



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Biología Experimental

MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA TOXICIDAD DEL  
PEPTIDO  $\beta$ -AMILOIDE EN TERMINALES NERVIOSAS  
AISLADAS DE RATAS VIEJAS. PAPEL DE LA ACTIVIDAD  
MITOCONDRIAL

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

**P R E S E N T A**

Michael Eduard Wasung de Lay

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**      **DRA. ANA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**COMITÉ TUTORAL:**                      **DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO**  
**INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**  
**DR. ROLANDO HERNANDEZ MUÑOZ**  
**INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**

**MÉXICO, D.F.**

**AGOSTO 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Biología Experimental

MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA TOXICIDAD DEL PEPTIDO  $\beta$ -  
AMILOIDE EN TERMINALES NERVIOSAS AISLADAS DE RATAS VIEJAS.  
PAPEL DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

**P R E S E N T A**

Michael Eduard Wasung de Lay

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**      **DRA. ANA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**COMITÉ TUTORAL:**                      **DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO**  
**INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**  
**DR. ROLANDO HERNANDEZ MUÑOZ**  
**INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**

**MÉXICO, D.F.**

**AGOSTO 2013**

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de marzo de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **WASUNG DE LAY MICHAEL EDUARD** con número de cuenta **507010803** con la tesis titulada **"MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA TOXICIDAD DEL PEPTIDO  $\beta$ -AMILOIDE EN TERMINALES NERVIOSAS AISLADAS DE RATAS VIEJAS, PAPEL DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA CLORINDA ARIAS ALVAREZ**:

Presidente: DRA. ANGELICA ZEPEDA RIVERO  
Vocal: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO  
Secretario: DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO  
Suplente: DR. JOSE FERNANDO PEÑA ORTEGA  
Suplente: DR. ROLANDO HERNANDEZ MUÑOZ

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud de la alumna, con base en lo establecido en el Artículo 25 y acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, del Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente.

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de Abril de 2013.

*María del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

Agradezco primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.

Se agradece al CONACYT por la beca otorgada.

Agradezco al Comité Tutorial: Dra. Clorinda Arias, Dra. Lourdes Massieu y Dr. Rolando Hernández.

A mi madre, padre y hermano, por el amor que me han dado toda la vida.

A Hélène por tu amor, bondad y cariño incondicional.

A la Dra. Clorinda Arias por el gran apoyo que me brindo durante todo este tiempo y su infinita paciencia. Tienen Usted mi más profunda admiración y respeto. Muchas gracias por dejarme formar parte de su Laboratorio y de su selecto grupo de alumnos, somos muy afortunados.

A mi abuelo, Rocío, Tante, Therese y Tío Mauricio por su comprensión y disposición de siempre.

Al Dr. Rolando Hernández y al Dr. Emilio Rojas, gracias por permitirme realizar mis experimentos en su laboratorio y por su disposición.

También doy gracias a mis sinodales: Dra. Angélica Zepeda, Dr. Emilio Rojas, Dra. Lourdes Massieu y Dr. Fernando Peña por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y su asesoría.

A Paty por su apoyo, comprensión y paciencia.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio, Ricardo, Octavio, Karina, David, Rigoberto, Pamela, Erika, Eva, Abril y Andrea que encarnan el brillante porvenir de la Ciencia en México. A mis amigos de la carrera y de toda la vida en las buenas y en las malas: Pieter, Philip, Dylan, Brian, Caro, Marianne, Aldo, Lalo, Andrés, George, Ricalde, Adolfo, Jaime, y Oscar.

**Dedicado a mi padre**



## ÍNDICE

Índice de abreviaturas .....	1
I. Resumen .....	3
II. Abstract .....	4
III. Introducción.....	5
La proteína $\beta$ -amiloide y la hipótesis amiloidogénica.....	8
Disfunción mitocondrial inducida por el péptido $\beta$ amiloide.....	10
Estrés oxidativo en la EA .....	11
Daño sináptico y EA.....	12
Modelos experimentales de la EA .....	14
IV. Planteamiento del problema .....	16
V. Hipótesis .....	16
VI. Objetivos .....	17
VII Métodos.....	18
VII.1. Obtención de los sinaptosomas .....	18
VII.2. Ensayo de reducción de MTT .....	19
VII.3. Consumo de oxígeno.....	19
VII.4 Análisis de la actividad del citocromo oxidasa.....	21
VII.5. Cuantificación de las especies reactivas de oxígeno.....	22
VII.6. Análisis de terminales sinápticas por microscopía electrónica .....	22
VIII.7. Análisis estadístico .....	23

VIII. Resultados.....	24
VIII.1 La actividad óxidorreductora mitocondrial esta disminuida en sinaptosomas de ratas viejas, y en presencia de la $\beta$ A se exagera esta disminución.....	24
VIII.2 La edad y el péptido $\beta$ A aumentan el consumo de oxígeno de los sinaptosomas de ratas jóvenes y viejas .....	25
VIII.3. La edad y el péptido $\beta$ A muestran una tendencia en aumentar la actividad del citocromo oxidasa en los sinaptosomas aislados de corteza e hipocampo .....	26
VIII.4. La edad y la presencia de $\beta$ A aumentan las ROS en los sinaptosomas obtenidos de ratas jóvenes y viejas .....	27
VIII.5. Los sinaptosomas obtenidos de ratas viejas muestran daño ultraestructural en comparación con los sinaptosomas obtenidas de ratas jóvenes.....	28
IX. Discusión .....	31
X. Conclusiones.....	38
XII. Bibliografía .....	39

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABAD: Alcohol deshidrogenasa

AICD: Dominio amiloideo intracelular (siglas en ingles)

APLP: Proteína precursora de amiloide semejante (siglas en ingles)

APOE4: Apolipoproteína E4

APP: Proteína precursora de amiloide (siglas en ingles)

ATP: Adenosin Trifosfato

$\beta$ A: Proteína  $\beta$ -amiloide

BACE-1: Enzima del metabolismo amiloidogénico del APP (siglas en ingles)

C83: Fragmento intracelular C-terminal

COX: Citocromo oxidasa

DCL: deterioro cognitivo leve

DHR: Dihidrorodamina-123

DSM-IV: Manual de diagnóstico estadístico (siglas en ingles)

EA: Enfermedad de Alzheimer

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

ICDH: Isocitrato deshidrogenasa

KGDH:  $\alpha$  cetoglutarato deshidrogenasa

mtDNA: DNA mitocondrial

MTT: 3-(3,5-dimetilitiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazodio

NINCDS: Instituto Nacional de Enfermedades Neurológicas, Comunicativas y Vasculares  
(siglas en ingles)

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Anión superóxido

OH<sup>-</sup>: Radical hidroxilo

PDH: Piruvato deshidrogenasa

ROS: Especies reactivas de oxígeno (siglas en ingles)

RPM: Revoluciones por minuto

sAPP  $\alpha$ : Fragmento soluble del APP N-terminal (siglas en ingles)

TgMAPP: ratones transgénicos con presencia de proteína precursora de amiloide mutante.

## I. RESUMEN

La proteína  $\beta$ -Amiloide ( $\beta$ A) es el principal componente de las placas seniles, que constituyen uno de los marcadores histopatológicos de la Enfermedad de Alzheimer (EA). Se sabe que la  $\beta$ A está involucrada en la inducción de estrés celular, la perturbación de la concentración intracelular de calcio y la activación de vías apoptóticas en neuronas *in vitro*. Sin embargo, se desconoce el papel que tienen algunos cambios bioquímicos asociados con el envejecimiento celular en estos procesos. Dado que las terminales sinápticas son especialmente susceptibles al daño inducido por la  $\beta$ A y que en el envejecimiento ocurre una reducción paulatina en la función mitocondrial, en el siguiente trabajo se evaluó el efecto de la exposición al fragmento  $\beta$ A 25-35 sobre la actividad mitocondrial, la generación de las especies reactivas de oxígeno y la morfología de terminales sinápticas aisladas (sinaptosomas) de corteza cerebral e hipocampo de ratas jóvenes (2-3 meses) viejas (18-24 meses). Para valorar el papel del envejecimiento sobre los efectos del péptido  $\beta$ A sobre la actividad oxidoreductora mitocondrial, se utilizó la técnica colorimétrica de reducción de MTT. Se observó que los sinaptosomas aislados de ratas jóvenes presentaron una mayor actividad oxidoreductora mitocondrial que los obtenidos de ratas viejas, y que en presencia de  $\beta$ A 25-35 esta disminución se exagera. Por estudios de oximetría se observó que los sinaptosomas de ratas viejas mostraron un aumento significativo en el consumo de oxígeno y una tendencia hacia una mayor actividad de la citocromo oxidasa durante la incubación con la  $\beta$ A 25-35. También se reporta que el péptido  $\beta$ A 25-35 incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno en los sinaptosomas obtenidos de ratas viejas, y particularmente los que provienen del hipocampo. Además, se muestran cambios ultraestructurales en los sinaptosomas de ratas viejas consistentes en la presencia de una membrana mitocondrial de mayor grosor y con mayor desarreglo de las crestas en comparación con los sinaptosomas de ratas jóvenes. Estos cambios se acentuaron al agregar el péptido  $\beta$ A 25-35. El análisis de estos resultados muestra que los efectos del  $\beta$ A 25-35 en sinaptosomas se exageran con la edad y se relacionan con un decremento en la función oxido-reductora mitocondrial y mayor acumulación de radicales libres. El aumento en el consumo de oxígeno en los sinaptosomas obtenidas de ratas de viejas en presencia del  $\beta$ A 25-35, sugiere un desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial.

Se concluyó que en el envejecimiento se presentan cambios de la función mitocondrial en terminales sinápticas que pueden incrementar la vulnerabilidad al daño inducido por la  $\beta$ A.

## II. ABSTRACT

Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) peptide is the principal component of amyloid plaques that are characteristic pathologic findings in Alzheimer's Disease (AD). *In vitro* experiments have shown that  $A\beta$  is involved with the induction of oxidative stress, intracellular calcium disruption and apoptosis of neurons; however it is unknown how cellular aging is involved with these factors. Due to the fact that synapses are susceptible to the damage induced by  $A\beta$  and that aging causes a slow reduction in mitochondrial activity, we decided to compare the mitochondrial activity, the generation of reactive oxygen species (ROS) and the ultrastructural changes of synaptosomes isolated from the cerebral cortex and hippocampus of young (2-3 months) and old rats (18-24 months) exposed to  $A\beta$  25-35.

Evaluation of synaptosomal mitochondrial redox capacity was assessed by the MTT reduction technique. We observed that synaptosomes isolated from young rats showed a higher MTT reduction in comparison to old rats. This reduction was exacerbated when synaptosomes were incubated with  $A\beta$  25-35. The rate of synaptosomal oxygen consumption and cytochrome oxidase activity was measured in a thermostated Clark-type oxygen electrode. We observed that synaptosomes isolated from older rats and incubated with  $A\beta$  25-35 had higher oxygen consumption and a higher tendency for cytochrome oxidase activity. We also observed more ROS production in synaptosomes isolated from old rats, and that the presence of  $A\beta$  25-35 increased ROS in both age groups. Ultrastructural changes of synaptosomes isolated from old rats showed swollen mitochondria with a dilated matrix in comparison to the mitochondrial architecture of synaptosomes isolated from young rats. These findings were exacerbated when synaptosomes were incubated with  $A\beta$  25-35. These results suggest that  $A\beta$  25-35 and aging are capable of changing mitochondrial functioning in synaptosomes. The toxicity of  $A\beta$  25-35 is exacerbated in older rats and correlates with a reduced mitochondrial redox activity and an increase in ROS production. We observed that oxygen consumption and cytochrome oxidase activity is increased in synaptosomes isolated from old rats and with  $A\beta$  25-35 incubation as a result of a possible proton leak.

We conclude that aging and the presence of  $A\beta$  25-35 induce changes in mitochondrial functioning in synaptosomes, and the combination of both exacerbates the mitochondrial dysfunction and the vulnerability of synapses that may have a role in the synaptic damage observed in AD.

### III. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso que conlleva a cambios biológicos incluyendo modificaciones de la función neuronal que pueden generar alteraciones en las habilidades cognitivas (den Dunnen y cols, 2008). Un grupo selecto de individuos presentan un envejecimiento “exitoso” caracterizado por tener cambios mínimos en la cognición y en diversos parámetros fisiológicos. Otros individuos pueden desarrollar cambios cognitivos con la edad que varían de intensidad, lo que los incluye en la categoría de envejecimiento “no exitoso” (Rowe y Kahn, 1987). Otro grupo de individuos con edad avanzada presentan alteración mínima en uno o más dominios cognitivos alterando su habilidad para llevar a cabo las actividades de la vida diaria sin llegar a la demencia. Esta categoría se conoce como deterioro cognitivo leve (DCL) (Barnes y cols, 2002). En casos más severos, durante el envejecimiento se pueden desarrollar diversas enfermedades crónico-degenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA). La EA es un problema de salud pública que afecta al 2% de la población en países industrializados y se calcula que para el año 2040 la incidencia aumentará tres veces (Vincent y cols, 2010). Actualmente más de 35 millones de personas a nivel mundial la padecen siendo la causa más común de demencia (Herbert y cols, 2003). En el año 2004 la Secretaría de Salud reportó 360 mil casos en México (Gutierrez, 2010). A través de estimaciones indirectas con modelos epidemiológicos ha sido posible calcular que la prevalencia de la EA en México podría estar alrededor del 5% entre los sujetos mayores de 60 años (Gutierrez LM, 2010).

Se ha señalado que el nivel educativo y el tabaquismo pueden influir en el riesgo de padecer EA (Rusanen y cols, 2010; Reitz y cols 2011) y algunos estudios sugieren que alteraciones sistémicas como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus y la obesidad predisponen esta enfermedad, así como antecedentes de traumatismo cráneo-encefálico (Whitmer y cols, 2008; Raji y cols, 2010; Rönneima y cols 2011). Sin embargo, hasta el momento el principal factor de riesgo para la EA es la edad, sin que se reconozca claramente qué cambios particulares del envejecimiento contribuyen a desencadenar esta patología. Al aumentar la esperanza de vida y con una población cada vez mayor de 65 años, se vuelve imperativo el estudiar los mecanismos por los cuales las funciones

cognitivas se alteran (Herbert y cols, 2003). Se requiere un mayor entendimiento de los eventos biológicos involucrados con la edad y como afectan la función cerebral global para que esta pueda ser tratada de manera más efectiva.

La EA es un padecimiento neurodegenerativo (Herbert y cols, 2010) que se caracteriza por pérdida progresiva de la memoria y cambios en el lenguaje, la personalidad, y el estado de ánimo (McKhann y cols, 2011). El cuadro clínico suele debutar insidiosamente como pérdida intermitente de la memoria reciente y la dificultad para incorporar nueva información; es la etapa en la que los pacientes se califican con DCL (Albert y cols, 2011). En esa etapa los pacientes pueden tener alteraciones sutiles de la personalidad y de la conducta, del estado afectivo y del sueño, que se acentuarán con la evolución de la enfermedad (Petersen y cols, 1999). La evolución natural de la EA es de 3 a 9 años hasta llegar prácticamente a un estado de dependencia total (Herbert y cols 2003). A medida que la enfermedad avanza los pacientes van presentando una afasia progresiva con anomia y dificultad para expresar conceptos. La alexia y la agrafia siguen un curso de deterioro paralelo al del lenguaje oral (McKhann y cols, 2011). El diagnóstico de la EA es sólo de probabilidad a partir de los datos clínicos de la historia y de la exploración neurológica y neuropsicológica (Jack y cols, 2011), pues se carece de un análisis biológico preciso que permita el diagnóstico en vida (Hyman y cols, 2012). Sin embargo actualmente en algunos países se cuenta con pruebas de laboratorio estandarizadas que evalúan los niveles de la proteína Tau y el contenido de la A $\beta$  en el líquido cefalorraquídeo (Fagan y cols, 2009). Para uso en los ensayos clínicos y en estudios sistemáticos se han propuesto diversos criterios (McKhann y cols, 2011), los más utilizados son los del DSM-IV y NINCDS-ARDRA.

Como se mencionó, el factor de riesgo más importante para padecer la EA es la edad ya que su incidencia se duplica cada 5 años a partir de los 65 años (Hirtz y cols 2007). Sin embargo existen factores de riesgo genéticos y ambientales que aumentan la incidencia de dicha enfermedad (Fratiglioni y cols, 1993). Dentro de los factores genéticos están las mutaciones en los genes que codifican para la proteína precursora del amiloide (APP) y las presenilinas presenilinas 1 y 2 (Vetrivel, 2006). Las mutaciones en estos tres genes



determinan la llamada Enfermedad de Alzheimer Familia (EAF), que representa menos del 1% del total de casos. Existen además polimorfismos en genes que se consideran de riesgo como el gen que codifica para la APOE4 (Reiman, 1996). La inactividad física, la dieta alta en grasa y la pobre estimulación cognitiva son ejemplos de posibles factores de riesgo ambientales (Herbert y cols 2003). El diagnóstico definitivo de la EA se hace *postmortem* debido a que existen otras causas de demencia y porque no existe una prueba 100% sensible y específica que permita hacer el diagnóstico *in vivo* de la EA. En la biopsia *postmortem* se puede apreciar los hallazgos patológicos típicos del padecimiento como son la presencia de las marañas neurofibrilares intracelulares y de las placas amiloideas extracelulares (Tiraboschi y cols, 2004). Las placas amiloideas se forman por el depósito del péptido  $\beta$  amiloide ( $\beta$ A) que deriva de la APP. Las placas amiloideas se localizan en la neocorteza, el hipocampo y otras regiones subcorticales que son esenciales para la función cognitiva y la memoria (Bouras y cols. 1994).

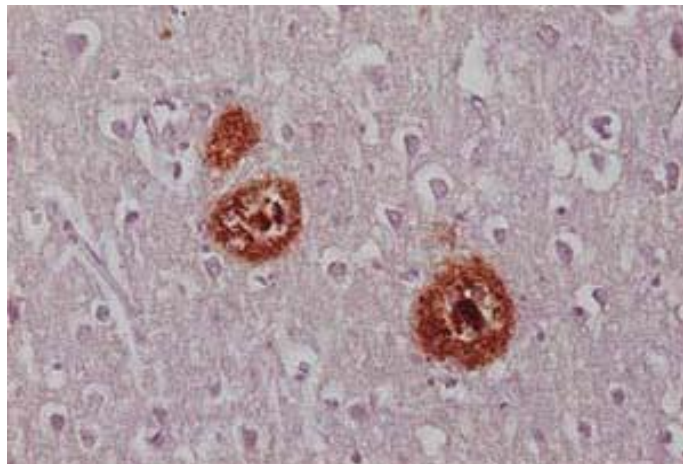


Figura 1. Imagen histopatológica de las placas amiloideas y marañas neurofibrilares en la corteza cerebral en un paciente con EA. (Modificada de Querfurth H y cols 2010)

La neurotoxicidad mediada por este péptido se ha estudiado en modelos *in vitro* y se ha asociado con su capacidad de producir estrés oxidante, perturbar la homeostasis intracelular de calcio y activar vías apoptóticas (Cotman y cols 1992, Hisiao y cols 1996; Hsia y cols 1999; Arias y cols 2002). Sin embargo, se desconoce si estos eventos junto con el envejecimiento celular predisponen a la toxicidad mediada por el  $\beta$ A.

La actividad mitocondrial neuronal juega un papel importante en la patogenia de la EA. La  $\beta$ A es capaz de entrar a la mitocondria, desacoplar la cadena respiratoria y promover la formación de especies reactivas de oxígeno (Manczak y cols 2006). El daño oxidativo es el resultado de un estrés oxidante continuo y depende de muchos factores incluyendo la producción de especies semireducidas del oxígeno a través del metabolismo aeróbico y la inhabilidad de los sistemas antioxidantes de contender con los ROS (Cooper, 1997). Se ha reconocido que el daño oxidativo aumenta con la edad (Smith y cols 1996). Este incremento dependiente de la edad puede asociarse a alteraciones bioquímicas mitocondriales como mutaciones en el DNA mitocondrial (mtDNA) y daño proteínas mitocondriales (Cardoso y cols, 2004) y pueden predisponer a la toxicidad mediada por el  $\beta$ A.

### **La proteína $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) y la hipótesis amiloidogénica**

Los péptidos de  $\beta$ A son productos naturales del metabolismo neuronal y consisten en fragmentos de 36 a 43 aminoácidos que se originan del corte proteolítico de la APP por las acción de la  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas (Seubert y cols 1993). La APP es un miembro de una familia que comprende dos proteínas semejantes a ella, la APLPI y APLP2 (amyloid precursor like proteins). A pesar de que la función de la APP es incierta, se ha propuesto su papel fisiológico en el transporte, señalización neurotrófica, adhesión celular, señalización celular (Nixon y cols, 2007). La APP se codifica en un solo gen en el cromosoma 21 y se conforma por un dominio único transmembranal, un dominio grande extracelular y una cola citoplasmática pequeña (Coulson y cols, 2000). La APP se procesa de manera amiloidogénica y no amiloidogénica después de sintetizarse en el retículo endoplásmico rugoso (Mattson y cols, 2004) El procesamiento proteolítico de la APP (Figura 2) por las  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas llevan a la formación del péptido  $\beta$ A (Mattson y cols 2004; Nixon y cols 2007).

La forma principal de  $\beta$ A es la de 40 aminoácidos ( $\beta$ A<sub>40</sub>), que se encuentra en concentraciones nanomolares en el líquido cefalorraquídeo (Vigo-Pelfrey y cols 1993). Sin embargo, la forma de 42 aminoácidos ( $\beta$ A<sub>42</sub>) es la más fibrilogénica y se encuentra altamente enriquecida en los núcleos de las placas seniles en pacientes y en modelos de

animales transgénicos de la enfermedad (Kuo y cols 1996). Se ha descrito que las formas de agregación temprana u oligómeros intermedios y solubles de la  $\beta$ A, son las formas con mayor toxicidad neuronal en diferentes modelos (Walsh y cols 2007). Estudios postmortem de pacientes con EA han demostrado que los oligómeros se acumulan en las terminales sinápticas (Walsh y cols 2005; Klyubin y cols 2008) y que la severidad del déficit cognitivo se correlaciona con la acumulación de los oligómeros de  $\beta$ A en el cerebro (Lue y cols 1999).

Se sabe que el desequilibrio entre la producción, secreción y agregación de los péptidos  $\beta$ A hace que éstos se acumulen y dañen a las neuronas, dando origen a la hipótesis amiloidogénica (Kamenetz y cols, 2003; Tanzi y Bertram, 2005).

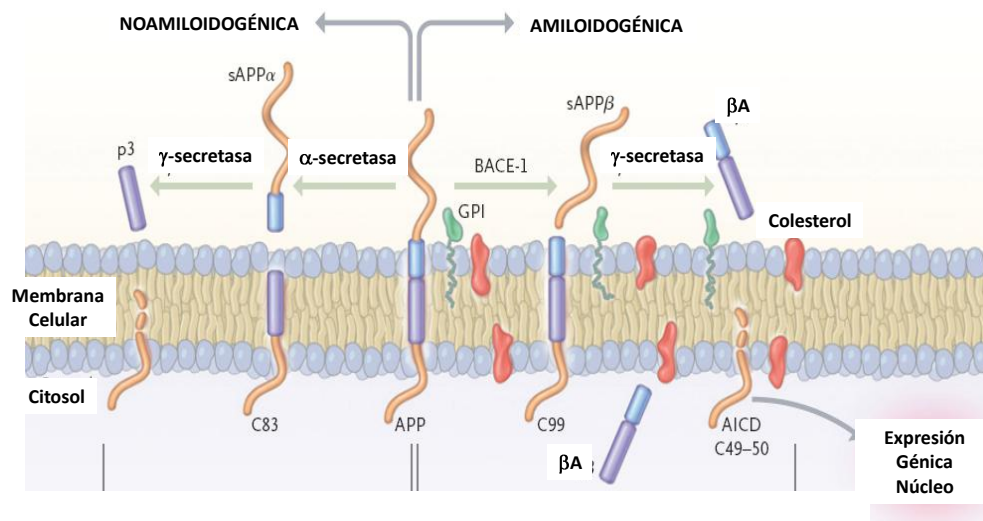


Figura 2. Representación esquemática del procesamiento de la proteína precursora de amiloide. (Figura tomada y modificada de Querfurth HW y cols, (2010). La APP se procesa de manera amiloidogénica y no amiloidogénica después de sintetizarse en el retículo endoplásmico rugoso; este procesamiento se lleva a cabo en la membrana plasmática. En la vía no amiloidogénica las  $\alpha$  secretasas cortan la APP dentro su dominio extracelular para generar un fragmento largo y soluble N-terminal ( $sAPP\alpha$ ) que se libera al exterior de la célula y un fragmento intracelular C-terminal (C83). Este fragmento es digerido por las  $\gamma$  secretasas liberando al dominio amiloideo intracelular (AICD) y al fragmento p3. El procesamiento amiloidogénico se inicia por las  $\beta$  secretasas, BACE-1 (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1). Estas enzimas actúan sobre la APP liberando el fragmento extracelular  $sAPP\beta$  y un fragmento intracelular C99. Este fragmento funciona como sustrato para las  $\gamma$  secretasas que generan al péptido  $\beta$ A y el AICD. Esta actividad ocurre dentro de la membrana plasmática en un proceso llamado “proteólisis intramembranal”

### **Disfunción mitocondrial inducida por el péptido $\beta$ amiloide**

El péptido  $\beta$ A es un compuesto tóxico para las mitocondrias; experimentos hechos por Butterworth y colaboradores (1990) demostraron que la actividad de la piruvato deshidrogenasa (PDH), enzima de la matriz mitocondrial que cataliza la reacción de descarboxilación oxidativa del piruvato, está reducida en la corteza parietal, temporal y frontal de los pacientes con EA. Experimentos hechos por Gibson y colaboradores en 1984 demostraron que la actividad de la  $\alpha$  cetoglutarato deshidrogenasa (KGDH), enzima de la matriz mitocondrial que participa en la conversión del 2-oxoglutarato a succinil-CoA en ciclo de Krebs, se encuentra reducida en la corteza temporal y parietal en pacientes con EA. Los mismos autores demostraron que los niveles de las subunidades E1k y E2k para KGDH se encontraban disminuidas en cerebros de pacientes con EA familiar. Estos resultados sugieren que el defecto en el ciclo de Krebs es un evento asociado con la cascada de alteraciones bioquímicas de la EA. Al analizar las diferentes enzimas del ciclo de Krebs de cerebro de pacientes con EA, se observó una reducción significativa en la actividad de PDH (41%), la isocitrato deshidrogenasa (ICDH, 27%) y la KGDH (57%) en la corteza prefrontal lateral. Más aun, la actividad reducida de la PDH y KGDH correlacionó con la reducción de la actividad cognitiva de los pacientes. Los autores también demostraron que la actividad reducida de PDH correlaciona con un mayor número de placas amiloideas (Gibson y cols 1988). Otra enzima mitocondrial involucrada en la patogenia de la EA es la citocromo c oxidasa (COX), también conocida como complejo IV. Esta es una proteína transmembranal mitocondrial que funciona como enzima en la cadena de transporte de electrones. Parker y colaboradores (1990) reportaron una reducción de la actividad de la COX en mitocondrias plaquetarias de pacientes con EA. Estos autores encontraron que mientras la concentración del citocromo *b*, *c1* y *aa3* se mantenía estable, existía una depresión en la actividad de la cadena respiratoria, en especial la actividad de la COX. Kish y colaboradores (1999) demostraron que la actividad reducida de COX se encontraba en varias regiones cerebrales, incluyendo la corteza frontal (-26%), temporal (-17%) y parietal (-16%). Experimentos realizados por Valla y colaboradores (2001) en pacientes postmortem con EA demostraron que la actividad reducida de la COX es mayor en la corteza cingulada posterior y que estos hallazgos tienen una relación directa con la

evolución clínica de la EA. Los mismos autores en el año 2010 demostraron una disminución en la actividad de la COX por medio de tomografía por emisión de positrones (PET) en pacientes jóvenes con mutación para la APOE $\epsilon$ 4, siendo un hallazgo temprano de la EA.

Utilizando mitocondrias purificadas de la corteza cerebral de ratones transgénicos con mutación humana de APP (TgmAPP), Mucke y cols (2000) demostraron que la  $\beta$ A se acumula de manera progresiva en la matriz mitocondrial. De igual modo encontraron que esta acumulación se asocia con una actividad enzimática reducida de los complejos mitocondriales III y IV de la cadena respiratoria y con una disminución en el consumo de oxígeno. El estudio de la acumulación de  $\beta$ A en las mitocondrias se evaluó utilizando animales de 4 y 24 meses de edad. La acumulación más rápida del  $\beta$ A ocurrió entre los 8 y 12 meses edad. Tanto la  $\beta$ A<sub>40</sub> y  $\beta$ A<sub>42</sub> se encontraron en la matriz mitocondrial, sin embargo los niveles de  $\beta$ A<sub>42</sub> fueron significativamente mayores. Utilizando microscopía confocal se demostró que el  $\beta$ A colocaliza con la proteína HSP60, una chaperona mitocondrial (Caspersen, 2005). Las neuronas de la corteza e hipocampo de ratones transgénicos de APP mostraron una distribución simultánea de  $\beta$ A y de HSP60. El 40% y 20% de las mitocondrias mostraron la presencia de  $\beta$ A de manera simultánea en la corteza y el hipocampo de los ratones TgmAPP respectivamente, en contraste con los controles no transgénicos los cuales no mostraron  $\beta$ A intramitocondrial. Se demostró, adicionalmente que la acumulación intramitocondrial de  $\beta$ A provoca anormalidades de la función mitocondrial. Mientras el consumo de oxígeno fue parecido en ratones TgmAPP y controles a los 4 meses, a los 12 meses hubo un menor consumo de oxígeno de las mitocondrias de ratones transgénicos. Además, la actividad de los complejos III y IV se encontró disminuída de manera significativa a partir de los 10 meses de edad en los ratones transgénicos en comparación con el grupo control. Estos datos muestran que la acumulación mitocondrial del péptido  $\beta$ A se correlaciona con cambios en el consumo de oxígeno y en la actividad de los complejos III y IV de la cadena respiratoria.

### **Estrés oxidante en la EA**

El estrés oxidante es una de las manifestaciones patológicas más conspicuas en la EA. El estrés oxidante se refiere a la oxidación de moléculas biológicas por especies reactivas de oxígeno (ROS) como el superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Los ROS son moléculas pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada que se producen normalmente durante el metabolismo celular (Cardenas y cols, 2002). En condiciones normales existe un equilibrio entre la generación de ROS y el sistema antioxidante de defensa; sin embargo, cuando hay sobreproducción de ROS y/o alteraciones en la capacidad antioxidante se produce estrés oxidante y daño celular. El cerebro tiene mayor susceptibilidad al daño oxidativo que otros órganos por su alto consumo de oxígeno. Las neuronas son particularmente vulnerables al estrés oxidante ya que presentan una alta tasa metabólica, una alta proporción de ácidos grasos polinsaturados en la membrana plasmática y una actividad reducida de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Smith, 1996; Cooper, 1997). Las mitocondrias generan la mayor parte de las ROS como productos de la fosforilación oxidativa.

Los signos del estrés oxidante en los cerebros de pacientes con EA se manifiestan por la oxidación de proteínas, peroxidación lipídica, oxidación de los ácidos nucleicos y la gluco-oxidación (Cotman y cols 1992, Hisiao y cols 1996; Smith 1996). El efecto directo de  $\beta A$  en la función mitocondrial y estrés oxidante se ha demostrado en varios experimentos hechos *in vitro*. Estos experimentos mostraron que al momento de exponer a las neuronas en cultivo o a las mitocondrias aisladas con  $\beta A$ , se generan ROS acompañados de una depleción de ATP y pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Pappolla y cols, 1998; Hirai y cols, 2001; Swerdlow y cols, 2004; Manczak y cols, 2006). Estudios realizados en pacientes con EA y en modelos animales se ha encontrado que la inhibición del metabolismo energético induce a un incremento en la producción de ROS lo cual exacerba tanto la toxicidad neuronal y aumento en la generación de  $\beta A$  (Smith y cols, 2000).

### **Daño sináptico y EA**

Un evento temprano que se reconoce en la patogenia de la EA es la pérdida de las terminales sinápticas. Esta pérdida correlaciona significativamente con la disminución de la

función cognitiva de los pacientes con EA. Los primeros estudios que mostraron esta asociación fueron hechos por Davies y colaboradores en 1987. Los autores mostraron por medio de estudios morfométricos de biopsias realizadas en pacientes con EA que a partir de 2 a 4 años del inicio de los síntomas existía una reducción del 25 a 35% en la densidad numérica de la sinapsis en la corteza en relación con sujetos controles de la misma edad. Estas observaciones se corroboraron posteriormente al demostrar que el grado de déficit cognitivo se asocia con una reducción de casi el 25% en el contenido de la proteína de vesículas sinápticas, sinaptofisina (Terry y cols, 1991). Esta disminución se exagera al avanzar la enfermedad haciendo que exista una correlación estrecha entre la pérdida sináptica y la presencia de síntomas de demencia. Más aún, estudios en modelos de ratones transgénicos de APP se ha observado que el número de terminales presinápticas positivas para sinaptofisina es 30% menor que el de ratones controles. De manera interesante, estos hallazgos histopatológicos aparecieron meses antes de que se observaran placas amiloideas (Masliah y cols, 2001). Estos resultados sugieren que la pérdida de las terminales presinápticas es un evento temprano que aparece antes que se desarrollen las placas amiloideas. En pacientes con DCL y en etapas tempranas de la EA existe una disminución del número de terminales sinápticas en el hipocampo y un aumento compensatorio en el tamaño de las sinapsis restantes (Scheff y cols, 2007). Durante el envejecimiento no patológico, también se ha reportado una pérdida sináptica particularmente en la región del giro dentado del hipocampo, particularmente (Mesaliah y cols, 2006; Lister y cols 2009). Existen varios factores que pueden intervenir en la vulnerabilidad de la sinapsis durante el envejecimiento y en la EA, incluyendo su alta tasa metabólica y oxidativa al igual que el constante recambio de calcio para sustentar la neurotransmisión y su capacidad plástica asociada con eventos de aprendizaje y memoria.

Las terminales sinápticas son sitios donde se ha reportado la acumulación de oligómeros de  $\beta$ A que promueven su disfunción y daño (Manczak y cols, 2006; revisado por Peña y cols, 2006). Larson y cols (1999) han encontrado que la acumulación de  $\beta$ A suprime la neurotransmisión y altera la potenciación a largo plazo (LTP) alterando el gradiente eléctrico. En experimentos in vitro se ha demostrado que el  $\beta$ A 25-35 potencia la liberación de glutamato dependiente de despolarización en el hipocampo de ratas jóvenes y viejas (Arias y cols, 1995). Así mismo, se demostró que existe una liberación basal de glutamato

significativamente mayor que en las ratas jóvenes, lo cual apoya la hipótesis de que la  $\beta A$  puede potenciar crónicamente la liberación de neurotransmisores excitadores, el cual puede encontrarse incrementado en el cerebro envejecido y colaborar en la neurodegeneración. Por otro lado Mattson y colaboradores (1999) al igual que nuestro grupo (Mungarro-Menchaca y cols, 2002) mostraron que la activación local de las proteasas de cisteína, conocidas como caspasas, en la terminales sinápticas pueden iniciar el daño sináptico y posteriormente la muerte neuronal.

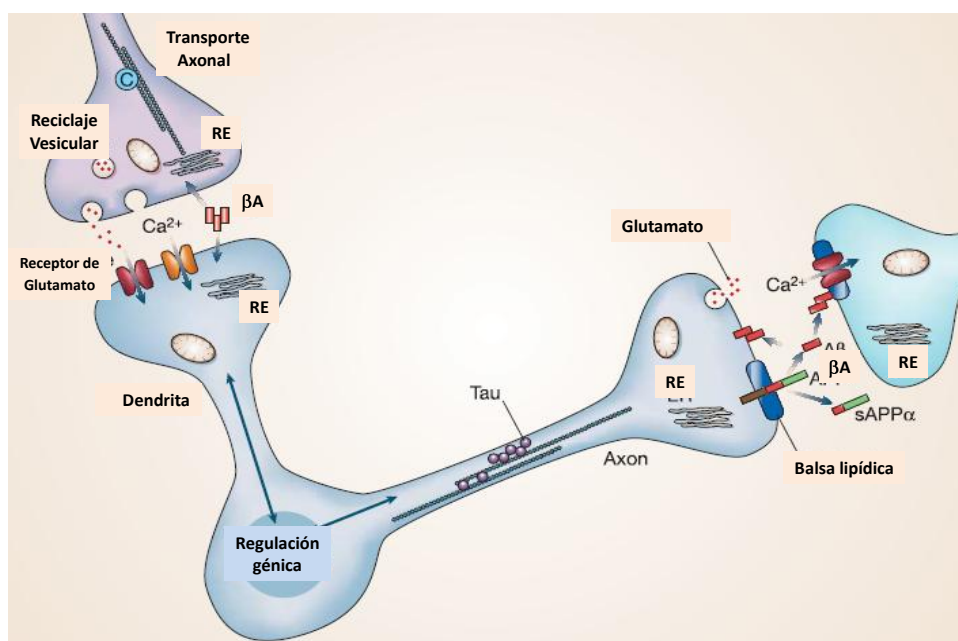


Figura 3. Representación esquemática de la disfunción sináptica en la Enfermedad de Alzheimer. (Tomado y modificada de Mattson y cols, 2004). El procesamiento alterado de la APP produce una mayor producción de  $A\beta$  a nivel sináptico. La APP se transporta en el axón y se acumula en las sinapsis en la EA. El  $A\beta$  a nivel sináptico provoca estrés oxidante, alteración en la homeostasis de calcio y altera la función mitocondrial.

### Modelos Experimentales de la EA

Debido a la etiología compleja de la EA hasta el momento no existe un modelo que reproduzca por si mismo todas las características de la enfermedad. Se han generado diversos modelos animales que de forma parcial desarrollan las características conductuales e histopatológicas observadas en la EA. Los modelos se pueden subdividir en aquellos que desarrollan la patología amiloidea de forma natural con la edad y aquellos genéticamente



modificados para expresar formas mutantes presentes en la EA. Ambos modelos tienen el inconveniente que no necesariamente desarrollan todas las características de la EA

La mayoría de los experimentos que han demostrado la toxicidad inducida por el  $\beta$ A han utilizado las formas  $\beta$ A1-40 o  $\beta$ A1-42 que son las que se localizan en las placas amiloides encontradas en la EA. Sin embargo, en este estudio utilizaremos el fragmento de 11 aminoácidos  $\beta$ A25-35 que se ha relacionado con algunas de las propiedades neurotóxicas y oxidantes de la proteína  $\beta$ A completa (Yankner y cols, 1990; Pike y cols, 1993; Maurice y cols 1996; Stepanichev y cols 2003). Varios de los efectos nocivos de este fragmento se deben a que el  $\beta$ A25-35 contiene al amino ácido metionina en la posición 35, el cual le confiere la capacidad oxidante a la proteína completa  $\beta$ A1-42 (Butterfield y cols 2004).

Dado que las terminales sinápticas son especialmente vulnerables al daño inducido por el péptido  $\beta$ A, un modelo para analizar algunos de los mecanismos que subyacen al daño sináptico inducido por  $\beta$ A es el uso de los sinaptosomas. Los sinaptosomas se aíslan de homogenados cerebrales y funcionan como elementos celulares independientes que retienen las enzimas necesarias para la glucólisis y contiene una o más mitocondrias. Así mismo preservan durante un tiempo todos los componentes celulares para que ocurra la liberación vesicular de neurotransmisores. Estas terminales aisladas se preparan a partir del tejido cerebral de diferentes regiones y permiten el estudio de la función mitocondrial bajo diferentes condiciones (Loscher W, 1985).

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Aunque el envejecimiento es el principal factor de riesgo para la EA, al momento se desconocen qué mecanismos biológicos asociados a éste pueden contribuir a incrementar la vulnerabilidad de las terminales sinápticas al daño inducido por la proteína  $\beta$ A. Una posibilidad involucra la disminución de la actividad mitocondrial y el incremento en el estrés oxidante asociados a la edad. Por lo tanto, en el presente trabajo se hará la comparación de la actividad mitocondrial y la generación de las especies reactivas de oxígeno en sinaptosomas obtenidos de dos regiones, corteza cerebral e hipocampo obtenidos de ratas jóvenes (3 meses) y viejas (18-24 meses), en ausencia y presencia del fragmento 25-35 de la proteína  $\beta$ A.

#### **V. HIPÓTESIS**

La toxicidad de la proteína  $\beta$ A se exagera en sinaptosomas de ratas viejas y se relaciona con un decremento en la función óxido-reductora mitocondrial y una mayor producción de radicales libres.

## VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar la actividad mitocondrial de los sinaptosomas de ratas jóvenes y viejas expuestas a la proteína  $\beta$ A por medio del ensayo de reducción de MTT
- Analizar el contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS) por medio de la cuantificación de fluorescencia de rodamina-123 en sinaptosomas de ratas jóvenes y viejas en presencia y ausencia de la proteína  $\beta$ A.
- Evaluar el consumo de oxígeno de los sinaptosomas de ratas jóvenes y viejas expuestas a la proteína  $\beta$ A.
- Analizar la actividad del citocromo oxidasa en sinaptosomas de ratas jóvenes y viejas expuestas a la proteína  $\beta$ A.
- Analizar algunas alteraciones de la morfología mitocondrial de sinaptosomas de ratas jóvenes y viejas en ausencia y presencia de la proteína  $\beta$ A.

## VII. MÉTODOS

### VII.1 OBTENCIÓN DE SINAPTOSMAS

Se utilizaron ratas Wistar machos jóvenes de 3 meses y viejas de 18-20 meses de edad. La purificación de la fracción sinaptosomal se realizó mediante el método descrito por Loscher et.al. (1985). Las ratas se decapitaron y se disecaron la corteza y el hipocampo en hielo (4°C). Los tejidos se homogenizaron en solución (1mg/ml) de sacarosa 0.32 M pH 7.2 con HEPES 5 mM (10% p/v). Los homegenados se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 min, al término de los cuales se separaron los sobrenadantes. Estos se colocaron sobre 1 ml de sacarosa 1.2 M y se centrifugaron a 50000 rpm durante 15 min en un rotor de ángulo fijo modelo 80Ti. Tras esta centrifugación se obtuvo un pellet, un sobrenadante y una interfase. La interfase se diluyó en sacarosa 0.32 M para obtener un volumen final de 2 ml. La fracción se colocó sobre 1 ml de sacarosa 0.8 M para ser centrifugada nuevamente a 50000 rpm durante 15 min. El pellet que se obtuvo correspondió a la fracción sinaptosomal la cual se resuspendió en 3 ml de buffer de Locke pH 7.2: NaCl 154 mM, KCl 5.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.3mM MgCl 1mM, NaHCO<sub>3</sub> 3.6 mM, glucosa 5 mM, HEPES 5mM, para el caso de la corteza cerebral y 2 ml en el caso del hipocampo. Finalmente se colocaron 50 µM del péptido βA 25-35 a 200 µl de proteína sinaptosomal (50 µg). En la micrografía que se muestra abajo se representa un ejemplo de la morfología sinaptosomal de la fracción obtenida.

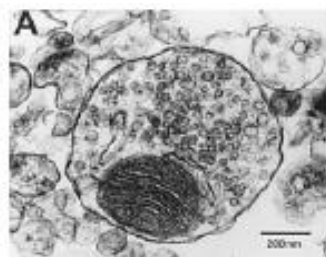


Figura 4. Micrografía electrónica de un sinaptosoma cortical de rata. Se observa una mitocondria junto con las vesículas sinápticas (Mungarro-Menchaca et al., 2002).

## VII.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL POR EL ENSAYO DE REDUCCIÓN DE MTT

La actividad mitocondrial se evaluó mediante una técnica colorimétrica con la cual se cuantifica la actividad óxido-reductora de la cadena respiratoria. Esta técnica se basa en la cuantificación de las sales de formazán, que es un producto insoluble de color morado, generado a partir de la reducción del 3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazodio (MTT), un compuesto soluble capaz de incorporarse a las mitocondrias por la acción de deshidrogenasas en presencia de NADH (Mosmann, 1983). Al transcurrir el periodo de 3 h de incubación de los sinaptosomas con y sin  $\beta$ A, se agregó una solución de MTT (2% v/v) para obtener una concentración final de  $100\mu\text{M}$ . Se incubaron los sinaptosomas con MTT durante una hora más. Al término de esta incubación, las muestras obtenidas se centrifugan a 500 rpm durante 5 min. A los sinaptosomas sedimentados se les agregaron 500ul de isopropanol ácido para así solubilizar las sales de formazán. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

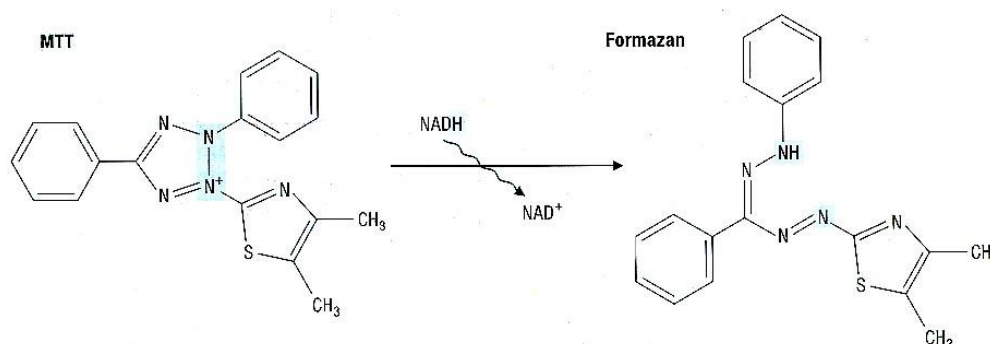


Figura 5. Reacción de MTT.

## VII.3 CONSUMO DE OXÍGENO

La respiración mitocondrial se analizó utilizando el oxímetro de Clark (Figura 4). Este oxímetro consta de dos electrodos que se encuentran inmersos en una solución de KCl y separados del compartimento de reacción por una membrana de teflón la cual es permeable al oxígeno. Los electrodos constan de un ánodo hecho de cloruro de plata y de un cátodo hecho de platino. En el cátodo de platino los electrones reducen a las moléculas de oxígeno en agua permitiendo que los aniones de cloruro migren hacia el ánodo para liberar

electrones. Este movimiento de electrones se registra en un circuito externo (Clark y cols, 1953). Los sinaptosomas obtenidos de las ratas jóvenes (2-3 meses) y viejas (18-24 meses) se incubaron en 3 ml de buffer de Locke sin glucosa a un pH 7.2: (NaCl 154 mM, KCl 5.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.3mM MgCl 1mM, NaHCO<sub>3</sub> 3.6 mM, HEPES 5mM) para el caso de la corteza cerebral y 2 ml en el caso del hipocampo. Se hicieron alícuotas de 1 ml. Cada muestra se introdujo en el compartimiento de reacción del oxímetro y se agregaron 2.2 ml de buffer de Locke sin glucosa y 0.6 ml de glucosa a 50 mM. La concentración final de glucosa en el compartimiento de reacción fue de 5 mM. El volumen final fue de 3.8 ml dentro del compartimiento. Utilizando estos valores se pudo calcular la cantidad de nanoátomos de oxígeno consumidos por minuto en cada una de las muestra. La figura 7 es una representación esquemática del trazo del consumo de oxígeno de los sinaptosomas.

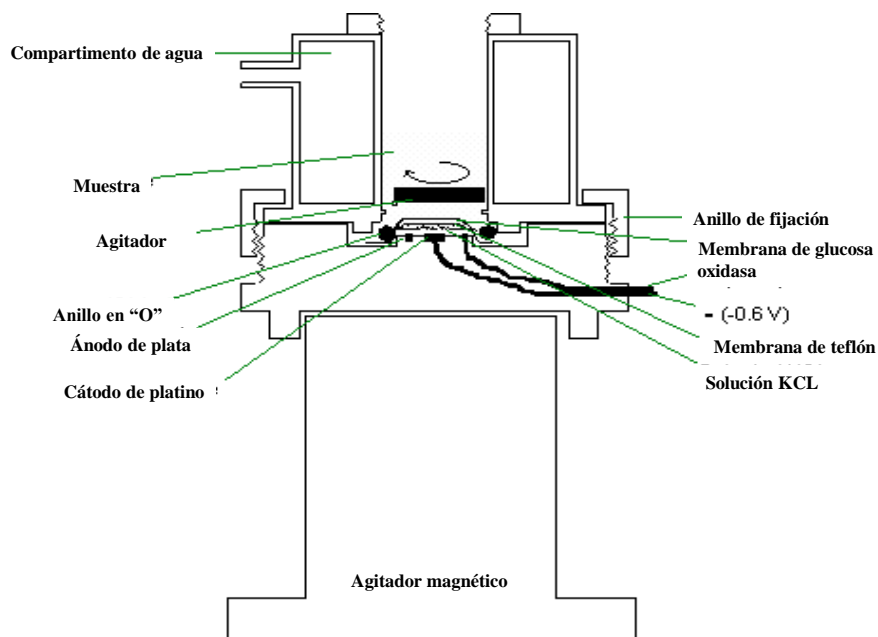
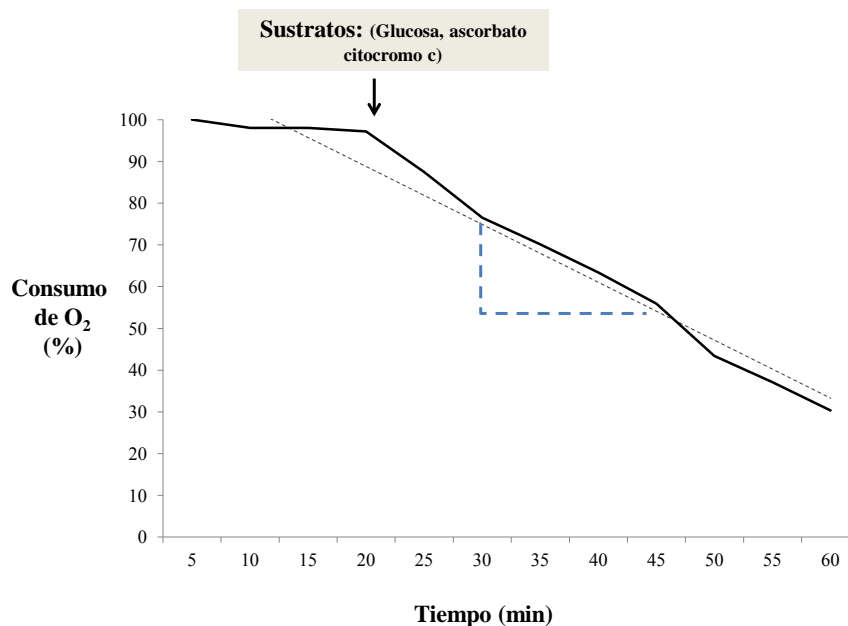


Figura 6. Representación esquemática del oxímetro de Clark.



**Figura 7.** Representación esquemática de trazo de las oximetrías obtenidas de las mitocondrias de sinaptosomas obtenidos de corteza e hipocampo de ratas. La flecha indica el momento en el cual se administran los diferentes sustratos (glucosa, ascorbato, citocromo c).

#### VII.4 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DEL CITOCROMO OXIDASA

La actividad del citocromo c oxidasa (complejo IV) se registró utilizando un electrodo de oxímetro de Clark (Figura 6). Los sinaptosomas obtenidos de las ratas jóvenes (2-3 meses) y viejas (18-24 meses) se incubaron en 3 ml de buffer de Locke sin glucosa a un pH 7.2 para el caso de la corteza cerebral y 2 ml en el caso del hipocampo. Las muestras se alicuotaron en 0.5 ml. Cada muestra se introdujo en el compartimiento de reacción del oxímetro junto con 1.6 ml de buffer de fosfato /EDTA a un pH 7.2 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0.34 g,  $\text{EDTA-Na}_2 \text{H}_2 2\text{H}_2\text{O}$ : 0.0186 g). Posteriormente se agregaron 0.2 ml de ascorbato pH 6 (0.1 M), 0.12 ml de citocromo c y 0.04 ml de N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilendediamina (TMPD) a 50 mM. El volumen final fue de 2.5 ml dentro del compartimiento. Utilizando estos valores, se calcularon los nanoátomos de oxígeno consumidos por minuto en cada una de las muestras. Los resultados fueron ajustados por miligramo de proteína, determinada por el método de Lowry. Este es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas.

## **VII.5 CUANTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

Este método se basa en la oxidación de la dihidrorodamina -123 (DHR) para formar el compuesto fluorescente Rodamina-123 que se detectó con un lector de placas de ELISA a 505 nm. El  $H_2O_2$  oxida a la DHR en presencia de peroxidasas. La DHR es una molécula no fluorescente que por oxidación da lugar a la rodamina 123; es un marcador fluorescente catiónico y lipofílico. La lipofilicidad de la DHR facilita su difusión a través de la membrana celular. Durante la oxidación de la DHR a rodamina 123, uno de los aminos equivalentes tautomeriza a una imina efectiva atrapando a la rodamina 123 dentro de la célula. (Gomes y cols, 2005).

Se tomaron 10  $\mu$ l de la suspensión de sinaptosomas de corteza y 20  $\mu$ l de la suspensión de sinaptosomas de hipocampo previamente resuspendidos en buffer de Locke. Después de haberse incubado los sinaptosomas obtenidos de ratas jóvenes (2-3 meses) y viejas (18-24 meses), se centrifugaron a 10000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante se desechó. Al botón se le agregaron 360  $\mu$ l de buffer A pH 7.4 (NaCl 140mM, KCl 5mM,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.8 mM,  $CaCl_2$  1.8 mM, glucosa 5 mM, HEPES 15 mM) y 40  $\mu$ l de solución stock de dihidrorhodamina -123 (concentración final 1 $\mu$ M). Los sinaptosomas se resuspendieron y se traspasaron a una placa de ELISA y posteriormente fueron incubados a 37°C por 2 minutos. La fluorescencia se detectó en un lector de placas a 505 nm. La absorbancia de las muestras se ajustó a la cantidad de proteína de las muestras. La cantidad de proteína de las muestras se calculó utilizando el método de Lowry.

## **VII.6 ANÁLISIS DE TERMINALES SINÁPTICAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Doscientos  $\mu$ g de proteína sinaptosomal fueron centrifugados y el pellet se fijó por 30 minutos en glutaraldehído al 3% con un pH de 7.4. Después de un lavado con el buffer de fosfato, el pellet se fijó en tetraóxido de osmio al 1%. Las secciones se incluyeron en una resina y se cortaron con un cuchillo de diamante y se tiñeron con acetato de uranilo. Las muestras se procesaron para microscopía electrónica y se analizó la presencia de vesículas así como la estructura de la membrana externa y crestas mitocondriales.



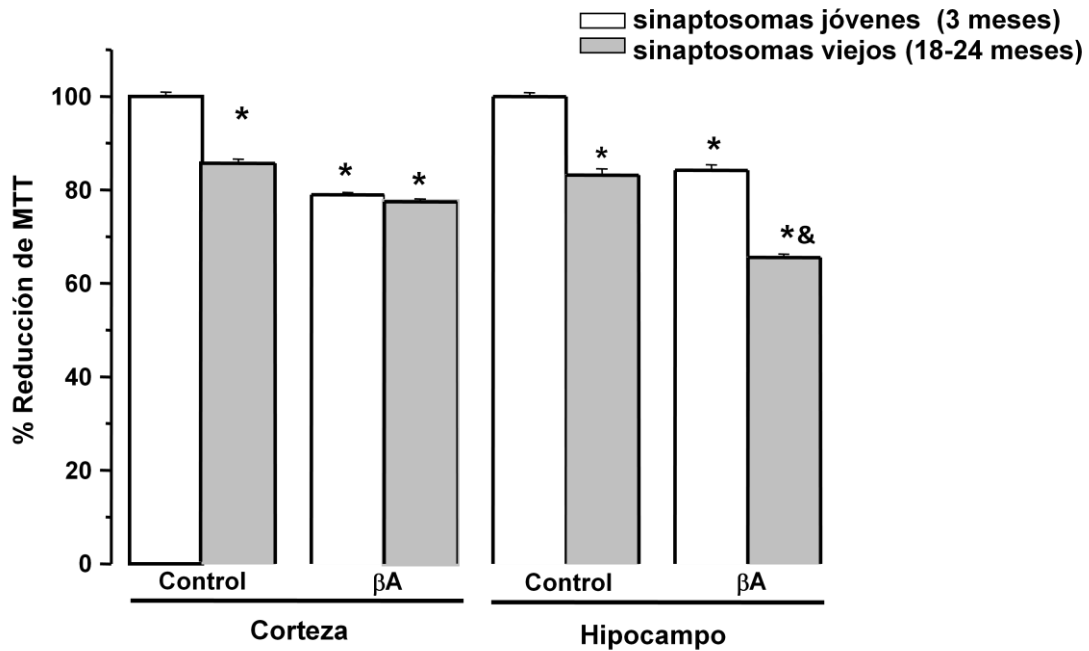
## **VII.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los datos se expresaron como medias  $\pm$  ES. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba de ANOVA a partir de 3 a 6 determinaciones independientes hechas por duplicado y se consideraron significativas cuando se obtuvo una  $p < 0.05$ .

## VIII. RESULTADOS

### **VIII.1. La actividad oxidorreductora mitocondrial se encuentra disminuida en sinaptosomas de ratas viejas y se exagera en presencia de $\beta$ A.**

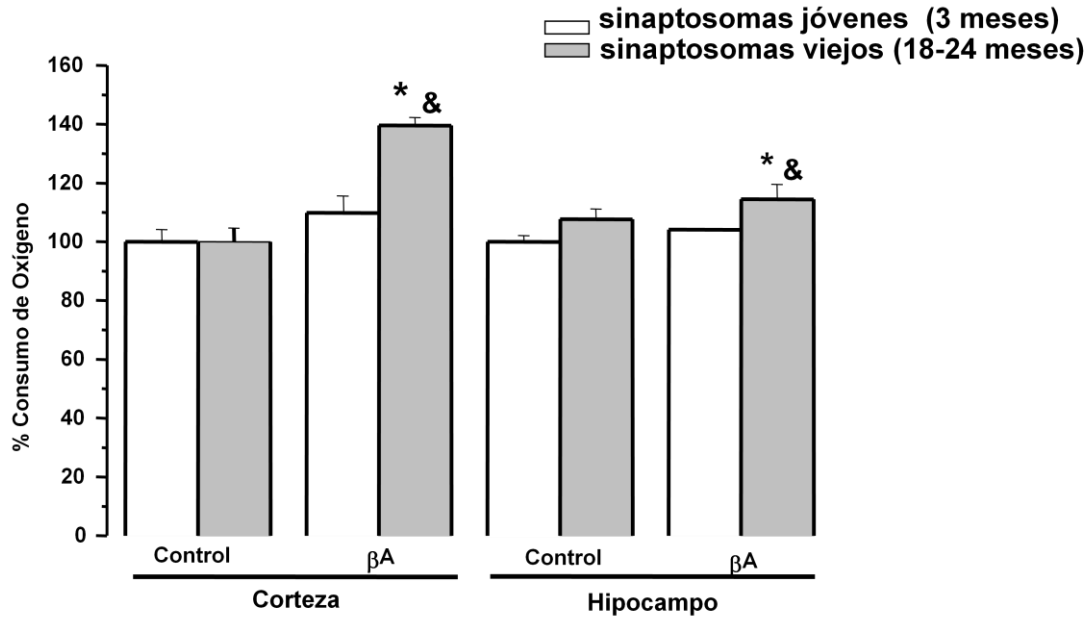
En la figura 8 se muestra el porcentaje de reducción de MTT de los sinaptosomas obtenidos de corteza e hipocampo de ratas jóvenes y viejas después de 3 h de incubación con el buffer de Locke en presencia y ausencia de  $\beta$ A 25-35. Se observa que la reducción de MTT disminuyó 15% en los sinaptosomas corticales de ratas viejas en comparación con las de ratas jóvenes ( $p < 0.05$ ). Cuando los sinaptosomas de corteza del grupo de ratas viejas se incubaron con el péptido  $\beta$ A, la reducción de MTT alcanzó un 20% y no fue estadísticamente significativo entre ratas jóvenes y viejas ( $p = 0.34$ ). En el caso del hipocampo se observó una disminución en la reducción de MTT del 13% en los sinaptosomas de ratas viejas en comparación con las de ratas jóvenes ( $p = 0.034$ ). Esta disminución alcanzó el 35% en presencia de  $\beta$ A en sinaptosomas de ratas viejas comparada con una reducción del 16% ( $p = 0.025$ ) en el grupo de jóvenes. Estos resultados indican que los sinaptosomas obtenidos de ratas viejas reducen menos MTT que los jóvenes y que, particularmente los del hipocampo, tienden a ser más susceptibles a los efectos deletéreos del  $\beta$ A.



**Figura 8.** Porcentaje de reducción de MTT en sinaptosomas de corteza e hipocampo obtenidos de ratas jóvenes de 3 meses de edad y ratas viejas de 18-24 meses de edad en presencia y ausencia del βA 25-35. Los datos son promedio ± ES (n=6) \* p<0.05 en comparación con la corteza y el hipocampo control (sin exposición al βA25-35); & p<0.05 entre las ratas jóvenes y ratas viejas.

## VIII.2. La edad y el péptido βA aumentan el consumo de oxígeno en los sinaptosomas de las ratas jóvenes y viejas.

En la figura 9 se muestra el consumo de oxígeno de los sinaptosomas obtenidos de corteza de ratas jóvenes en comparación con las obtenidas de ratas viejas. En condiciones basales no se encontraron diferencias en la respiración mitocondrial entre jóvenes y viejos. Sin embargo, en presencia de βA 25-35 el consumo de O<sub>2</sub> aumentó significativamente un 15% en el caso de los sinaptosomas hipocampales de ratas viejas (p = 0.04) y un 40% en los corticales de este mismo grupo, comparado con lo obtenido en jóvenes (p = 0.01).

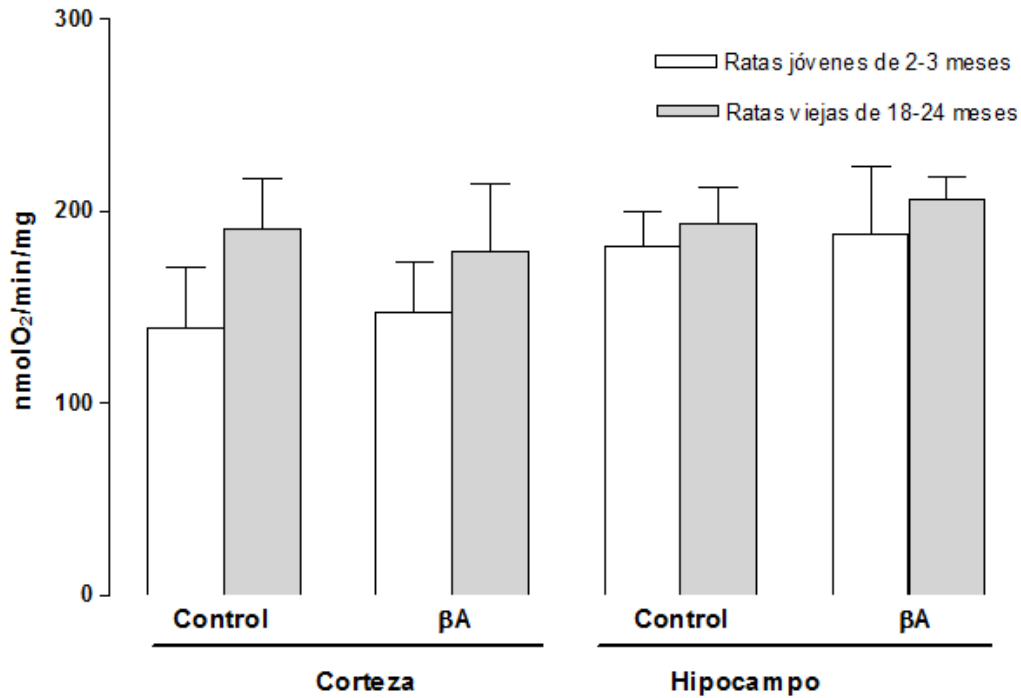


**Figura 9.** Porcentaje de consumo de oxígeno en sinaptosomas de corteza e hipocampo obtenidos de ratas jóvenes de 3 meses de edad y ratas viejas de 18-24 meses de edad en presencia y ausencia del péptido  $\beta$ -amiloide. Los datos son promedio  $\pm$  ES (n=6). \*  $p < 0.05$  en comparación con la corteza y el hipocampo control (sin exposición al  $\beta$ A 25-35); &  $p < 0.05$  entre las ratas jóvenes y ratas viejas.

### VIII.3. Efecto de la edad y el péptido $\beta$ A en la actividad de la citocromo oxidasa en sinaptosomas de corteza e hipocampo.

La actividad de la enzima citocroma oxidasa se muestra en la figura 10 y se representa como  $\text{nmolO}_2/\text{min}/\text{mg}$  de proteína sinaptosomal. La actividad promedio de la citocromo oxidasa en la corteza de ratas de 3 meses fue de  $139 \pm 15 \text{ nmolO}_2/\text{min}/\text{mg}$ . Al momento de exponerlos sinaptosomas al péptido  $\beta$ A 25-35, se observó un incremento promedio de en un 38% ( $191 \pm 17 \text{ nmolO}_2/\text{min}/\text{mg}$ ), aunque no fue estadísticamente significativo ( $p = 0.21$ ). Los sinaptosomas obtenidos de corteza del grupo de ratas viejas presentaron una actividad promedio ligeramente mayor que la de los jóvenes ( $191 \pm 15 \text{ nmolO}_2/\text{min}/\text{mg}$ ), sin llegar a ser estadísticamente significativa ( $p = 0.34$ ). Cuando se expusieron los sinaptosomas de

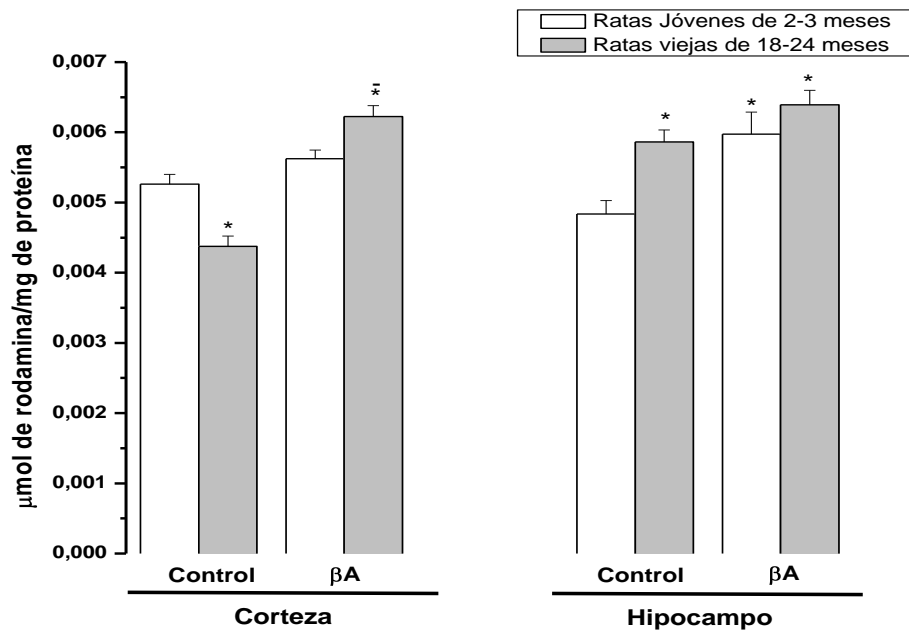
corteza o hipocampo con el péptido  $\beta$ A, no hubo cambios significativos en ningún caso.



**Figura 10.** Actividad de la citocromo oxidasa expresada en consumo de oxígeno en nmolO<sub>2</sub>/min/mg de proteína en sinaptosomas de corteza e hipocampo obtenidos de ratas jóvenes y viejas, en presencia y ausencia del péptido  $\beta$ A (n=4).

#### VIII.4. Contenido de ROS en sinaptosomas de ratas jóvenes y viejas en ausencia y presencia del péptido $\beta$ -amiloide

Con el objeto de cuantificar la producción de especies reactivas de oxígeno se utilizó la técnica fluorométrica de rodamina-123. Los resultados muestran que la cantidad basal de ROS es menor en la corteza de ratas viejas en comparación con las ratas jóvenes (Figura 11). Al exponerse por 3 horas al péptido  $\beta$ A25-35, se observó un incremento significativo solo en el caso de las ratas viejas (40% de incremento) en comparación al control. En los sinaptosomas hipocampales de ratas viejas el contenido de ROS fue significativamente mayor ( $p = 0.023$ ) que en los obtenidos de ratas jóvenes. Después de 3 horas de exposición al péptido  $\beta$ A25-35, la producción ROS se incrementó significativamente en ambos grupos (25% en jóvenes y un 10% en viejas) ( $p < 0.05$ ).

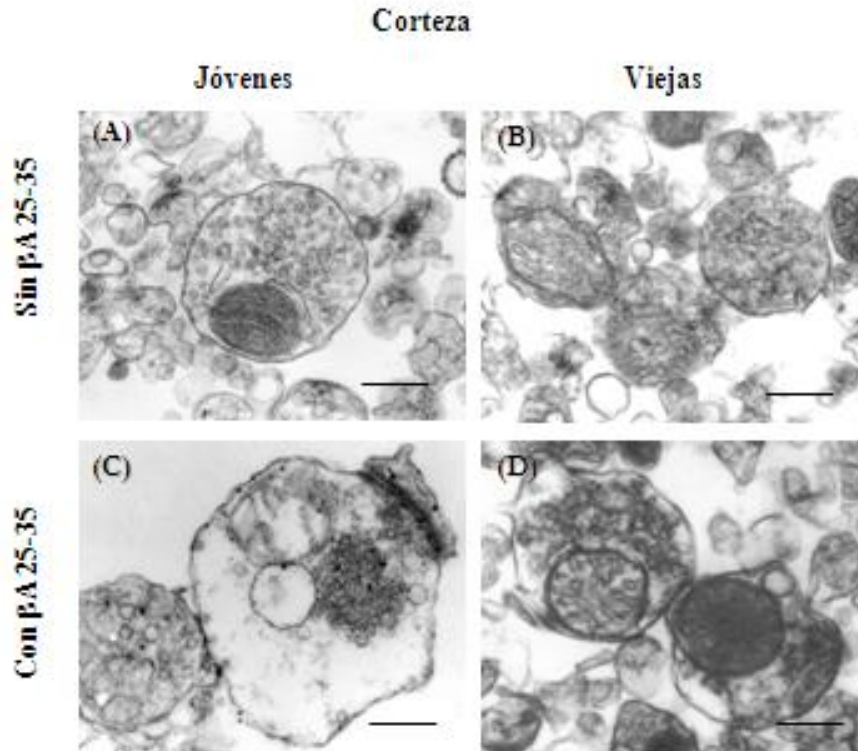


**Figura 11.** µmol de rodamina-123 producidas por miligramo de proteína de sinaptosomas de corteza e hipocampo obtenidos de ratas jóvenes de (3 meses) y viejas (18-24 meses). Los resultados son promedio ± ES (n=4). \* (p<0.05) cuando se compara la corteza con el hipocampo (sin exposición al βA 25-35); - (p<0.05) entre las ratas jóvenes y ratas viejas.

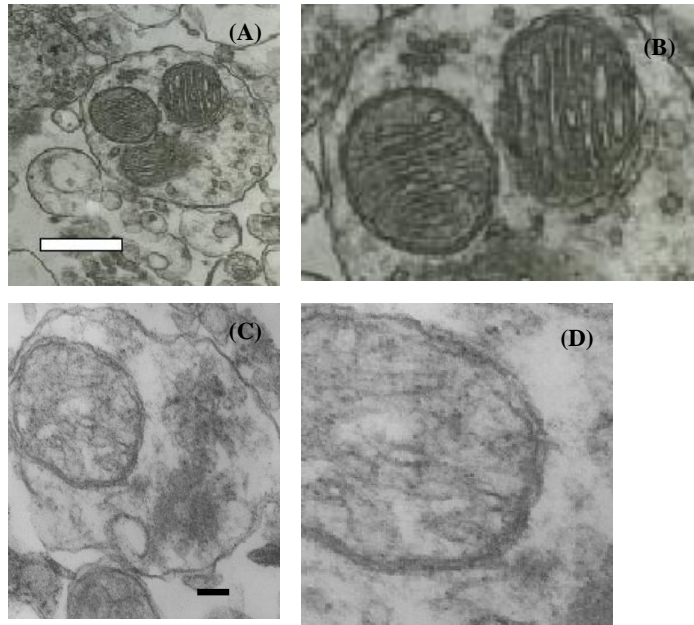
### VIII.5. Cambios ultraestructurales en sinaptosomas corticales de ratas jóvenes y viejas

Los sinaptosomas de hipocampo de ratas jóvenes y viejas se visualizaron por microscopía electrónica y las imágenes representativas se muestran en las figuras 12 y 13. En sinaptosomas de ratas jóvenes se puede apreciar claramente su morfología característica con una membrana sellada, la presencia de múltiples vesículas sinápticas claras y una o más mitocondrias en su interior (Figura 12.A; Figura 13.A; Figura 13.B). Los sinaptosomas obtenidos a partir de ratas viejas muestran mitocondrias agrandadas con una membrana de mayor grosor y un desarreglo de las crestas mitocondriales que parecen hinchadas (Figura 12.B; Figura 13.C; Figura 13.D). El desarreglo y el posible edema mitocondrial observados en los sinaptosomas de ratas viejas, se hacen más evidentes al momento de incubarlas con el péptido βA 25-35 (Figura 12.D). Los sinaptosomas de ratas joven incubados por 3 horas con el péptido βA 25-35 muestran la presencia de reclutamiento vesicular y movilización

hacia el sitio activo más en comparación con las ratas control, como hemos reportado previamente (Mungarro-Menchaca y cols., 2002) (Figura 12.C).



**Figura 12.** Micrografías electrónicas representativas de sinaptosomas de corteza obtenidos de ratas jóvenes de 2-3 meses de edad y viejas de 18-24 meses de edad con y sin exposición al péptido  $\beta$ A 25-35. (A) Sinaptosomas control obtenidos de corteza de ratas jóvenes de 3 meses de edad. Se observa que la membrana de los sinaptosomas está sellada con múltiples vesículas sinápticas con una o más mitocondrias. (B) Sinaptosomas obtenidos de corteza de ratas viejas de 18 – 24 meses de edad. Observamos que la membrana mitocondrial es de mayor grosor y las mitocondrias están agrandadas (C) Sinaptosomas obtenidos de corteza de ratas jóvenes de 3 meses incubados con  $\beta$ A 25-35. Observamos en la imagen reclutamiento de vesículas sinápticas (D) Sinaptosomas obtenidos de corteza de ratas viejas de 18 – 24 meses incubadas con  $\beta$ A 25-35. Observamos mayor el desarreglo de las crestas mitocondriales y posible edema mitocondrial. Magnificación 25.000x.



**Figura 13.** Micrografías electrónicas de los sinaptosomas de corteza obtenidos de ratas jóvenes de 3 meses de edad y viejas de 18-24 a mayor magnificación (30.000x). (A) Sinaptosomas control obtenidos de corteza de ratas jóvenes. Magnificación 25.000x. (B) Los mismos sinaptosomas a mayor amplificación. La membrana mitocondria y las crestas se ven bien preservadas. (C) Sinaptosomas obtenidos de corteza de ratas viejas de 18 – 24 meses (x 25.000) y su magnificación en (D). Se puede observar claramente un desarreglo importante de la citoarquitectura mitocondrial.



## IX. DISCUSIÓN

El presente trabajo se llevó a cabo en un modelo *in vitro*, el cual permitió estudiar los efectos del  $\beta$ A 25-35 sobre terminales nerviosas aisladas. Este modelo ha demostrado ser muy útil para el análisis de eventos funcionales como la neurotransmisión pero también para evaluar la función mitocondrial en un sistema enriquecido y prácticamente aislado. Nuestros resultados demostraron que la toxicidad de la proteína  $\beta$ A se exagera en sinaptosomas de ratas viejas correlacionando con un decremento en la función oxidoreductora mitocondrial y una mayor acumulación de ROS. Estos resultados sugieren que el envejecimiento se asocia con alteraciones mitocondriales que pueden contribuir a la pérdida de la integridad sináptica y que incrementan la vulnerabilidad a la  $\beta$ A. La administración del fragmento 25-35 del  $\beta$ A en terminales nerviosas de ratas viejas, disminuyó considerablemente la capacidad reductora mitocondrial, particularmente en los sinaptosomas aislados del hipocampo (Figura 8). Estos resultados corroboran varios estudios *in vitro* sobre los efectos de la  $\beta$ A en las propiedades mitocondriales (Pappolla M.A y cols, 1998; Hirai K y cols, 2001; Swerdlow R.H y cols, 2004; Manczak M y cols, 2006; Moreira y cols, 2001; 2002). Experimentos previos han demostrado que a concentraciones micromolares la proteína  $\beta$ A es capaz de generar ROS, depletar el ATP, reducir el consumo de oxígeno e inhibir enzimas de la cadena respiratoria en células PC12 (Shearman M.S y cols, 1994). Evidencia previa del laboratorio ha demostrado que *tanto in vivo* como *in vitro*, la toxina mitocondrial, 3-NP exagera la toxicidad inducida por  $\beta$ A en el hipocampo (Arias y cols, 2002; Montiel, y cols, 2006). Por otro lado también se ha demostrado que la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas endógenas potencia esta toxicidad por un mecanismo de disfunción mitocondrial e induce cambios morfológicos semejantes a los reportados en este trabajo (Mungarro-Manchaca y cols, 2002).

El envejecimiento es el principal factor de riesgo para desarrollar la EA, y hasta el momento no se conoce qué cambio o cambios bioquímico/funcionales incrementen la vulnerabilidad al daño sináptico y/o neuronal. En este trabajo observamos que la presencia del  $\beta$ A 25-35 aumentan la cantidad de especies reactivas de oxígeno en sinaptosomas (Figura 11). Algunas de las condiciones que se han reportado asociadas al envejecimiento son la acumulación de ROS y la disminución de la función mitocondrial, probablemente

resultado de un daño en el DNA mitocondrial (Cardoso SM y cols, 2004) o en los sistemas de fusión/fisión mitocondrial.

Las ROS son moléculas pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada que se producen normalmente durante el metabolismo celular (Cardenas E y cols, 2002). Se sabe que la mitocondria es una fuente importante de radicales libres ya que alrededor del 1% del oxígeno molecular que entra a la cadena respiratoria no se reduce completamente llevando a la formación del radical superóxido (Wallace D.C, 2005). El estrés oxidante relacionado con una disfunción mitocondrial puede exacerbarse por diversos procesos patológicos, por el aumento en la demanda metabólica y por la edad (Moreira y cols, 2005). Se sabe que el  $\beta$ A puede penetrar las membranas y se ha encontrado acumulado en mitocondrias y particularmente en contacto con los complejos de la cadena respiratoria (Reddy y cols, 2006). Esto puede provocar una disfunción mitocondrial y, como consecuencia, podría estar incrementando la producción de ROS como se demuestra en este estudio (Figura 11). Por otro lado, está documentado que las terminales sinápticas son sitios de alta demanda energética y dado que la transmisión sináptica requiere niveles altos de ATP celular para la liberación de neurotransmisores, modificaciones pequeñas y crónicas de la actividad mitocondrial pudieran tener impacto en la integridad sináptica a lo largo del envejecimiento (Reddy PH y cols, 2008). Se debe puntualizar además que los sitios de mayor daño estructural en la EA, son aquellos de alta plasticidad sináptica, lo que explicaría la mayor vulnerabilidad de regiones como el hipocampo. Lo anterior, aunado a la presencia de  $\beta$ A, potenciaría la disfunción de las mitocondrias sinápticas y disminuiría la producción de ATP, aumentando la producción de ROS, y en conjunto contribuyendo a la degeneración de la sinapsis. Nuestros resultados muestran que la edad y la exposición al  $\beta$ A, correlacionan con la disminución de la capacidad funcional de la mitocondria y a su vez, con un aumento en la producción de ROS. Estos hallazgos pueden ser importantes para entender ciertos eventos que conducen a la disfunción sináptica temprana que ocurre en la EA.

Otro hallazgo interesante que merece ser analizado con mayor detenimiento en un trabajo futuro es el hecho de que en el envejecimiento y en presencia del péptido  $\beta$ A parece existir un incremento en el consumo de oxígeno (Figura 8) y, además se observó una tendencia

(hasta el momento no significativa) en aumentar la actividad de la citocromo oxidasa (Complejo IV) a mayor edad y en presencia de  $\beta$ A (Figura 9). Aunque estos hallazgos parecen contradecir estudios previos en donde se ha demostrado que la edad disminuye el consumo de oxígeno y la actividad de los complejos enzimáticos mitocondriales (Curti y cols, 1990; Bowling y cols, 1993; Ferrandiz y cols, 1994), se debe tener en cuenta que este estudio involucra cambios muy agudos, porque en los experimentos de oximetría se valoró el efecto inmediato del péptido. Es posible que en estados crónicos de exposición, finalmente se produzca la disminución observada en los trabajos mencionados. De cualquier manera, un incremento en el consumo de oxígeno puede reflejar un estado desacoplado de la cadena respiratoria que estaría acorde con una disfunción mitocondrial inicial. En la década de los años ochentas se descubrió que existen deficiencias en la actividad de las enzimas piruvato deshidrogenasa y de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa en pacientes con EA (Perry y cols 1980; Sorbi y cols 1983; Gibson y cols, 1988). La actividad reducida de la COX se reportó por primera vez en 1990 en plaquetas de pacientes con EA (Parker y cols, 1990). El mecanismo propuesto de la inhibición del complejo IV por  $\beta$ A incluye el bloqueo de los canales de importación de la mitocondria y disminución del importe de subunidades nucleares del complejo IV (Reddy, 2006); secuestro del grupo hemo por  $\beta$ A (Atamana H, 2006) e interacción de  $\beta$ A con la alcohol deshidrogenasa (ABAD) (Lustbander J.W y cols, 2004). Con la edad, la actividad enzimática de los complejos I y IV se encuentran disminuidos en mitocondrias aisladas de ratas (Benzi y cols, 1992; Lenaz G y cols 1997; Martinez M y cols, 1994). Existe controversia si la función mitocondrial altera la dinámica del  $\beta$ A o si es el  $\beta$ A quien altera la función mitocondrial en la EA. En los pacientes con EA, la actividad reducida de la COX y el depósito de placas amiloideas se hacen evidentes cuando hay un deterioro cognitivo leve, o incluso antes de que este se manifieste. La actividad de la COX está reducida en mitocondrias aisladas de la corteza de pacientes jóvenes que portan la isoforma de la APOE  $\epsilon$ 4 y esta apolipoproteína es capaz de unirse a la  $\beta$ A y alterar su agregación (Valla y cols, 2010).

Una posible explicación al aumento del consumo de oxígeno de los sinaptosomas obtenidos de las ratas jóvenes y viejas (Figura 8) y a la tendencia en el aumento de la actividad de la COX (Complejo IV) a mayor edad y en presencia de  $\beta$ A (Figura 9) se refiere al posible desacoplamiento de la cadena del transporte de electrones (Cardoso S, Santos M, 2013).

El desacoplamiento mitocondrial también conocido como fuga de protones es un proceso en el que los protones vuelven a entrar a la matriz mitocondrial sin contribuir a la síntesis de ATP (Cox, 2004). El desacoplamiento hace desaparecer el gradiente de protones sin intervención de la ATP sintasa, de este modo se prosigue el transporte de electrones a ritmo rápido y el sistema hace un intento inefectivo de restaurar el gradiente. La energía producida por el transporte de electrones se descarga en forma de calor en vez de utilizarse para la síntesis de ATP (Werner, Muller-Esterl, 2008). El consumo de oxígeno aumenta cuando existe fuga de protones (Harper ME, Brand M, 1993). Joyce y cols (2003) describieron el metabolismo energético mitocondrial en sinaptosomas obtenidos de ratas viejas (24 meses) y jóvenes (3 meses), utilizando el oxímetro de Clark para medir el consumo de oxígeno. Aunque no encontraron diferencias significativa en la tasa de consumo de oxígeno en ambos grupos, demostraron que el 85% del consumo de oxígeno de las mitocondrias de corteza obtenidos de ratas jóvenes y viejas es el resultado de una fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La formación de superóxido tiene implicaciones con la fuga de protones a través de las proteínas desacopladoras 1 (UCP-1). Las UCP-1 permiten que los protones reingresen a la matriz mitocondrial sin que se capture energía en forma de ATP. Echtay K y cols (2002) demostraron que a través de la interacción de la UCP-1 con el superóxido en tejido adiposo, se disminuía la producción mitocondrial de ROS, siendo un mecanismo potencial para la reducción de ROS. El aumento en el consumo de oxígeno en los sinaptosomas de ratas viejas al incubarse con  $\beta$ A puede ser la consecuencia del desacoplamiento mitocondrial que a su vez estaría subyaciendo la reducción de ROS (Skulachev, 1996).

Manczak M y cols (2005) demostraron una mayor expresión de los genes mitocondriales de los complejos I, III, IV y V en ratones de 12 a 18 años en comparación con los ratones de 2 meses de edad. Estos resultados sugieren un potencial mecanismo de sobreproducción de proteínas de transferencia de electrones. Los mismos autores observaron que la sobreexpresión del mRNA de los genes mitocondriales disminuía en los ratones de 24 meses sugiriendo que la sobreexpresión de genes mitocondriales no puede sostenerse suficiente tiempo y la expresión tiende a disminuir en etapas tardías del envejecimiento. Es posible que el aumento en el consumo de oxígeno (Figura 8) y de la actividad de la COX a

mayor edad y en presencia de  $\beta$ A 25-35 (Figura 10) sean mecanismos compensatorios iniciales y que posteriormente haya una disminución en su actividad al progresar el daño. La hipótesis de la cascada mitocondrial en la EA propone que los genes son los que determinan la función y la durabilidad mitocondrial (Swerdlow y cols, 2004). Tanto los genes nucleares y mitocondriales (mtDNA) y el daño ambiental contribuyen al mantenimiento de la función mitocondrial (Swerdlow y cols, 2009). La homeostasis celular y sináptica pueden compensar y adaptarse a los cambios asociados con la edad, sin embargo llega un punto en el cual la compensación puede ya no ser posible. La hipótesis de la cascada mitocondrial propone que el inicio de daño mitocondrial se determina por mutaciones del DNA mitocondrial en conjunto con la disfunción mitocondrial inducida por el ambiente.

Nosotros observamos que la edad y la presencia de  $\beta$ A alteran de manera importante la morfología sinaptosomal. El análisis ultraestructural mostró que el péptido  $\beta$ A 25-35 causó reclutamiento de vesículas, presencia de vesículas pleomórficas y movilización hacia el sitio activo (Figura 12.C), sugiriendo que el péptido  $\beta$ A es capaz de activar un mecanismo de exocitosis. En los sinaptosomas obtenidos de cortezas de ratas viejas, las mitocondrias se observa con mayor edema, demostrado por el desarreglo de las crestas y un engrosamiento de la membrana externa (Figura 12.B; 12.D; 13.C; 13.D). Estas imágenes sugieren que las mitocondrias de las ratas viejas tienen daño ultraestructural mitocondrial, lo que aporta más evidencias en este sentido. Estas observaciones concuerdan con los estudios ultraestructurales previos de cerebros de pacientes con EA. Hirai y cols (2001) realizaron una descripción ultraestructural detallada de los cerebros de pacientes con EA y describieron una mayor masa mitocondrial en las neuronas durante el envejecimiento y que este cambio persistía en la EA. Muchas mitocondrias cerebrales en pacientes con EA muestran distintas formas de desarreglo, así como degradación lisosomal. Las neuronas de pacientes con EA tienen un menor número de mitocondrias con aspecto normal en comparación al tejido de pacientes sanos, y se correlaciona con un número mayor de deleciones de 5kb en el DNA mitocondrial (Cardenas E y cols, 2002).

Nuestros resultados señalan que los sinaptosomas aislados a partir del hipocampo parecen ser más sensibles a los efectos del  $\beta$ A 25-35 en comparación a los sinaptosomas obtenidos de la corteza, lo que refleja una vulnerabilidad del hipocampo al envejecimiento y a la exposición del  $\beta$ A. El hipocampo es de las regiones que más tempranamente y más severamente se dañan en la EA. Estas observaciones las hicieron por primera vez por O'Keefe y Destovsky (1971) al demostrar que los pacientes con alteraciones en la memoria espacial y episódica tenían daño hipocampal. Estos hallazgos se confirmaron posteriormente en diferentes modelos animales (Bouras y cols. 1994). Geinisman y cols (1992) cuantificaron el número de sinapsis en el hipocampo de ratas jóvenes y viejas por medio de estereología. Ellos observaron una disminución del 24% de la sinapsis axoespinosas en las ratas viejas en comparación con las jóvenes. También mostraron una reducción en la amplitud de los potenciales excitadores postsinápticos. Estos datos sugieren que la edad deteriora el número y la función de las terminales sinápticas en el hipocampo. El hipocampo y su entrada colinérgica son un substrato neuroanatómico importante para los procesos de aprendizaje y memoria. Dado que las alteraciones en la memoria y aprendizaje son una consecuencia común de eventos neurotóxicos, es posible que el hipocampo sea un sitio blanco importante por sus características metabólicas asociadas con su gran plasticidad.

Dado que las terminales sinápticas son especialmente vulnerables en la EA, los sinaptosomas representan un modelo para el estudio *in vitro* de los eventos de toxicidad que se relacionan con el envejecimiento natural y la presencia del  $\beta$ A (Loscher y cols, 1985; Arias y cols, 2002). Con los resultados obtenidos se demostró que la toxicidad de la proteína  $\beta$ A se exagera en sinaptosomas de ratas viejas, y se relaciona con un decremento en la función oxido-reductora mitocondrial y acumulación ROS. En resumen, estos resultados sugieren que la edad y que la presencia del fragmento  $\beta$ A 25-35 son capaces de inducir cambios en la función mitocondrial en las terminales sinápticas aisladas, y que la combinación de ambos contribuye a exagerar la disfunción. Observamos también un aumento en el consumo de oxígeno y una ligera tendencia a incrementar la actividad de la COX en los sinaptosomas obtenidos de corteza de ratas de viejas y en presencia del  $\beta$ A 25-35. Es posible que el aumento en el consumo de oxígeno y de la actividad de la COX a

mayor edad y en presencia de  $\beta$ A 25-35 sean mecanismos compensatorios iniciales con una reducción posterior al progresar el daño. Observamos efectos más severos en el hipocampo, el cual es una región cerebral importante en las funciones cognitivas, pudiendo explicar el deterioro cognitivo en los pacientes con EA. Corroboramos que la edad y la presencia del péptido  $\beta$ A 25-35 donde inducen cambios morfológicos en los sinaptosomas. A mayor edad, las mitocondrias se observan con mayor edema, demostrado por el desarreglo de las crestas.

A diferencia de los estudios realizados *in vitro*, los cuales revelan la neurotoxicidad del  $\beta$ A, en los estudios en humanos la  $\beta$ A no parece actuar como una neurotoxina potente. La deficiencia mitocondrial en EA y su papel en la etiología de la EA todavía no se ha definido, sin embargo se sugiere que los cambios mitocondriales son eventos tempranos en la fisiopatología de esta enfermedad y juegan un papel importante en su etiología. Es necesario comprobar por medio de otros ensayos el posible desacoplamiento mitocondrial que proponemos como explicación al aumento en el consumo de oxígeno y de la actividad de la COX (Figura 8; Figura 10). Para un trabajo futuro se propone medir la cinética de los protones, el potencial de membrana mitocondrial, la oxidación de sustratos para valorar los diferentes sitios del sistema de fosforilación oxidativa, además de analizar la susceptibilidad de mitocondrias sinápticas contra mitocondrias del soma neuronal.

## X. CONCLUSIONES

- Los sinaptosomas son un buen modelo para estudiar los mecanismos de toxicidad de la proteína  $\beta$ A.
- Los sinaptosomas obtenidos de ratas viejas son más susceptibles a la toxicidad de la  $\beta$ A 25-35 comparados con los de ratas jóvenes.
- La edad y la presencia de  $\beta$ A 25-35 favorecen un aumento en el consumo de  $O_2$  sugiriendo un posible desacoplamiento mitocondrial.
- Los sinaptosomas aislados a partir del hipocampo parecen ser más sensibles que los obtenidos de corteza a los efectos del  $\beta$ A 25-35.
- La edad y la presencia del péptido  $\beta$ A 25-35 se asocian con cambios morfológicos en los sinaptosomas.
- El envejecimiento y la presencia de  $\beta$ A 25-35 aumentan la cantidad de especies reactivas de oxígeno en los sinaptosomas.
- La producción de especies reactivas de oxígeno tiene correlación con la alteración en la actividad mitocondrial en los sinaptosomas.



## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox N, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging–Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* (2011) 3, 270–9.
- Alvarez G, Ramos M, Ruiz F, Satrústegui J, Bogónez E. Pyruvate protection against  $\beta$ -amyloid-induced neuronal death: role of mitochondrial redox state. *Journal of Neuroscience Research*. (2003) 73: 260-269.
- Apelt J, Bigl M, Wunderlich P, Schliebs R. Aging-related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta secretase activity and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology. *Int. J. Devl Neuroscience* (2004) 22, 475-484.
- Arias C, Montiel T, Quiroz R, Massieu L.  $\beta$ -Amyloid Neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo an in isolated nerve terminals: Implications for Alzheimer's Disease. *Experimental Neurology* (2002) 176, 163-174.
- Atamna H, Boyle K. Amyloid- $\beta$  peptide binds with heme to form a peroxidase: Relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease. *PNAS* (2006) 103, 3381-86.
- Barnes L, Fox, J.H, Bach J. Natural history of mild cognitive impairment in older persons. *Neurology* (2002) 59, 198-205.
- Benzi G, Pastoris O, Marzatico F, Villa RF, Dagani F, Curti D. The mitochondrial electron transfer alteration as a factor involved in the brain aging. *Neurobiol Aging* (1992) 13, 361–368.
- Bouras C, Hof PR, Giannakopoulos P, Michel JP, Morrison JH. Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: a quantitative evaluation of a one-year autopsy population from a geriatric hospital. *Cereb. Cortex* (1994) 4 (2), 138–50.

- Bowling D.C, Matisya E.M, Walker L, et.al. Age dependent impairment of mitochondrial function in the primate brain. *J Neurochem* (1993) 60, 1964-67.
- Busse, A, Hensel A, et.al. Mild cognitive impairment. Long-term course of four clinical subtypes. *Neurology* (2006) 67, 2176-2185.
- Butterfield D.A., Bush A. Alzheimer's amyloid  $\beta$  peptide (1-42) involvement of methionine residue 35 in the oxidative stress and neurotoxicity of this peptide. (2004) 35, 563-68.
- Butterworth R.F, Besnard A. Thiamine dependent enzyme changes in temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis.* (1990) 5, 179-184.
- Cappai R, White A. Amyloid  $\beta$ . *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* (1999) 31, 885-889.
- Cardenas E, Davies K. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology of Medicine* (2002) 29, 222-230.
- Cardoso S, Santos M, et.al. UCP2 and ANT differently modulate proton-leak in brain mitochondria of long-term hyperglycemic and recurrent hypoglycemic rats. *J Bioenerg Biomembr* (2013) 24, 113-120.
- Cardoso SM, Santana I, Swerdlow RH, Oliveira CR. Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances Abeta toxicity. *J Neurochem* (2004) 89, 1417-26.
- Caspersen C, Wang N, Yao J, Sosunov A, Chen X, Lustbader JW, Xu HW, Stern D, McKhann G, Yan SD. Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J* (2005)19, 2040–2041.
- Chen J, et al.. Amyloid  $\beta$  Induced Mitochondrial Dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease* (2007)12, 177-184.
- Chertkow HM, Bergman H, et.al. Standard neuropsychological tests do not predict development of Alzheimer's Disease in individuals with "Age associated Cognitive Decline." *Can J Neurol Sciences* (1998)25, Suppl 1: S27.
- Clark Jr, LC; Wolf, R; Granger, D; Taylor, Z. Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *Journal of applied physiology* (1953) 6, 189–93.

- Cooper A, et.al. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. En: Rosemberg RN, Prusiner SB, DiMauro S. The molecular and genetic basis of neurological disease. Boston: Buterworth-Heinemann, pp:1242-5.
- Cotman C.W, Pike C, Copani A.  $\beta$ -Amyloid neurotoxicity: a discussion of invitro findings. *Neurobiol. Aging* (1992)13, 587-590.
- Coulson E.J, Paliga K, et.al. What the evolution of the amyloid protein precursor supergen family tells us about its function. *Neurochem. Int.* (2000) 36, 175-184.
- Cox, Nelson (2004). *Lehninger* (cuarta edición). Palgrave Macmillan. pp. 704-723.
- Curti D, Giangare M.C, Redolfi M.E, et.al. Age related modifications of cytochrome c oxidase activity in discrete brain regions. *Mech. Aging Dev* (1990)55, 171-180.
- Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* (1987) 78, 151-64.
- Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *The Lancet.* (1976) 2, 1403-12.
- den Dunnen WF, Brouwer WH, Biljard E, et.al. No disease in the brain of a 115 year old woman. *Neurobiol Aging* (2008) 29, 1127-32.
- Dodart JC, Mathis C, Bales KR, Paul SM, Ungerer A. Early regional cerebral glucose hypometabolism in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. *Neurosci Lett* (1999) 277, 49-52.
- Duchen MR. Mitochondria in heath and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* (2004) 25, 365-451.
- Echtay K, Roussel, et.al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* (2002) 415, 96-99.
- Elahi, D., Muller D. Effect of age and obesity on fasting levels of glucose, insulin, glucagon and growth hormone in man. *Journal of Gerontology* (1982) 37,485-491.
- Fagan AM, Mintun MA, Shah AR, Aldea P, Roe CM, et al. Cerebrospinal fluid tau and ptau(181) increase with cortical amyloid deposition in cognitively normal individuals: implications for future clinical trials of Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* (2009) 1, 371-380.

- Ferrandiz M.L, Martinez M, De Juan E, et.al. Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in the brain of aged mice. *Brain Res* (1994) 644, 335-338.
- Fratiglioni L, Ahlbom A, Viitanen M, Winblad B. Risk factors for late-onset Alzheimer's disease: A population-based, case control study. *Ann Neurol* (1993)33, 258–66.
- Friedlander R. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. (2003). *N Engl J Med* (2003) 348, 1365-1375.
- Geinisman Y, Morrell F, de Toledo-Morrell L. Increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities following hippocampal kindling. *Brain Res* (1992) 569, 341-7.
- Gibson GE, Sheu KF, Blass JP, Baker A, Carlson KC, Harding B, Perrino P. Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. *Arch Neurol* (1988) 45, 836–840.
- Gomes A, Fernandes E, Lima J. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of biochemical and biophysical methods* (2005) 65, 45-80.
- Gylys K, Fein J, Yang F, Wiley D, Miller C, Cole G. Synaptic changes in Alzheimer's Disease. Increased amyloid  $\beta$  and gliosis in surviving terminals is accompanied by decreased PSD-95 fluorescence. *Am J Pathol* (2004) 165,1809-1817.
- Hardy J, Selkoe D. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* (2002) 297, 353-357.
- Hashimoto M, Rockenstein E, Crews L, Masliah E. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Neuro Molecular Medicine* (2003) 4, 21-34.
- Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer's disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 Census. *Neurology*.
- Hebert LS, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer's disease in the U.S. population: Prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* (2003) 60, 1119–22.

- Heintz K, Beck M, Schliebs R, Perez-Polo J. Toxicity mediated by soluble oligomers of b-amyloid (1-42) on cholinergic SN56.B5.G4 cells. *J.Neurochem.* (2006) 98, 1930-1945.
- Herbert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* (2000) 60, 1119-22.
- Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* (2001)21, 3017–3023.
- Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology* (2007) 68, 326-37.
- Hopen, Fein, Yang. Synaptic Changes in Alzheimers Disease: Increased Amyloid- $\beta$  and Gliosis in Surviving Terminals is Accompanied by Decreased PSD-95 Fluorescence. *Neurobiology* (2004) 165, 1809-17.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* (2004) 274, 99-102.
- Hyman BT, Phelps, CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, et al. National Institute on Aging–Alzheimer’s Association guidelines on neuropathologic assessment of Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement* (2012) 8, 1–13.
- Jack CR, Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, et al. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging–Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement* (2011) 7, 257–62.
- Joseph J.A, Shukitt-Hale V, Casadesus G, Fisher D. Oxidative stress and inflammation in brain aging: nutritional considerations. *Neurochemical Research.* (2005) 30, 927-935.

- Joyce O.J.P, Farmer M.K, Tipton K.F, Porter R.K. Oxidative phosphorylation by in situ synaptosomal mitochondria from whole brain of young and old rats. *J.Neurochem.* (2003) 86, 1032-1041.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, et.al. APP processing and synaptic function. *Neuron.* (2003) 37, 925-37.
- Kish F, Mastrogiacono M, Guttman Y, Furukawa J.W, et.al. Decreased brain protein levels of cytochrome oxidase subunitis in Alzheimer's disease and in hereditary spinocerebellar ataxia disorders: a nonspecific change? *J Neurochem* (1999) 72, 700-707.
- Klyubin I, Betts V, Welzel AT, et.al. Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci* (2008) 28, 4231-7.
- Larson J, Lynch G, Games D, Seubert P. Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Res* (1999) 840, 23-35.
- Lasarge, C.L. et al., Deficits across multiple cognitive domains in a subset of aged Fischer 344 rats. *Neurobiol. Aging* (2006) 22, 144-52.
- Lenaz G, Bovina C, Castelluccio C, Fato R, Formiggini G, Genova ML, Marchetti M, Pich MM, Pallotti F, Parenti CG, Biagini G. Mitochondrial complex I defects in aging. *Mol Cell Biochem* (1997) 174, 329–333.
- Lister JP, Barnes CA. Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Arch Neurol* (2009) 66, 829-33.
- Loscher W, Boheme G, Muller F, Pagliusi S. Improved Method for Isolating Synaptosomes from 11 Regions of One Rat Brain: Electron Microscopic and Biochemical Characterization and Use in the Study of Drug Effect on Nerve Terminal gamma-Aminobutyric Acid in vivo. *Journal of Neurochemistry.* (1985) 45, 879-889.
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, et.al. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* (1999) 155, 853-62.

- Lustbander J, Cirilli M, Lin C, et.al.. ABAD directly links A $\beta$  to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease, *Science* (2004) 304, 448-452.
- Manczak M, Anekonda T, Henson E, Park P, Quin J, Reddy H. Mitochondria are a direct site of A $\beta$  accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for a free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human Molecular Genetics* (2006) 15, 1437-1449.
- Manczak M, Jung Y, Park BS, Partovi D, Reddy PH. Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging. *J Neurochem* (2005) 92, 494–505
- Martinez M, Ferrandiz ML, De Juan E, Miquel J. Age-related changes in glutathione and lipid peroxide content in mouse synaptic mitochondria: relationship to cytochrome c oxidase decline. *Neurosci Lett* (1994) 170, 121–124.
- Masliah E, Mallory M, Alford M, et al.. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* (2001) 56, 127-9.
- Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimers disease. *Nature*. (2004)430, 631-639.
- Maurice T, Lockoart B.P. Reversion of  $\beta$  (25-35) amyloid peptide-induced amnesia by NMDA-receptor associated glycine site antagonists. *Brain Res.* (1996) 731, 253-259.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging–Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* (2011) 7, 263–9.
- Mesalial E,, Crews L, Hansen L. Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* (2006) 9, Suppl: 91-9.
- Moreira P.L, Sledlak S, Allev G, Zhu X, Cash A, Smith M, Perry G. Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer's Disease. *Journal of Neural Transmission* (2002) 112, 921-932.
- Moreira PI, Santos MS, et.al. Amyloid beta-peptide promotes permeability transition pore in brain mitochondria. *Biosci Rep* (2001) 21, 789-800.

- Moreira PI, Santos MS, et.al. Effect of amyloid beta on permeability transition pore: a comparative study. *J Neurosci Res* (2002) 69, 257-67.
- Mosmann, T, et.al. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* (1983) 65, 55–63.
- Mucke L, Masliah E, Yu G, Mallory M. et.al.. High level neuronal expression of A $\beta$  1-42 in wild type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation, *J Neurosci* (2000) 20, 4050-4058.
- Mungarro X, Ferrera P, Moran J, Arias C. Amiloide Peptide Induces Ultrastructural Changes in Synaptosomes and Potentiates Mitochondrial Dysfunction in the Presence of Ryanodine. *J Neurosci Res* (2002) 68:89-96.
- Nixon R, et.al. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer's Disease. *Journal of Cell Science* (2007) 120, 4081-91.
- O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* (1971) 34;1, 171-5.
- Pappolla M.A, Chyan Y.J, Omar R, Hsiao K, Perry G, Smith M.A, Bozner P. Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo. *Am. J. Pathol* (1998) 152, 871-877.
- Parker WD Jr, Filley CM, Parks JK. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* (1990)40:1302–1303.
- Peña F, Gutiérrez-Lerma A, Quiroz-Baez R, Arias C. The role of beta-amyloid protein in synaptic function: implications for Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol* (2006)4;2,149-63.
- Perry EK, Perry RH, Tomlinson BE, Blessed G, Gibson PH. Coenzyme A-acetylating enzymes in Alzheimer's disease: possible cholinergic 'compartment' of pyruvate dehydrogenase. *Neurosci Lett* (1980)18;105–110.
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: Clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* (1999)56;303–8.



- Pike C.J, Brudick D, Walencevich A.J, et.al. Neurodegeneration induced by  $\beta$ -amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci.* (1993) 13, 1676-87.
- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretzschmar H, Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* (2006) 26;27: 7212-7221.
- Querfurth H, La Ferla F. Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* (2010) 28, 362;4.
- Quiroz R. Estudios Sobre Toxicidad y Generación de la Proteína  $\beta$ -amiloide en dos Modelos in Vitro. Relevancia Para la Enfermedad de Alzheimer. Tesis de Licenciatura en Investigaciones Biomédicas. UNAM.
- Raji CA, Ho AJ, Parikshak NN, Becker JT, Lopez OL, Kuller LH, et al. Brain structure and obesity. *Hum Brain Mapp* (2010)31, 3:353–64.
- Reddy PH, Beal MF. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* (2008)14; 45-53.
- Reddy PH, McWeeney S, Park BS, Manczak M, Gutala RV, Partovi D, Jung Y, Yau V, Searles R, Mori M, Quinn J. Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* (2004)13; 1225–1240.
- Reddy PH. Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage. Implications for the development and progression of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* (2006) 96, 1-13.
- Reiman EM, Caselli RJ, et.al. Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E. *N Engl J Med* (1996) 334, 12; 752-8.
- Reiman EM, Uecker A, Gonzalez-Lima F, Minear D, Chen K, Callaway NL, Berndt JD, Games D. Tracking Alzheimer's disease in transgenic mice using fluorodeoxyglucose autoradiography. *Neuroreport* (2000)11; 987–991.
- Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* (2011)7; 3: 137–52.

- Rolfe D.F, Brand M.D. The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. *Biosci Rep.* (1997) 17, 9-16.
- Rönnekaa E, Zethelius B, Lannfelt L, Kilander L. Vascular risk factors and dementia: 40-year follow-up of a population-based cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord* (2011)31(6):460-6.
- Rowe JW, Kahn RL. Human Aging: Usual and Successful. *Science* (1987), 237, 143-149.
- Rusanen M, Kivipelto M, Quesenberry CP, Zhou J, Whitmer RA. Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Intern Med* (2010);171,4:333–9.
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* (2007); 68: 1501-8.
- Smith M.A, Nunomura A, Zhu X, Takeda A, Perry G. Metabolic, metallic and mitotic sources of oxidative stress in Alzheimer disease. *Antioxid Redox Signal* (2000); 2 (3) 413-20. .
- Smith MA, Perry G, Richey PL, et.al. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* (1996); 382; 120-1.
- Sorbi S, Bird ED, Blass JP. Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain. *Ann Neurol* (1983);13:72–78.
- Stepanichev M, Zdobnova I.M. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  central administration on hippocampal damage in rat induced by amyloid  $\beta$ -peptide 25-35. *J. Neurosci Res.* (2003) 71, 110-120.
- Strazielle C, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Lalonde R. Regional brain cytochrome oxidase activity in [beta]-amyloid precursor protein transgenic mice with the swedish mutation. *Neuroscience* (2003);118:1151–1163.
- Swerdlow R, Burns J, Khan S. The Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis. *J Alzheimers Dis* (2010); 20: 265–279.
- Swerdlow RH, Khan SM. A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses* (2004);63:8–20.

- Swerdlow RH, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: an update. *Exp Neurol* (2009);218:308–315.
- Swerdlow RH. Is aging part of Alzheimer's disease, or is Alzheimer's disease part of aging? *Neurobiol Aging* (2007); 28:1465–1480.
- Swerdlow RH. Mitochondrial medicine and the neurodegenerative mitochondriopathies. *Pharmaceuticals* (2009);2:150–167.
- Takuma K, Shi Du S, Stern D, Yamada K. Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum, stress and apoptosis in Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci* (2007); 97, 312-316.
- Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* (2005); 120: 545-55.
- Tapp, P.D. et al., Concept abstraction in the aging dog: development of a protocol using successive discrimination and size concept tasks, *Behav. Brain Res* (2004); 153, 199.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* (1991); 30: 572-80.
- Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J. «The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD». *Neurology* (2004) 62 (11) 1984–9.
- Valla J, Yaari R, Wolf AB, Kusne Y, Beach TG, Roher AE, Corneveaux JJ, Huentelman MJ, Caselli RJ, Reiman EM. Reduced posterior cingulate mitochondrial activity in expired young adult carriers of the APOEepsilon4 allele the major late-onset Alzheimer's susceptibility gene. *J Alzheimers Dis.* in press
- Vetrivel K, Zhang Y, Xu H, Thinakaran G. Physiological and pathological functions of presenilins. *J Mol Neurosci* (2006). 1: 1-12.
- Vincent GK, Velkof VA. The next four decades: The older population in the United States: 2010 to 2050. Washington, D.C.: U.S. Census Bureau (2010).
- Wallace D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* (2005), 39, 359-407.

- Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers-a decade of discovery. *J Neurochem* (2007); 101: 1172-84.
- Walsh DM, Townsend M, Podlisny MB, et.al. Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (A $\beta$ ) fibrillogenesis block oligomerization of natural A $\beta$  and thereby rescue long-term potentiation. *J Neurosci* (2005); 25: 2455-62.
- Werner, Müller-Esterl (2008). *Bioquímica, Fundamento para Medicina y Ciencias de la Vida* (1 edición). Editorial Reverté. pp. 518.
- Whitehouse PJ, Struble RG, Clark AW, Price DL. Alzheimer disease: plaques, tangles, and the basal forebrain. *Ann Neurol* (1982); Nov;12 (5):494.
- Whitmer RA, Gustafson DR, Barrett-Connor E, Haan MN, Gunderson EP, Yaffe K. Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology* (2008);71:1057–64.
- Wirths O, Weis J, Kayed R, Saido T, Bayer T. Age dependent axonal degeneration in an Alzheimer mouse model. *Neurobiol Aging* (2007);28(11):1689-99.
- Yankener B.A, Duffy L, Kishner D. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid protein: reversal by tachykinin neuropeptides. (1990) *Science*. 250, 279-82.