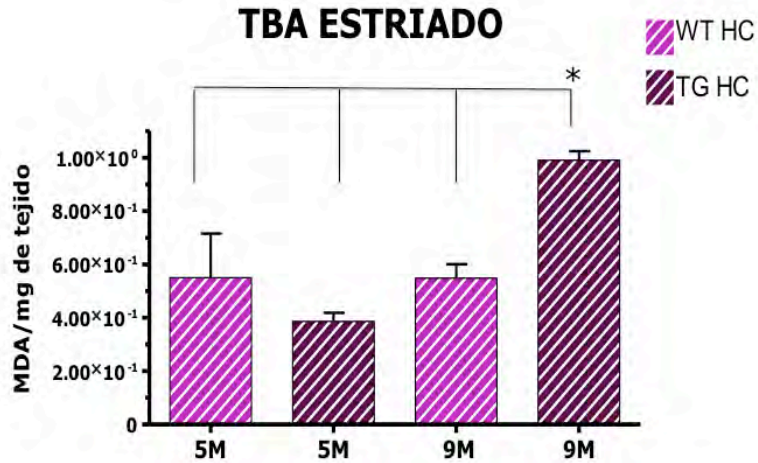


Fig. 31 TBA en Estriado de ratones transgénicos TG y controles WT de 5 y 9 meses de edad. Aumento significativo de MDA en ratones transgénicos TG de 9 meses de edad comparado con el mismo grupo de 5 meses de edad y los animales WT de 5 y 9 meses de edad $P < 0.05$. $N=12$

Se comparó la cantidad de MDA en HC de ratones TG y WT de 9 meses de edad, como se puede observar en la figura 32 existe un incremento de MDA en hipocampo de los ratones TG de 9 meses de edad; lo cual se corroboró mediante la prueba estadística de Kruskal-Wallis $P=0.0018$ que indica que existen diferencias significativas entre grupos. Posteriormente realizamos una prueba estadística post-hoc de Dunn's para ver entre que grupos existían estas diferencias; obtuvimos que existen diferencias significativas entre los grupos TG de 5 y 9 meses de edad, WT y TG de 5 meses de edad y TG de 9 meses de edad y todos los demás grupos $P < 0.05$.

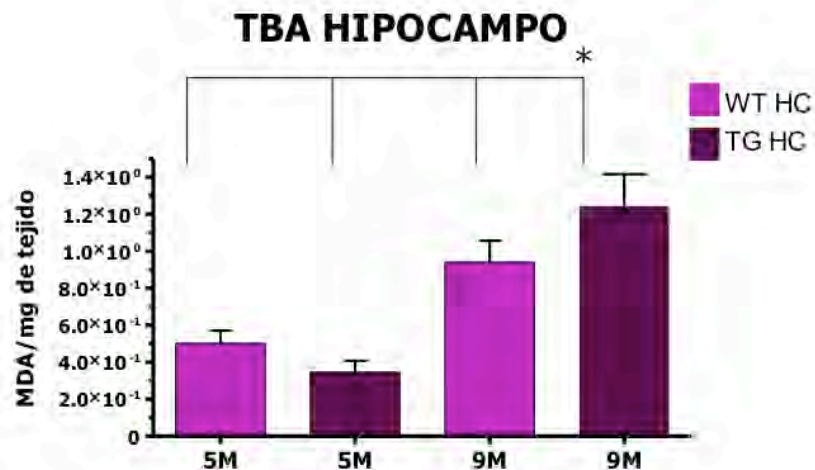


Fig. 32 TBA en Hipocampo de ratones transgénicos TG y controles WT de 5 y 9 meses de edad. Aumento de TBA en animales TG de 9 meses comparados con los de 5 meses de edad y los WT de 5 y 9 meses de edad $P < 0.05$. Diferencias significativas en TBA de TG y WT de 9 meses de edad $P < 0.05$. $N=12$

Continuamos con la determinación de peroxidación de lípidos en plasma sanguíneo de ratones TG y WT de 5 y 9 meses de edad. En la figura 33 se observa un incremento de MDA en plasma de los ratones TG de 9 meses de edad; para corroborar estos resultados realizamos una prueba estadística de Kruskal-Wallis; se obtuvo un valor de $P=0.044$ lo cual indica diferencias en las medianas de los grupos. Realizamos además una prueba estadística post-hoc de Dunn's para ver entre que grupos existían estas diferencias, sólo existen diferencias significativas entre el grupo TG de 9 meses de edad y todos los demás grupos $P < 0.05$.

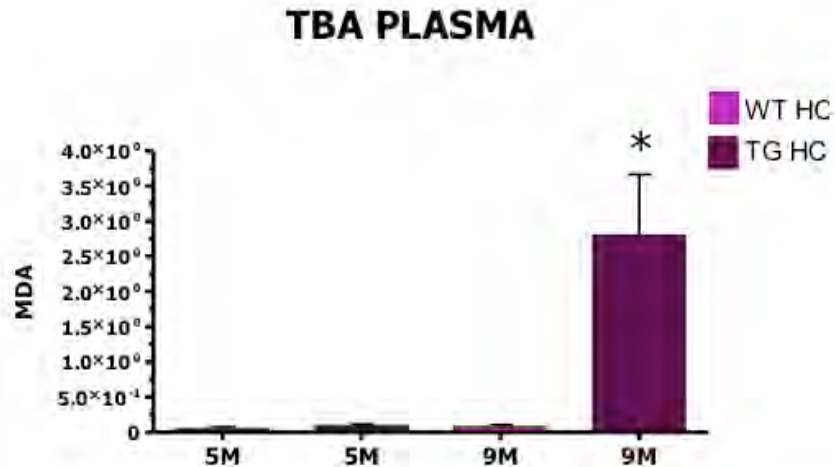


Fig. 33 TBA en Plasma de ratones transgénicos TG y controles WT de 5 y 9 meses de edad. Se observa un aumento significativo de TBA en plasma de animales TG de 9 meses de edad comparado con los demás grupos $P= 0.044$. $N=12$.

- Determinación de la funcionalidad mitocondrial.

Para evaluar la actividad mitocondrial se emplearon 100 μ L de homogenado de HC y ES, al cual se le agregaron 50 μ L de PBS 1x y 15 μ L de una solución de MTT (5mg/ml), estas muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C en oscuridad, una vez transcurrido el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se le agregó al botón o pellet 500 μ L de isopropanol-ácido, este botón se resuspendió en el isopropanol tomando un color morado. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 560nm en un lector de placas Epc.

Evaluamos la funcionalidad mitocondrial en HC y ES de los grupos TG y WT de 5 y 9 meses de edad. Observamos diferencias en la funcionalidad mitocondrial del HC y ES de los ratones TG y WT; como se puede observar en la figura 34 existe determinada reducción de formasán a MTT lo cual indica que la mitocondria aún conserva su funcionalidad en el estriado de los ratones TG de 5 meses de edad, con una posterior disminución de esta funcionalidad a los 9 meses de edad en estos mismos animales; mientras que en los ratones WT la funcionalidad mitocondrial es la misma a los 5 y 9 meses de edad. Para corroborar lo observado en la gráfica, se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis, que indica que existen diferencias en las medianas de los grupos, $P=0.0309$. Realizamos además una prueba estadística post-hoc de Dunn's para ver diferencias entre cada grupo; existen diferencias significativas entre el grupo TG de 5 meses de edad y los demás grupos.

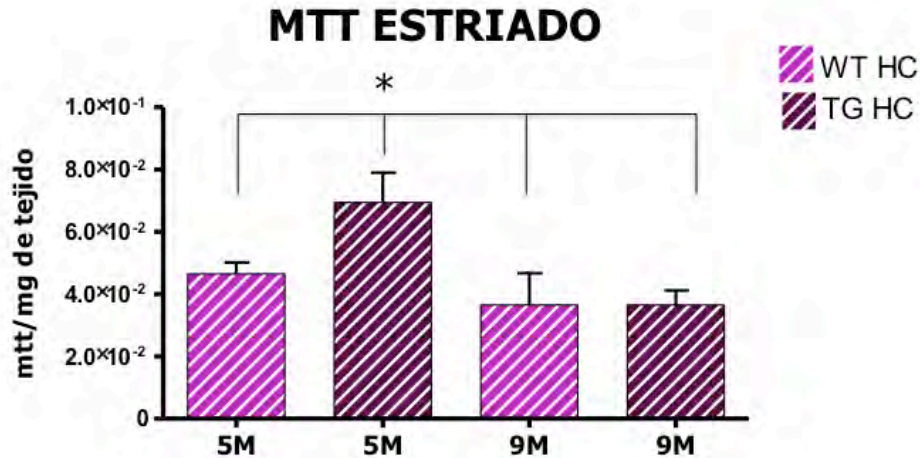


Fig. 34 MTT en Estriado de ratones transgénicos TG y controles WT de 5 y 9 meses de edad. El estriado de los animales TG de 5 meses tiene mayor funcionalidad mitocondrial comparado con los otros grupos $P= 0.0309$. $N=12$.

Como lo corroboran las pruebas estadísticas, el grupo de animales TG de 5 meses posee mayor funcionalidad mitocondrial comparado con los otros ratones del mismo grupo TG de 9 meses y los WT de 5 y 9 meses de edad; esto podría deberse a una respuesta o mecanismo de adaptación en el TG para contrarrestar el estrés oxidativo que sufre este modelo desde etapas tempranas.

Realizamos la misma evaluación de funcionalidad para el HC de ratones TG y WT de 5 y 9 meses de edad. Como se puede observar en la figura 35 los animales TG y WT de 5 meses poseen viabilidad mitocondrial normal; sin embargo a los 9 meses esta viabilidad se reduce de forma significativa en ambos grupos. Realizamos la prueba estadística de Kruskal-Wallis para corroborar que existían diferencias significativas y obtuvimos un valor de $P=0.0014$, lo que indica que existen diferencias entre grupos, para ver entre que grupos existían estas diferencias realizamos además una prueba estadística post-hoc de Dunn's y obtuvimos diferencias significativas en los grupos TG y WT de 5 meses contra los grupos TG y WT de 9 meses de edad, $P<0.05$; sin embargo estas diferencias no existen entre grupos de la misma edad $P>0.05$.

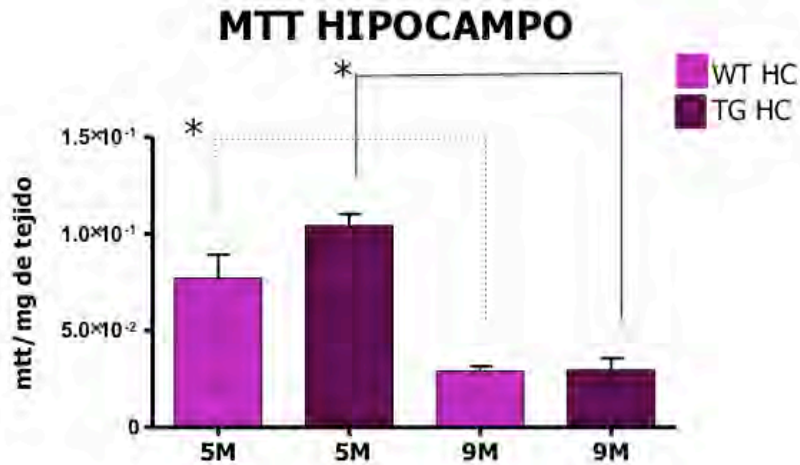


Fig. 35 MTT en Hipocampo de ratones transgénicos TG y controles WT de 5 y 9 meses de edad. Se observa mayor funcionalidad mitocondrial en los grupos WT y TG de 5 meses de edad y esta funcionalidad disminuye a los 9 meses de edad en ambos grupos $P < 0.05$. $N=12$.

10.4 Genotipificación

Se realizó la genotipificación mediante PCR de los ratones 3xTgAD y WT en los cuales se buscaron los genes APP, presenilina 1 y 2 (PS1 y PS2) y TAU. Se comprobó que los ratones utilizados sí correspondían al grupo indicado y que el grupo transgénico no perdió ninguno de los genes introducidos. Se presenta una foto representativa de los geles de agarosa al 2% en los que se señala el número de ratón del que se tomó la muestra y a qué grupo pertenecía (Fig.36 y 37)

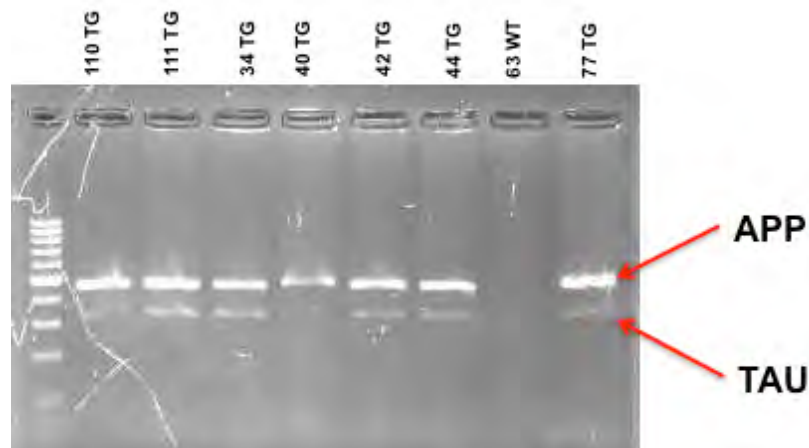


Fig. 36 Gel de agarosa al 2% se observan las bandas de APP y TAU de 500pb y 350 pb respectivamente. Los ratones transgénicos 3xTg-AD muestran las dos bandas, los ratones controles no transgénicos WT no presentan las bandas.

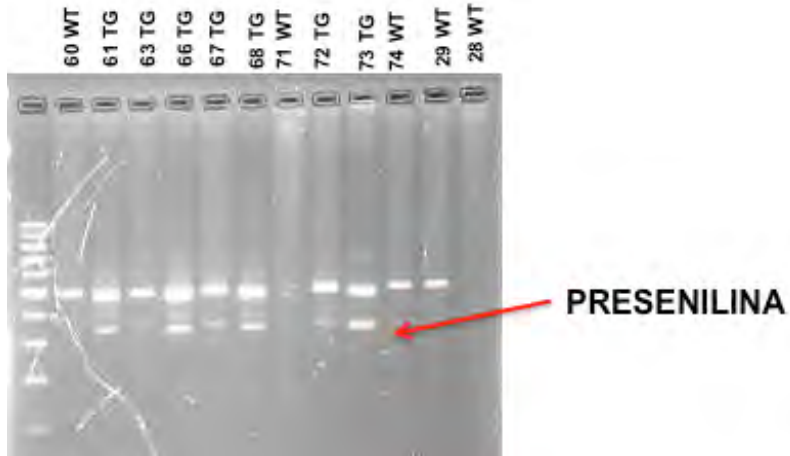


Fig. 37 Gel de agarosa al 1% se observan las bandas de PS1 y PS2 en los ratones transgénicos 3xTg-AD se ven tres bandas aproximadamente de 500, 300 y 250 pb en los ratones no transgénicos WT se ve una sola banda de 500 pb.

11. Discusión

La longitud del telómero es reducida con cada división celular y esta disminución varía en cada organismo, tejido e incluso tipo celular, el acortamiento telomérico puede resultar en fusión de los fragmentos teloméricos, lo que incrementa el riesgo de inestabilidad genómica que a su vez es un evento de iniciación en algunos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas. En específico en la enfermedad de Alzheimer se han reportado cambios en la longitud telomérica de células sanguíneas y en cerebro, aunque en el segundo caso han habido discrepancias entre los resultados obtenidos acerca de si la longitud disminuye o aumenta.

Observamos un decremento en la longitud del telómero de células de sangre periférica de los animales 3xTgAD en comparación con los controles WT. Esta diferencia podría estar relacionada con el incremento en el estrés oxidativo en éstos animales de acuerdo a la medición de peroxidación de lípidos (TBARs) y aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). De acuerdo a nuestros datos podemos inferir que el estrés oxidativo va en aumento a medida que avanza la edad de los ratones que desarrollarán la EA. En concordancia con nuestros datos, se sabe que el acortamiento telomérico además de ocurrir con cada división celular se ha visto afectada por factores ambientales como estrés psicológico y fisiológico, tabaquismo, obesidad y factores internos como el estrés oxidativo. Al respecto, se ha observado que la longitud del telómero se reduce después de realizar un tratamiento con H_2O_2 , que induce estrés oxidativo, en fibroblastos (Coluzzi *et al.* 2014).

En pacientes con la EA, Mecocci y colaboradores (2006) observaron un incremento de la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG), un marcador de estrés oxidativo en ADN, en los linfocitos de pacientes con la EA comparado con un grupo control. Estos resultados coinciden con los nuestros ya que en el grupo de ratones WT no hay un aumento significativo del estrés oxidativo respecto a la edad como en los ratones 3xTgAD, en los que el aumento en el estrés oxidativo es considerable.

Por otra parte, nuestros resultados sobre el decremento en la longitud telomérica en células de sangre periférica de los ratones 3xTgAD también coinciden con los reportados por Panossian y colaboradores en 2003, quienes reportaron una disminución en la longitud telomérica de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con la EA. Así mismo, Thomas y colaboradores en 2008, reportaron una disminución de la longitud telomérica de leucocitos de pacientes con la EA.

En cuanto a los resultados que obtuvimos en las mediciones de tejido, observamos que, la longitud telomérica, tanto de hipocampo como de estriado no cambia durante la progresión de la enfermedad en ninguno de los grupos (3xTgAD o WT). Sin embargo sí pudimos observar un incremento en la peroxidación de lípidos (TBARs), aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y decremento en la actividad mitocondrial (MTT) en el hipocampo de los ratones

3xTgAD, mientras que en los WT sólo observamos un aumento en la peroxidación de lípidos de los ratones de 9 meses de edad.

Al respecto existe un trabajo en el que se midieron niveles de 8OHdG en áreas corticales e hipocampales de pacientes con la enfermedad de Alzheimer para determinar si estos niveles 8OHdG correlacionaban con el daño oxidativo del ADN en la etiología de esta enfermedad; encontraron que los niveles de 8OHdG en el cerebro de los pacientes no fueron diferentes entre las áreas estudiadas y tampoco encontraron diferencias en los niveles de 8OHdG entre los pacientes con EA y sus controles. Es decir, que a pesar de la existencia de estrés oxidativo, no existe daño al ADN en estas estructuras y que el 8OHdG presente en altos niveles en los pacientes con EA no tiene una localización preferencial en las diferentes estructuras cerebrales.

Los autores de este trabajo establecen que la comparación del daño oxidativo al ADN, en estas áreas cerebrales, no es compatible con el papel del daño oxidativo al ADN en la etiología de la EA, consideran además que a pesar de que su trabajo no apoya un papel del daño oxidativo al ADN en la etiología de la EA tampoco toma en cuenta las diferencias locales en los niveles nucleares de 8OHdG entre las diferentes áreas cerebrales o entre los distintos tipos celulares o incluso la pérdida del DNA con daño oxidativo debido a muerte celular (Koppele, 1996). Nuestros resultados difieren en parte con lo que obtuvimos en este trabajo, ya que nosotros si observamos un incremento del estrés oxidativo en hipocampo y estriado de los ratones 3xTgAD de 9 meses de edad; pero coincide en que este daño oxidativo no afecta la longitud del telómero, no hay daño al ADN. En resumen nuestros resultados indican que hay un incremento diferencial en el estrés oxidativo dependiente de la progresión de la enfermedad de Alzheimer en el modelo murino para la EA 3xTgAD, pero este no parece afectar al ADN.

Nuestros resultados coinciden además con lo reportado por Franco y colaboradores (2006), en donde midieron la longitud telomérica de las zonas subcortical, granular e hipocampal en animales transgénicos para A β PP y sus controles y reportan que no hay cambios en la longitud telomérica a pesar de que éstos animales presentan acumulación del péptido β amiloide similar a la que se presenta durante la enfermedad de Alzheimer en humanos.

La ausencia de cambios en la longitud telomérica del hipocampo podría basarse en el hecho de como ya se ha reportado, regularmente hay neurogénesis en las zonas subventricular y subgranular del giro dentado hipocampal durante la adultez. Muchos estudios han demostrado que esta neurogénesis está involucrada en el aprendizaje y la memoria, lo que permitió generar la hipótesis de que el daño a la memoria durante el envejecimiento y debido a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, involucran una neurogénesis anormal. Específicamente para la EA existe evidencia de que hay un decremento en la neurogénesis. Además se ha visto que en esta enfermedad hay un incremento en la proliferación celular como medida para contrarrestar el incremento en la cantidad de la proteína beta amiloide soluble, β -42. Sin embargo,

muchas de estas nuevas neuronas mueren por la presencia de β -42 que genera un ambiente inapropiado para que estas neuronas maduren (Shruster y Offen, 2014).

Existe otro trabajo en el que se establece que la proliferación celular del giro dentado dorsal disminuye tanto en ratones macho 3xTgAD como en los WT a los 9 y 12 meses de edad (Rodríguez *et al.*, 2008) por lo que no se esperaría un acortamiento telomérico del hipocampo ya que hay una débil proliferación, lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo.

En este sentido, varios estudios en modelos animales para la enfermedad de Alzheimer han reportado que a pesar de que existe proliferación en la zona subgranular, muchas de estas neuronas no llegan a convertirse en neuronas maduras y que esto ocurre después del desarrollo de la patología de la enfermedad de Alzheimer y los síntomas clínicos de la enfermedad (Ming Wang *et al.*, 2010). En nuestro caso, la reducción de la neurogénesis provocaría que la longitud del telómero permaneciera constante debido a que no hay proliferación celular, uno de los principales mecanismos de acortamiento telomérico.

Existe además otro trabajo en el que se ha establecido que el acortamiento telomérico también reduce la neurogénesis en el giro dentado y perjudica el mantenimiento de neuronas post-mitóticas en ratones envejecidos deficientes de telomerasa (Rolyan *et al.*, 2011).

En cuanto a nuestras observaciones de la existencia de diferencias en la longitud telomérica en hipocampo con respecto al estriado tanto en los animales 3xTgAD como en los WT, podemos observar que el estriado tiene una menor longitud telomérica en ambos grupos y que esto es independientemente de la edad. Al respecto, ya se han observado diferencias significativas en la longitud de los telómeros en diferentes regiones del cerebro que, de acuerdo a los autores, sugiere niveles variables de envejecimiento de las células cerebrales. Ellos midieron la longitud telomérica en la sustancia nigra, hipocampo (HC), corteza prefrontal-dorsolateral, amígdala y núcleo acumbens de pacientes con desorden depresivo mayor, trastorno bipolar, esquizofrenia y sujetos control; encontraron variación en la longitud telomérica entre las diferentes estructuras cerebrales, pero no entre las diferentes enfermedades, la sustancia nigra y el hipocampo tenían los telómeros más largos y la corteza prefrontal-dorsolateral los más cortos (Zhang *et al.*, 2010). Nakura y colaboradores obtuvieron resultados similares en los que observaron diferente longitud telomérica en materia gris comparada con la materia blanca.

Finalmente existe otro trabajo en el que comparan los cambios en la longitud telomérica de diferentes tejidos: hígado, páncreas, pulmón y cerebro. Ellos encontraron que en el cerebro, la longitud telomérica permanece estable en ratas envejecidas, pero los demás tejidos presentan disminución de longitud telomérica asociada a la edad (Cherif *et al.*, 2003). Además de lo reportado por Franco y colaboradores (2006), que midieron la longitud telomérica de neuronas de hipocampo en ratones transgénicos A β PP y no encontraron diferencias entre estos ratones y sus controles No Tg, lo que concuerda con nuestros resultados en los que podemos ver una disminución en la

longitud telomérica en células de sangre periférica y ningún cambio en el tamaño del telómero del hipocampo o del estriado.

En humanos, el acortamiento telomérico a lo largo de la vida es afectado por el estilo de vida (fumar, obesidad y estrés psicológico) y por efectos a nivel genético y epigenético, por lo cual estos aspectos sugieren que la longitud telomérica puede ser un buen indicador del estatus general de salud y de la edad biológica de los individuos. Sin embargo también debemos tomar en cuenta que la variabilidad en la longitud telomérica entre diferentes tejidos, especies y células existe en los organismos y es un factor a considerar si lo que se pretende es establecer un marcador de la enfermedad. Nosotros, de acuerdo a los resultados obtenidos, consideramos que la longitud telomérica pueda ser un dato adicional para medir la progresión de la EA siempre y cuando las comparaciones sean en un mismo individuo. Por ello, no sugerimos la longitud del telómero como un marcador diagnóstico sino de progresión. Consideramos además, que estudios longitudinales del telómero pueden ser un valioso instrumento para caracterizar afectos positivos o negativos de ciertos tratamientos o cambios en el estilo de vida o progresión de la EA.

Debido a que en nuestro estudio solo pudimos observar una disminución de la longitud del telómero a los 13 meses por lo que no podemos asegurar que sea progresivo pero sí que es dependiente de la EA producida en nuestro modelo murino ya que los animales controles no presentan dicho cambio. Al parecer hay una relación estrecha entre el incremento del estrés oxidativo y el acortamiento del telómero en los ratones 3xTg-AD que no puede verse en los controles y que podría explicar el cambio en la longitud del telómero en células de sangre periférica que no puede verse en el tejido del sistema nervioso central. Consideramos que al continuar con este estudio y analizando muestras de ratones más viejos, podríamos observar una progresión en la disminución del telómero de los ratones transgénicos para así asegurar que es debido al avance de la EA.

En este modelo murino triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer, los cambios en la longitud telomérica de sangre periférica pueden deberse al incremento en el estrés oxidativo debido a la enfermedad; por otro lado, el mantenimiento de la longitud telomérica de tejidos tanto estriado como hipocampo puede deberse a la falta de la mitosis de las neuronas y la sustitución lenta de las células gliales en el estriado así como la disminución en la neurogénesis en los 3xTgAD. En general, la longitud de los telómeros se considera que es estable en el cerebro adulto sano (Zhang *et al.*, 2010).

En el caso del estriado e hipocampo, no sabemos y no ha sido reportado que el estrés oxidativo provoque daño a los telómeros en las poblaciones de células del sistema nervioso central, ni se sabe si ROS induce acortamiento de los telómeros en las neuronas y glía. Por lo tanto, aún no es posible establecer si el estrés oxidativo es una causa o un efecto de las enfermedades neurológicas. Lo que sí puede sugerirse, es que el acortamiento de los telómeros en los leucocitos

y microglía podría afectar indirectamente, la salud neuronal por comprometer las funciones normales de estas células inmunes dentro del cerebro (Eitan *et al.*, 2014), y que los cambios en la longitud telomérica de sangre periférica en la enfermedad de Alzheimer pueden deberse a una alta proporción de división celular en sangre y este mecanismo no se da en el cerebro en el que nosotros no obtuvimos diferencias significativas en la longitud telomérica del ni del hipocampo ni del estriado.

12. Conclusiones

- Se observó un decremento en la longitud del telómero en células de sangre periférica total en ratones 3xTgAD de 5 y 13 meses y WT de 13 meses de edad.
- Este decremento en la longitud telomérica de los ratones 3xTgAD puede estar relacionado con el incremento en el estrés oxidativo en sangre periférica que observamos en estos animales.
- En tejido, tanto estriado como hipocampo, no hay cambios en la longitud del telómero en los animales 3xTgAD o WT. Se observa un incremento en el estrés oxidativo de hipocampo que parece ser independiente al mantenimiento en la longitud del telómero del tejido; en estriado no existe un aumento del estrés oxidativo.
- La disminución de la longitud telomérica en células de sangre periférica podría ser un marcador de progresión de la enfermedad de Alzheimer además de los encontrados hasta ahora, pero no por si solo debido a la variabilidad entre individuos de esta medición en particular.
- La presencia de alteraciones estructurales o funcionales en células de sangre periférica de este modelo murino sugieren que la EA afecta de manera sistémica al individuo, a pesar de que hasta el momento la mayoría de los cambios patológicos hayan sido observados en cerebro.
- Este acortamiento telomérico podría estar relacionado con la patogénesis de la EA a través del estrés oxidativo y la inflamación.

13. Perspectivas

Se pretende medir actividad de la telomerasa para determinar si existen diferencias en la actividad de esta enzima durante la progresión de la Enfermedad de Alzheimer y como un posible factor que este influyendo en el acortamiento telomérico. Además, se finalizará con las mediciones de estrés oxidativo a los 13 meses de edad de los animales 3xTgAD y se realizarán mediciones de la longitud de telómero en células de sangre periférica de un grupo más de edad, 18 meses, para ver si la tendencia a la disminución de la longitud del telómero es indicativo de la progresión de la EA en estos animales.

14. Literatura citada

- Acosta, D., Brusco, L., Guglielmetti, P., Guerra, M., Mena, R., Nitrini, R., Santos, Z., Ventura, R. 2012. Editorial Medica Panamericana. 1era edición. México, Distrito Federal. La enfermedad de Alzheimer, diagnóstico y tratamiento: una perspectiva latinoamericana. pps 119.
- Alvarado-Esquivel, Cosme, Hernández-Alvarado, Ana Berthina, Tapia-Rodríguez, Rosa Oralia, Guerrero-Iturbe, Ángel, Rodríguez-Corral, Karina, Estrada Martínez, Sergio. 2004. Prevalence of dementia and Alzheimer's disease in elders of nursing homes and a senior center of Durango City, Mexico. *BMC Psychiatry*. 18;4:3.
- Andrews, N., Fujii, H., Goronzy, J., Weyand, C. 2010. Telomeres and Immunological Diseases of Aging. *Gerontology*. 56:390-403.
- Barbara, Kosciolk, Kriton, Kalantidis, Martin, Tabler, Peter, Rowley. 2003. Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2:209-216.
- Blackburn, E.H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* 350: 569-573.
- Blasco, A., y Vera, Elsa. 2012. Beyond average: potential for measurement of short telomeres. *Aging*. 4:6, 379-392.
- Beckman, KB., Ames, BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiology Reviews*. 78:547-581.
- Butterfield, D.A., y Sultana, R. 2011. Methionine-35 of A β (1-42): Importance for oxidative stress in Alzheimer Disease. *Journal of Amino Acids*.
- Cawthon, R.M., Smith, K.R., O'Brien, E., Sivatchenko, A., Kerber, R.A. 2003. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *The Lancet*. 361: 393-395.
- Cherif, H., Tarry, J.L., Ozanne, S. E., Hales, N. 2003. Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acids Research*. 31 (5): 1576-1583.

- Coluzzi, E., Colamartino, M., Cozzi, R., Leone, S., Meneghini, C., O'Callaghan, N., Sgura, A. 2014. Oxidative Stress Induces Persistent Telomeric DNA Damage Responsible for Nuclear Morphology Change in Mammalian Cells. *Oxidative Stress: Telomere and Chromosome Damage*. 9: 1-12.
- Czech, C., Tremp, G., Pradier, L. 2000. Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Progress in Neurobiology*. 60: 363-384.
- de Souza-Pinto, N.C., Wilson, D.M., Stevnsner, T.V., Bohr, V.A. 2008. Mitochondrial DNA, base excision repair and neurodegeneration. *DNA Repair*. 7(7); 1098-109.
- Eitan, Erez, Hutchison, Emmette, Mattson, Mark. 2014. Telomere Shortening in Neurological Disorders: An Abundance of Unanswered Questions. *Trends Neuroscience*. 37(5): 256-263.
- Flanary, B., Streit, W. 2005. Effects of Axotomy on Telomere Length, Telomerase activity and Protein in Activated Microglia. *Journal of Neuroscience Research*. 82:160-171.
- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Sczufca, M. 2005. Alzheimer Disease International. *Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study*. *The Lancet*. 366(9503); 2112-2117.
- Ferri, C.P., Sousa, Renata, Albanese, Emiliano, Ribeiro, Wagner, S., Honyashiki, Mina. 2009. Informe Mundial sobre el Alzheimer. Resumen Ejecutivo Alzheimer's Disease International. 2-21.
- Frei, B. 1994. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am J Med*. 97:5-13.
- Gilson, E., Géli, V. 2007. How Telomeres are Replicated. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 8: 825-838.
- Giulian, D. 1999. Microglia and the Immune Pathology of Alzheimer Disease. *Am. J. Hum. Genet*. 65: 13-18.

- Grönholm, P., Rinne, J., Laine, M. 2010. Learning and forgetting new names and objects in MCI and AD. *Neuropsychologia*. 48: 1079-1088.
- Hawkins, DB., Graff-Radford, NR. 2007. The Ability to Pun May be Retained in Alzheimer Disease. *Neurocase*. 13(1):50-4.
- Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*. 344:721-724.
- Halliwell, B. y Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*. 142, 231-255.
- Hernández Fernández Rolando A. Telómeros y Telomerasas. 1999. *Rev. Cubana Investigación Biomédica*. 18 (2) 121-129.
- Ing. Cuauhtémoc Cárdenas Solórzano, Lic. Clara Jusidman B., Lic. María Magdalena Gómez Rivera, Pablo Enrique Yanes Rizo, Erasmo Cisneros Paz, Mtra. Elizabeth Caro López, Lic. Lilia Mendoza Martínez, Carlos Plascencia Fabila. 1999. La Enfermedad de Alzheimer. Recomendaciones para un cuidado de calidad. Manual de atención. Dirección General de Equidad y Desarrollo Social / Asociación Mexicana de Alzheimer y Enfermedades Similares, A.C. Impreso en Corporación Mexicana de Impresión, S.A. de C.V. (COMISA) Gral. Victoriano Zepeda 22, Col. Observatorio, México, D.F. 41pp.
- Jasekelioff, M., Muller, F.L., Paik, J.H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadiñanos, J., Horner, J.W., Maratos-Flier, E., DePinho, R.A. 2011. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase deficient mice. *Nature*. 469(7328): 102-106.
- Johnson, S., Schmitz, T., Moritz, C., Meyerand, M., Rowley, H., Alexander, A., Hansen, K., Gleason, C., Carlsson, C., Ries, M., Asthana, S., Chen, K., Reiman, E., Alexander, G. 2006. Activation of brain regions vulnerable to Alzheimer's disease: the effect of mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging*. 27: 1604-1612.
- Koppele Te, J.M., Lucassen, P. J., Sakkee, A.N., Asten Van, J. G., Ravid, R., Swaab, D.F., Bezooijen Van, C.F.A. 1996. 8OHdG Levels in Brain Do Not Indicate Oxidative DNA Damage in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*. 17 (6): 819-826.

- Lavados, M., Guillón, M., Mujica, M.C., Rojo, L.E., Fuentes, P., Maccioni, R.B. 2008. Mild cognitive impairment and Alzheimer patients display different levels of redox-active CSF iron. *Journal Alzheimers Disease*. 2:225-32.
- Lucy, G., Andrews, Trygve O. 2008. *Methods of Telomerase Inhibition*. National Institutes of Health. *Methods Molecular Biology*. 405: 1-8.
- Lukens, J.N., Deerlin, V.V., Clark, C.M., Xie, S.X., Johnson, F.B. 2009. Comparisons of telomere lengths in peripheral blood and cerebellum in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*. 5: 463-469.
- Maccioni, R.B., Rojo, LE, J.A., Kuljis, R.O. 2009. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci*. 1153: 240-6.
- Machlin, L.J., Bendich, A. 1987. Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J*. 1:441-445.
- Meccoci, P., Polidori, M.C., Ingegni, T., Cherubini, A., Chionne, F., Cecchetti, R., Senin, U. 1998. Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients. *Neurology*. 51: 1014-1017.
- Meraz-Ríos, M.A., Lira-De León, K., Campos-Peña, V., De Anda-Hernández, M., Mena López, R. 2010. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. 112 1353-1367.
- Moon, IK., Jarstfer, MB. 2007. The human telomere and its relationship to human disease, therapy, and tissue engineering. *Front Biosci*. 1: 12: 4595-620.
- Noguchi, N., Niki, E. 1999. *Chemistry of active oxygen species and antioxidants*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 3-20.
- Oddo, S., Caccamo, S., Shepherd, J., Murphy, M., Golde, T., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M., Akbari, Y. y LaFerla, F. 2003. Triple-Transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular AB and synaptic dysfunction. *Neuron*. 39: 409-421.

- Oleinick, N.L., Chiu, S.M., Friedman, L.R., Xue, L.Y., Ramakrishnan, N. 1986. DNA-protein cross- links: new insights into their formation and repair in irradiated mammalian cells. *Basic Life Science*. 38:181-192.
- Panossian, L.A., Pkorter, V.R., Valenzuela, H.F., Zhu, X., Reback, E., Masterman, D., Cummings, J.L., Effros, R.B. 2003. Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiology of Aging*. 24: 77-84.
- Patten, D., Germain, M., Melissa, A., Slack, K., Slack, R. 2010. Reactive Oxygen Species: Stuck in the Middle of Neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*. 20 S357-S367.
- Querfurth, H. y LaFerla, F. 2010. Mechanisms of disease: Alzheimer disease. *The new England journal of medicine*. 362: 329-344.
- Ries, M., Schmitz, T., Kawahara, T., Torgerson, B., Trivedi, T., Johnson, S. 2009. Task-dependent posterior cingulate activation in mild cognitive impairment. *Neuroimage*. 29: 485-492
- Rivas-Arancibia, S., Gallegos-Ríos, C., Gómez-Crisostomo, N., Ferreira-Garcidueñas, E., Briseño, D., Navarro, L., Rodríguez-Martínez, E. 2011. Oxidative Stress and Neurodegenerative Disease. *Neurodegenerative Diseases-Processes, Prevention, Protection and Monitoring*. Dr. Raymond Chuen-Chung Chang (Ed.) (3): 53-88.
- Rodríguez, J.J., Jones VC., Tabuchi, M., Allan, S.M., Knight, E.M., LaFerla, F.M., Oddo, S., Verkhratsky, A. 2008. Impaired Adult Neurogenesis in the Dentate Gyrus of a Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer disease. *PLoS ONE*. 3 (8): 1-8.
- Rodríguez, M. y Rodríguez, W. 2006. Métodos físico-químicos en Biotecnología. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. II; 2-55.
- Rojo, L.E., Sjöberg, M.K., Hernández, P., Zambrano, C., Maccioni, R.B. 2006. Roles of cholesterol and lipids in the etiopathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-17.
- Rolyan, H., Scheffold, A., Heinrich, A., Begus-Nahrmann, Y., Langkopf, B.H., Höltner, S.M., Vogt-Weisenhorn, D.M., Liss, B., Wurst, W., Lie, D.C., Thal, D.R., Biber, K., Rudolph, K.L. 2011. Telomere shortening reduces Alzheimer's disease amyloid pathology in mice. *Brain A Journal of Neurology*. 134: 2044-2056.

- Rudbeck, L., Dissing, J. 1998. Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, bucal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *Biotechniques*. 25: 588-592.
- Shaftel, S., Griffin, T., O'Banion, K. 2008. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *Journal of neuroinflammation*. 5:7 1-12.
- Selkoe, D. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiological reviews*.81: 741-766.
- Shruster Adi, Offen Daniel. 2014. Targeting neurogenesis ameliorates danger assessment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*. 261: 193-201.
- Sisodia, S.S. y Tanzi R.E. 2010. Springer Science Business Media, LLC, 1era edición, New York, EEUUA. Alzheimer's disease Advances in genetics, molecular and celular biology. 286pp.
- Thomas, P., O'Callaghan, N.J., Fenech, M. 2008. Telomere length in white blood cells, buccal cells and brain tissue and its variation with ageing and Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*. 129: 183-190.
- Valasek, MA., Repa, JJ. 2005. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 29:151-159.
- Wang, JM., Singh, C., Liu, L., Irwin, RW., Chen, S., Chung, EJ., et al. 2010. Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Nat Acad Sci USA*. 107:6498–503.
- Wimo, A., Winblad, B., Jonsson, L. 2007. An estimate of the total worldwide societal costs of dementia in 2005. *Alzheimer's and Dementia*. (3):81-91.
- Zglinicki, Thomas. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences*. 27 (7): 339-344.
- Zhang, Dandan., Cheng, Lijun., Craig, David., Redman, Margot., Liu, Chunyu. 2010. Cerebellar Telomere Length and Psychuatric Disorders. *Behaviour Genetics*. 40 (2): 1-10.
- Zhang, P., Dilley, C., Mattson, M.P. 2007. DNA damage responses in neural cells: focus on the telomere. *Neuroscience*. 145: 1439-1448.

- Zhu, H., Belcher, M., Van derHarst, P. 2011. Healthy aging and disease: role for telomere biology. *Clinical Science*. 120: 427–440.