



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Biología Experimental

**Efecto de los flavonoides sobre moléculas pro-inflamatorias en
ratas inyectadas con $A\beta_{(25-35)}$.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Biología Experimental

PRESENTA:

Nallely Cervantes Piza

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca
Facultad de Medicina

COMITÉ TUTOR: Dra. Rosalinda Guevara Guzmán
Facultad de Medicina
Dr. Luis Felipe Jiménez García
Facultad de Ciencias

MÉXICO, D.F. AGOSTO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Biología Experimental

**Efecto de los flavonoides sobre moléculas pro-inflamatorias en
ratas inyectadas con $A\beta_{(25-35)}$.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Biología Experimental

PRESENTA:

Nallely Cervantes Piza

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca
Facultad de Medicina

COMITÉ TUTOR: Dra. Rosalinda Guevara Guzmán
Facultad de Medicina
Dr. Luis Felipe Jiménez García
Facultad de Ciencias

MÉXICO, D.F. AGOSTO DE 2013

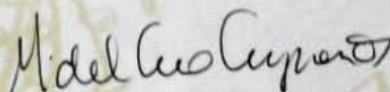
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de marzo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **CERVANTES PIZANALLELY** con número de cuenta **301192426** con la tesis titulada **"EFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE MOLÉCULAS PRO-INFLAMATORIAS EN RATAS INYECTADAS CON AMILOIDE β (25-35)"** realizada bajo la dirección de la **DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA:**

Presidente: DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO
Vocal: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Secretario: DRA. FRANCISCA PÉREZ SEVERIANO
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ
Suplente: DR. FRANCISCO RAÚL CHÁVEZ SÁNCHEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 6 de junio de 2013



DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADEZCO

- **Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.**

Por abrirme las puertas y permitir mi estancia en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina y en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

El ingreso a la UNAM significo para mí una valiosa oportunidad para crecer y continuar mi formación personal.

- Al apoyo recibido por el **CONACYT**

(Número de becario 363386)

- A los miembros de mi comité tutorial:

- **Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca.**

Por permitirme colaborar en este proyecto.

- **Dra. Rosalinda Guevara Guzmán.**

- **Dr. Luis Felipe Jiménez García.**

Por sus comentarios y aportaciones a este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

- Al jurado del examen:
 - Presidente: **Dra. María de Lourdes Massieu Trigo.**
 - Vocal: **Dr. Luis Felipe Jiménez García.**
 - Secretario: **Dra. Francisca Pérez Severiano.**
 - Suplente: **Dra. María del Carmen García Rodríguez.**
 - Suplente: **Dr. Francisco Raúl Chávez Sánchez.**

Por guiarme en este trabajo a través de correcciones y comentarios.

- A **Estephania**, gracias por enfrentar lo bueno y lo malo conmigo, pues sin ti no lo hubiera logrado. Gracias por emprender este proyecto conmigo y ser mi amiga.

- A la **Dra. Francisca Pérez Severiano** por abrirme las puertas de su laboratorio, pero sobre todo por su enseñanza.

- A **Minerva** por su enseñanza en las técnicas de histología y por su paciencia.

- A **Alfonso Díaz** por enseñarme la técnica de ELISA y por su hospitalidad en Puebla.

Al Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y al Bioterio de la Facultad de Medicina por su ayuda, al proporcionarnos las ratas para este proyecto.

Y a todos aquellos que hicieron posible esta Tesis... Muchas Gracias!!

DEDICATORIA

Esto no sería igual sin la participación de mi familia.

- A mis padres, **Gabriel Cervantes** y **Francisca Piza**, mil gracias por darme en todo este tiempo lo mejor de ustedes; porque me han enseñado a valorar lo que tengo, por todo lo que me han dado y en especial por su amor, consejos, comprensión y cariño.
- A mis hermanas, **Chumuki** y **Monne** a las que les tengo mil cosas que agradecer. No hay palabras suficientes para ustedes....gracias por su paciencia, comprensión, motivación, amor, cariño. GRACIAS POR TODO.
- A **Christian** por tu amor, cariño, enseñanza, comprensión y motivación. En especial en los momentos más difíciles. Gracias por estar a mi lado todo este tiempo.

A todos ustedes porque son muy importantes en mi vida....

ÍNDICE

	PAG
Resumen.....	13
Abstract.....	14
I. Introducción.....	15
II. Antecedentes.....	17
2.1 Enfermedades Neurodegenerativas.....	17
2.2 Enfermedad de Alzheimer.....	17
2.2.1 Definición.....	17
2.2.2 Neuropatología de Alzheimer.....	19
2.2.2.1 Péptido Amiloide- β	20
2.3 Inflamación.....	26
2.3.1 Interleucinas.....	28
2.3.1.1 Citocinas pro-inflamatorias.....	29
2.3.1.1.1 Factor de Necrosis Tumoral- α	29
2.3.1.1.2 Interleucina 1 β	31
2.3.1.1.3 Interleucina 6.....	32
2.3.1.1.4 Interleucina 17.....	33
2.3.2 Péptido amiloide β e Inflamación.....	34
2.4 Estrés oxidante.....	36
2.4.1 Radicales libres.....	37
2.4.1.1 Fuentes endógenas.....	40
2.4.1.2 Fuentes exógenas.....	42
2.4.2 Péptido amiloide β y estrés oxidante.....	43
2.4.3 Peroxidación lipídica.....	47
2.5 Antioxidantes.....	50
2.5.1 Flavonoides.....	52
2.5.1.1 Epicatequina.....	54

2.5.1.2. Resveratrol.....	56
III. Justificación.....	60
IV. Hipótesis.....	60
V. Objetivo general.....	61
VI. Objetivos particulares.....	61
VII. Material y método.....	62
8.1 Animales.....	62
8.2 Preparación del agregado amiloide- $\beta_{(25-35)}$, del resveratrol, la epicatequina y cirugía estereotáxica.....	63
8.3 Determinación de especies reactivas de oxígeno.....	63
8.4 Medición de peroxidación lipídica.....	65
8.5 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.....	65
8.6. Determinación de la expresión de interleucinas pro-inflamatorias.....	66
VIII. Análisis estadístico.....	67
IX. Diagrama de trabajo.....	68
X. Resultados.....	69
11.1 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno.....	70
11.2 Cuantificación de la peroxidación lipídica.....	74
11.3 Cuantificación de los niveles de TNF- α	78
11.4 Cuantificación de los niveles de la Interleucina-6.....	80
11.5 Cuantificación de los niveles de la Interleucina- 1 β	82
11.6 Cuantificación de los niveles de la Interleucina-17.....	84
XI. Discusión.....	86
XII. Conclusiones.....	98
XIII. Referencias bibliográficas.....	99
XIV. Anexos.....	112

Abreviaturas

- α PPAs** porción α -soluble de la PPA
- β PPAs** porción β -soluble de la PPA
- A β** amiloide β
- A β ₍₂₅₋₃₅₎** amiloide β fracción 25-35
- ADAM17** dominio metalopeptidasa 17
- ApoE** apolipoproteína E
- CA** Cornu ammonis
- COX** ciclooxigenasa
- COX-1** enzima ciclooxigenasa-1
- COX-2** enzima ciclooxigenasa-2
- CSF** factores estimulantes de colonias
- Cu** cobre
- CuSO₄** sulfato de Cobre
- DFC** diclorofluoresceina
- DCF DA** diclorofluoresceina diacetato
- EA** enfermedad de Alzheimer
- ERNs** especies reactivas de nitrógeno
- EROs** especies reactivas de oxígeno
- FC** factores de crecimiento
- Fe** hierro o fierro
- FHA** filamentos helicoidales apareados
- GPx** glutatión peroxidasa
- GRed** glutatión reductasa
- GST** glutatión-s-transferasa

HOO· hidroperoxilo
H₂O₂ peróxido de hidrógeno
HClO ácido hipocloroso
HNO₂ ácido nitroso
IFN interferones
ILs Interleucinas
IL-1 β Interleucina 1 β
IL-6 Interleucina 6
IL-17 Interleucina 17
iNOS sintasa del óxido nítrico, isoforma inducible
LCR líquido cefalorraquídeo
LTs leucotrienos
Mg magnesio
MHC-I complejo de histocompatibilidad
Mn manganeso
MNFs marañas neurofibrilares
Na₂CO₃ carbonato de sodio
NADH nicotinamida adenina dinucleótida
NADPH nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
NaOH hidróxido de sodio
NF κ B factor nuclear kappa B
NO₂⁺ catión nitrilo
NOS sintasa del óxido nítrico
O₂⁻ anión superóxido
O₃ ozono
-OH anión hidroxilo
ON óxido nítrico
ONOO⁻ peroxinitrito
ONOOH ácido peroxinitroso
¹O₂ oxígeno singulete

PAF factor activador de plaquetas
PGs prostaglandinas
PL peroxidación de lípidos
PMN polimorfonucleares
PN placas neuríticas
PNs placas neuríticas seniles
PPA proteína precursora amiloide
PS1 presenilina 1
PS2 presenilina 2
PUFAs ácidos grasos poliinsaturados
RL radicales libres
RO· radical alcoxilo
ROO· radical peroxilo
ROOH peróxidos orgánicos
ROONO alquil peroxinitritos
Se selenio
SOD superóxido dismutasa
TACE factor de necrosis tumoral- α de la enzima convertidora
T_h 17 T helper 17
TNF- α factor de necrosis tumoral α
Zn zinc

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida de la memoria. Neuropatológicamente se observan marañas neurofibrilares y placas neuríticas que contienen amiloide- β .

El amiloide- β , componente principal de las placas neuríticas (PN), proviene de la hidrólisis alternativa de la proteína precursora de amiloide (PPA). El A β se agrega en condiciones de alta hidrofobicidad, provocando un cambio conformacional en el péptido. Se ha descrito que en la secuencia de aminoácidos del A β existen varios dominios funcionales, entre los que cabe destacar el dominio de neurotoxicidad A β ₍₂₅₋₃₅₎. Estudios *in vitro* sugieren que la metionina localizada en la posición 35 es la responsable del daño oxidante. El uso de antioxidantes, como el resveratrol y la epicatequina, evita el daño que causa el péptido. Es por eso que en nuestro trabajo evaluamos el efecto del A β ₂₅₋₃₅ inyectado en el hipocampo de ratas; cuantificamos la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF α , así como la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y peroxidación de lípidos (PL) a diferentes tiempos; además utilizamos un pre-tratamiento con Epicatequina y Resveratrol.

Los resultados muestran que el A β ₂₅₋₃₅ incrementa la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF α , así como la formación de EROS y PL. El pre tratamiento con Resveratrol y Epicatequina disminuyó la formación de EROS y PL. También disminuyó la concentración de citocinas pro-inflamatorias.

Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder characterized by memory loss. Neuropathological hallmarks of this disease are the neurofibrillary tangles and neuritic plaques.

Amyloid- β is the main component of the neuritic plaques, it cleaves from the amyloid precursor protein (APP). Amyloid- β 's domains had been described; the fraction 25-35 is the neurotoxic domain. Studies *in vitro* suggest that methionine localized in 35 position is responsible of oxidative damage. The use of antioxidants as resveratrol and epicatechin prevent damage induced by peptide. In this sense, our work evaluates the function of these antioxidants in rats injected in the hippocampus with de fraction 25-35. We quantified the expression of IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF α . Likewise we determined reactive oxygen species and lipid peroxidation.

Our results indicate that A β 25-35 produces a significant increase of ROS, LP and expression IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF α . Pretreatment with epicatechin and resveratrol decreased the formation of ROS, PL and pro-inflammatory cytokines concentration.

I. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida de la memoria de acontecimientos recientes y de la capacidad de razonar y manipular objetos cotidianos¹. En el estudio microscópico se observan marañas neurofibrilares (NFT), placas neuríticas que contienen amiloide- β y la acumulación de éste en las paredes de arterias cerebrales¹.

El amiloide- β ($A\beta$), componente principal de las placas neuríticas (PN), proviene de la hidrólisis alternativa de la proteína precursora de amiloide (PPA)², el cual, al encontrarse en condiciones de alta hidrofobicidad, provoca un cambio conformacional en el péptido. Las PN están constituidas tanto por el $A\beta_{(1-40)}$ como por el $A\beta_{(1-42)}$, éste último se encuentra en mayor proporción dado que es hidrofóbico y presenta un mayor potencial de agregación, formando un núcleo sobre el que se deposita el $A\beta_{(1-40)}$ ³. Por otro lado, está descrito que en la secuencia de aminoácidos del $A\beta$ existen varios dominios funcionales, entre los que cabe destacar el dominio de neurotoxicidad $A\beta_{(25-35)}$ ⁴. El $A\beta$ ejerce efectos tóxicos sobre las neuronas, vía estrés oxidante e inflamación⁵.

El estrés oxidante, que desempeña un papel fundamental en la patología temprana de la enfermedad, provoca la alteración de la transmisión sináptica, la cual es promovida por la presencia de especies reactivas de oxígeno (EROs). Además, el estrés oxidante incrementa la producción y agregación del amiloide- β favoreciendo la hiperfosforilación de tau^{2,3}.

Se considera que existen varios mecanismos promotores de EROs durante la enfermedad, uno de ellos es la microglía activada; la cual tiene la capacidad de producir grandes cantidades de EROs como resultado de la inducción de la expresión de moléculas pro-inflamatorias y sintasa de óxido nítrico

(NOS), y que además produce grandes cantidades de óxido nítrico (ON), éste último, a su vez, produce peroxinitritos altamente dañinos para la célula³.

Por otro lado, el A β puede promover la neurodegeneración por la activación de las células de la microglía. Las cuales, una vez activadas, también puede activar a los astrocitos y así, ambos pueden activar la respuesta inflamatoria contra los depósitos extracelulares del A β ⁶. De esta manera, la microglía libera una gran variedad de marcadores pro-inflamatorios, especies reactivas de oxígeno, entre otros^{2,3}.

Hasta la fecha no existe cura para la enfermedad de Alzheimer, por lo que se continua con la búsqueda de un tratamiento o preventivo; recientemente, se ha enfocado la atención sobre los efectos neuroprotectores de los flavonoides, debido a que, como es sabido, las células del organismo permanecen en un balance entre eventos oxidativos y antioxidantes⁷.

Con la finalidad de encontrar un tratamiento en el modelo experiemetal de Alzheimer en este trabajo utilizamos el modelo de inyección intrahipocampal del A β (25-35), en ratas Wistar. Cuantificamos las especies reactivas de oxígeno (EROs) y la peroxidación de lípidos (PL) como marcadores de estrés oxidante y realizamos ELISA para cuantificar las interleucinas pro-inflamatorias (IL-1 β , 1L-6, IL-17 y TNF- α) como marcadores de inflamación. Además utilizamos un pre-tratamiento con flavonoides para evitar el estrés oxidante.

Los datos presentados en este trabajo, demuestran que el péptido A β (25-35) aumenta la formación de EROs y LP, y también aumentan las interleucinas pro-inflamatorias, lo que nos sugiere que el péptido A β (25-35) ejerce daño vía estrés oxidante e inflamación. El pre-tratamiento con el resveratrol y la epicatequina, disminuyó dicho daño.

II. Antecedentes

2.1 Enfermedades Neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la muerte de neuronas en diferentes regiones del sistema nervioso y por consiguiente el deterioro funcional de las partes afectadas⁸. Estas enfermedades se clasifican según la localización de las lesiones principales: a) ganglios basales, b) médula espinal, c) cerebelo, d) sistema nervioso periférico y e) hemisferios cerebrales⁹.

2.2 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más frecuente de incapacidad física y mental en personas mayores¹. Esta se estudió por primera vez, a través de los análisis histopatológicos del médico alemán Alois Alzheimer, realizados hacia 1906, en una mujer de 51 años que presentaba un cuadro demencial. Entre los signos y síntomas sobresalientes se encontraron pérdida de la memoria, desorientación en tiempo-espacio y deterioro cognoscitivo progresivo⁹. Tras el fallecimiento de la paciente, el Dr. Alzheimer examinó su cerebro y observó la existencia de placas neuríticas seniles (PNs) y marañas neurofibrilares (MNFs). Estos hallazgos permitieron, por primera vez, separar esta demencia de las alteraciones producidas por el mero envejecimiento⁹.

2.2.1 Definición

La enfermedad de Alzheimer se define como un trastorno neurodegenerativo irreversible del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza clínicamente por una demencia progresiva además de una serie de anormalidades que afectan selectivamente regiones neuronales específicas tales como: neocorteza, área entorrinal, hipocampo, amígdala, núcleo basal, tálamo anterior y varios núcleos

monoaminonérgicos del tallo cerebral. También hay un declive en el funcionamiento intelectual que abarca funciones como la memoria, el lenguaje, así como las funciones ejecutivas, que con el paso del tiempo genera una pérdida o deterioro global de cada uno de los procesos cognoscitivos¹⁰.

La enfermedad de Alzheimer se clasifica en dos tipos principales, de acuerdo a la edad en la que aparecen los síntomas:

- 1) Enfermedad de Alzheimer presenil o de aparición precoz: cuando los síntomas se manifiestan antes de los 65 años¹⁰.
- 2) Enfermedad de Alzheimer o aparición tardía: si la enfermedad se manifiesta después de los 65 años¹⁰.

Por otro lado, la enfermedad puede ser familiar o esporádica¹¹.

En las formas familiares se han identificado diferentes genes cuyas mutaciones conducen a la acumulación del péptido A β . Los genes descritos hasta el momento asociados como factor causal de la enfermedad de Alzheimer familiar son:

- Gen de la proteína precursora amiloide (PPA), localizado en el cromosoma 21.
- Gen de la presenilina 1 (PS1), localizado en el cromosoma 14.
- Gen de la presenilina 2 (PS2), localizado en el cromosoma 1.

Por otro lado, está descrito que el alelo 4 de la apolipoproteína E (ApoE), localizado en el cromosoma 19, es un factor potente de susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en la forma esporádica¹².

La ApoE tiene tres variantes polimórficas ApoE2, ApoE3 y ApoE 4. La ApoE4 incrementa tres veces el riesgo de padecer la EA en individuos heterocigotos y 15 veces en homocigotos^{12,13}.

2.2.2 Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer

El análisis macroscópico post-mortem de los cerebros de pacientes con EA severa, revela una reducción significativa en el tamaño del cerebro, adelgazamiento de los giros corticales, agrandamiento de los surcos y dilatación de los ventrículos¹⁴ (Figura 1).

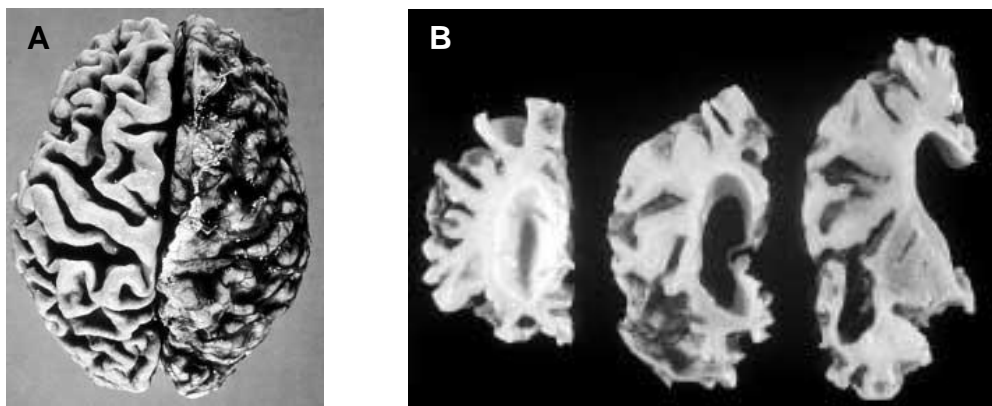


Figura 1. A) Visión de un cerebro de un paciente con EA. En el hemisferio izquierdo se eliminó la aracnoides. **B)** Cortes coronales de un hemisferio proveniente de un paciente con EA, se muestra atrofia cortical así como subcortical, se observa dilatación de las cavidades ventriculares (Guimerá et al., 2002).

A nivel microscópico, existen diferentes lesiones observables: las placas neuríticas (PNs) y las marañas neurofibrilares (MNFs)¹⁵ (Figura 2).

Las marañas neurofibrilares se observan al microscopio como una maraña compuesta por fibrillas entrelazadas, insolubles (conocidas como filamentos helicoidales apareados (FHA)). Su principal componente es la proteína tau hiperfosforilada¹⁷.

Se sabe que la función normal de la proteína tau es unir y estabilizar a los microtúbulos, los cuales forman el citoesqueleto de la neurona y son importantes en el transporte de proteínas en la neurona. Este proceso de unión y estabilidad de los microtúbulos se da mediante la fosforilación y desfosforilación mediado por la acción enzimática de cinasas y fosfatas¹⁵. Si la proteína tau fosforilada no se desfosforila es incapaz de unirse a los microtúbulos, generando así la polimerización de la proteína tau fosforilada en filamentos enrollados; los filamentos enrollados se entrelazan, formando así los FHA de tau¹⁶. Los FHA son estructuras anormales intracelulares que se forman en el pericario de la neurona.

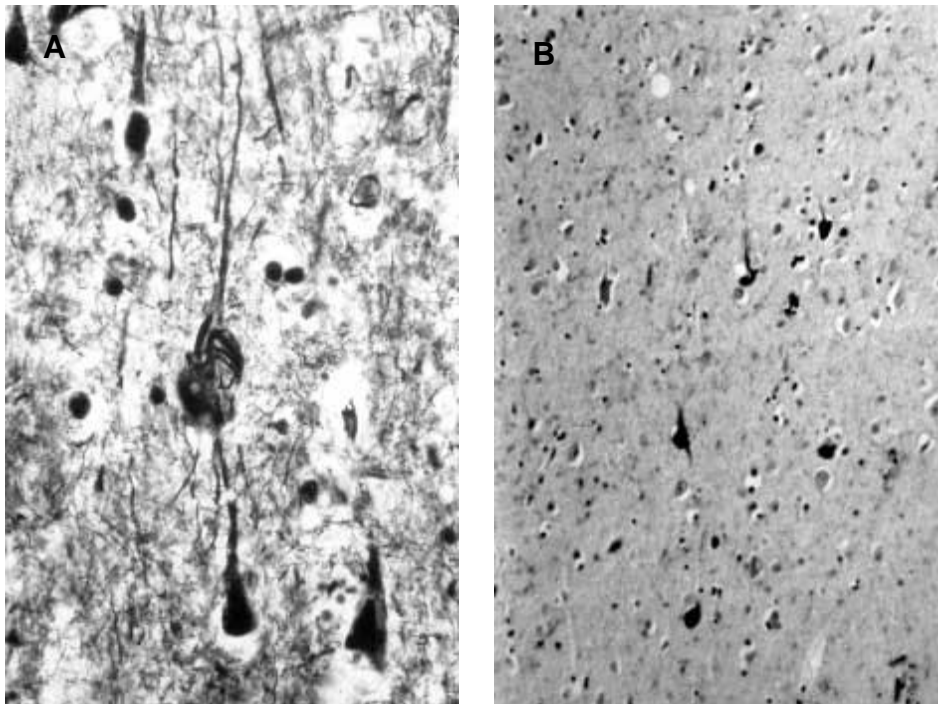


Figura 2. *A) Neurona piramidal de la corteza de un paciente con EA. B) Degeneración neurofibrilar en neuronas de tamaño medio, puesta de manifiesto con inmunotinción para la proteína tau (Guimerá et al., 2002).*

Por otro lado, existen dos tipos de placas, las placas neuríticas (PNs) y las placas difusas, ambas reconocidas en el cerebro de pacientes con EA¹⁷(Figura 3). Las PNs son depósitos extracelulares esféricos de diámetro variable (50 a 200 μ m), constituidos por un núcleo central amiloideo rodeado de neuritas distróficas.

Estas neuritas contienen astrocitos, microglía, restos de lisosomas, mitocondrias y vesículas sinápticas, resultantes del daño neuronal adyacente.¹⁸ Las placas difusas representan el estadio temprano de la formación de PNs, ya que aunque no presentan un núcleo amiloideo, ni neuritas distróficas, pero contienen una pequeña porción de péptido amiloide¹⁹. La naturaleza y el desarrollo preciso de las placas han sido de gran interés, dado que se conoce que las mutaciones que causan la enfermedad de Alzheimer familiar (EAF) involucran alteraciones en la APP, favoreciendo la generación del amiloide- β . Siendo el amiloide- β el principal componente de las PNs²⁰.

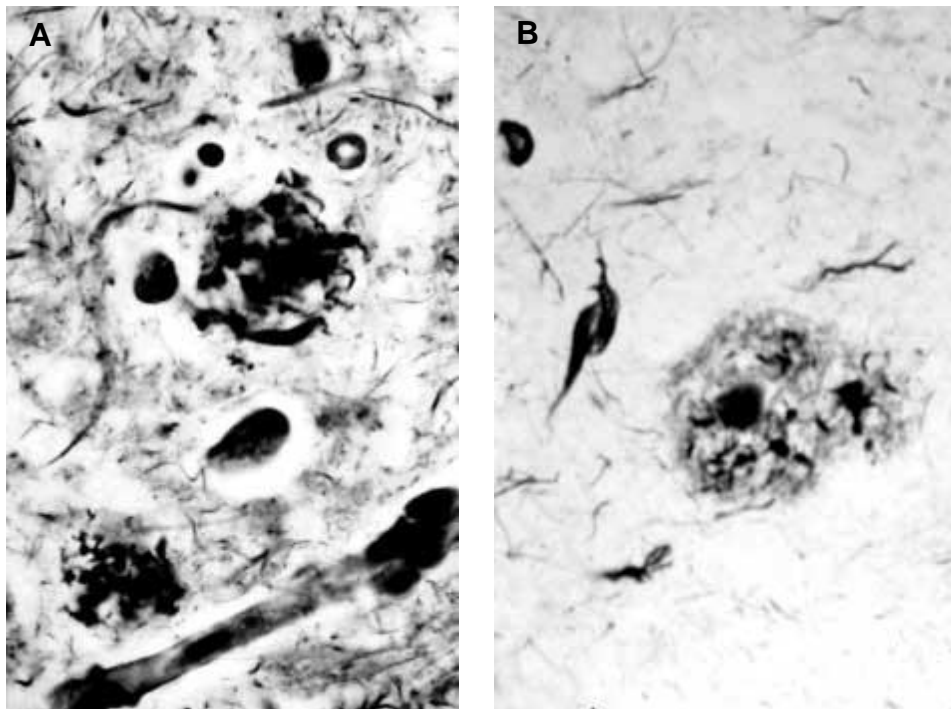


Figura 3. A) Corte histológico teñido con Bielschowsky que muestra placas seniles distróficas en el neuropilo B) Se observa una placa neurítica. Esta es una lesión compleja que contiene amiloide, procesos neuríticos distróficos y células gliales reactivas (teñido con plata de Bielschowsky) (Guimerá et al., 2002).

2.2.2.1 Péptido amiloide- β

En 1984 se aisló y secuenció el componente fundamental de las PNs, un péptido de 40 o 42 aminoácidos, que se denominó péptido amiloide- β ²⁰. Este péptido proviene de la hidrolisis alternativa de la proteína precursora amiloide (PPA). La PPA es una proteína transmembrana con un segmento amino-terminal extracelular largo y un segmento carboxilo-terminal intracelular corto, cuyo gen se localiza en el cromosoma 21. A nivel celular, la PPA se localiza en la mayoría de las membranas de la célula, tales como el retículo endoplásmico, compartimientos del aparato de Golgi, vesículas de secreción, endosomas y membrana plasmática²¹. No se conoce con exactitud la función que desempeña la PPA; aunque se describe que actúa como inhibidor de proteasas en neuronas, permitiendo perpetuar la sinapsis establecida. Además, presenta un papel neurotrófico, estimula el crecimiento celular en cultivos y participa en la adhesión celular (ya que se han encontrado en la PPA dominios de unión específicos para laminina, integrina 1- β , heparina y colágeno)²².

El metabolismo normal de la PPA en las células se denomina vía no amiloidogénica, mientras que el metabolismo de la PPA que produce A β se denomina vía amiloidogénica (Figura 4).

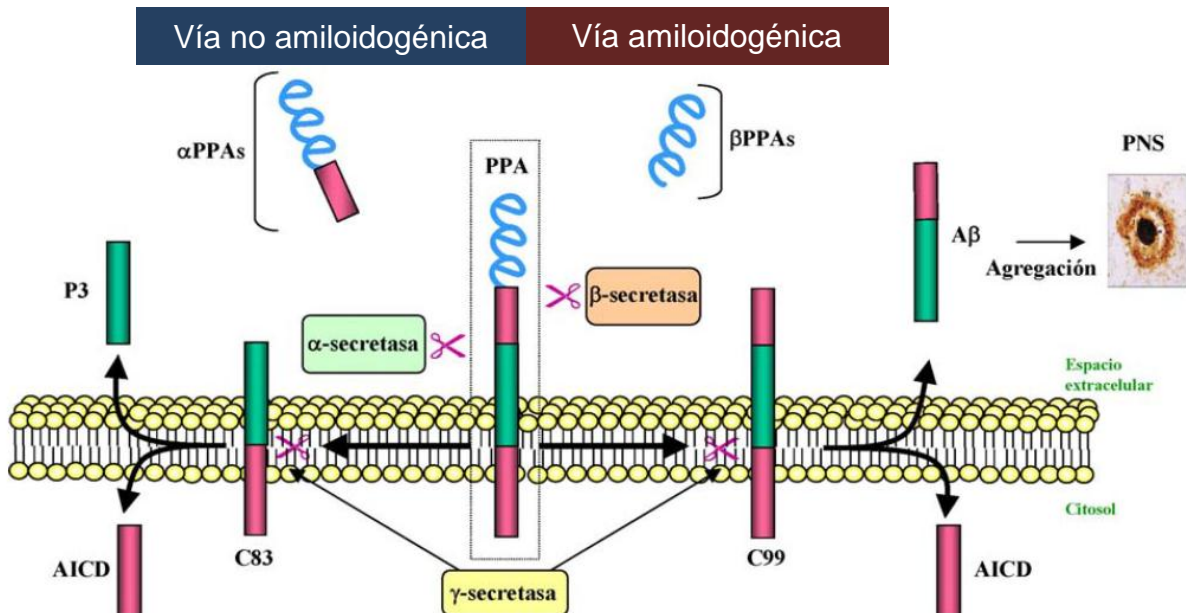


Figura 4. Procesamiento de la proteína precursora de amiloide (PPA) a través de la vía no amiloidogénica y vía amiloidogénica (Burgos, 2006).

LA PPA se hidroliza mediante la acción de una metaloproteasa denominada α -secretasa, que escinde la porción extracelular de la molécula por el dominio más próximo a la superficie de la membrana, produciendo un fragmento denominado porción α -soluble de la PPA (α PPAs). Este fragmento se secreta al espacio extracelular donde actúa como un factor autocrino y neuroprotector, mejorando la sinapsis y supervivencia celular²³. El fragmento carboxilo-terminal C83 queda en la membrana²⁴.

Existe un metabolismo alternativo en el que participa una primera enzima aspartil-proteasa, denominada β -secretasa o BACE, cuya actividad esta incrementada en la EA²⁴. Esta enzima realiza un corte distal en el extremo N-terminal, dando lugar a la porción β -soluble de la PPA (β PPAs), que se libera al espacio extracelular liberándose del fragmento carboxilo-terminal C99, el cual permanece en la membrana. La β PPAs participa en la modulación de la adhesión y regulación de la proliferación celular²⁵.

Otra enzima, la γ -secretasa; un complejo formado por las proteínas presenilinas (PS1 y PS2), Aph-1, nicastrina y Pen-2²⁶, hidroliza los fragmentos C83 y C99 por el dominio intramembranal, liberando al espacio extracelular un fragmento insoluble de 3kDa denominado P3 o $A\beta_{(17-42)}$ en el caso de C83, y el $A\beta$ de 40 ó 42 aminoácidos en el caso de C99. En ambos casos se liberan al citosol los dominios intracelulares de la PPA (AICD) que actúan como factores de transcripción en el núcleo²³.

El procesamiento de PPA se produce en el metabolismo normal de cualquier célula, tanto por la vía no amiloidogénica como por la vía amiloidogénica. Seubert y colaboradores en el año de 1992 detectaron que el $A\beta$ está presente tanto el líquido cefalorraquídeo (LCR) como en el plasma de sujetos sanos²⁷. La forma soluble del $A\beta_{(1-40)}$ es la que se produce mayoritariamente durante el metabolismo normal de las células. Sin embargo, la producción mayoritaria del $A\beta_{(1-42)}$ está

asociada a procesos patológicos, como en la EA²⁸. Por ello, el A β es un producto metabólico normal que es constantemente anabolizado y catabolizado en el cerebro, cuyos niveles estacionarios están determinados por el balance metabólico entre ambos procesos. Alteraciones en este balance durante un largo periodo de tiempo podría provocar la aparición de depósitos amiloides, causando aumento de la incidencia y desarrollo de la EA, ya que, tanto un aumento del anabolismo como una disminución de la actividad de las enzimas que degradan el A β , favorecen la formación de PNs²⁸.

La neurotoxicidad del A β fue demostrada, por primera vez, por Yankner y colaboradores en 1990 en cultivos de neuronas hipocampales diferenciadas, al observar que el A β inducía la retracción de axones y dendritas, seguido de la muerte neuronal²⁹.

Numerosos estudios demuestran que el A β es neurotóxico sólo cuando se agrega formando fibrillas amiloidogénicas²⁹. Este se agrega en condiciones de alta hidrofobicidad, provocando un cambio conformacional en el péptido. Los oligómeros del A β son los primeros en agregarse. Dan lugar a las protofibrillas que se ensamblan formando las fibrillas insolubles de conformación hoja β -plegada, que a su vez se agrupan constituyendo parte de las PNs. Las PNs están constituidas tanto por el A β (1-40) como por el A β (1-42), aunque este último se encuentra en mayor proporción dado que es altamente hidrofóbico y presenta un mayor potencial de agregación, este fragmento hace de núcleo, sobre el que se deposita el A β (1-40)³⁰.

Además, está descrito que en la secuencia de aminoácidos del A β existen varios dominios funcionales (Figura 5), entre los que cabe destacar el dominio de agregación, de neurotoxicidad y de unión a la superficie celular³¹.

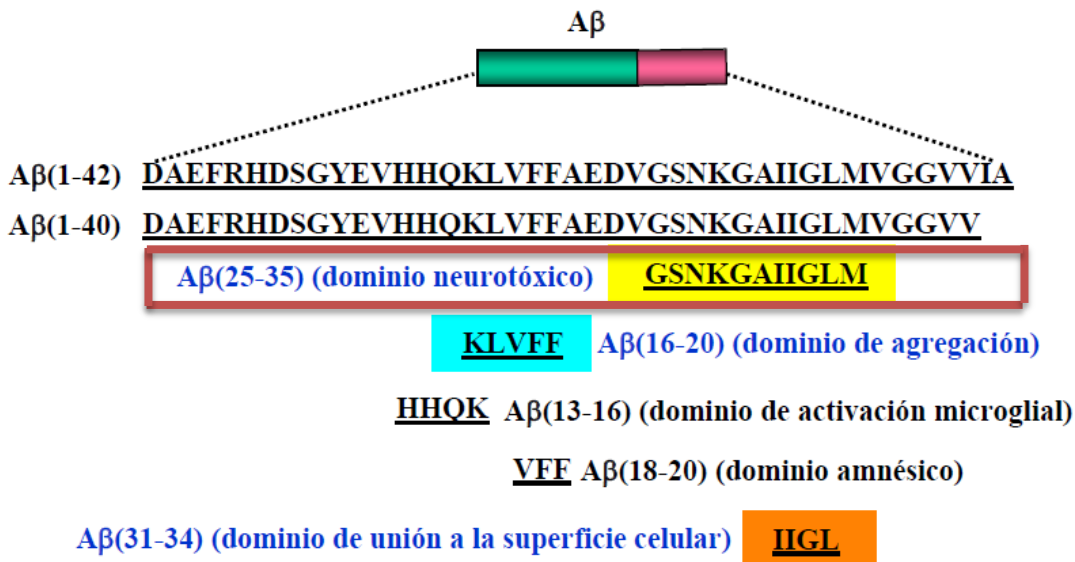


Figura 5. Secuencia de aminoácidos del A β (1-42) y del A β (1-40) incluidos sus dominios funcionales (Burgos, 2006).

El péptido A β (25-35) es un fragmento pequeño de 11 aminoácidos con secuencia GSNKGAIIGLM y peso molecular de 160 Da, proveniente del péptido A β (1-42). Se propone que la A β (25-35) representa la región biológicamente activa del A β (1-42) debido a que es una secuencia localizada en la secuencia integral y conserva la toxicidad del péptido integral A β (1-42)³².

D' Ursi y colaboradores, en el 2004, propusieron un modelo de la estructura de este fragmento; además, se sabe que esta secuencia tiene el efecto neurotóxico en las neuronas ya que es capaz de generar retracción dendrítica y axonal seguido de la muerte de las neuronas.

Las propiedades citotóxicas de la A β están mediadas por radicales libres de oxígeno y factores adicionales (estructura secundaria del péptido, estado de agregación, tiempo de exposición, osmolaridad, cambio de pH y concentración) que tienen la capacidad de inducir oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos³², entre otras. Además, conduce a la activación inmune de la microglía y los astrocitos y los correspondientes procesos inflamatorios³³.

2.3 Inflamación

La inflamación es una respuesta para acabar con la causa inicial de la lesión celular, como son las células necróticas y los tejidos dañados resultantes. Si el tejido no es restaurado, la inflamación se convierte en un proceso crónico que continuamente erosiona los tejidos circundantes, lo que ocasiona un deterioro grave a los tejidos³².

Desde hace tiempo se sabe que la inflamación es un factor importante, no sólo en la EA, sino en un gran número de enfermedades asociadas a la edad, incluyendo la aterosclerosis, diabetes, artritis reumatoide y esclerosis múltiple (MS)^{34, 35}.

Un rasgo característico de los tejidos inflamados es el aumento del número de monocitos, así como de macrófagos tisulares, es decir, microglía, células del sistema nervioso central (SNC)^{36,37}. La inflamación del cerebro es una característica patológica de la EA. Sin embargo, los rasgos característicos inflamatorios tales como hinchazón, calor y dolor no están presentes en este.³⁸ La inflamación se produce claramente en las regiones vulnerables del cerebro con Alzheimer, con una mayor expresión de proteínas y citocinas pro-inflamatorias, que son apenas evidentes en el cerebro normal³⁹, incluyéndose las siguientes: factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en el suero de pacientes con EA⁴⁰ y la interleucina-6 (IL-6) en el tejido cerebral^{41,42}. En comparación con los controles de la misma edad, existe un aumento de las células microgliales activadas alrededor de las placas seniles en la corteza cerebral⁴³.

A su vez, las células microgliales activadas⁴⁴ y los astrocitos⁴⁵ producen mediadores inflamatorios tales como las citocinas pro-inflamatorias, especies reactivas de oxígeno (y otros radicales), óxido nítrico, entre otros⁴⁶ (*Cuadro 1*).

Microglía	Astrocitos
Proteínas complementarias	Proteínas complementarias
Inhibidores complementarios	Inhibidores complementarios
A β	A β
Citocinas y Quimiocinas	Citocinas y Quimiocinas
IL-1	IL-1
TNF- α	TNF- α
IL-6	IL-6
IL-8	IL-8
MIP-1	S100
Especies reactivas de oxígeno	COX-2
MHC II	

Cuadro1. Productos de la microglía y astrocitos

Además, la microglía activada puede matar a las neuronas adyacentes por la liberación de productos altamente tóxicos, como son los intermediarios reactivos del oxígeno, por ejemplo: óxido nítrico (ON), enzimas proteolíticas, los factores complementarios, o aminoácidos excitatorios⁴⁷.

Los mediadores inflamatorios y las condiciones de estrés, a su vez, pueden aumentar la producción de la APP, favoreciendo la vía amiloidogénica e induce la producción del amiloide- β (1-42) y de péptidos derivadas de este. En estas circunstancias, también se inhibe la formación de la fracción soluble de APP, la cual tiene un efecto protector neuronal⁴⁸.

Por otra parte, A β induce la expresión de citocinas pro-inflamatoria en las células gliales, éstas activan la cascada del complemento⁴⁹ y la inducción de los sistemas enzimáticos inflamatorios tales como: la enzima inducible del óxido nítrico sintasa (iNOS) y la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2). Varias líneas de investigación sugieren que todos estos factores pueden contribuir a la disfunción neuronal y muerte celular, ya sea individualmente o en conjunto⁵⁰.

2.3.1 Interleucinas

Las interleucinas (ILs) son pequeñas proteínas con pesos moleculares que van de 8.000 a 40.000 Da; originalmente llamados linfocinas y monocinas para indicar sus fuentes celulares, pronto se hizo claro que el término "citocina" es la mejor descripción, ya que casi todas las células nucleadas son capaces de sintetizar estas proteínas y a su vez, también son capaces de responder a estas moléculas. Sus actividades biológicas nos permiten agruparlos en diferentes clases. Las citocinas son secretadas por una variedad de células inmunes (por ejemplo: los linfocitos T, macrófagos, células *natural killers*). Los efectos biológicos inducidos por las citocinas incluyen la estimulación o la inhibición de la proliferación celular, la citotoxicidad/apoptosis, actividad antiviral, el crecimiento celular, la diferenciación, la respuesta inflamatoria y la sobrerregulación de la expresión de proteínas de superficie de la membrana. La función principal de las citocinas es la regulación de la diferenciación de células T⁵¹. Estas incluyen las proteínas reguladoras del ILs, los interferones (IFN), los factores estimulantes de colonias (CSF), TNF y ciertos factores de crecimiento (FC)⁵².

Está demostrado que muchas de estas citocinas son producidas por las neuronas o glía^{53,54}.

Las citocinas pueden ser divididas esquemáticamente en⁵⁴:

CITOCINAS

Citocinas de la inmunidad innata	TNF, IL-1, Quimiocinas, IL-12, IFN de tipo I (IFN- α , IFN- β), IL-10, IL-6, IL-15, IL-18, IL-23 e IL-27.
Citocinas de la inmunidad adaptativa	IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ , TGF- β , Linfotoxina, IL-13 e IL-17.
Citocinas hematopoyéticas	Factor de las células progenitoras (ligando de c-Kit) IL-7, IL-3, CSF de granulocitos-monocitos (GM-CSF) CSF de monocitos (M-CSF), CSF de neutrófilos (G-CSF)

Abreviaturas: CSF (factor estimulador de colonias), TNF(factor de necrosis tumoral), IFN (Interferón)

Cuadro 2. Muestra la clasificación de las citocinas (Abbas et al., 2008).

2.3.1.1 Citocinas pro-inflamatorias

Algunas citocinas promueven la inflamación, éstas son llamadas citocinas pro-inflamatorias, a las citocinas que suprimen la actividad de las citocinas pro-inflamatorias, se les llama citoquinas anti-inflamatorias⁵².

La clase de citocinas de los mediadores de la inflamación es secretada por la microglía y los astrocitos que rodean las placas neuríticas A β . Su producción se incrementa durante los estados inflamatorios⁵².

Entre las citocinas pro-inflamatorias se encuentran IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , siendo IL-1 y TNF- α , probablemente, las más importantes en el proceso inflamatorio. En general, todas ellas están implicadas en la activación de macrófagos y polimorfonucleares (IFN- γ , TNF- α , IL-1) o linfocitos T (TNF, IL-1, IL-12) produciendo la síntesis de otros mediadores solubles, como: prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), factor activados de plaquetas (PAF), etc⁵⁵.

2.3.1.1.1 *Factor de Necrosis Tumoral- α*

El Factor de necrosis tumoral (TNF) es el principal mediador de la respuesta inflamatoria y responsable de muchas complicaciones de la inflamación tanto crónica como aguda. El TNF se identificó como una sustancia presente en el suero de animales tratados con LPS bacteriano que causaba la necrosis de los tumores cuando se inoculaba en los mismos y por ello se le denomina factor de necrosis tumoral o TNF. Posteriormente, se comprobó que tenía una multitud de acciones, estando implicado en procesos tan diversos como: Artritis, Esclerosis múltiple, tuberculosis, enfermedad inflamatoria, enfermedad de Alzheimer, entre otras⁵⁶.

El TNF puede ser producido por macrófagos, polimorfonucleares (PMN) y linfocitos Th1 activados. El TNF se sintetiza, en primer lugar, como un homotrímero en la membrana y posteriormente libera su parte extracelular por una enzima metaloproteasa llamada TACE, la cual, por el proceso de “shedding” va a liberar el TNF- α ⁵⁷.

El TNF- α es una proteína no glicosilada de 17 kDa⁵⁷, con una longitud de 157 aa. Esta forma es producida a partir del procesamiento de un precursor de 233 aa y 26 kDa de peso (pro-TNF- α). Este precursor presenta secuencias hidrofóbicas que le permiten su anclaje a la membrana plasmática. A partir de esta forma, por medio de ADAM17/TACE, se va a producir la liberación de la forma madura. Una vez liberada al medio, la forma soluble madura tiende a formar complejos de diferente número de unidades, aunque su forma activa es el trímero⁵⁸.

Aunque originalmente se tomó al TNF- α como un agente antitumoral, en la actualidad se considera que es una de las principales citocinas implicadas en la inflamación, la cual forma parte de la estimulación inmunogénica y de la resistencia a agentes infecciosos y tumores. El rango de actuaciones en el que interviene es muy amplio incluyendo apoptosis, diferenciación, proliferación y supervivencia. El TNF- α actúa de modo autocrino y paracrino (en las células de las inmediaciones) a bajas concentraciones sobre los leucocitos y las células endoteliales, causando lo siguiente⁵⁹:

- Aumento en la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, lo que facilita la adhesión de los leucocitos⁵⁹.
- Estimula los fagocitos mononucleares y otras células a producir citocinas: IL-1, IL-6, entre otras⁵⁹.
- Como coestimulador en la activación de las células T, estimula la producción de anticuerpos por las células B⁵⁹.
- Ejerce una acción protectora frente a virus, parecida a la del interferón, y aumenta la expresión de MHC-I (complejo de histocompatibilidad), con lo

que se incrementa la posibilidad de reconocimiento de estas células por los linfocitos Tc⁵⁹.

Si la concentración de TNF- α es muy alta, pueden ser causantes de su propia muerte.

A parte de estar involucrado con esta gran cantidad de funciones biológicas, se piensa que el TNF- α es un mediador en varias enfermedades neurológicas; incluyendo tanto enfermedades infecciosas e inmunológicas como en el caso de la esclerosis múltiple⁵⁹. También es importante su participación en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer⁶⁰.

2.3.1.1.2. Interleucina 1 β

Es una proteína de 17 kDa sintetizada fundamentalmente por monocitos, aunque también la producen neutrófilos linfocitos y células endoteliales⁶¹. Es una citocina pro-inflamatoria que actúa como factor quimiotáctico de neutrófilos, monocitos y linfocitos, siendo así, un iniciador importante de la respuesta inmune, jugando un papel clave en la aparición y desarrollo de una compleja cascada inflamatoria, hormonal y celular. La principal función de la IL-1, al igual que la del TNF, es mediar la respuesta inflamatoria del huésped a las infecciones y a otros estímulos inflamatorios. La IL-1 actúa junto con el TNF en la inmunidad innata e inflamación⁶⁰.

Hay dos formas de IL-1, llamadas IL-1 α e IL-1 β , que muestran una homología entre sí, inferior al 30%, pero que se unen a los mismos receptores de superficie y median las mismas actividades biológicas. La IL-1 β es escindida proteolíticamente por una proteasa denominada enzima de conversión de la IL-1 β (ICE en inglés IL-1 β converting enzyme) para generar la proteína secretada biológicamente activa⁶² (caspasa 1).

Los efectos biológicos de la IL-1 son similares a los del TNF- α y dependen de la cantidad de citocinas producidas. En concentraciones bajas, actúa como mediador de la inflamación local, actúa sobre las células endoteliales aumentando la expresión de moléculas de superficie⁶⁰. En concentraciones mayores, entra en la circulación y ejerce efectos endocrinos.

Existe evidencia de un aumento de la IL-1 β en el líquido cefalorraquídeo y el parénquima cerebral dentro de las primeras horas después de la lesión cerebral en los seres humanos y roedores⁶³. Sin embargo, está documentado que la IL-1 juega un papel importante en la degeneración neuronal. En los astrocitos, la IL-1 induce la producción de IL-6, estimula la actividad de la iNOS⁶⁴ e induce la producción de MCSF. Además, la IL-1 aumenta la actividad de la acetilcolinesterasa neuronal y la activación microglial⁶⁵.

2.3.1.1.3. Interleucina 6

Es una glicoproteína de 30 kDa producida por diferentes tipos de células, incluyendo fibroblastos, monocitos, linfocitos y células endoteliales. Está considerada como una citocina pro-inflamatoria, ya que es secretada en grandes cantidades tras el TNF y la IL-1 durante infecciones agudas⁶⁶.

La forma funcional de la IL-6 es un homodímero en el que cada subunidad forma un dominio globular de cuatro hélices α ^{66, 67}. El receptor de cada IL-6 consta de una proteína de unión a citocinas y una subunidad transductora de señales; ambas pertenecen a la familia de receptores de citocinas tipo I. La subunidad transductora de señales tiene un tamaño de 130 kDa, ésta activa una vía de señalización de JAK/STAT y también es el componente de señalización de otros receptores de citocinas⁶⁸.

Así, la IL-6 es una citocina multifuncional que juega un papel importante en la defensa del huésped⁶⁶ con efectos reguladores importantes de la respuesta

inflamatoria^{67,68} que además, tiene efectos neurotróficos tanto directos como indirectos en las neuronas⁶⁷. La IL-6 promueve astrogliosis⁶⁹, activa la microglia⁷⁰ y estimula la producción de proteínas de fase aguda⁷¹.

2.3.1.1.4. Interleucina 17

La interleucina 17 es una proteína de 155 aa que es secretada por una glicoproteína con una masa molecular de 35 kDa⁷². Cada subunidad del homodímero es de aproximadamente 15-20 kDa. La estructura de la IL-17 consiste en un péptido señal de 23 aa seguido por una cadena de 123 aa de la familia IL-17. Comparando la estructura de esta Interleucina con otras, se reveló que tiene cuatro cisteínas conservadas que forman dos enlaces disulfuro⁷³. Siendo así la IL-17 es la única que no tiene ninguna semejanza con las de otras interleucinas. Además, la IL-17 no se parece a cualquier otra proteína conocida⁷⁴.

La interleucina 17 es una citocina que actúa como un potente mediador en reacciones de tipo celular mediante el aumento de la producción de quimiocinas en diversos tejidos para reclutar monocitos y neutrófilos al sitio de la inflamación, similar al interferón gamma. Esta interleucina es producida por células T cooperadoras e inducida por IL-23 cuando se presenta daño tisular destructivo en reacciones de tipo retardado⁷⁵. La interleucina 17 responde a la invasión del sistema inmune por patógenos extracelulares e induce la destrucción de la matriz celular del patógeno. La cual actúa sinérgicamente con TNF- α y con la IL-1 β ⁷⁶.

Numerosas funciones de regulación inmune son reportadas para la familia IL-17 de citocinas, debido a que inducen muchas moléculas de señalización inmune. El papel más notable de la IL-17 es su participación en la inducción de respuestas pro-inflamatorias y mediadores. IL-17 comúnmente se asocia con respuestas alérgicas. De igual manera, induce la producción de muchas otras citocinas (como IL-6, G-CSF, IL-1 β , TGF- β , TNF- α), quimiocinas (incluyendo IL-8, GRO- α , y MCP-1) y prostaglandinas (por ejemplo: PGE₂) de muchos tipos de células (fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, queratinocitos y macrófagos)^{76,77}.

La función de la IL-17 también es esencial para un subconjunto de células CD4+ T, llamadas T helper 17 (T_h 17). De igual manera, está relacionado con muchas enfermedades inmunes / autoinmunes incluyendo artritis reumatoide, asma, enfermedades neurodegenerativas, entre otras⁷⁷.

2.3.2 Péptido Amiloide-β e Inflamación

La inflamación es una respuesta inmunológica protectora fundamental, pero cuando no es regulada, puede llegar a ser un cofactor importante en la patogénesis de muchas enfermedades humanas crónicas, incluyendo EA⁷⁸. Los astrocitos y la microglía son células que juegan un papel fundamental en el proceso de inflamación, las cuales desempeñan múltiples funciones en la organización y mantenimiento de la estructura y la función⁷⁹ del cerebro. Recientes investigaciones sugieren que los astrocitos y la microglía modulan dinámicamente el procesamiento de la información, la transmisión de la señal y la regulación de la plasticidad neuronal y sináptica⁸⁰. Estas células dotan a las neuronas con el soporte metabólico y también regulan el crecimiento dendrítico, además de ser guía de axones⁸¹. Estas células tienden a localizarse alrededor de las placas amiloides, lo que sugiere que la deposición de Aβ es un potente desencadenante de la activación astrogliar en el cerebro con EA.

Microglia, astrocitos y neuronas son los responsables de activar la reacción inflamatoria mediante las citocinas e interleucinas⁸². Recientemente, se ha demostrado que Aβ promueve la activación de NF-κB en el hipocampo y la corteza prefrontal a través de una vía dependiente de TNF-α⁸³. Corroborando estos hallazgos, Carrero y sus colegas encontraron que los niveles de NF-κB se incrementan en astrocitos después de administrar Aβ en la corteza de rata. Aunque estos autores no han relacionado experimentalmente la activación de NF-

kB a la regulación de TNF- α , IL-1 β y los niveles de COX-2, es probable que esta ruta condujera a la expresión de estas proteínas en respuesta a A β ⁸⁴ (Figura 6)⁸⁴.

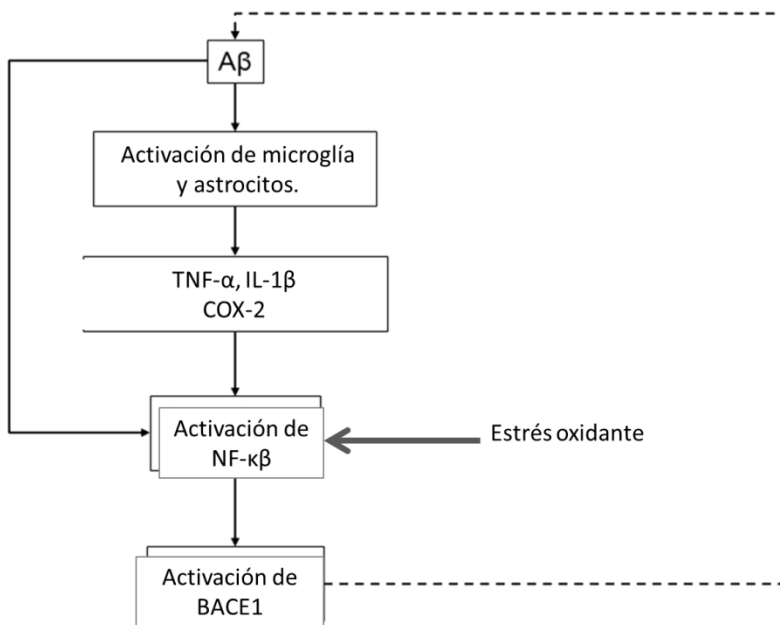


Figura 6. Los péptidos A β son pro-inflamatorias. Estos activan microglía y astrocitos que liberan mediadores inflamatorios. Los cuales activan NF-kappa β , que también se activa por estrés oxidante. La activación patológica de NF-kB activa BACE1, lo que aumenta los niveles del péptido A β , creándose así un círculo vicioso. (Chami et al., 2012)

Carrero y sus colegas investigaron los mecanismos de la activación astrogliar en respuesta a oligómeros A β en la corteza de rata *in vivo*. La inyección de oligómeros de A β en la corteza, evidencia la activación del factor transcripcional factor nuclear kB (NF-kB) sobre la regulación de mediadores inflamatorios críticos, a saber, TNF- α , IL-1 β y la ciclooxygenasa-2 (COX-2)⁸⁵ (Figura 7)⁸⁶.

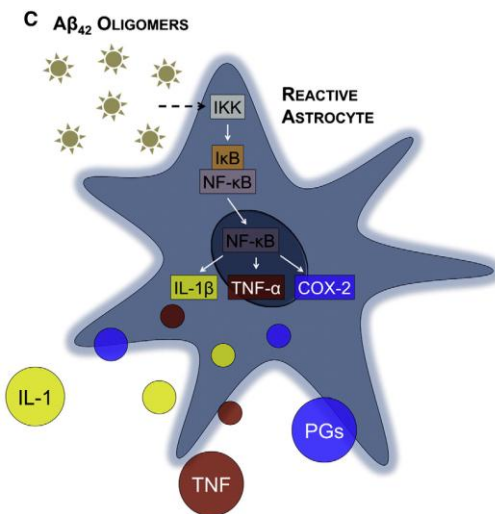


Figura 7. Carrero y sus colegas mostraron que los oligómeros de A β 42 activan NF-kB, que probablemente es el resultado de la sobre regulación de mediadores proinflamatorios (TNF- α , IL-1 β y COX-2) (Medeiros et al., 2013)

En particular, está demostrado que estas vías inflamatorias juegan un papel crítico en la patogénesis de la EA. Dentro de esta vía inflamatoria encontramos a las citocinas, las cuales, son importantes moduladores de la comunicación neuronal y la desregulación en su producción podría contribuir a desencadenar diferentes patologías, ya que son reguladoras clave para la respuesta inmune innata y adaptativa. En el cerebro, las proteínas más notables son: de las citocinas; el factor de necrosis tumoral- alfa (TNF- α), interleucina-1-beta (IL-1 β), interleucina-17 (IL-17) y interleucina-6 (IL-6); la familia de interferon-gamma (IFN- γ) y el factor de crecimiento transformante- beta (TGF- β). Todos ellos actúan en contexto para modular los procesos inflamatorios que afectan la permeabilidad de la BHE⁸⁷.

Estudios recientes han utilizado animales transgénicos con modificaciones específicas de los genes que expresan la IL-1 β para investigar la contribución de la inflamación en la neurodegeneración⁸⁸ y muestran que los ratones con deficiencia de IL-1 β muestran una reducción en la muerte celular a pesar de que los animales son sometidos a diferentes daños neuronales. Esto indica la importancia que tiene la IL-1 β en la promoción del progreso de la neurodegeneración. Así mismo, está demostrado que la IL-1 β induce la expresión de la iNOS que desencadena la liberación de NO en las células gliales (astrocitos y microglia) y causan estrés oxidante⁸⁹.

2.4. Estrés oxidante

En el periodo de 1956-1966, Rebeca Gerschman, como parte de su teoría de la toxicidad del oxígeno, formuló la hipótesis de que: “Un aumento de la presión parcial de oxígeno o disminución de las defensas antioxidantes llevan igualmente a un daño celular”. Con base a esas ideas, en 1985 Helmut Sies elaboró el concepto de estrés oxidante como una situación de desequilibrio con un aumento de oxidantes o con una disminución de antioxidantes⁹⁰ (Cuadro 3). Al romperse

este equilibrio, las especies reactivas aumentan, se producen daños al ADN, a las proteínas y a los lípidos. Estos daños pueden ser reversibles al ser reparados o al remplazar a las moléculas dañadas. Sin embargo, si en la célula se producen especies reactivas en exceso, o bien, los sistemas antioxidantes de la célula no responden adecuadamente, la célula puede morir⁹¹.

Oxidantes	Antioxidantes
Peroxinitrito	Enzimáticos
Radical hidroxilo	Superóxido dismutasa
Radical alquilo	(Mn-SOD y Cu, Zn-SOD)
Radical peroxilo	Catalasa
Radical alcoxilo	Glutación peroxidasas
Hidroperóxidos orgánicos	(Se-dependiente y Se-independiente)
Oxígeno singulete	
Pro-oxidantes	No enzimáticos
Radical superóxido	Glutación reducido
Peróxido de hidrógeno	α-tocoferol
Óxido nítrico	Ácido ascórbico
Ubisemiquinona	

Cuadro 3. Principales oxidantes, prooxidantes y antioxidantes en las células de los mamíferos (Konigsberg et al., 2008).

2.4.1. Radicales libres

Un radical libre es un átomo o molécula neutra o cargada, que contiene uno o más electrones desapareados, ya sea por pérdida o ganancia de estos. La existencia de electrones desapareados incrementa la reactividad de la especie química, pues los electrones tienden a aparearse con un electrón libre de otro átomo o molécula. Los radicales libres se generan por la adición o remoción de un electrón en una reacción de óxido-reducción, durante el metabolismo de la célula⁷⁸.

Actualmente los radicales libres también son conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERNs). Según Halliwell, en 1996, tanto EROs como ERNs son términos globales que incluyen radicales y algunos no radicales (Cuadro 4) que son agentes oxidantes del oxígeno y del nitrógeno. Algunos radicales a veces aparecen clasificados en ambas categorías⁷⁷.

Radicales		No Radicales	
Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	Peróxidos orgánicos	ROOH
Alcoxilo	$\text{RO}\cdot$	Oxígeno singulete	$^1\text{O}_2$
Hidroperoxilo	$\text{HOO}\cdot$	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Superóxido	$\text{O}_2\cdot^-$	Ácido hipocloroso	HClO
Peroxilo	$\text{ROO}\cdot$	Ácido nitroso	HNO_2
Óxido nítrico	$\text{NO}\cdot$	Catión nitrilo	NO_2^+
Dióxido de Nitrógeno	$\text{NO}_2\cdot$	Peroxinitrito	ONOO^-
		Ácido peroxinitroso	ONOOH
		Alquil peroxinitritos	ROONO
		Ozono	O_3
		Ácido hipobromoso	HBrO

Cuadro 4. Nomenclatura de las principales especies reactivas del oxígeno (EROs). *Modificada de Halliwell y Whiteman (2004).*

Son muchas las EROs que actúan como oxidantes biológicos. La capacidad de cada radical o ERO viene determinada desde el punto de vista químico, por cuatro características básicas, como son: reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. El $\text{O}_2\cdot^-$ es el mayor reductor, la simple adición de un protón da lugar a

la formación de H_2O_2 convirtiéndose en un agente oxidante muy activo, selectivo y específico. El $O_2\bullet$ no es particularmente reactivo con lípidos, glúcidos o ácidos nucleicos y exhibe reactividad limitada con determinadas proteínas.⁷⁸ El $O_2\bullet$ reacciona con proteínas que contienen metales en su grupo prostético. El $OH\bullet$, sin embargo, reacciona con cualquier molécula que tenga cerca, sin especificidad alguna y el peligro radica en la importancia funcional del compartimiento celular en el que se origina o la molécula a la que ataque. Así pues, si ataca al ADN puede producir o generar graves alteraciones. Por el contrario, si la producción del radical tiene lugar en un entorno como el plasma y la molécula dañada es una enzima que se encuentra presente en gran cantidad, el daño biológico real será prácticamente imperceptible^{78, 92}.

Los radicales libres se producen de forma natural como intermediarios o productos de numerosas reacciones oxidativas de las células, así como a través de diversos procesos físico-químicos o de bio-transformación⁹³. También existen fuentes externas, es decir, de origen tanto endógeno como exógeno. Los EROs pueden producirse a través de la exposición a oxidantes del medio ambiente, tóxicos y metales pesados que pueden perturbar el equilibrio entre las reacciones de reducción celular y las de oxidación, alterando la normalidad de las funciones biológicas⁷⁷ (Figura 8).

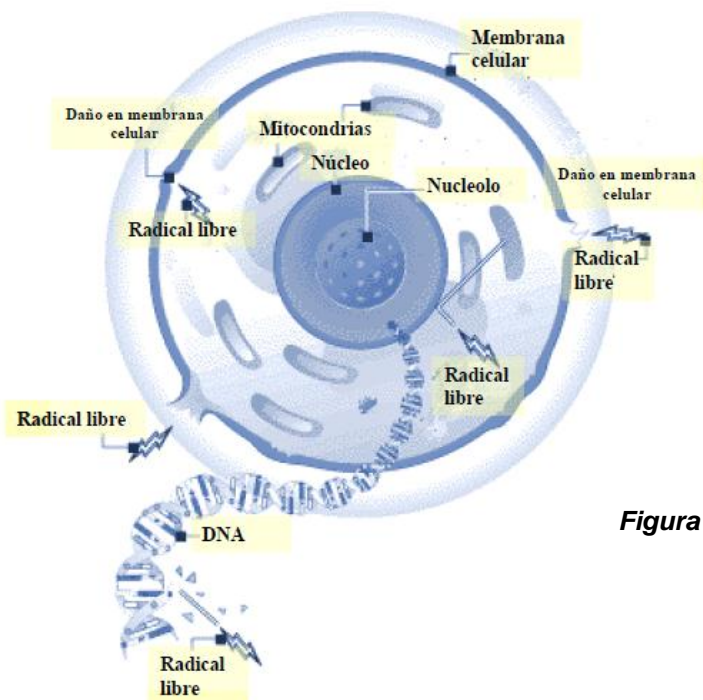


Figura 8. Ataque de los radicales libres a una célula (Austad. 1997)

2.4.1.1. Fuentes endógenas

Las principales fuentes endógenas de radicales libres en la célula son^{94,95}:

- La cadena de transporte de electrones mitocondrial, a nivel fisiológico es considerada como la mayor fuente de formación de radicales libres de carácter accidental. Del total del oxígeno que llega a la mitocondria, la cadena de transporte de electrones es la responsable de la formación del anión superóxido que por acción de la superóxido dismutasa pasa a peróxido de hidrógeno y éste a radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton o de Haber-Weiss. Cualquier situación que produzca un aumento en el consumo de oxígeno aumentará de forma proporcional a la generación del radical superóxido^{82,83}.
- Sistema xantina-oxidasa. La xantina-oxidasa es la primera oxidasa identificada como productora de radicales libres. Esta enzima cataliza la oxidación de un gran número de sustratos endógenos; como las purinas, pirimidinas, aldehídos y exógenos como el etanol. Está considerada como una enzima constituyente del catabolismo de las purinas en la mayoría de las células, cataliza los pasos terminales de la vía de degradación de la purina o de la oxidación de hipoxantina a xantina y de la última a ácido úrico, acoplado a dicha oxidación una reducción monovalente del oxígeno molecular. Como consecuencia se producen peróxido de hidrógeno y anión superóxido^{82,83}.
- Metabolismo del ácido araquidónico. El ácido araquidónico es un ácido graso insaturado de cadena larga que posee cuatro dobles enlaces. Es un precursor de las prostaglandinas, leucotrienos y troboxanos, los cuales, al sintetizarse se oxidan por acción de la ciclooxigenasas y lipooxigenasas, generando anión superóxido cuando hay NADH o NADPH disponibles. Al

mismo tiempo, pueden generarse peróxidos intermedios tanto por la vía de la ciclooxigenasa como por la vía de la lipooxigenasa^{82,83}.

- Fagocitos y otras fuentes de radicales. Las células fagocíticas constituyen otra fuente biológica importante de radicales libres, principalmente de anión superóxido^{82,83}.
- Formación de hemoglobina y mioglobina. La oxidación de estas hemoproteínas pueden producir radicales libres de oxígeno.
- El transporte electrónico microsomal (reacciones de hidroxidación). Denominado como citocromo p450 es, en realidad, un conjunto de citocromos localizados en el retículo endoplásmico y otros organelos implicados en la oxidación de sustratos a expensas de oxígeno que requiere poder reductor en forma de NADPH, aportado por la NADPH-citocromo p450 reductasa, liberando peróxido de hidrógeno y anión superóxido^{82,83}.
- NADPH. La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH ox) es un complejo enzimático que fue identificado en células fagocíticas como neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos⁹⁶; posteriormente se encontraron análogos de esta enzima en células no fagocíticas⁹⁷. La función de este complejo enzimático es la generación del $O_2^{\circ-}$ por medio de la extracción de electrones de su sustrato, el NADPH intracelular, y que posteriormente son transferidos al oxígeno molecular para generar⁹⁸ $O_2^{\circ-}$, es decir, la oxidación del NADPH y la reducción del oxígeno molecular (Reacción 1).
$$2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^{\circ-} + NADP^+ + H^+$$

El anión superóxido generado por la NADPH ox es utilizado como materia prima para la producción de otras EROs que se utilizan para la defensa del hospedero. Por otro lado, si existe una sobreactivación de esta

enzima entonces se generan daños colaterales significativos debido a la presencia de las EROs (Figura 9)⁹⁹.

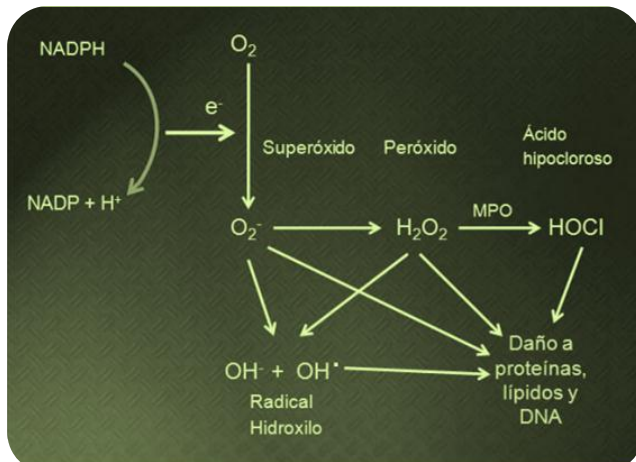


Figura 9. Productos de la NADPH. El superóxido se dismuta a peróxido de hidrógeno. El H_2O_2 y el $O_2^{\cdot-}$ pueden reaccionar para producir el $^{\circ}OH$ en presencia de iones metálicos. El H_2O_2 puede también servir como un sustrato para la mieloperoxidasa (MPO) mediante la oxidación de haluros. Las EROs pueden entonces producir daños al interactuar con los constituyentes celulares (Cross et al., 2004)

2.4.1.2 Fuentes exógenas

También existe un origen exógeno de EROs. Dentro de este grupo destacan las radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioleta, luz visible en presencia de fotosensibilizadores y activación de xenobióticos que ejercen su acción tóxica mediante sus productos intermediarios reactivos considerados como radicales libres. Entre ellos se encuentran diversos pesticidas, el humo del tabaco, antimicrobianos como la adriamicina,^{100,101} fármacos anticancerígenos⁶⁷ y otros medicamentos⁶⁷ capaces de incrementar el estrés oxidante^{102,103}.

Aunque tradicionalmente las EROs, se han observado desde un punto de vista negativo para la función y la viabilidad celular, también juegan un papel importante en el origen de la vida y la evolución biológica con efectos beneficiosos en los organismos. En los últimos años se reconoció y revaluó la función de las EROs y su papel en funciones de la señalización y de la modulación de la expresión génica. De hecho no es fácil catalogar a las EROs como moléculas beneficiosas o dañinas. Según Jackson y colaboradores en el 2002, todo depende del proceso celular que se analice, para ello estos autores toman dos ejemplos:

El papel de las EROs en los procesos de inflamación también puede ser ambivalente. Son vistos como beneficiosos en el papel pro-inflamatorio ya que proporciona un perfeccionamiento en la respuesta inmune siguiendo a la infección. Por otro lado, las EROs causan oxidación a biomoléculas tales como lípidos, moléculas de colesterol, glúcidos, proteínas y ácidos nucleicos; las cuales son susceptibles de ser atacadas *in vivo* por radicales libres.

Particularmente el cerebro es vulnerable al estrés oxidante ya que presenta una elevada tasa metabólica derivada de la glucosa, posee niveles muy bajos de defensas antioxidantes, contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados; que son posible blanco de la peroxidación lipídica⁷⁸.

2.4.2 Péptido Amiloide- β y estrés oxidante

El péptido A β induce efectos neurotóxicos a través de formas extracelulares e intracelulares. La toxicidad de los A β es difícil de precisar debido a que su agregación *in vivo* genera diversas formas: monómeros, oligómeros solubles, oligómeros insolubles, fibrillas amiloides, etc. Algunos estudios han demostrado que el A β soluble no es tóxico, pero al formar las fibrillas adquiere las propiedades dañinas¹⁰⁴.

Mediante la utilización de ensayos *in vitro* se sabe que los péptidos que contienen al fragmento hidrofóbico 29-35 (GAIIGLM) forman lentamente agregados estables y se transforman en neurotóxicos después de un proceso de incubación. En cambio el fragmento 25-35 (GSNKGAIIGLM), descrito como la parte más tóxica del péptido, se agrega rápidamente y es neurotóxico de forma inmediata¹⁰⁵. Todos estos estudios demuestran que es necesaria la transición del péptido de una forma soluble monomérica a una insoluble o fibrilar para que sean tóxicos a la célula y que esto es el resultado de un cambio al azar en su estructura secundaria (α -hélice) a una de lámina β ¹⁰⁶. Asimismo, en 1999 Walsh y

colaboradores reportaron que los monómeros y dímeros del A β no son tóxicos para las células, mientras que oligómeros agregados de bajo peso molecular llamados protofibrillas sí lo son¹⁰⁷.

La toxicidad de los oligómeros o grandes agregados de fibrillas se ve reflejado en la afectación de los procesos celulares fundamentales. Por ejemplo, la interacción de las placas con las membranas celulares podría causar daños por bloqueo mecánico de los intercambios celulares con el exterior o bien, al aumentar los radicales libres y así generar estrés oxidante¹⁰⁸. Los péptidos A β se generan en respuesta a la degeneración celular ó bien son la causa de la degeneración¹⁰⁹, y éstos, en su etapa inicial de agregación, generan a las especies reactivas de oxígeno¹¹⁰ (Figura 10)¹¹¹.

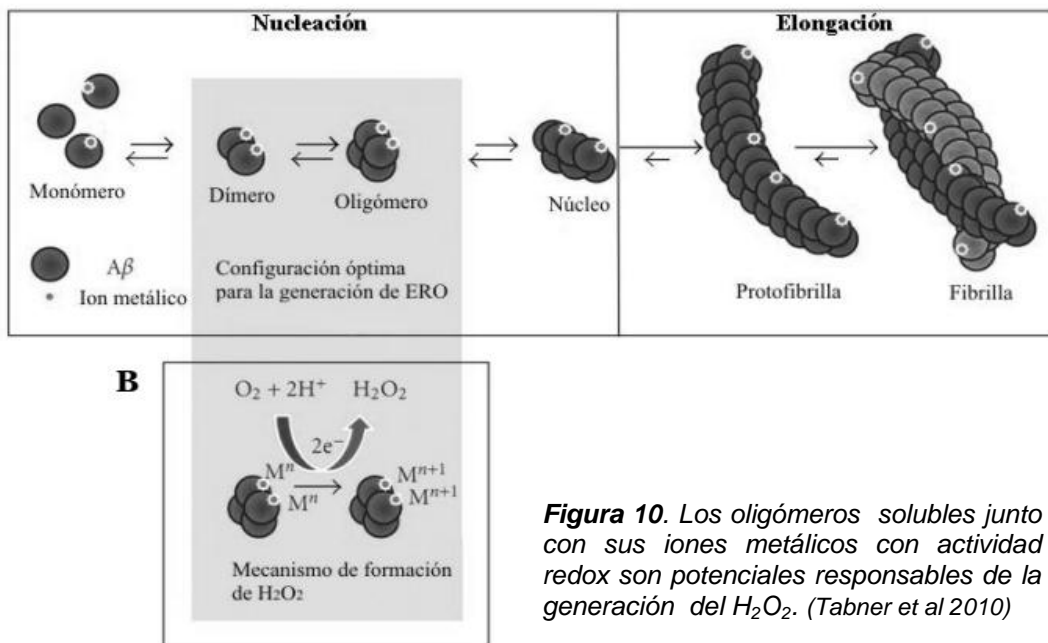


Figura 10. Los oligómeros solubles junto con sus iones metálicos con actividad redox son potenciales responsables de la generación del H_2O_2 . (Tabner et al 2010)

Los estudios de Behl y colaboradores¹¹² sugieren que estos péptidos pueden generar un aumento en los niveles de H_2O_2 y, en especial, cuando existe la interacción del A β con metales como el Fe y el Cu genera además EROs altamente tóxicas (Figura 11)¹¹³.

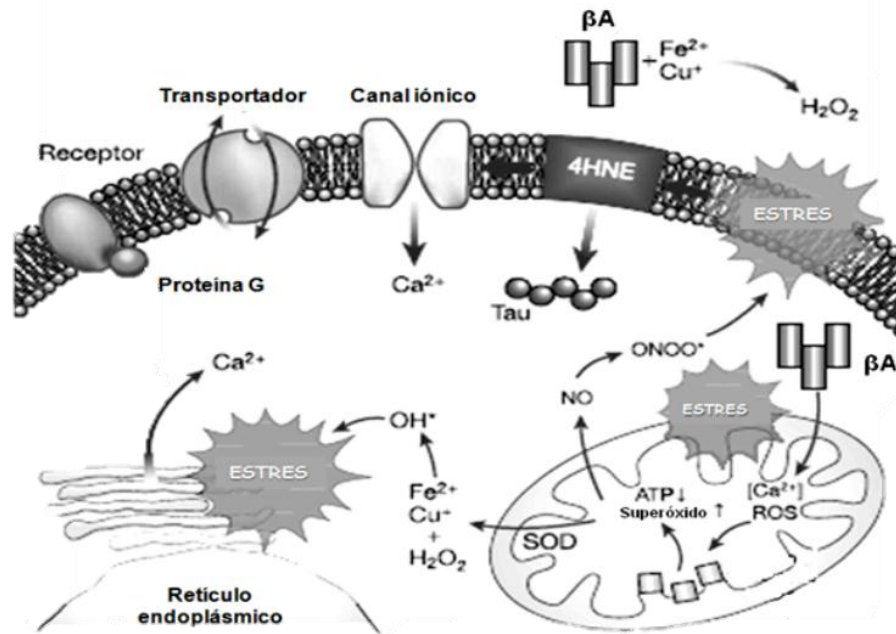


Figura 11. Formación de EROs por interacción de Aβ con Fe²⁺ y Cu⁺ (Modificado de Martínez Lazcano et al., 2010)

Diversos estudios indican que la presencia de iones metálicos puede ser fundamental tanto para la fibrilización del Aβ, como para la iniciación de la generación de especies de oxígeno reactivas (EROs) relacionadas con el proceso de estrés oxidante¹¹⁴. Mediante ensayos *in vitro* se conoce que en ausencia de estos iones metálicos, el Aβ es monomérico y presenta una conformación α-hélice y no forma agregados¹¹⁵. Estudios epidemiológicos han sugerido una alta incidencia de la enfermedad de Alzheimer asociada con niveles ambientales elevados de Al³⁺, Zn²⁺ y Fe³⁺¹¹⁶. Asimismo, se detectó un alto contenido de Al³⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺ en el cerebro de pacientes con esta enfermedad.

Bush y colaboradores en 1999 sugirieron que el Cu²⁺ juega un papel importante en el estrés oxidante producido por el Aβ¹¹⁷. Estos investigadores proponen que el Aβ provee de un electrón al Cu²⁺ unido al péptido, formando Cu¹⁺¹¹⁸.

Atwood y colaboradores¹¹⁹, han caracterizado al A β como una metaloproteína que une iones de elementos de transición por medio de tres histidinas (posiciones 6,13 y 14) y una tirosina (posición 10), localizadas en la parte hidrofílica N-terminal del péptido, y una metionina 35 en la región lipofílica C-terminal¹²⁰. Algunos estudios indican que los residuos de histidina son importantes para la agregación del A β , ya que la ausencia de histidinas¹²¹, o la modificación de estos residuos, disminuye notablemente la agregación del A β promovida por el Cu²⁺, Zn²⁺ o Fe³⁺¹²².

Por otra parte, los péptidos que pierden la metionina 35 tienen una baja capacidad de reducir al Cu²⁺. La sustitución de este residuo por otro aminoácido elimina la acción prooxidante del péptido 25-35¹²³ y disminuye la oxidación de proteínas, así como su neurotoxicidad¹²⁴. Sin embargo, la presencia de la metionina 35 no es suficiente para explicar la actividad redox del péptido y su neurotoxicidad ya que, en la rata, el A β que posee la metionina 35 carece del sitio clave de unión a iones metálicos (histidina 13).

El grupo de Butterfield se propuso un modelo de estrés oxidante para explicar la neurotoxicidad del A β basada en el residuo metionina 35. Este aminoácido está asociado con la formación de fibrillas y la generación de estrés oxidante, lo cual, se demuestra en ensayos *in vitro*, en los que se sustituyó este residuo por un aminoácido del mismo tamaño y la misma hidrofobicidad que la metionina, pero con un grupo -CH₂ en lugar del átomo de azufre del grupo tioeter de la metionina. Este cambio no provoca oxidación de proteínas o toxicidad en ensayos realizados con neuronas de hipocampo aún en presencia de Cu²⁺¹²⁵. La metionina 35 es el residuo más susceptible a la oxidación *in vivo*, especialmente bajo condiciones de estrés oxidante¹²⁶. El estudio de placas seniles que contienen al A β 1-40 muestra una gran proporción de metionina sulfóxido¹²⁷. Se conoce que la oxidación de residuos de metionina altera significativamente la estructura secundaria de los mismos e induce una estructura de lámina β ¹²⁷.

Existen otros mecanismos por los cuales se manifiesta la toxicidad del A β , que incluyen: Formación de poros en la membrana que causa una pérdida en la homeostasis del calcio y el flujo de Ca²⁺ hacia las neuronas¹²⁸. Se demostró que el fragmento A β (25-35) induce la formación del poro¹²⁹. Por otro lado, el A β se une y modifica la función de la enzima alcohol deshidrogenasa, promoviendo, así, la disfunción mitocondrial. Las mitocondrias juegan un papel importante en la célula, ya que estas producen la energía que se requiere. El desequilibrio entre la producción de EROs mitocondrial y el nivel intracelular de defensas antioxidantes conlleva al estrés oxidante. EROs también puede causar daño oxidante al ADN nuclear y mitocondrial, este daño incluye modificación en los pares de base, rotura de la hebra y entrecruzamiento del ADN¹³⁰.

Varios informes sugieren que A β incrementa el estrés aumentando la peroxidación lipídica. Debido a que los lípidos son componentes de la membrana, la interacción de los oligómeros y protofibrillas de A β con ésta provoca el deterioro de los procesos celulares originando estrés oxidante, aumento de la concentración de iones de calcio e inflamación, que a la larga conduce a la muerte celular¹³¹.

2.4.3 Peroxidación Lipídica

La peroxidación lipídica (PL) es un mecanismo conocido de daño celular, siendo por ello utilizado en ocasiones como indicador del estrés oxidante y también como biomarcador de contaminación ambiental.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son fundamentales en la célula ya que forman parte de los fosfolípidos de las membranas celulares y son responsables de su fluidez. Se encuentran en todas las membranas de la célula. Su función es mantener la integridad celular. Los PUFAs son las moléculas biológicas más susceptibles al estrés oxidante. A su degradación se le denomina peroxidación lipídica. Esto se debe a que poseen dobles enlaces C=C de tipo *cis*

separados por un CH2 alílico lo que les hace especialmente susceptibles al ataque de los radicales libres. Esta peroxidación es el efecto más importante de los radicales libres en la célula, ya que la destrucción y ruptura de los PUFAs, junto con la formación de puentes disulfuro en las cadenas proteicas provoca un desmoronamiento de la estructura de membrana que conduce a la pérdida de la permeabilidad y, por tanto, a la muerte celular¹³².

El daño a los lípidos consta de tres etapas; iniciación, propagación y terminación (véase figura 12).

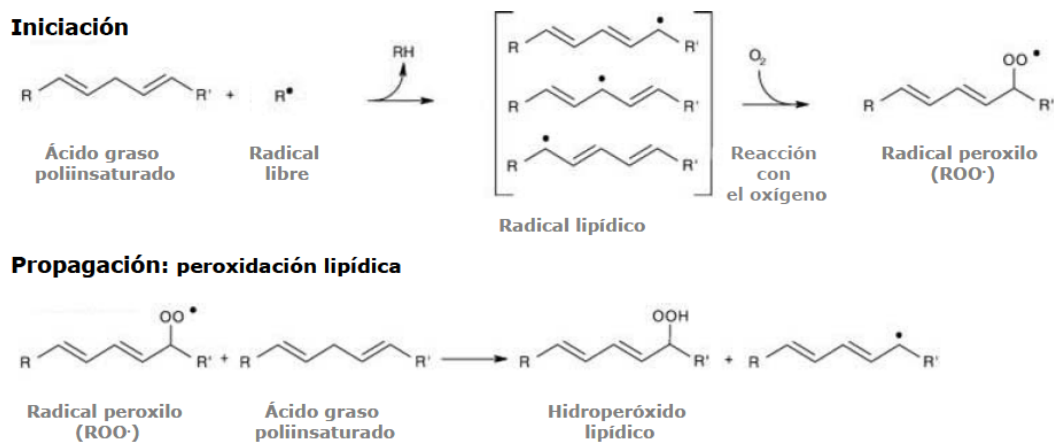


Figura 12. Proceso de peroxidación lipídica iniciada por el radical R• (Boots et al., 2008)

Como consecuencia de la peroxidación lipídica, se produce una alteración en la conductibilidad, fluidez, permeabilidad y transporte de las membranas.

Si consideramos que los ácidos grasos son los componentes principales de la membrana, al alterarlos vamos a provocar la destrucción de la membrana, y por ello, de la célula. Los fosfolípidos; en los que al menos una de sus moléculas esterificadas es un ácido graso polinsaturado, constituyen los elementos moleculares básicos de las membranas celulares al mismo tiempo que

representan objetivos potenciales y especialmente selectivos para el ataque de las EROs¹³³.

El grado de lesión de la membrana celular puede ser escaso y no llegar a suponer importantes cambios en la composición de sus componentes lipídicos. Sin embargo, esto puede ser suficiente como para potenciar la susceptibilidad de la membrana a daños oxidativos posteriores¹³⁴.

2.5. Antioxidantes

A pesar del daño oxidativo que puede generar el estrés oxidante, el organismo cuenta con una serie de sistemas de defensa antioxidante que intentan neutralizar la agresión; de tal manera que definimos un antioxidante como “cualquier sustancia que, en bajas concentraciones en presencia de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación del mismo”¹³⁵. De tal manera que su función primordial en nuestro organismo es protegernos del daño oxidativo que causan moléculas conocidas como radicales libres, entre otras. Las defensas antioxidantes de nuestro organismo son indispensables para preservar nuestra salud. La evidencia actual demuestra que patologías crónicas, tales como demencias, la enfermedad de Alzheimer y el proceso biológico del envejecimiento se aceleran en función de la magnitud del estrés oxidante¹³⁶.

Aproximadamente un 2 % del oxígeno consumido por un organismo normal va a la formación de EROs de las cuales varias son radicales libres¹³⁷. Cuando la generación de EROs sobrepasa las numerosas barreras de defensas antioxidantes del organismo, se produce gran aumento en el daño por lesión química de las estructuras biológicas; a este proceso le denominamos estrés oxidante. En consecuencia, las defensas antioxidantes del organismo son claves para el control de enfermedades crónicas¹³⁸.

Los antioxidantes son elementos esenciales para proteger de la oxidación a las macromoléculas biológicas (Cuadro 5). Las defensas antioxidantes de los organismos son de tipo enzimático y no enzimático. La primera defensa antioxidante es intracelular y es principalmente de tipo enzimático. Las enzimas antioxidantes requieren de la presencia de metales como Cu, Fe, Mg, Zn o Se para su acción; a los que suelen llamarles metales antioxidantes. Las más importantes son la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa que requieren Fe^{+2} , Zn^{+2} y Cu^{+2} o Mn^{+2} y Se^{+2} . La segunda barrera antioxidante es de tipo no enzimática y está dada por compuestos antioxidantes que actúan tanto a nivel celular como extracelular. Son los responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos; como el plasma, y de la protección del daño oxidativo de las distintas partículas y macromoléculas circulantes. Esta segunda defensa antioxidante está formada por distintos compuestos que se clasifican en endógenos y exógenos. A diferencia de las enzimas antioxidantes, las sustancias antioxidantes se modifican al reaccionar con los radicales libres y necesitan ser reemplazados.

SISTEMA	FUNCIÓN
Enzimas	
Superóxido dismutasa	Eliminación de radical superóxido
Catalasa	Eliminación de hidroperóxidos. (e.j. H_2O_2)
Glutatión peroxidasa (GPx)	Eliminación de hidroperóxidos.
Glutatión reductasa (GRed)	Reducción de glutatión oxidado.
Glutatión-s-transferasa (GST)	Eliminación de peróxidos lipídicos.
Metionina sulfóxido reductasa	Reparación de residuos oxidados de metionina.
Peroxidasa	Descomposición de peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos.
Antioxidantes del plasma/suero	
Ácido úrico	Captador de oxígeno singulete y radicales libres.
Albúmina	Actividad peroxidasa en presencia de GSH.
Bilirrubina	Captación de radicales peroxilo.
Glutatión reducido (GSH)	Sustrato para la acción de los enzimas GPx y GST y captador de radicales libres.

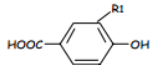
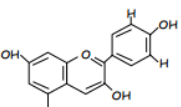
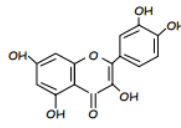
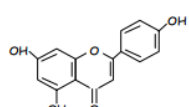
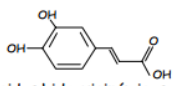
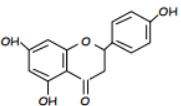
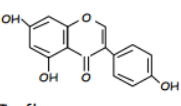
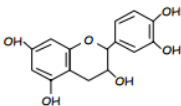
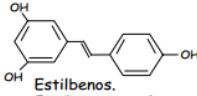
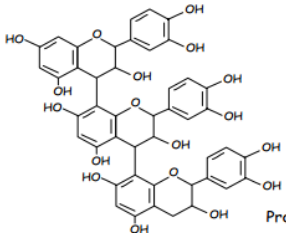
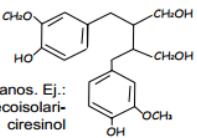
Ubiquinol (Coenzima Q)	Captador de radicales libres.
Antioxidantes de la dieta	
Ácido ascórbico	Reacción con superóxido, oxígeno singulete y radical peroxilo. Regeneración de tocoferoles.
Tocoferoles	Protección de membranas lipídicas. Bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación.
Carotenoides	Desactivación del oxígeno singulete. Bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación.
Compuestos fenólicos	Captación de radicales libres y actividad quelante de metales

Cuadro 5. Basado en Beckman y Ames (1998), Fang et al. (2002) y Lee et al. (2004)

Algunos de origen endógeno son: glutatión, urato, ubiquinol y proteínas plasmáticas que son reemplazados por síntesis. Los de origen exógeno, es decir, provienen de la dieta y para ser reemplazados necesitan ser nuevamente ingeridos en ésta. Estos compuestos antioxidantes, llamados hoy antioxidantes dietarios, son fundamentales para la prevención de enfermedades ya que son fácilmente modificables; algunos bien conocidos (vitamina C, vitamina E, carotenoides y Se) y otros Polifenoles¹³⁹.

Los antioxidantes polifenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos con una lista de más de 8000 estructuras que sigue en continuo crecimiento. Estos compuestos son esenciales tanto en la fisiología como en la morfología de los vegetales. Se encuentran prácticamente en todas las plantas y por tanto están integrados en la dieta humana¹⁴⁰.

Existen numerosas clasificaciones, pero la más usual está determinada por el número de anillos fenólicos que contienen y la unión entre éstos. A partir de esta clasificación se distinguen dos grandes grupos de moléculas, polifenoles flavonoides y no flavonoides, siendo el primero el más numeroso¹⁴¹ (Cuadro 6).

POLIFENOLES			
No flavonoides	Flavonoides		
 <p>Ácidos benzóicos. Ej.: R1= R2= OH = Ác. Gálico</p>	 <p>Antocianinas. Ej.: Pelargonidina</p>	 <p>Flavonoles. Ej.: Quercetina</p>	 <p>Flavonas. Ej.: Apigenina</p>
 <p>Ácidos hidroxicinnámicos. Ej.: Ác. Caféico</p>	 <p>Flavanonas. Ej.: Naringenina</p>	 <p>Isoflavonas. Ej.: Genisteina</p>	 <p>Flavonoles monoméricos y poliméricos. Ej.: Epicatequina</p>
 <p>Estilbenos. Ej.: Resveratrol</p>	 <p>Proantocianidinas</p>		
 <p>Lignanos. Ej.: Secoisolariciresinol</p>			

Cuadro 6. Polifenoles y su clasificación: No flavonoides y Flavonoides.

2.5.1. Flavonoides

Los flavonoides constituyen el grupo más importante dentro de la clasificación mencionada arriba, la cual cuenta con más de 5000 compuestos. Fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien, en 1930, aisló una sustancia de la cáscara del limón, la citrina, que regula la permeabilidad de los capilares. En un principio, los flavonoides se denominaron como vitamina P (por la permeabilidad capilar del sistema circulatorio humano) o vitamina C₂ (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950¹⁴².

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes, sobre todo en las angiospermas; sólo algunos se han detectado en hongos y algas. Se encuentran prácticamente en todas las partes de la planta: fruto, semilla,

corteza, etc. Son los pigmentos responsables de las coloraciones amarilla, naranja y roja de esas partes en las plantas. El término flavonoide se refiere a un grupo de compuestos químicos que comparten un esqueleto común de tres anillos¹⁴³ (Figura 13).

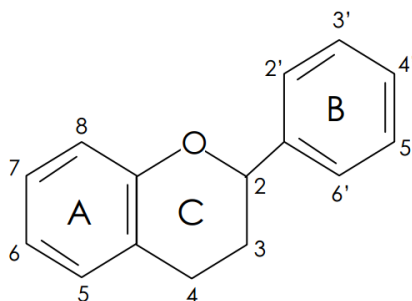


Figura 13. Estructura básica de los flavonoides.

Esta estructura básica se compone de dos anillos bencénicos (A y B) unidos por un pirano (C)¹⁴⁴, lo que permite una multitud de sustituciones y variaciones que determinan las distintas clases de flavonoides¹⁴⁵. Los flavonoides se encuentran a menudo hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5'. La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina la subdivisión en las dos clases principales de flavonoides; los 3-hidroxi flavonoides (flavanoles, flavonoles, proantocianidinas o taninos condensados) y los flavonoides no hidroxilados en posición 3 (flavonas, isoflavonas, flavanonas)¹⁴⁶.

Los flavonoides actúan como potentes agentes quelantes de metales y secuestradores de radicales. Se cree que su actividad antioxidante reside, principalmente, en su habilidad para donar átomos de hidrógeno y así, "barrer" los radicales libres generados durante la peroxidación lipídica^{147,148}.

Los flavanoles predominantes son la catequina y su isómero epicatequina, la galocatequina y su isómero epigalocatequina, y los ésteres con ácido gálico en posición 3 como el epicatequín galato y el epigalocatequín galato. Los flavonoles

glicosilados son poco frecuentes, algunas fuentes de flavanoles en la dieta son el té, las frutas y las legumbres¹⁴⁹.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se ve determinada por su estructura química, por lo que existen grandes diferencias en la efectividad antioxidante entre los distintos grupos de compuestos. Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales¹⁰⁴:

- **Como captadores de radicales libres.** Los compuestos fenólicos pueden actuar como donantes de hidrógeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, deteniendo las reacciones en cadena en las que están implicados los radicales libres. El radical fenoxilo generado es menos reactivo ya que se estabiliza por resonancia con los electrones p del anillo aromático.
- **Como quelantes de metales.** Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático. De este modo, los o-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton.
- **El grado de polimerización de los compuestos fenólicos** tiene un marcado efecto sobre la actividad antioxidante. Así, los compuestos poliméricos son más potentes como antioxidantes que los monómeros.

2.5.1.1. Epicatequina

La epicatequina es un tipo de flavonoide presente en una gran cantidad de vegetales. La catequina, la epicatequina y epigallocatequina son los flavonoles más comunes y suelen ser denominados genéricamente como catequinas

Las cantidades individuales de catequina y epicatequina, presentes en la naturaleza, son pequeñas y variables. En la actualidad han despertado un gran interés debido a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones beneficiosas en la salud humana, tales como el tratamiento y prevención de cáncer, envejecimiento y otras patológicas de carácter inflamatorio¹⁰⁴.

Los efectos fisiológicos asociados a la epicatequina se deben a la estructura de la misma (Figura 14).

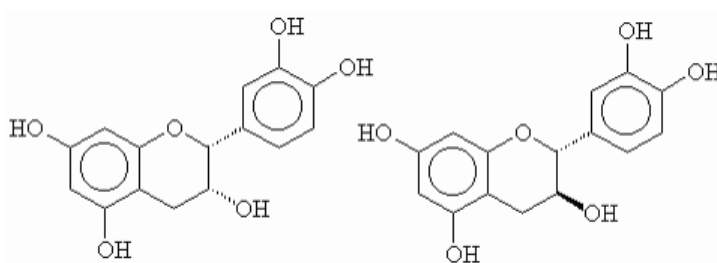


Figura 14. Estructura básica de la catequina y epicatequina.

Siendo su principal propiedad la formación de complejos con proteínas, la formación de quelatos con iones metálicos y la capacidad para eliminar radicales (capacidad antioxidante), también pueden disminuir la lipoperoxidación en membranas biológicas. La epicatequina es capaz de incrementar los niveles de colesterol HDL, disminuir la cantidad de colesterol LDL y proteger de la oxidación a la LDL¹⁵⁰. Diversos estudios demuestran que algunos flavonoides del chocolate, particularmente la catequina y la epicatequina, tienen un efecto antiplaquetario similar al de la aspirina¹⁵¹. En otro estudio se encontró una reducción en la activación plaquetaria en personas que consumían 100 g de chocolate amargo al día, mientras que las que consumían chocolate blanco o chocolate con leche no presentaron este efecto¹⁵²; probablemente la leche puede inhibir la absorción intestinal de los flavonoides. También está demostrado que la epicatequina contenida en el chocolate tiene la capacidad de mejorar la función endotelial mediante el incremento en la producción de ON¹⁵³. Está comprobada la capacidad de la epicatequina para aumentar la expresión de la eNOS¹⁵⁴, inhibir la oxidación

de óxido nítrico a peroxinitrito y aumentar la biodisponibilidad del óxido nítrico. Todo esto contribuye al mejoramiento de la presión sanguínea debido a que el óxido nítrico es un vasodilatador, además de disminuir el estrés oxidativo, mejorar la función endotelial y aumentar la sensibilidad de la insulina¹⁵⁵.

Estudios *in vivo* muestran que la administración crónica de epicatequina, en combinación con el ejercicio físico, mejora la memoria espacial; que se debe al incremento en la proteína Akt que activa a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), promueve la angiogénesis y aumenta la densidad neuronal en regiones como el giro dentado del hipocampo, núcleo muy importante en el procesamiento de la memoria.

2.5.1.2. Resveratrol

Existen distintos alimentos y bebidas de origen vegetal que contienen varios tipos de compuestos fenólicos. Entre estos compuestos, el resveratrol es identificado como el más activo de los estilbenos (fitoalexinas). Fue detectado en las uvas por primera vez en 1976 por Langcake y Pryce. El interés por este compuesto despertó cuando estudios epidemiológicos revelaron una relación inversa entre el consumo de frutas y bebidas ricas en resveratrol; como las uvas y el vino, y la aparición de enfermedades cardiovasculares. Con el paso de los años se han realizado numerosos estudios sobre las cualidades de esta molécula para mejorar la salud humana, y se han demostrado sus efectos en enfermedades como el cáncer, la diabetes mellitus, la obesidad¹⁵⁶, enfermedades cardiovasculares; los cuales son atribuidos al control de la agregación plaquetaria, la vasodilatación por aumento de la producción y liberación de ON, la regulación del metabolismo lipídico, los efectos antioxidantes, la sensibilización a la acción de la insulina o los efectos antiinflamatorios¹⁵⁷. Otros estudios recientes también le atribuyen al resveratrol el poder de aumentar la esperanza de vida en algunas levaduras y moscas, con lo que tendría un efecto anti-edad que podría ser

importante en ciertas enfermedades humanas relacionadas con el envejecimiento¹⁵⁸.

El resveratrol existe en las formas isoméricas *cis*- y *trans*- (Figura 15); pero sólo la isoforma *trans* fue aislada en la uva, es el isómero más abundante en la naturaleza debido a que es el más estable. Su concentración en la uva oscila entre 50 y 400 µg/g y suele encontrarse en forma de glucósido. Se sintetiza principalmente en la piel de las uvas en respuesta a agresiones del entorno; como la radiación ultravioleta o infecciones por hongos. La razón por la que el vino presenta una cantidad significativa de resveratrol, se debe al tiempo que pasan en contacto la pulpa y la piel durante el proceso de elaboración de la bebida¹⁵⁹.

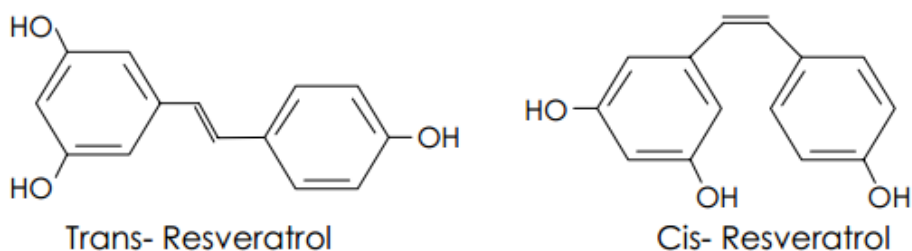


Figura 15. Formas isoméricas *cis*-y *trans* del Resveratrol

Con respecto al metabolismo y biodisponibilidad del resveratrol, existen varios estudios en distintas especies de roedores y humanos que demuestran una buena absorción y distribución del mismo en diferentes tejidos; con un metabolismo fundamentalmente hepático.

Algunos de los efectos benéficos que se atribuyen al resveratrol son los siguientes:

- Actividad antioxidante. El resveratrol como agente antioxidante fue reconocido por Zini y colaboradores en 1999¹⁶⁰, quienes sugirieron tres mecanismos por los que se ejercería esta acción.

- Desactivando radicales activos del oxígeno formados en la mitocondria.
- Inhibiendo la peroxidación lipídica.

Además, está demostrado que el resveratrol es capaz de mantener la concentración intracelular de los antioxidantes endógenos localizados en varios tejidos, como es el caso del glutatión.

- Efectos anti-inflamatorios. La acción anti-inflamatoria del resveratrol se ha propuesto como mecanismo de acción responsable de varios efectos benéficos. Esta se lleva a cabo mediante la inhibición de la síntesis de mediadores pro-inflamatorios como el TNF- α , la inhibición de enzimas (iNOS, LOX y COX) o factores de transcripción pro-inflamatorios (NF- κ B y AP-1)¹⁶¹.
- Cardioprotección. La capacidad del resveratrol para proteger el sistema cardiovascular se debe por su papel como antioxidante intracelular, agente anti-inflamatorio y su capacidad para inducir la expresión de eNOS.¹⁶² La protección ejercida por el resveratrol se debe a que este polifenol, por los mecanismos postulados, produce los siguientes efectos ¹⁶³ (Figura 16):
 - Inhibe las moléculas de adhesión ICAM y VCAM.
 - Es antihipertensivo.
 - Inhibe la peroxidación lipídica
 - Reduce el daño provocado por la isquemia-reperfusion.
 - Disminuye las arritmias ventriculares.
 - Induce vasorelajación.
 - Reduce la agregación plaquetaria.
 - Reduce la hipertrofia cardiaca mediante la acción de la AMPK.¹⁶⁴

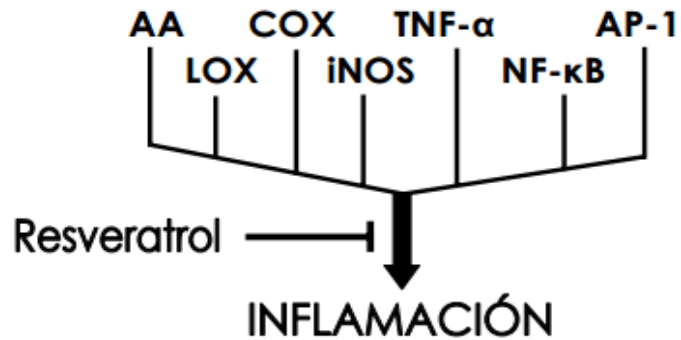


Figura 16. Efectos del resveratrol.

Podría sugerirse, por tanto, que los polifenoles, que como sabemos se encuentran presentes en muchos alimentos, especialmente vegetales y frutas, pueden “detener” y/o “atrasar” algunos de los procesos que conducen a la acumulación del péptido beta-amiloide en el cerebro y, por tanto, retrasar la potencial aparición del Alzheimer u otras enfermedades neurodegenerativas¹⁶⁵.

III. JUSTIFICACIÓN

El A β es una molécula involucrada en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Se sabe que la fracción A β (25-35), ejerce un efecto neurotóxico. Uno de los mecanismos implicados en el proceso de neurotoxicidad es la inflamación, la cual se ha visto implicada con el estrés oxidante. Hasta la fecha no existe cura para esta enfermedad. Los tratamientos farmacológicos existentes, sólo son paliativos. Por lo que se tiene la necesidad de buscar maneras de prevenirla o bien tratarla. Se propone que los flavonoides (epicatequina y resveratrol) sirvan para combatir o prevenir el avance de la EA debido a que disminuyen el efecto tóxico de la fracción A β (25-35).

IV. HIPÓTESIS

La administración de epicatequina y resveratrol pueden reducir el daño inflamatorio generado por la producción de radicales libres inducidos por la administración intrahipocampal del fragmento 25-35 del péptido amiloide.

V. OBJETIVO GENERAL

- Analizar el efecto de los flavonoides (Epicatequina y resveratrol) sobre los marcadores pro-inflamatorios en el hipocampo de ratas inyectadas con amiloide- β (25-35).

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF α a las 2 horas, 4 horas y 30 días después de la inyección de amiloide- β y administración de los flavonoides.
- Cuantificar los niveles de especies reactivas de oxígeno a las 2, 4 horas y 30 días después de la inyección de amiloide- β y administración de los flavonoides.
- Cuantificar los niveles de peroxidación lipídica a las 2, 4 horas y 30 días después de la inyección de amiloide- β y administración de los flavonoides.

VII. MATERIAL Y MÉTODO

Todos los experimentos fueron realizados con la aprobación del comité de ética para uso de animales de experimentación de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) de acuerdo con la “Norma Oficial Mexicana 062” y de acuerdo estrictamente con “*The Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research*”.

7.1. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 260-290 gramos. Los animales fueron facilitados por el Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez y por el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los cuales fueron alojados en cajas de acrílico en grupos. Se establecieron 18 grupos (Cuadro 7)

	2 HORAS	4 HORAS	30 DÍAS
Control	17 ratas	17 ratas	17 ratas
Amiloide- β	17 ratas	17 ratas	17 ratas
Epicatequina	17 ratas	17 ratas	17 ratas
Epicatequina + A β	17 ratas	17 ratas	17 ratas
Resveratrol	17 ratas	17 ratas	17 ratas
Resveratrol + A β	17 ratas	17 ratas	17 ratas

Cuadro 7. De grupos y número de ratas que se ocuparon.

De cada grupo se tomaron 6 ratas para las pruebas de medición de peroxidación lipídica y determinación de especies reactivas de oxígeno. 5 ratas para la determinación de las interleucinas pro-inflamatorias.

7.2. Preparación del agregado amiloide- β (25-35), del resveratrol, la epicatequina y la cirugía estereotáxica

A β (25-35) (sigma-Aldrich Ltd., St. Louis, MO, USA) fue disuelto en una solución salina isotónica estéril, con pH 7.4, a una concentración final de 100 μ M. La solución A β (25-35) fue incubada a 37^o C por 24 horas antes de su aplicación.

Se administró tanto el resveratrol (Sigma-Aldrich, USA) como la epicatequina (Sigma-Aldrich, USA) a una dosis de 30 mg/kg¹⁶⁶, en un volumen máximo de 1 mL con una cánula de administración oral, 5 horas previas a la micro-inyección.

Todos los animales fueron anestesiados con pentobarbital (300 mg/kg, i.p). Las ratas fueron divididas al azar en grupos para la cirugía estereotáxica (Stoelting, IL, USA). Se asignaron a unos grupos de animales la inyección bilateral en el hipocampo (CA1) de 1 μ L solución salina isotónica y a otros la inyección bilateral en el hipocampo (CA1) de 1 μ L de amiloide- β . Se adaptaron al aparato estereotáxico, se realizó una incisión anteroposterior sobre el cráneo y se localizaron coordenadas a partir del bregma. Las coordenadas para el hipocampo son: anteroposterior -4.2; lateral \pm 3.0 respecto al bregma y profundidad de -2.9¹⁶⁷, luego se procedió a la realización del trepano mediante el punto determinado por las coordenadas.

Se inyectó 1 μ L de A β (25-35) lentamente en un periodo de 5 minutos en la región CA1 del hipocampo de ambos hemisferios, con una micro-jeringa Hamilton de 10 μ L. Al término de la cirugía se esperó 2 y 4 horas para las siguientes pruebas y el grupo de 30 días fue llevado al bioterio hasta el momento de las pruebas.

7.3. Determinación de especies reactivas de oxígeno

Se utilizó la técnica espectrofluorométrica de la 2, 7 DCF diacetato (DCFDA). La DCFDA es una molécula capaz de entrar a la célula, en la que las esterasas hidrolizan sus grupos acetilos para formar 2,7, diclorodihidrofluoresceína;

entonces, la forma deacetilada es susceptible a la oxidación por especies reactivas, generando una molécula fluorescente. La diclorofluoresceína se puede medir a través de un espectrofotómetro. La acumulación de la diclorofluoresceína indica la producción de sustancias activas redox (Figura 17).

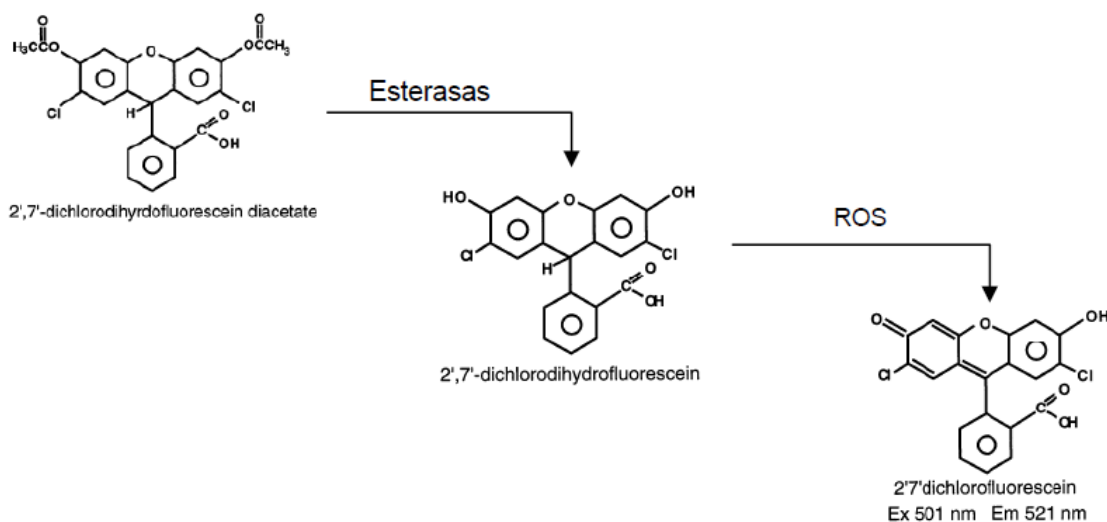


Figura 17. Formación de la 2',7', diclorofluoresceína.

Los cerebros de las ratas fueron extraídos por decapitación, de estos cerebros tomamos el hipocampo y éste último se almacenó en nitrógeno líquido.

El hipocampo se homogenizó en una solución salina isotónica en frío y protegida de la luz. Las EROs presentes en cada muestra se determinaron al hacerlas reaccionar con la DCF-DA contenida en una solución de HEPES-TRIS (18:1), pH=7.4, durante 1 hora a 37° C con agitación constante y en cámara oscura.

Para la curva estándar se utilizaron concentraciones conocidas de diclorofluoresceína. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 525 nm de excitación y 470 nm de emisión. Los resultados fueron expresados en nmoles de DCF/mg de proteína. La cuantificación de las proteínas se realizó con el método de Lowry.

7.4. *Medición de peroxidación lipídica*

La medición de peroxidación lipídica (PL) se realizó a las 2, 4 horas y a los 30 días después de la inyección del péptido A β (25-35). Se determinó la concentración de los productos finales de la lipoperoxidación. El hipocampo se homogenizó en una solución salina isotónica, en frío y protegida de la luz. Los compuestos fluorescentes presentes en cada muestra se extrajeron en una mezcla de cloroformo-metanol (3:1) grado HPLC. Esta reacción se llevó a cabo durante 30 minutos en hielo y cámara oscura. Al término de la reacción se eliminó la fase acuosa y la mezcla de cloroformo-metanol se utilizó para la cuantificación de los PL presentes en cada muestra. Todas las muestras se hicieron por duplicado y se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro de fluorescencia a longitud de onda de 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia por mg de proteína.

7.5. *Cuantificación de proteínas con el método de Lowry*

Se realizó a las 2, 4 horas y a los 30 días después de la inyección del péptido y la solución salina (conforme al grupo). Posteriormente se determinó la concentración del contenido de proteínas, el hipocampo se homogenizó en una solución salina isotónica en frío. El cual, una vez homogenizado se diluyó 1:20 en agua. Posterior a esto se le agregó una solución de Na₂CO₃ (2%) en NaOH 0.1N más CuSO₄ (1%) más Tartrato de Na⁺/K⁺ al (2%), 15 minutos después se agregó la solución de Folín 1:1 y se dejó incubar por 30 minutos. Por último se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro de fluorescencia a una longitud de onda de 550 nm¹⁶⁸.

7.6. *Determinación de la expresión de interleucinas pro-inflamatorias*

Se hizo a las 2, 4 horas y a los 30 días después de la inyección del péptido A β (25-35) y solución salina (dependiendo del grupo). Se determinó la concentración de las interleucinas proinflamatorias Interleucina 1- β (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 17 (IL-17), así como el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α). Las ratas fueron decapitadas y los cerebros fueron extraídos, se realizó posteriormente la disección del hipocampo, el cual fue homogenizado en PBS con inhibidor de proteasas (pH 7.4) en frío.

Posteriormente se realizó:

- Primera etapa: fijación del antígeno. En una placa de 96 pozos se colocó la solución de fijación, seguida de esto se agregó la muestra y se incubó, se retiró el líquido residual y se procedió a bloquear con ABS.
- Segunda etapa: Reacción antígeno-anticuerpo. Para esto se agregó solución fijadora, después se coloca el anticuerpo primario a una dilución de 1:500 (IL-6, IL-1 β , IL-17y TNF- α). Se hicieron los lavados. Se colocó el anticuerpo secundario (1:5000). Posteriormente se añadió el ABTS (la cual desarrolla el color). Una vez finalizado esto se procedió a leer en el lector de placas a 450 nm.

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan por la media del grupo en cada ensayo \pm error estándar de la media. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía, con una post-prueba de Tukey, realizados en el programa SPSS. Para graficar se utilizó el GraphPad versión 5.0. Se consideró una diferencia significativa con una $p < 0.05$.

IX. DIAGRAMA DE TRABAJO

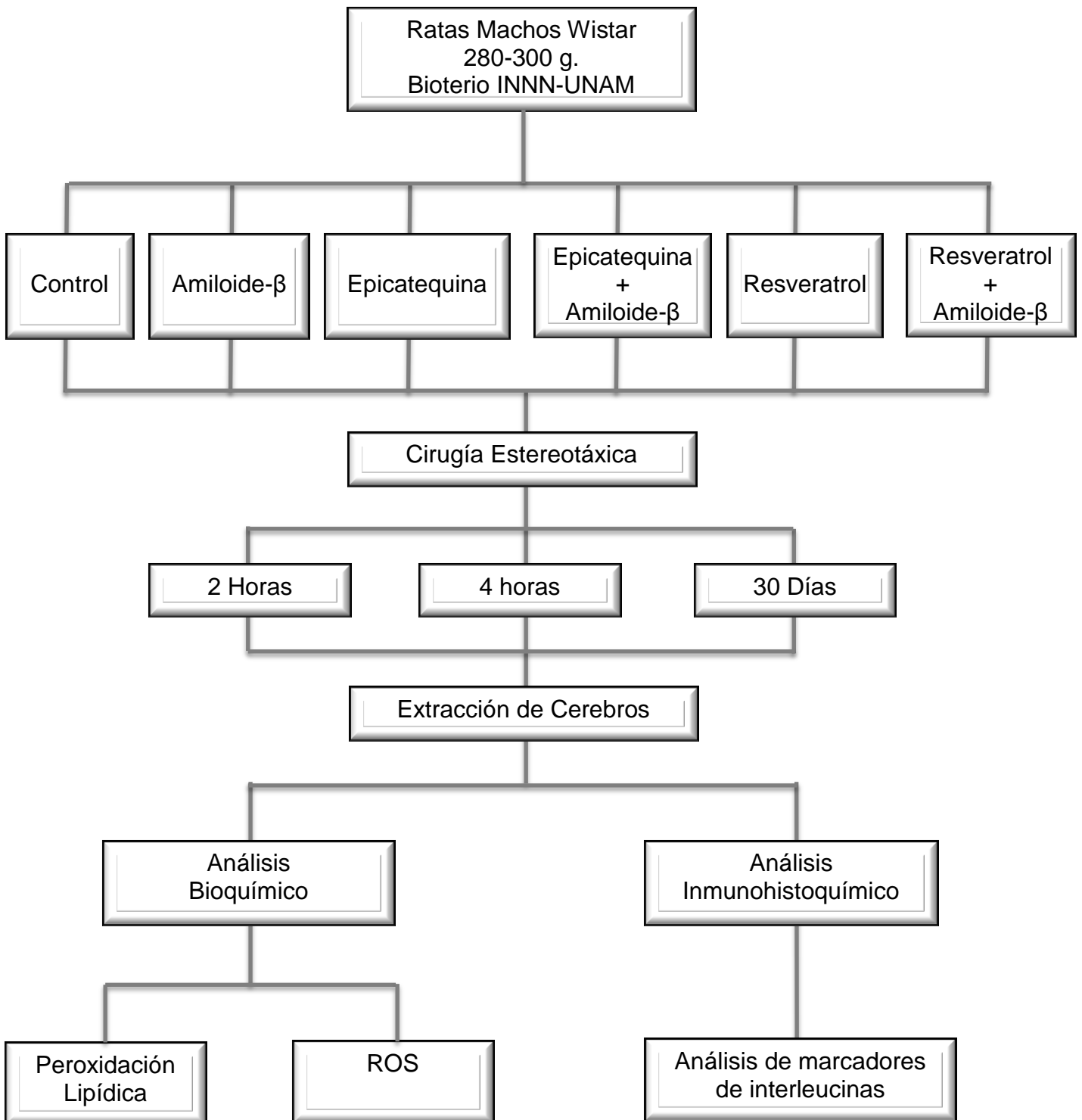


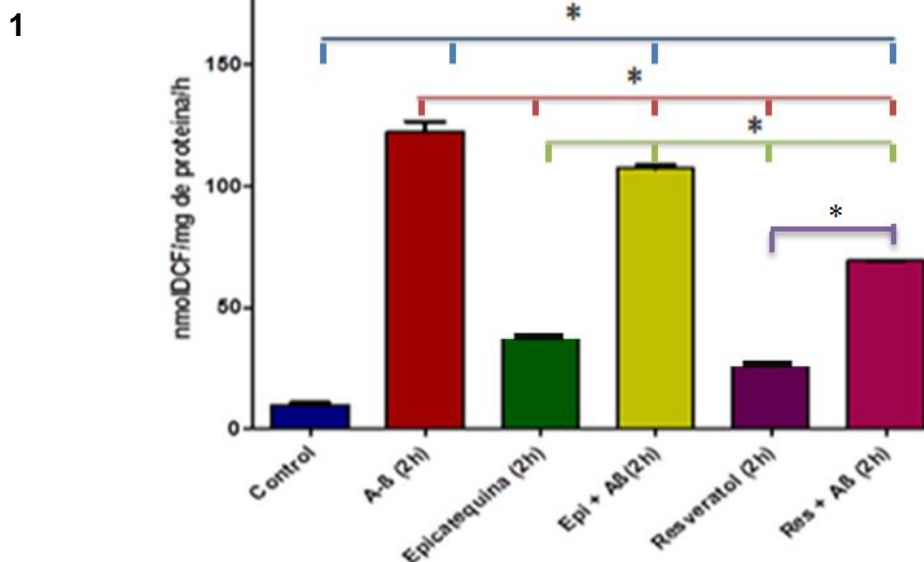
Fig. 14. Diagrama general de trabajo. Se muestra a manera de diagrama de flujo los pasos que se siguieron a lo largo de los experimentos.

X. RESULTADOS

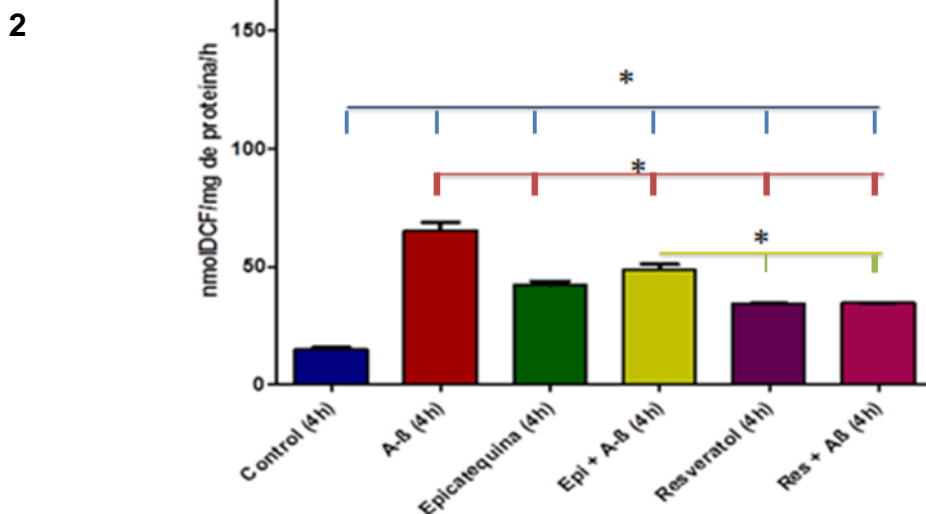
Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el amiloide- β (25-35) induce de manera temprana la formación de especies reactivas de oxígeno, generando estrés oxidante; el cual genera daño en las membranas. Esto se ve reflejado por el aumento en la peroxidación lipídica.

El pre-tratamiento con los flavonoides (epicatequina y resveratrol) disminuyen la formación de EROs, PL y moléculas pro-inflamatorias.

10.1. Resultados de la cuantificación de especies reactivas de oxígeno

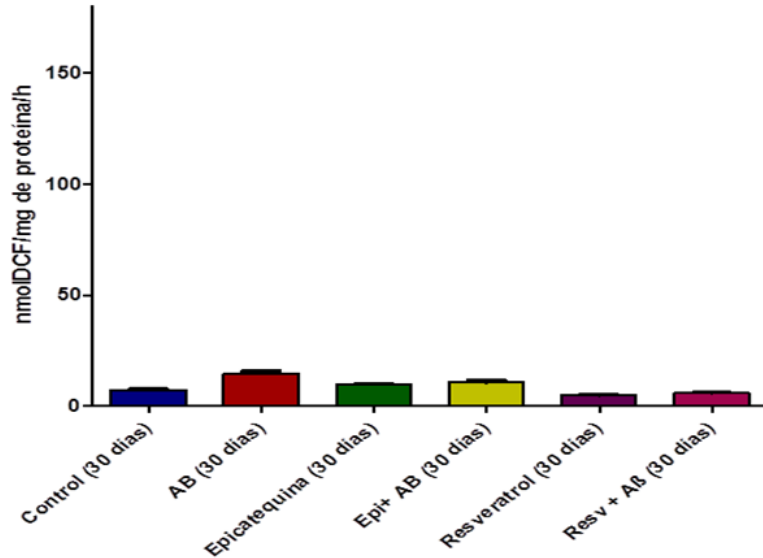


Gráfica 1. Concentraciones de EROs a las 2 horas. Las barras representan las medias y ESM por grupo, de la concentración de diclorofluoresceína normalizada por mg de proteínas. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una post-prueba de Tukey ** $p < 0.001$.



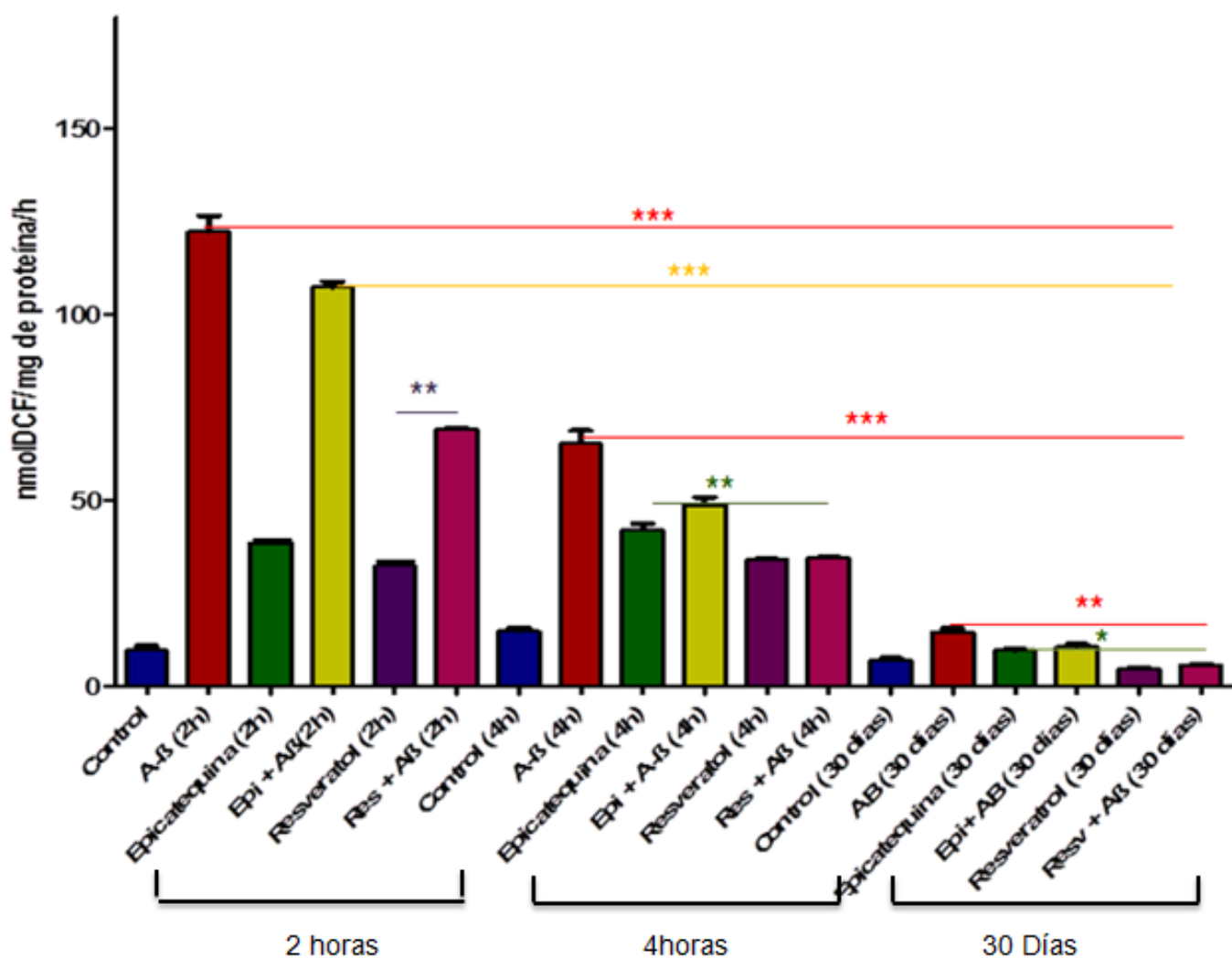
Gráfica 2. Concentraciones de EROs a las 4 horas. Las barras representan las medias y ESM por grupo, de la concentración de diclorofluoresceína normalizada por mg de proteínas. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una post-prueba de Tukey ** $p < 0.001$.

3



Gráfica 3. Concentraciones de EROs a los 30 días. Las barras representan las medias y ESM por grupo, de la concentración de diclorofluoresceína normalizada por mg de proteínas. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una post-prueba de Tukey ** $p < 0.001$.

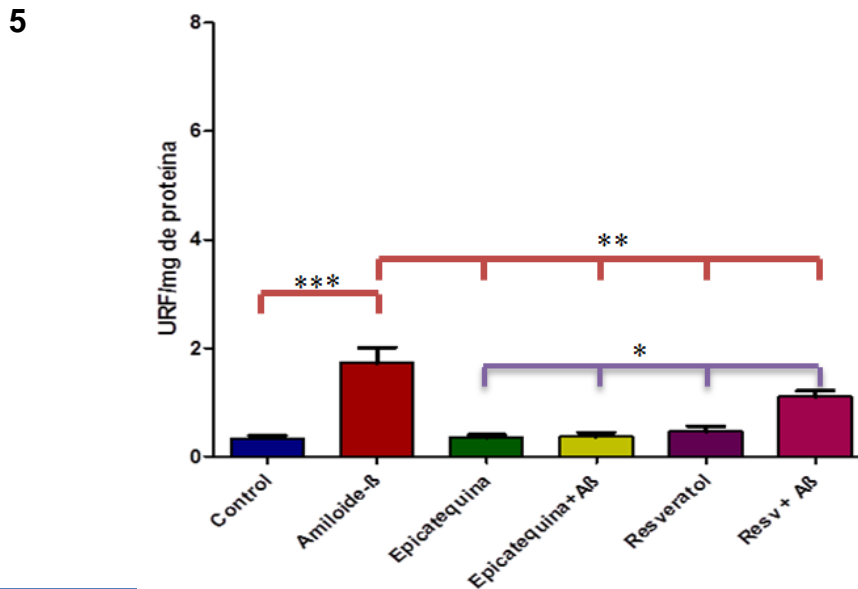
Las gráficas 1, 2 y 3 muestran la concentración de la diclorofluoresceína (DCF) como un marcador directo de la formación de EROs a las 2, 4 horas y a los 30 días después de la micro-inyección del péptido $A\beta_{(25-35)}$. Encontramos que existe un aumento significativo en la formación de EROs por parte del grupo tratado con $A\beta_{(25-35)}$ en comparación con el grupo tratado con la solución vehículo (control). Por otro lado, los grupos pre-tratados, tanto con Epicatequina como con Resveratrol, tuvieron una disminución significativa comparada con el grupo tratado con $A\beta_{(25-35)}$. Estos resultados en conjunto indican que la micro inyección del péptido $A\beta_{(25-35)}$ en el hipocampo es capaz de producir la formación de EROs de manera temprana.



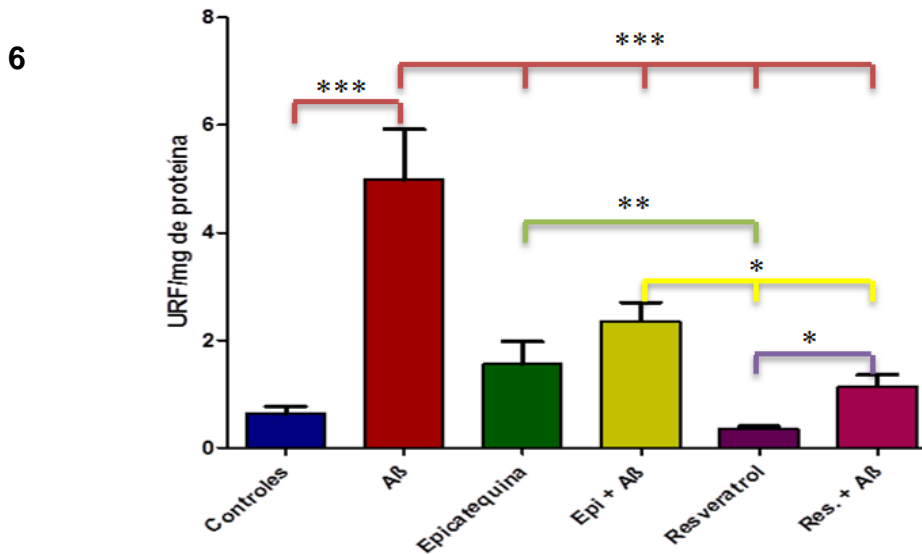
Gráfica 4. Concentraciones de EROs a las 2 horas, 4 horas y 30 días. Las barras representan las medias y ESM por grupo, de la concentración de diclorofluoresceína normalizada por mg de proteínas. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una pos prueba de Tukey ** p<0.001. La grafica muestra la concentración de la diclorofluoresceína (DCF), como un marcador directo de la formación de EROs, a las 2, 4 y 30 días después de la micro inyección del péptido Aβ₍₂₅₋₃₅₎.

Encontramos que existe un aumento significativo en la formación de EROs por parte del grupo tratado con el A β ₍₂₅₋₃₅₎, comparado con el grupo tratado con la solución vehículo y con los grupos pre-tratados con epicatequina y resveratrol. Se puede ver en esta gráfica como el péptido A β ₍₂₅₋₃₅₎ es capaz de producir la formación de EROs de manera temprana, y conforme pasa el tiempo las EROs disminuyen. La formación de EROS de manera temprana puede estar oxidando a los lípidos de las membranas celulares.

10.2. Resultados de la cuantificación de la peroxidación lipídica

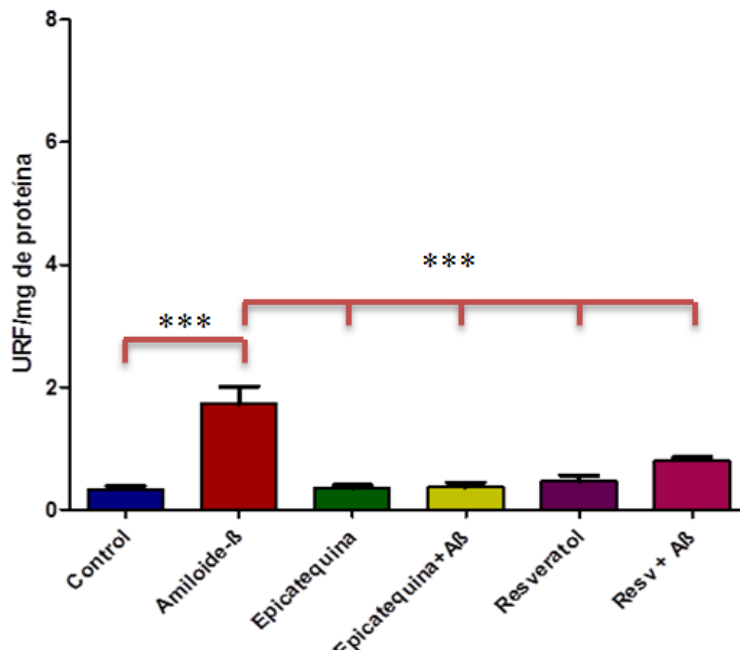


Gráfica 5. Peroxidación lipídica post-inyección del amiloide- β (25-35) a las 2 horas después de la inyección. Las barras representan las medias y ESM por grupo, de las unidades relativas de fluoresceína normalizada por mg de proteínas. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una pos prueba de Tukey*** $p < 0.001$.



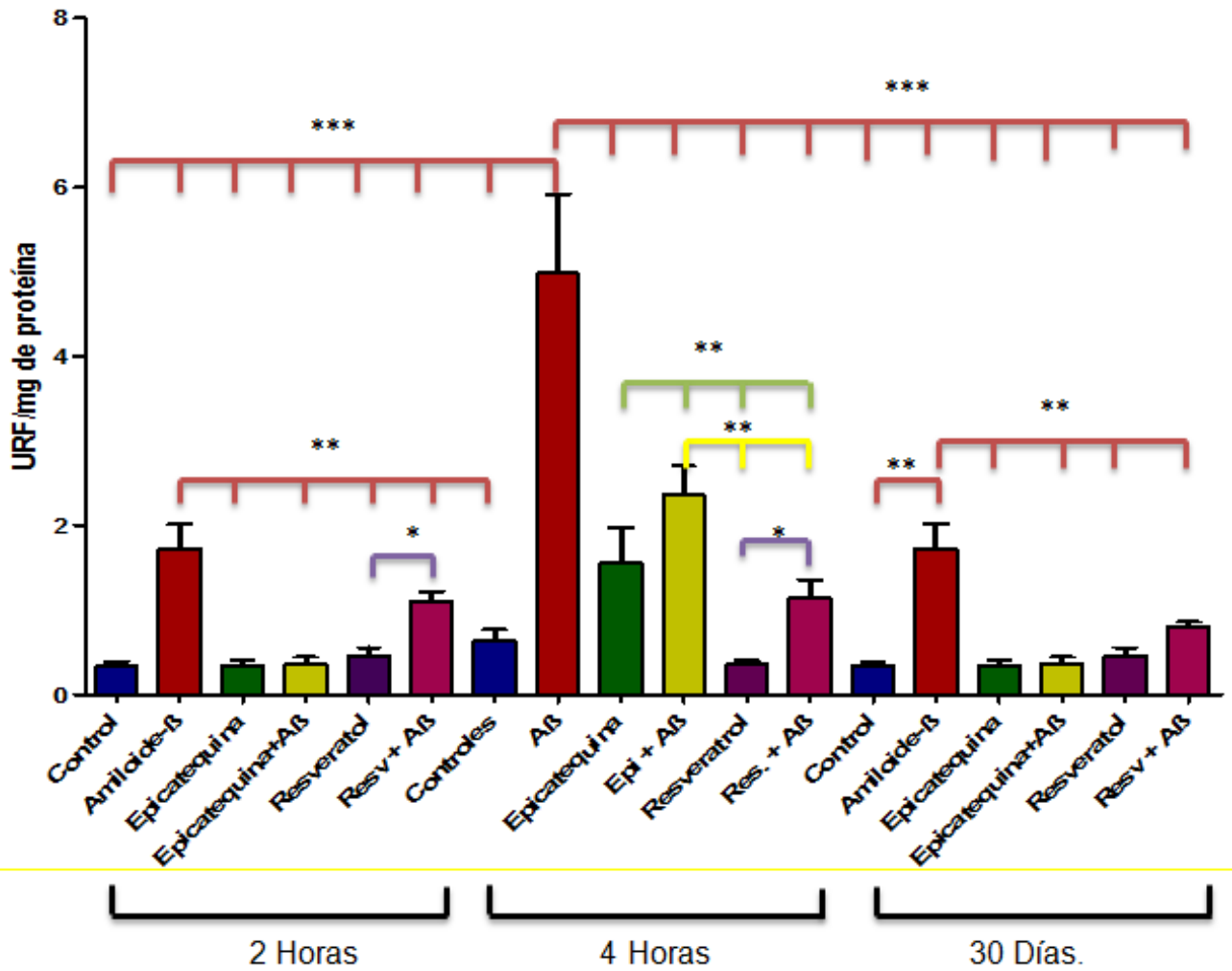
Gráfica 6. Peroxidación lipídica post-inyección del amiloide- β_{25-35} a las 4 horas después de la inyección. Las barras representan las medias y ESM por grupo, de las unidades relativas de fluoresceína normalizada por mg de proteínas. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una post-prueba de Tukey*** $p < 0.001$.

7



Gráfica 7. Peroxidación lipídica post-inyección del amiloide- β (25-35) a los 30 días después de la inyección. Las barras representan las medias y ESM por grupo, de las unidades relativas de fluoresceína normalizada por mg de proteínas. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una post-prueba de Tukey*** $p < 0.001$.

Las gráficas 5, 6 y 7 muestran la peroxidación lipídica como un marcador de daño oxidativo a membranas celulares, a las 2, 4 horas y a los 30 días después de la micro inyección del péptido A β (25-35). Encontramos que existe un aumento significativo en la PL por parte del grupo tratado con el A β (25-35) en comparación con el grupo tratado con la solución vehículo (control). Los grupos pre-tratados con epicatequina y resveratrol tuvieron una disminución de PL con respecto al grupo A β (25-35). Además el pico más alto de aumento se dio a las 2 horas, esto se podrá ver más claramente con la siguiente gráfica, donde colocamos los 3 tiempos en una.

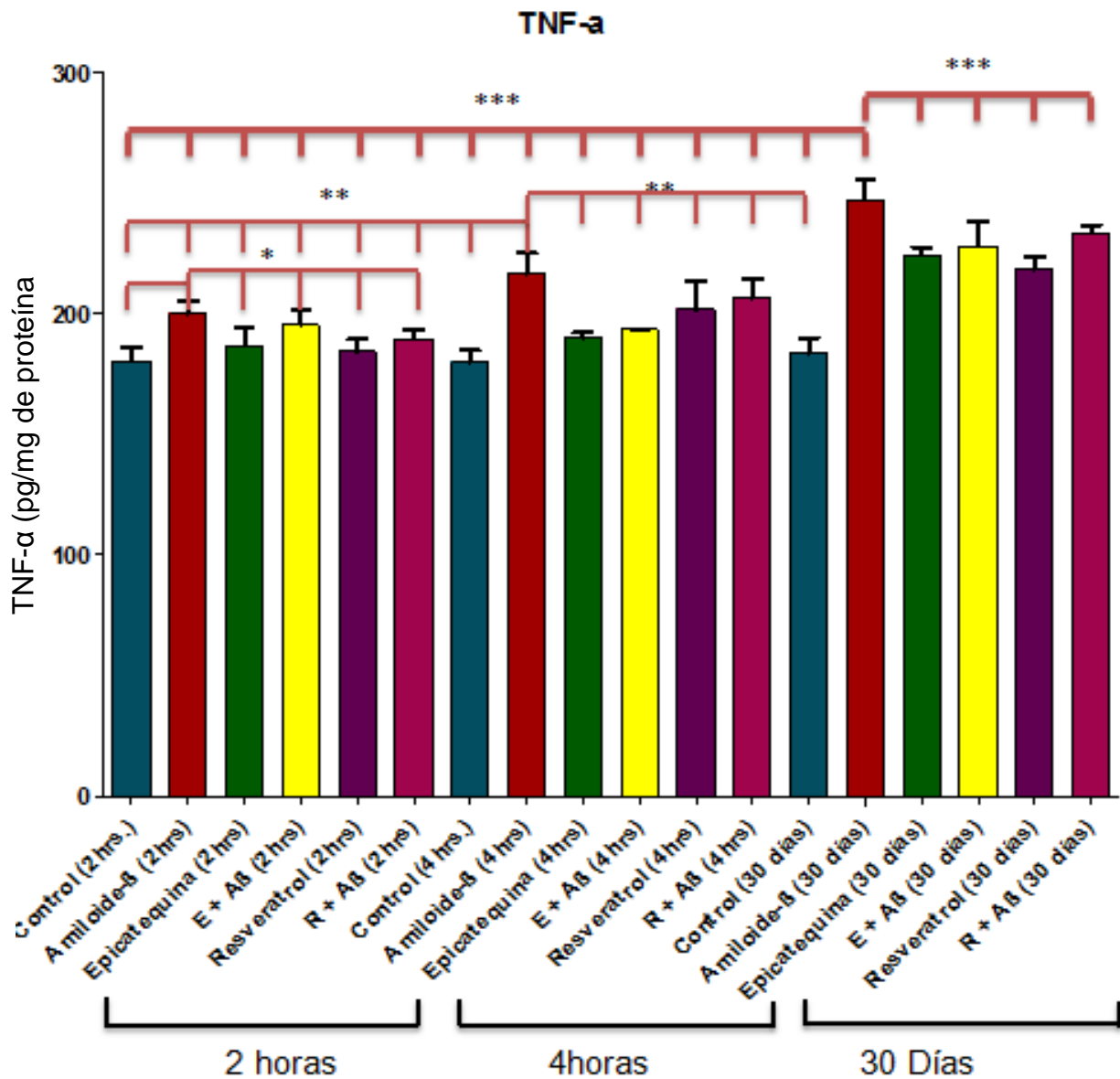


Gráfica 8. Peroxidación lipídica post-inyección del amiloide-β₍₂₅₋₃₅₎ a las 2 horas, 4 horas y 30 días. Las barras representan las medias y ESM por grupo, de las unidades relativas de fluoresceína normalizada por mg de proteínas. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una post-prueba de Tukey***p<0.001.

Además obtuvimos un aumento de la concentración de moléculas pro-inflamatorias, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-17, ocasionado por la inyección del A β (25-35) en el hipocampo.

El pre-tratamiento con epicatequina y resveratrol disminuyen la formación de moléculas pro-inflamatorias ocasionadas por la fracción 25-35 del A β .

10.3. Resultados de la cuantificación de los niveles de TNF- α



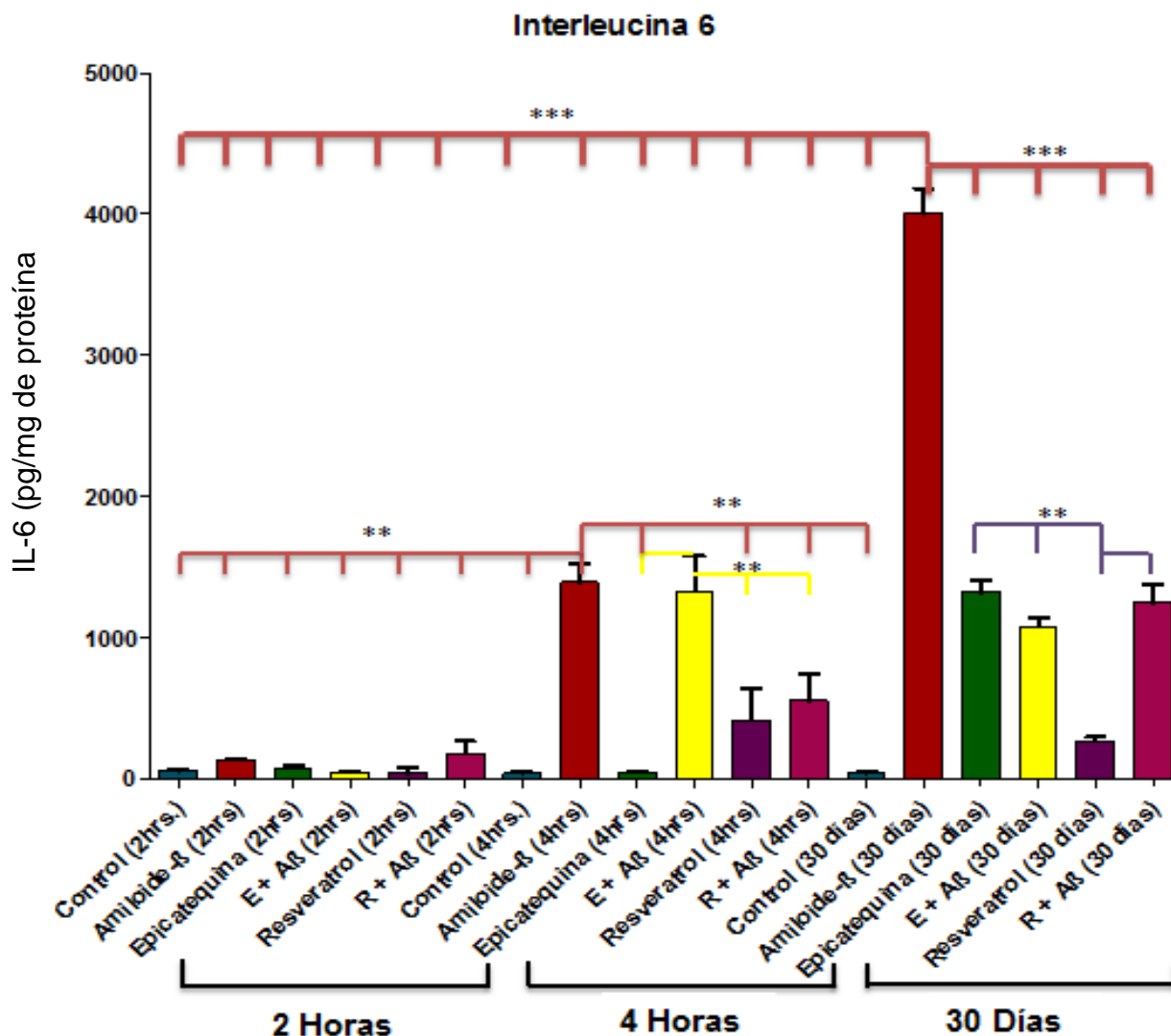
Gráfica 9. TNF- α las 2 horas, 4 horas y a los 30 días después de la micro inyección y la administración de los antioxidantes. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una post- prueba de Tukey. *** $p < 0.005$.

La gráfica 9 muestra la cuantificación del factor de necrosis tumoral- α como un marcador de inflamación a las 2, 4 horas, así como a los 30 días después de la micro inyección en los diferentes grupos: control, amiloide- β , epicatequina, epicatequina + $A\beta$, resveratrol y resveratrol + $A\beta$.

Encontramos que existe un aumento significativo en la expresión del TNF- α en el grupo tratado con sólo el $A\beta$ (25-35) comparado con el control, así como con los pre-tratados con los antioxidantes en todos sus tiempos, aunque el mayor aumento se da a los 30 días. Estos resultados indican que la micro inyección del péptido $A\beta$ (25-35) es capaz de activar al TNF- α de manera temprana, la cual puede estar activando a otras moléculas, entre ellas a interleucinas pro-inflamatorias, esto podría provocar que con el paso del tiempo en vez de disminuir su expresión aumente, y por ello, ver un aumento de esta interleucina a los 30 días.

Por otro lado, los grupos tratados con epicatequina y resveratrol disminuyen significativamente la expresión del factor de TNF- α en comparación con los grupos que contienen $A\beta$ (25-35).

10.4. Resultados de la cuantificación de los niveles de la Interleucina-6



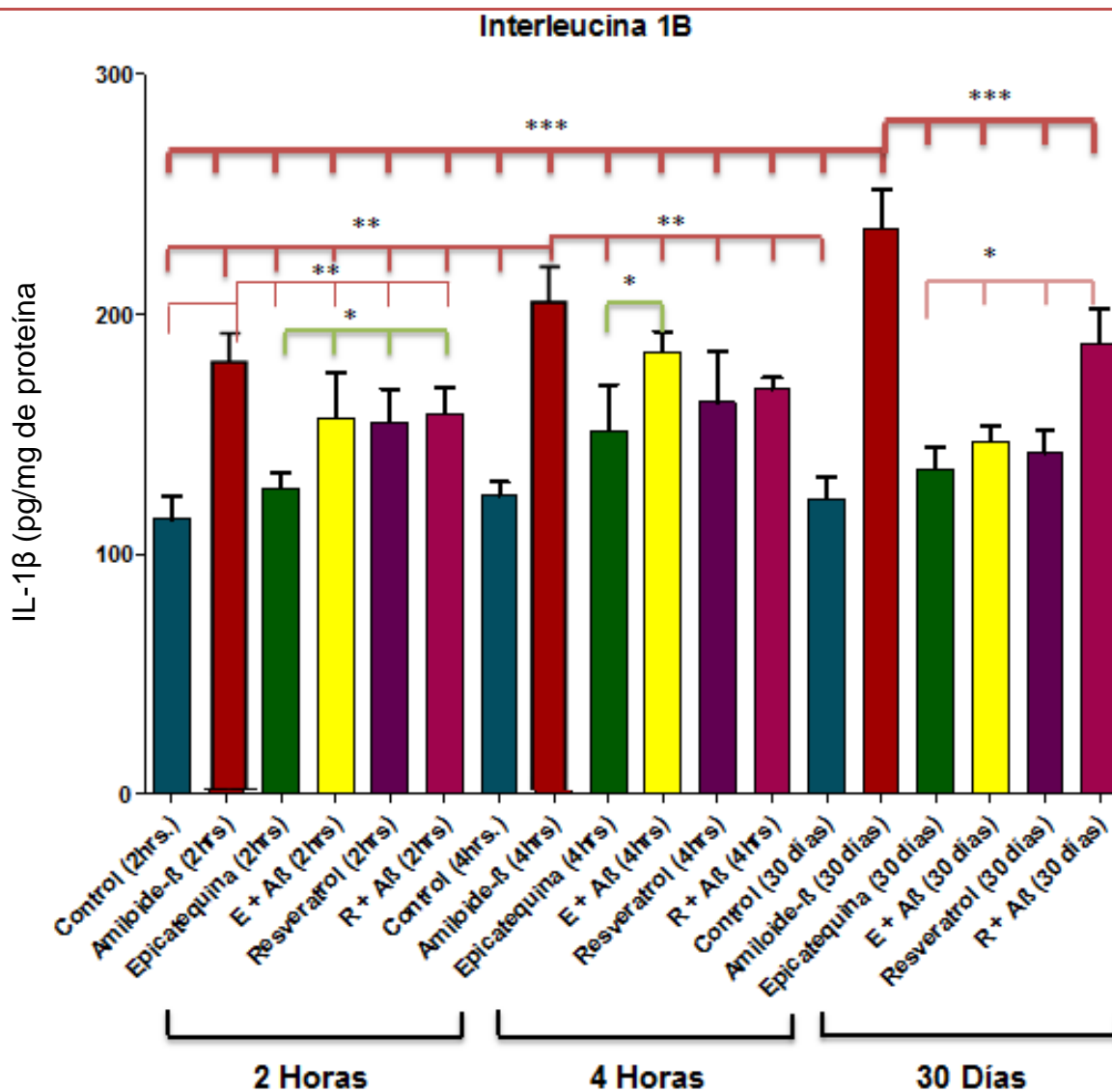
La gráfica 10. Concentración de la IL-6 las 2 horas, 4 horas y a los 30 días después de la micro-inyección y la administración de los antioxidantes. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una post-prueba de Tukey. * $p < 0.005$.

La gráfica 10 muestra la concentración de la Interleucina 6 como un marcador de inflamación a las 2, 4 horas, así como a los 30 días después de la micro-inyección en los diferentes grupos.

Encontramos que existe un aumento significativo en la expresión de la Interleucina 6 por parte del grupo tratado con el $A\beta_{(25-35)}$ comparado con los demás grupos a partir de las 4 horas; en esta gráfica podemos ver a que a las 2 horas después de la micro-inyección no hay una diferencia significativa entre los diferentes grupos, pero a partir de las 4 horas después de la micro-inyección vemos un aumento en la expresión de la IL-6 por parte del grupo $A\beta_{(25-35)}$ y vuelve a aumentar significativamente a los 30 días.

Por otro lado, podemos observar el resveratrol disminuye significativamente la expresión de la Interleucina 6 con respecto al grupo $A\beta_{(25-35)}$ a las 4 horas y 30 días; distinto a lo ocurrido con la epicatequina, ya que ésta por si sola no tuvo ningún aumento significativo de la IL-6, pero con $A\beta_{(25-35)}$ tuvo un aumento y no hubo una diferencia significativa entre epicatequina + $A\beta_{(25-35)}$ y $A\beta_{(25-35)}$, a las 4 horas, pero a los 30 días los grupos con epicatequina se mantuvieron y no aumentaron.

10.5. Resultados de la cuantificación de los niveles de la Interleucina-1 β



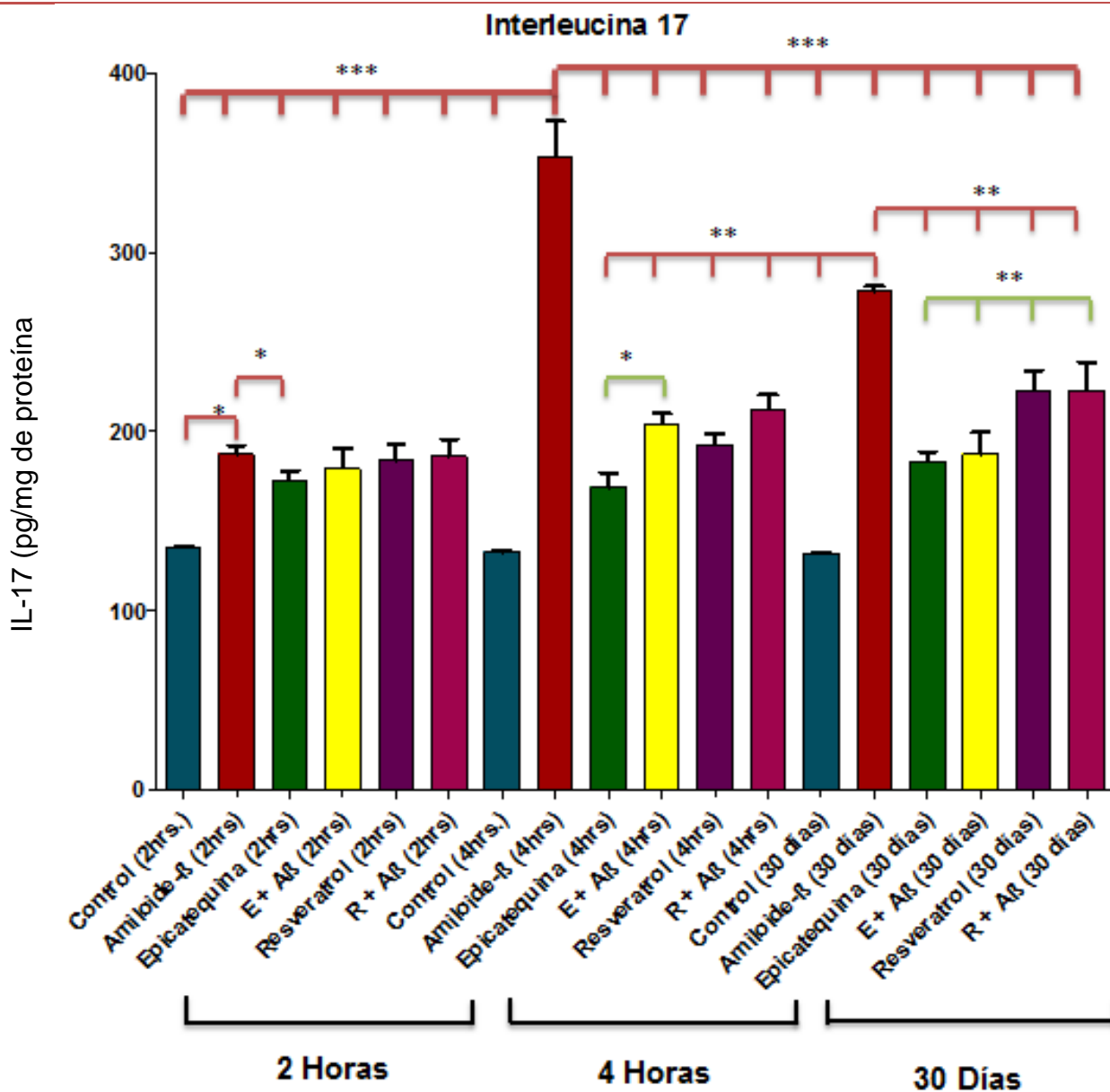
Gráfica 11. Concentración de la IL-1 β a las 2 horas, 4 horas y a los 30 días después de la micro-inyección del péptido A β (25-35) y la administración de los antioxidantes. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una post-prueba de Tukey. * p<0.005.

La gráfica 11 muestra la expresión de la interleucina 1 β como un marcador de inflamación a las 2, 4 horas y a los 30 días después de la micro-inyección en los diferentes grupos: control, amiloide- β , epicatequina, epicatequina + A β , resveratrol y resveratrol + A β .

Encontramos que existe un aumento significativo en la expresión de la interleucina 1 β por parte del grupo tratado con A β (25-35) comparado con los demás grupos en todos sus tiempos; el mayor aumento se da a los 30 días. Estos resultados indican que la micro-inyección del péptido A β (25-35), es capaz de activar de la interleucina 1 β de manera temprana.

El A β aumenta significativamente la IL-1 β y a TNF- α , pero el mayor aumento de estos se da a los 30 días. Por otro lado, los grupos tratados con epicatequina y resveratrol disminuyen de manera significativa la expresión del factor de la interleucina 1 β en comparación con los grupos que contienen A β (25-35).

10.6. Resultados de la cuantificación de los niveles de la Interleucina-17



Gráfica 12. Concentración de la IL-17 las 2 horas, 4 horas y a los 30 días después de la micro-inyección y la administración de los antioxidantes. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una post-prueba de Tukey. * $p < 0.005$.

La gráfica 12 muestra la concentración la Interleucina 17 como un marcador de inflamación a las 2, 4 horas y a los 30 días después de la micro inyección en los diferentes grupos.

Encontramos que existe un aumento significativo en la expresión de la interleucina 17 por parte del grupo tratado con $A\beta_{(25-35)}$ comparado con los demás grupos en todos sus tiempos; no obstante, el mayor aumento se da a las 4 horas. Por otro lado, los grupos tratados con epicatequina y resveratrol disminuyen significativamente la expresión del factor de la interleucina 17 en comparación con los grupos que contienen $A\beta_{(25-35)}$.

XI. DISCUSIÓN

Actualmente, existe la necesidad de entender mejor la enfermedad de Alzheimer, pues en México más de 350,000 personas son afectadas por esta y cerca de 2,030 pacientes mueren al año¹. En Estados Unidos hay 4 millones pacientes con EA, de estos mueren anualmente más de 100,000 personas, siendo la cuarta causa de muerte entre adultos mayores de 65 años. Se estima que una de cada tres de personas enfrentará esta enfermedad para el año 2050.¹⁶⁹

La enfermedad de Alzheimer, como ya se había mencionado, se caracteriza clínicamente por una demencia progresiva, además de una serie de anormalidades que afectan regiones neuronales específicas en las que se observan diferentes lesiones: las marañas neurofibrilares (MNFs) y las placas neuríticas (PNs)¹⁵. Las placas neuríticas están compuestas principalmente por el A β , el cual se acumula extraneuronamente en pacientes con EA¹⁷.

En nuestro grupo de investigación utilizamos un modelo murino en el cual inyectamos la fracción A β ₍₂₅₋₃₅₎ en el hipocampo. Que se ha visto ejerce un efecto neurotóxico. Los datos presentados en nuestro grupo de laboratorio demuestran que el péptido A β ₍₂₅₋₃₅₎, inyectado en la región CA1 del hipocampo de ratas macho, genera daño cognoscitivo vía estrés oxidante, puesto que induce la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y peroxidación de lípidos¹²⁴.

Cuevas y colaboradores en el 2010 midió la concentración de diclorofluoresceína como un marcador directo de la formación de EROs a las 2 y 24 horas después de la micro-inyección del péptido A β ₍₂₅₋₃₅₎. En el cual, se encontró que existe un aumento significativo en la formación por parte del grupo tratado con A β ₍₂₅₋₃₅₎, con respecto al grupo control; de igual manera se midió la peroxidación lipídica como un marcador de daño oxidante a membranas celulares

a las 2 y 24 horas después de la micro-inyección y se encontró que existe un aumento significativo en la PL por parte del grupo tratado con A β ₍₂₅₋₃₅₎¹⁷⁰.

Respaldando estos datos medimos la concentración de diclorofluoresceína a las 2 horas, 4 horas y a los 30 días para ver si el efecto del A β ₍₂₅₋₃₅₎ continúa teniendo un efecto crónico (Gráfica 4). De igual manera medimos la peroxidación lipídica a las 2 horas, 4 horas y a los 30 días (Gráfica 8).

Las gráficas 4 y 8 nos muestran los tres tiempos de la concentración de las especies reactivas de oxígeno y de la peroxidación lipídica. En la gráfica 4 se muestra la concentración de las EROs. Se puede observar que el mayor aumento se da a las 2 horas, y conforme pasa el tiempo esta disminuye de manera significativa. A los 30 días después de la micro-inyección aún hay concentración de EROs pero es significativamente menor que a las 2 horas; esto podría explicarse debido a que estos agentes oxidantes son fácilmente convertidos a radicales, tienen una vida media biológica de microsegundos y la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un daño a las moléculas; una de las principales dianas de los procesos de oxidación inducido por los EROs son los ácidos grasos poliinsaturados presentes mayoritariamente en las membranas celulares⁷⁷.

La reacción de oxidación se inicia cuando el ácido graso diana pierde un átomo de hidrógeno convirtiéndose en un radical lipídico. Este nuevo radical se reorganiza molecularmente para incrementar su estabilidad y reacciona rápidamente con el oxígeno, creando un radical peroxilo (ROO•)^{78,83}; este último dará lugar a un hidroperóxilo lipídico y a un nuevo radical lipídico por sustracción de un átomo de hidrógeno de un segundo ácido graso, así, sucesivamente desencadena lo que se conoce como peroxidación lipídica, la cual se va prolongando por el paso continuo de un electrón desapareado de una molécula a otra. Esta reacción en cadena finalizará cuando¹⁷¹:

1. Se consuma una de las moléculas reactivas (ácidos grasos o el oxígeno).
2. Se forme un radical poco reactivo.
3. Dos radicales al reaccionar formen un par no radical.

En nuestros resultados podemos observar que lo primero que se forman son las EROs, por eso el pico más alto en la gráfica 1 es a las 2 horas; estas especies reactivas van a desencadenar, como se mencionó arriba, la PL; por lo que su pico más alto se da a las 4 horas, pues para que se desencadene esta reacción debieron de haber interactuado una gran variedad de moléculas con las EROs⁷⁸.

Desde que se postuló que el estrés oxidante es un mecanismo por el que actúa el A β , se han realizado experimentos con antioxidantes; algunos contenidos en extractos naturales de plantas como los flavonoides, en distintos modelos de neurodegeneración de la enfermedad de Alzheimer¹⁷². Los flavonoides pueden ejercer acción protectora o tóxica en las células dependiendo de la concentración utilizada, no solo por su actividad antioxidante sino también a través de la modulación de las cascadas de señalización de cinasas, lípidos y proteínas^{173, 174}.

El uso de antioxidantes ha ayudado a entender parte del mecanismo de acción del A β ¹⁷⁵. El efecto de los flavonoides sobre los cambios conductuales sustentan la hipótesis de que el A β (25-35), puede inducir daño vía estrés oxidante. En el trabajo de Cuevas del 2010 se probaron distintos antioxidantes en el modelo de inyección con A β (25-35), se encontró que la catequina, quercetina y epicatequina mostraron un efecto protector frente a la pérdida del aprendizaje y memoria inducida por el A β (25-35)¹²⁵. Cuando se comparó el efecto de cada uno de los antioxidantes se encontró que la epicatequina fue la más eficiente; además previene la formación de EROs y peroxidación de lípidos provocados por la inyección de A β (25-35), además protege a las neuronas del daño oxidativo a través de un mecanismo que implica la inhibición pro-caspasa-3¹²⁴. Razón por la cual fue utilizada en este trabajo.

Por otro lado, elegimos al resveratrol; un polifenol presente en la cáscara de la uva y en otras muchas plantas, pues presenta un amplio rango de acciones biológicas que incluyen actividades antialérgica, anti-inflamatoria, antioxidante, anti-cancerígena y anti-plaquetaria^{112, 113}.

En la gráfica 4, donde se muestra la concentración de diclorofluoresceína a las 2 y 4 horas, hay un aumento significativo tanto en los grupos epicatequina como en los grupos de resveratrol con respecto al control. Esto nos estaría diciendo que están ocasionando daño; pero, por otro lado, también observamos que hay una disminución significativa de la concentración de diclorofluoresceína de los grupos de epicatequina + A β (25-35) y resveratrol + A β (25-35) con respecto al grupo A β (25-35), lo que indica que están previniendo la formación de EROs ocasionadas por el péptido.

Estos resultados se pueden deber gracias a que los antioxidantes se comportan de manera similar a las especies reactivas de oxígeno. Por un lado participan en funciones básicas para el correcto funcionamiento del organismo, pero también pueden actuar como agentes oxidantes dañando diversas estructuras celulares¹⁰⁴. Las mismas propiedades que caracterizan la actividad antioxidante de los flavonoides determinan que tengan efectos pro-oxidantes. El carácter antioxidante o pro-oxidante está determinado por la estabilidad redox del radical formado a partir del flavonoide original. De esta manera, los flavonoides pueden actuar como antioxidantes/prooxidantes dependiendo de los niveles consumidos y de las condiciones fisiológicas del organismo. Una exposición a niveles demasiados altos de flavonoides puede saturar al organismo provocando la formación de EROs, llegando incluso a dañar el ADN y otras moléculas. Los efectos que pueden provocar los flavonoides en condiciones pro-oxidantes son, entre otros, inducir apoptosis, producir citotoxicidad, disminuir la activación de factores de transcripción, expresar moléculas de adhesión, suprimir la proliferación celular e inhibir el crecimiento celular¹⁷⁶.

Por otro lado, en la gráfica 8, que muestra los niveles de peroxidación a las 2, 4 horas y a los 30 días. En esta podemos observar que el grupo al que se le inyectó resveratrol fue igual al grupo control. No hubo diferencia significativa. Por su parte, la epicatequina tuvo solo un aumento a las 4 horas, mientras que a las 2 horas y 30 días se comportó igual al control. Por otra parte, los grupos de epicatequina + A β (25-35) y resveratrol + A β (25-35) disminuyeron significativamente la concentración de peroxidación lipídica, lo que nos indica que están inhibiendo la peroxidación lipídica.

En base a lo anterior, se puede inferir que los flavonoides pueden estar actuando durante la peroxidación lipídica de la siguiente manera¹⁷⁷(Figura 18):

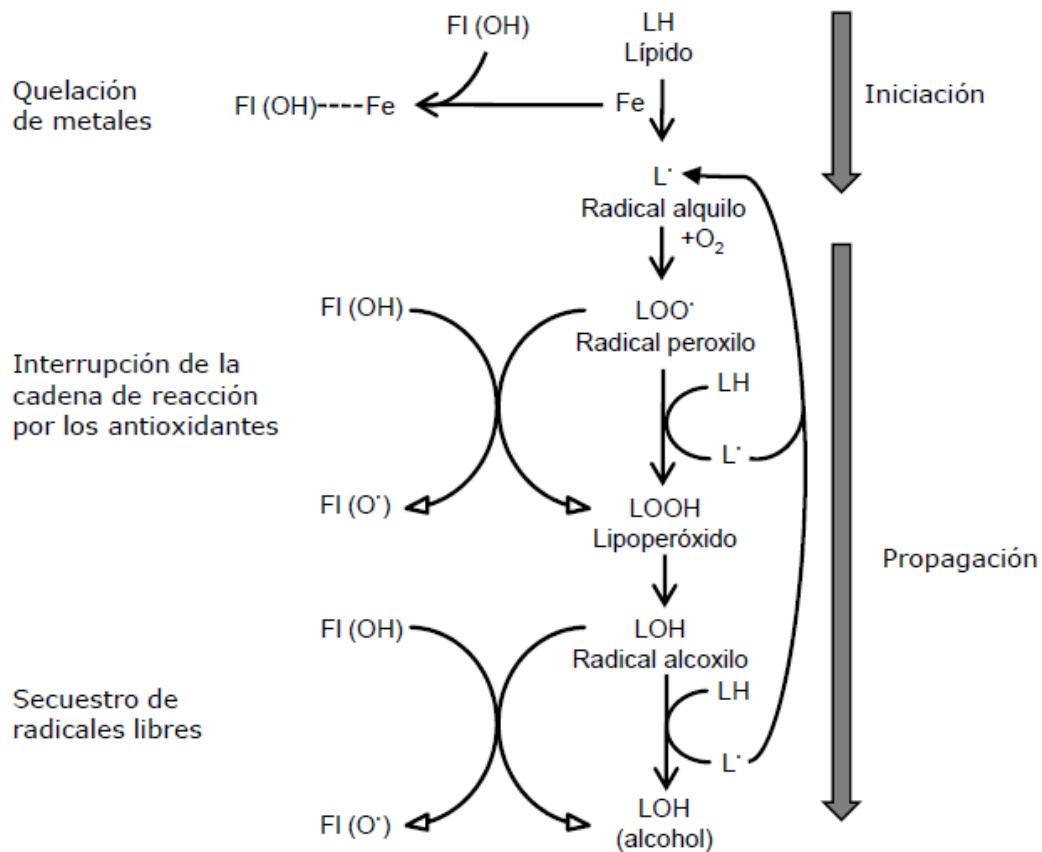


Figura. 18 Diversos mecanismos que son capaces de ejecutar los flavonoides para inhibir los procesos de peroxidación.

Se puede observar que el A β (25-35) puede generar EROs, las cuales pueden iniciar un amplio rango de reacciones oxidativas tóxicas que incluyen la iniciación de la peroxidación lipídica¹⁷⁸, la inhibición directa de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial, la inactivación de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la inhibición de la actividad ATP-asa sodio/potasio de membrana, la inactivación de los canales de sodio de membrana y otras modificaciones a proteínas¹⁷⁹. Todos estos eventos tóxicos probablemente juegan un rol en la inflamación.

En un trabajo previo a este, realizado por el equipo de nuestro laboratorio, se midió la expresión de la inmunoreactividad para la proteína ácida fibrilar (GFAP)¹²⁴, la cual se expresa en altas concentraciones cuando los astrocitos reactivos se encuentran activados. En este trabajo se obtuvo que el A β (25-35) produce activación de la microglía y estrés oxidante, el cual es causa de activación de astrocitos¹⁸⁰.

Los astrocitos reactivos son células de la glía¹⁸¹ que proliferan a partir de algún daño en el Sistema Nervioso Central, estos se diferencian a astrocitos¹⁸² y tienen una amplia participación en los procesos inflamatorios. Los astrocitos se vuelven hipertróficos liberando una gran cantidad de sustancias químicas como interleucinas, citocinas y óxido nítrico.

Por lo anterior, nuestro grupo de laboratorio midió la concentración de nitratos y nitritos. Se obtuvo un aumento significativo de estos provocados por el A β (25-35)¹⁸³.

En base a estos resultados se demostró que el A β (25-35) es capaz de inducir formación de ON y producción exacerbada de radicales libres tales como las especies reactivas de oxígeno. Esto que sugiere que todos estos factores pueden contribuir a un proceso de inflamación, la cual genera disfunción neuronal y muerte celular, que a su vez, producen un deterioro cognitivo¹⁸⁴ (Figura 20).

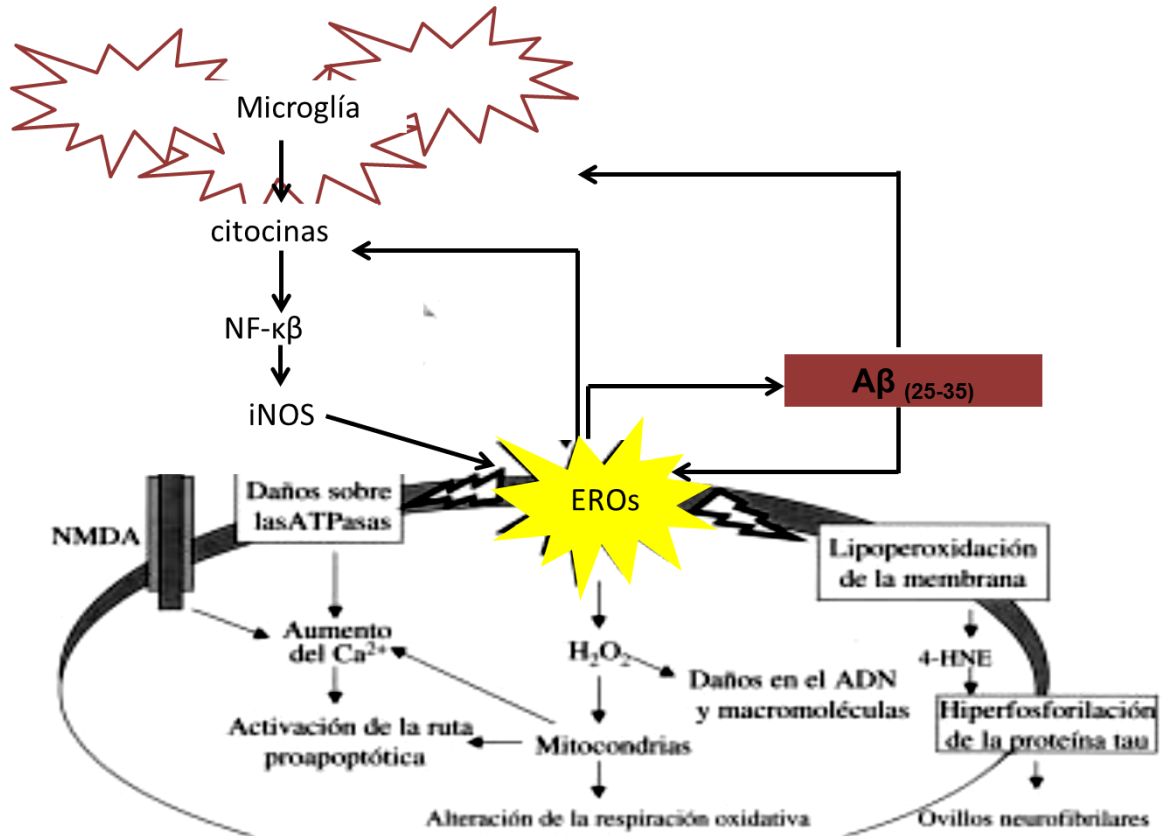


Figura 20. Esquema de la posible cascada de reacciones.

Por lo que decidimos estudiar el papel de $A\beta_{(25-35)}$ por medio de la concentración de citocinas pro-inflamatorias crónicas y agudas. A través de la técnica de ELISA se evaluó la concentración de IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF- α a las 2, 4 horas y a los 30 días. La elección de estas interleucinas se debe a que se han reportado como principales citocinas pro-inflamatorias en el sistema nervioso central. Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas 3, 4, 5 y 6.

La gráfica 9 nos muestra la concentración del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en los distintos tiempos. Se puede observar la existencia de un aumento significativo de la concentración del TNF- α en los grupos $A\beta_{(25-35)}$ con respecto a los controles. Además, se observa que el mayor aumento significativo se da a los

30 días. Por otro lado, con estos resultados se puede ver que en los grupos pre-tratados con flavonoides hay una disminución significativa de la concentración del TNF- α con respecto a los grupos A β (25-35).

A partir de estos resultados, podemos inferir que el péptido está activando o aumentando la concentración del TNF- α . Este último ha sido implicado en los procesos de toxicidad ya que la administración de anticuerpos anti-TNF- α produce una disminución de infartos isquémicos, mientras que la administración de TNF- α potenciaba el daño. Su expresión en el SNC es controvertida^{139, 140}. Cuando es inducida por daño, el TNF- α tiene un papel clave como mediador de muerte celular, estando implicado en la patogénesis de muchas enfermedades neurológicas. Los mecanismos por los que TNF- α produce daño son múltiples: aumentando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a nivel vascular, incitando la expresión de moléculas de adhesión, favoreciendo la acumulación de neutrófilos e induciendo, a través de mecanismos NF- κ B-dependientes, la expresión de genes inflamatorios como iNOS/COX-2 que generan apoptosis en neuronas y son potentes productores de radicales libres¹⁸⁵.

Por otro lado, la gráfica 10, nos muestra la concentración de la interleucina 6 en los distintos tiempos y en cada grupo. Se puede observar que existe un aumento significativo en la concentración de la interleucina 6 por parte del grupo tratado con el A β (25-35) en comparación con los demás grupos a partir de las 4 horas. Además, se observa que a las 2 horas después de la micro-inyección no hay una diferencia significativa entre los diferentes grupos, pero a partir de las 4 horas después de la micro-inyección se presenta un aumento en la expresión de la IL-6 por parte del grupo A β (25-35), este aumenta significativamente a los 30 días. Lo anterior nos indica que la micro-inyección del péptido A β (25-35) puede estar activando a ciertas moléculas, como algunas interleucinas, como es el caso del TNF- α , el cual se ha reportado que puede activar otras citocinas entre las que se encuentra la IL-6¹⁸⁶.

Lo observado en nuestros resultados, es decir, el que la IL-6 se encuentre en bajas concentraciones a las 2 horas, es congruente en la literatura, pues la detección de IL-6 es mínima en condiciones basales, sin que haya un proceso inflamatorio, pero es fuertemente inducible en condiciones patológicas¹²⁵. La IL-6 puede ser sintetizada por microglía, astrocitos y algunas Interleucinas como la IL-1 β y el TNF- α ¹²⁵. Nosotros vimos que esta interleucina se encuentra muy baja en nuestros controles, pero con la administración del A β (25-35) aumentó significativamente. Por lo que la IL-6 se considera como el producto final en la cascada de citocinas.

La gráfica 11 muestra la expresión de la interleucina 1 β como un marcador de inflamación en sus diferentes tiempos después de la micro-inyección del A β (25-35). Encontramos que existe un aumento significativo en la expresión de la interleucina 1 β por parte del grupo tratado con A β (25-35) comparado con los demás grupos y su mayor aumento se presenta a los 30 días. Estos resultados indican que la micro-inyección del péptido A β (25-35) es capaz de activar a la interleucina 1 β de manera temprana, la cual se va a seguir produciendo, ya sea por la microglía, astrocitos, la activación de interleucinas o el péptido A β (25-35). IL-1 β es un pro-inflamatorio que induce la expresión de iNOS y la producción de NO mediado por la activación de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y NF κ B, por ello, puede contribuir o limitar a la neurotoxicidad. Liberada en cantidades pequeñas promueve la remielinización y la supervivencia neuronal, en grandes cantidades se asocia con el envejecimiento y con el aumento de la reactividad glial¹³⁴. En la EA su expresión es inducida de manera temprana.

Por otro lado, la IL-17 juega un papel importante en los procesos de inflamación crónica, como en modelos experimentales de inflamación inducida por A β causando daño neuronal¹⁸⁷. Nuestros resultados confirman que la IL-17 está implicada en la toxicidad causada por A β (25-35) *in vivo*, los cuales podemos ver en la gráfica 12. Esta muestra la concentración de la interleucina 17 como un marcador de inflamación a las 2, 4 horas y a los 30 días después de la micro-

inyección en los diferentes grupos. Se observa que existe un aumento significativo en la expresión de la interleucina 17 por parte del grupo tratado con A β (25-35) comparado con los demás grupos en todos sus tiempos; aunque el mayor aumento se da a las 4 horas.

En base a estos resultados podemos decir que el péptido A β va a activar las células gliales, (astrocitos y microglia) las cuales van a conducir a la producción prolongada de citocinas pro-inflamatorias y otros mediadores que pueden contribuir a la activación progresiva de la apoptosis provocando la muerte de las neuronas¹³⁴. Su modulación desencadena una cascada de eventos moleculares en la glía y en las neuronas, activando la respuesta inflamatoria. A su vez, las citocinas pro-inflamatorias¹³¹ (IL-1 β y TNF- α) modulan la activación glial. Formando un círculo vicioso¹⁸⁸.

Por otro lado, tanto la IL-1 β como el TNF- α pueden asociarse en la producción de otras citocinas, tales como IL-6, en respuesta al tratamiento con A β e inducen la proliferación de células gliales; además, regulan la expresión de iNOS en los astrocitos y la microglía para producir altas concentraciones de NO, lo que facilita disfunción neuronal y muerte¹³² (Véase figura 21).

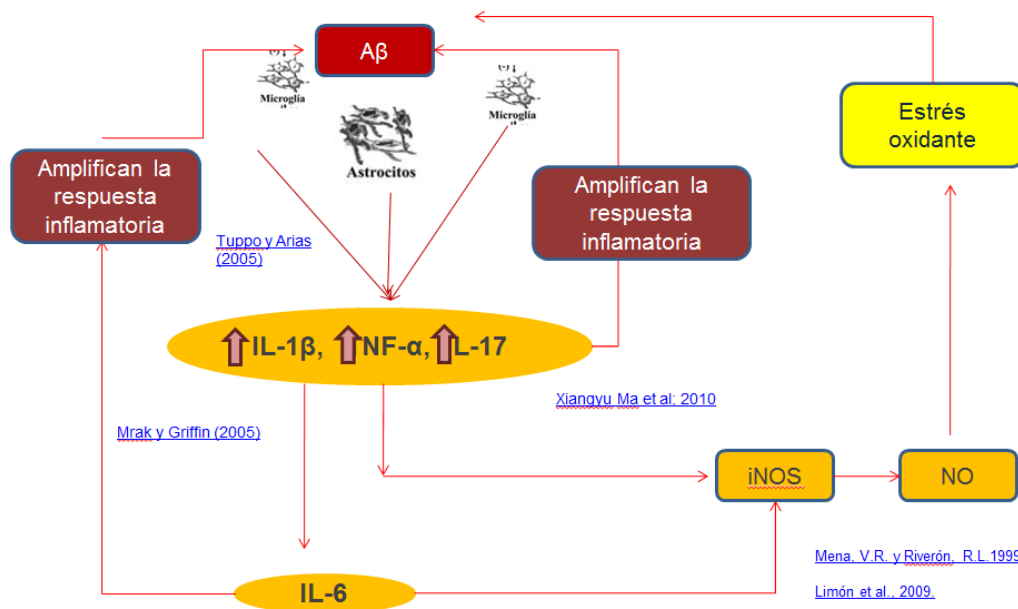


Figura 21. Esquema de la hipotética cascada de reacciones. Que desencadenan la producción de citocinas.

El óxido nítrico generado puede seguir provocando un daño crónico, pues va atacar a la mitocondria. Esto provoca que se genere peroxinitrito, el cual desencadena la peroxidación lipídica y por lo tanto estrés oxidante¹⁸⁹. De tal manera podemos decir que las citocinas son consideradas como reguladores de la intensidad y la duración del proceso inflamatorio¹⁹⁰, debido a que promueven la activación de diversas vías de señalización en respuesta al estrés celular, incluyendo la iNOS, responsable de concentraciones crecientes de óxido nítrico, que alcanzando niveles tóxicos pueden conducir a la muerte neuronal in vitro^{191,192}.

Varios investigadores informan que la IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF- α desempeñan un papel central en la modulación de la respuesta inflamatoria y la proliferación de inducción de los astrocitos y la microglía en el sistema nervioso central^{193, 194}. A este respecto, A β (25-35) podría promover la activación crónica de la glía acompañado por el aumento de la liberación de citocinas pro-inflamatorias y, por lo tanto, causa la desregulación del proceso inflamatorio a largo plazo, conduciendo a la muerte neuronal. IL-1 β y TNF- α desencadenan la producción de otras citocinas, tales como IL-6, en respuesta al tratamiento con A β ¹⁹⁵ e inducir la proliferación de células gliales. Además, regulan la expresión de iNOS en los astrocitos y microglía para producir altas concentraciones de ON, lo que facilita la disfunción neuronal y la muerte^{196, 197}. Además, IL-17 juega un papel importante en los procesos inflamatorios crónicos, tales como en modelos experimentales de la encefalitis autoinmune inducida por A β causando daño neuronal^{198,199}, nuestros resultados confirman que la IL-17 está implicado en la toxicidad causada por A β (25-35).

En este sentido, estos datos sugieren que las respuestas inflamatorias podrían contribuir al daño neuronal causado por A β (25-35) porque hay una mayor expresión de citoquinas pro-inflamatorias, lo que sugiere también que el proceso inflamatorio es un evento clave para el deterioro de procesamiento cognitivo en pacientes con enfermedad de Alzheimer²⁰⁰.

La enfermedad de Alzheimer, como ya se había mencionado, no tiene cura, los tratamientos farmacológicos existentes, sólo son paliativos. Por lo que se ha buscado maneras de prevenirla con los antioxidantes, como se observó, los antioxidantes pueden intervenir en el estrés oxidante, y en base a nuestros resultados, podemos decir que juegan un papel en la inflamación, ya que pueden influir en la activación de los factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NFkB) implicado en la inducción de iNOS, el cual es un factor determinante en la respuesta inflamatoria del SNC¹³². Estos pueden inhibir la activación del factor nuclear kappa β y por lo tanto inhibir a iNOS, impidiendo que se desencadene la cascada inflamatoria.¹³² Estudios muestran que la administración de antioxidantes bloquea la respuesta inflamatoria al inhibir la iNOS y la expresión de la ciclooxigenasa (COX-2) así como la producción de ON, la liberación de citocinas pro-inflamatorias y la generación de EROs en los astrocitos y la microglia.^{201,202}.

XII. CONCLUSIONES

Con los datos obtenidos en este trabajo podemos concluir que la fracción 25-35 del péptido amiloide- β induce de manera temprana la formación de especies reactivas de oxígeno, las cuales van a desencadenar la peroxidación lipídica, generando daño en las membranas neuronales.

Siendo el sistema nervioso sensible al daño mediado por los radicales libres debido a que el cerebro tiene un alto contenido de hierro (metal que participa en la generación de radicales libres), es rico en ácidos grasos muy susceptibles a la oxidación y, además, posee niveles bajos de defensas antioxidantes respecto de las halladas en otros órganos. El pre-tratamiento con los flavonoides epicatequina y resveratrol disminuye la formación de EROS y por lo tanto de PL, además de las interleucinas pro-inflamatorias. Estos antioxidantes se encargan de atrapar los radicales libres y otras sustancias oxidantes que son las responsables del daño en las membranas celulares.

Por otro lado, la fracción 25-35 del péptido amiloide- β también va a aumentar la concentración de citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-17, estas citocinas pueden contribuir al daño neuronal, debido a que a una mayor expresión de las citocinas pro-inflamatorias a largo plazo sugiere un proceso inflamatorio crónico el cual es un evento clave para el deterioro de procesamiento cognitivo en pacientes con Alzheimer. El pre-tratamiento con antioxidantes puede bloquear la respuesta inflamatoria ya sea por al inhibir la iNOS, así como la producción de ON, la liberación de citocinas pro-inflamatorias y la generación de ROS en los astrocitos y la microglía.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Kachaturian Z.S. (1985) Diagnosis of Alzheimer's disease. Arch Neurol. 42:1097-1106.
- ² Cuevas E., Limon D., Perez-Severiano F., Díaz A, Ortega L., Zenteno E. y Guevara J.(2009) Antioxidant effects of Epicatechin on the hippocampal toxicity caused by Amyloid β -25-35 in rats. European Journal of Pharmacology 616:122-127.
- ³ Findeis, M. A. (2007).The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. Pharmacology and Therapeutics, vol. 116, no. 2, pp. 266–286.
- ⁴ Atwood C. S., Obrenovich M., Liu T. (2003) Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- β , *Brain Research Reviews*, vol. 43, no. 1, pp. 1–16.
- ⁵ McGeer PL, Roger J, McGeer EG (1994) Neuroimmune mechanisms in Alzheimer' disease pathogenesis. Alzheimer Dis Assoc Disord; 8:149-165.
- ⁶ Dickson DW, Sinicropi S, Yen HS (1996). Glycation and microglial reaction in lesions of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging.17:733-743.
- ⁷ Cuevas E., Limon D., Pérez-Severiano F., Díaz A., Ortega L., Zenteno E y Guevara J. (2009). Antioxidant effects of Epicatechin on the hippocampal toxicity caused by Amyloid β -25-35 in rats. European Journal of Pharmacology 616:122-127.
- ⁸ Rusina R (2012) Neurodegenerative disorders: review of current classification and diagnostic neuropathological criteria. Cesk Patol. 2011 Apr;48(2):83-90.
- ⁹ Pasantes, H., Arias, C., Massieu, L., Zentella, A., Tapia, R.(1999) Enfermedades Neurodegenerativas. Mecanismos celulares y moleculares. ED. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 133-160.
- ¹⁰ Arango L.J.C y Fernández G.S. (2003). Características clínicas de le EA. En: Las demencias. Aspectos clínicos, neuropsicológicos y tratamiento. Ed. El Manual Moderno. 1º edición. Vol.II. pp.197-208.
- ¹¹ Rossor M.N., Fox N.C., Greeborough P.A y Harvey R.J.(1996) Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease. Neurodegeneration. 5:393-397
- ¹² ZannisV, Just P, Breslow J. (1981) Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. Am. J. Hum. Gene. 33:11-24
- ¹³ Holtzman, D.M.(2001) Role of ApoE/Abeta interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. J. Mol. Neurosci. 17:147-155.

-
- ¹⁴ Guimerà A., Gironès X., Félix F. Cruz-Sánchez (2002) Actualización sobre la Patología de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Esp Patol.* Vol 35, n.º 1: 21-48.
- ¹⁵ Alonso A. (1997) Importancia de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Divulgación científica y tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy.* Departamento de Química. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Colombia. 7:14-15.
- ¹⁶ Brion JP, Anderton BH, Authelat M, Dayanandan R, Leroy K, Lovestone S, Octave JN, Pradier L, Touchet N, Tramp G (2001) Neurofibrillary tangles and tau phosphorylation. *Bochem Soc Symp.* 67:81-88
- ¹⁷ Gomez-Isla T., Hollister T., West H., Mui S., Growdon J.H., Petersen R.C., Parisi J.E. y Hyman B.T. (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41:17-24.
- ¹⁸ Dennis W. y Dickson M.D. (1997) The pathogenesis of senile plaques. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 56:321-339.
- ¹⁹ Gowling E., Roher A.E., Woods A.S., Cotter R.J., Chaney M., Little S.P. y Ball M.J. C (1994) Chemical characterization of A β 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 269:10987-10990.
- ²⁰ Glenner G. G. y Wong C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 120:885-890.
- ²¹ Schebret W., Prior R., Weidemann A., Dirksen H., Multhaup G., Masters C.L y Beyreuther K. (1991) Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res* (1991) 563:184-194.
- ²² Turner P.R., O'Connor K., Tate W.P. y Abraham W.C. (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70: 1-32.
- ²³ Harkany, T., Abraham, I., Konya, C. (2000) Mechanism of beta-amyloid neurotoxicity: perspectives of pharmacotherapy. *Rev Neurosci*, 11(4):329-382.
- ²⁴ Fukumoto H., Cheung B.S., Hyman B.T. y Irizarry M.C. (2002) β -secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 59: 1381-1389.
- ²⁵ Mattson M.P. (1997) Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev.* 77: 1081-1132.
- ²⁶ Siman R. y Salidas S. (2004) Gamma-secretase subunit composition and distribution in the presenilin wild-type and mutant mouse brain. *Neuroscience.* 129: 615-628.
- ²⁷ Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Esch F., Lee M., Dovey H., Davis D., Sinha S., Schlossmacher M., Whaley J., Swindlehurst C., McCormack R., Wolfert R., Selkoe D.,

Lieberburg I., y Schenk D.(1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids . *Nature*. 359: 325-327.

²⁸ Selkoe D.J.(2001)Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev* 81: 741-766.

²⁹ Yankner B.A., Duffy L.K. y Kirshnet D. A.(1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides.*Science*. 250: 279-282.

³⁰ Gandy S. (2005).The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 115: 1121-1129.

³¹ Yamada K. y Nabeshima T. (2000). Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol and Therap* 88: 93-113.

³² Bayer L, Eggermann E, Serafin M, Saint-Mleux B, Machard D, Jones BE, Mühlethaler M (2001) Orexins (hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons. *Eur J Neurosci* 14:1571–1575.

³³ McGeer EG, McGeer PL (2010) Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J Alzheimers Dis* 19:355–361.

³⁴ Bishop NA, Lu T, Yankner BA (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 464:529–535.

³⁵ Loerch P.M, Lu T, Dakin KA et al (2008) Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. *PLoS ONE* 3:e3329

³⁶ Mitchell R. and Cotran R. (2003) Acute and chronic inflammation. in *Robbins Basic Pathology*, V. Kumar, R. Cotran, and S. Robbins, Eds., Saunders, Philadelphia, Pa, USA.

³⁷ Finch C.E. and Morgan T. E. (2007) Systemic inflammation, infection, ApoE alleles, and Alzheimer disease: a position paper. *Current Alzheimer Research*, vol. 4, no. 2, pp. 185–189.

³⁸ H. Akiyama, S. Barger, S. Barnum (2000).Inflammation and Alzheimer's disease," *Neurobiology of Aging*, vol. 21, no. 3, pp. 383–421.

³⁹ Mrak R. E., and Griffin W. S. T. (2005).Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*, vol. 26, no. 3, pp. 349–354.

⁴⁰ Fillit H, Ding WH, Buee L et al (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 129:318–320.

⁴¹ Bauer J, Strauss S, Schreiter-Gasser U et al (1991) Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett* 285:111–114.

⁴² Bauer J, Ganter U, Strauss S et al (1992) The participation of interleukin-6 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Res Immunol* 143:650–657.

-
- ⁴³ Haga S, Akai K, Ishii T (1989) Demonstration of microglial cells in and around senile (neuritic) plaques in the Alzheimer brain. An immunohistochemical study using a novel monoclonal antibody. *Acta Neuropathol* 77:569–575.
- ⁴⁴ Dickson D.W., J. Farlo J., Davies P., Crystal H., Fuld H., and Yen (1988). Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *American Journal of Pathology*, vol. 132, no. 1, pp. 86–101.
- ⁴⁵ Findeis M. A. (2007). The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 116, no. 2, pp. 266–286.
- ⁴⁶ Town T., Nikolic V., and Tan J. (2005) The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *Journal of Neuroinflammation*, vol. 2, article 24.
- ⁴⁷ Halliday, S. R. Robinson, C. Shepherd, and J. Kril. (2000). Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms," *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 27, no. 1-2, pp. 1–8.
- ⁴⁸ Atwood C. S., Obrenovich M. E., Liu T. (2003). Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- β ," *Brain Research Reviews*, vol. 43, no. 1, pp. 1–16.
- ⁴⁹ McGeer P.L, Kawamata, Walker D.G., Akiyama T., Tooyama I. and. McGeer E. G. (1993) Microglia in degenerative neurological disease. *Glia*, vol. 7, no. 1, pp. 84–92.
- ⁵⁰ Rubio-Perez J.M., and Morillas-Ruiz J. (2012) A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. *The Scientific World Journal* Volume 2012 :10.1100/2012/756357
- ⁵¹ Steinman L. (2007). A brief history of TH17, the first major revision in the T H1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Medicine*, vol. 13, no. 2, pp. 139–145.
- ⁵² Meager A. (2005). Viral inhibitors and immune response mediators: the interferons. in *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, R. Meyers, Ed., pp. 387–421, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- ⁵³ Baggiolini, M. (2001). Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250: 91.
- ⁵⁴ Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. (2008) *Inmunología Celular y Molecular*. 6° Edición. Elsevier. 267- 300 pp.
- ⁵⁵ Dinarello, C. A. (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* 118: 503.
- ⁵⁶ Di Bona D., Candore G., Franceschi C., Licastro F., Colonna-Romano G., Camma C., Lio D., Caruso C. (2009) Systematic review by meta-analyses on the possible role of TNF- α polymorphisms in association with Alzheimer's disease, *Brain Res. Rev.* 61: 60–68.

-
- ⁵⁷ Perry R.T., Collins J.S., Wiener H., Acton R., and Go R.C.P.(2001) The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, vol. 22, no. 6, pp. 873–883.
- ⁵⁸ McGeehan G.M., Becherer J.D., Bast Jr. R.C., Boyer C.M., Champion B., Connolly K.M., Conway J.G., Furdon P., Karp S., Kidao S., McElroy A.B., Nichols J., Pryzwanski K.M., Schoenen F., Sekut L., Truesdale A., Verghese M., Warner J., Ways J.P. (1994). Regulation of tumour necrosis factor- α processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature*. 370, 558- 561.
- ⁵⁹ Meistrell ME, Botchkina GI, Wang H, Di Santo E, Cockroft KM, Bloom O, VishnubhakatJM, Ghezzi P, Tracey KJ. (1997). Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock*. 8, 341-348.
- ⁶⁰ Mattson MP., Cheng B., Baldwin S., Smith-Swintosky VL., Keller J., Geddes JW., Scheff SW., Christakos S. (2000). Brain injury and tumor necrosis factors induce expression of calbindin D-28k in astrocytes: a cytoprotective response. *J Neurosci Res*. 42, 357-370.
- ⁶¹ Calandra T., Heumann D.(2000) Inhibitor cytokine. Marshall JC, Cohen J, editors. *Immune responses in the critically ill*. Heidelberg:Springer.67-83.
- ⁶² Abbas, Abul K, Lichtman Andrew H, Pober Jordan S. (2002) *Inmunología Celular y Molecular*. 4º Edición. Editorial Mc-Graw Hill. Cap 11. Pag 243-279.
- ⁶³ Winter C.D., Lannotti F., Pringle A.K., Trikkas C., Clough C.F., and Church M.K (2002). "A microdialysis method for the recovery of IL-1 β , IL-6 and nerve growth factor from human brain in vivo," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 119, no.1, pp. 45–50
- ⁶⁴ Rossi F. and Bianchini E. (1996). Synergistic induction of nitric oxide by beta-amyloid and cytokines in astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 225, pp. 474–478.
- ⁶⁵ Mrak R.E. and Griffin W.S.T. (2001) Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease," *Neurobiology of Aging*, vol.22, no. 6, pp. 903–908.
- ⁶⁶ Hammacher A., Ward L.D., Weinstock J., Treutlein H., Yasukawa K. and Simpson R.J. (1994) Structure-function analysis of human IL-6: identification of two distinct regions that are important for receptor binding. *Protein Science*, vol. 3, no. 12, pp. 2280–2293.
- ⁶⁷ Raivich G., Bohatschek M., Kloss C.U.A., Werner A., Jones L.L., and Kreutzberg G.W.(1999)Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Research Reviews*, vol. 30, no. 1, pp. 77–105.
- ⁶⁸ Hopkins S.J. and Rothwell N.J. (1995) Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends in Neurosciences*, vol. 18, no. 2, pp. 83–88.
- ⁶⁹ Selmaj K. W., Farooq M., Norton W. T., Raine C. S, and Brosnan C.F. (2006).Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *Journal of Immunology*, vol. 144, no. 1, pp. 129–135.

-
- ⁷⁰ Heyser C. J., Masliah E., Samimi A., Campbell I. L., and Gold L. H. (1997) Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 4, pp. 1500–1505.
- ⁷¹ Castell J. V., Andus T., Kunz D., and Heinrich P. C (1999). Interleukin-6: the major regulator of acute-phase protein synthesis in man and rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 557, pp. 87–101.
- ⁷² Kolls JK, Lindén A (2004). "Interleucina-17 miembros de la familia y la inflamación" *Inmunidad*.21(4):467-76.
- ⁷³ Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ (1995). Human IL-17:a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol.* 155 (12): 5483–6.
- ⁷⁴ Aggarwal S, Gurney AL (2002). IL-17 prototype member of an member of an emerging cytokine family. *J. Leukoc. Biol.* 71 (1): 1–8
- ⁷⁵ Kuby, Janis; Kindt, Thomas J.; Goldsby, Richard A.; Osborne, Barbara A. (2007) *Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes.* Kuby immunology.. San Francisco: WH Freeman. 396 pp.
- ⁷⁶ Miossec P, Korn T, Kuchroo VK (2009). Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. Engl. J. Med.* 361 (9): 888–98
- ⁷⁷ Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006). TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24 (2): 179–89.
- ⁷⁸ McGeer E.G., McGeer P.L. (2003) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog.Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 741–749.
- ⁷⁹ Sofroniew M.V., Vinters H.V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.*119, 7–35.
- ⁸⁰ Halassa M.M., Haydon P.G. (2010) Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 335–355.
- ⁸¹ Blackburn D., Sargsyan S., Monk P.N., Shaw P.J. (2009) Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia* 57, 1251–1264.
- ⁸² McGeer E.G., McGeer P.L.(2003) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog.Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 741–749
- ⁸³ Medeiros R., Figueiredo C.P., Pandolfo P., Duarte F.S., Prediger R.D., Passos G.F., Calixto J.B.(2010) The role of TNF-alpha signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by beta-amyloid peptide. *Behav. Brain Res.* 209, 165–173.
- ⁸⁴ Chami L., Checler F. (2012) BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and β -amyloid production in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* 7:52 2-15

-
- ⁸⁵ Carrero I., Gonzalo M.R., Martin B., Sanz-Anquela J.M., Arevalo-Serrano J., Gonzalo-Ruiz A., (2012) Oligomers of beta-amyloid protein (Abeta1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Exp. Neurol.* 236, 215–227.
- ⁸⁶ Medeiros R., LaFerla F.M. (2013) Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Experimental Neurology* 239: 33–138.
- ⁸⁷ Liu R., Xiao N., Tian K.L., Diao Y.F. (2002) The inflammatory mediators induced endothelial cell injury through delay neutrophils apoptosis *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* 35(3): 211-2.
- ⁸⁸ Diaz A., Limon D., Chávez R., Zenteno E., Guevara J. (2012) A β_{25-35} injection into the temporal cortex induces chronic inflammation that contributes to neurodegeneration and spatial memory impairment in rats. *J Alzheimers Dis.* 30(3):505-22.
- ⁸⁹ Grilli, M., Goffi, F., Memo, M., and Spano, P.P. (1996) Interleukin-1p and glutamate activate the NF- κ B/Rel. *J. Biol. Chem.* 271:15002-15007.
- ⁹⁰ Mina Konigsberg Fainstein (2008) Radicales libres y estrés oxidativo. Editorial Manual Moderno.
- ⁹¹ Manzano-León N. y Jaime Mas-Oliva (2006) Estrés oxidativo, péptido β -amiloide y enfermedad de Alzheimer. *Gac Méd Méx Vol.* 142 No. 3
- ⁹² Austad, S.N.(1997). *Why we age*; John Wiley & Sons:New York, pp.256.
- ⁹³ Pryor W.A.(1976) *Free radicals in Biology.* En Pryor, W.A.(Ed.) New York; Academic press . Vol 1 p. 1-277.
- ⁹⁴ Beckman K.B., Ames B.N.(1998) The free radicals theories of aging matures. *Physiol. Rev.* 547-581.
- ⁹⁵ Lindsay D.G, Astley S.B.(2002) European research on the functional effects of dietary antioxidants- EUROFEDA. *Mol Aspects Med.* 23:1-38.
- ⁹⁶ Chrissobolis S. Faraci F.M. (2008) The role of oxidase stress and NADPH oxidase in cerebrovascular disease. *Trends Mol Med* 14 :495-502.
- ⁹⁷ Quinn M.T., Gauss K.A. (2004) Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* 76:760-781.
- ⁹⁸ Babior B.M. (2004) NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 16:42-47.
- ⁹⁹ Cross A.R., Segal A.W. (2004) The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 1657:1-22.
- ¹⁰⁰ Valls-Bellés V, Muñoz P, González P, González-Sanjósé ML, Beltrán S.(2002) Mechanism of protection by epicatechin against tert-butylhydroperoxide induced oxidative cell injury in isolated rat hepatocytes and calf thymus DNA. *Process Biochem.* 37: 659-667.

-
- ¹⁰¹ Betteridge J (2000). What is de Oxidative Stress?. *Metabolism*. 49 (2) S1: 3-8.
- ¹⁰² Valls-Bellés V, Muñoz P, González P, González-Sanjosé ML, Beltrán S.(2002) Mechanism of protection by epicatechin against tert-butylhydroperoxide induced oxidative cell injury in isolated rat hepatocytes and calf thymus DNA.Process *Biochem*. 37: 659-667.
- ¹⁰³ Betteridge J (2000). What is de Oxidative Stress?. *Metabolism*. 49 (2) S1: 3-8.
- ¹⁰⁴ Octave J.N. (1995) The amyloid peptide precursor in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Belg* 95:197-209.
- ¹⁰⁵ Pike CJ., Burdick D., Walencewicz A.J., Glabe C.G., Cotman C.W. (1993) Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13:1676-1687.
- ¹⁰⁶ Iversen L.L., Mortishire-Smith R.J., Pollack S.J., Shearman M.S.(1995) The toxicity in vitro of β -amyloid protein. *Biochem J* 311:1-16.
- ¹⁰⁷ Walsh D.M., Hartley D.M., Kusumoto Y., Fezoui Y., Condron M.M., Lomakin A.(1999) Amyloid-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* 274:25945-25952.
- ¹⁰⁸ Saavedra L., Mohamed A., Ma V., Posse Kar, de Chaves S (2007) Internalization of beta-amyloid peptide by primary neurons in the absence of apolipoprotein E. *J Biol Chem* 282:35722–35732.
- ¹⁰⁹ Armstrong R.A. (2009) The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 81:328-335.
- ¹¹⁰ Fukumoto H., Tokuda T., Ishigami N.,Hidaka H. (2010) High molecular weight beta amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *FASEB J*. 24:2716-2726.
- ¹¹¹ Tabner B.J., Mayes J., Allsop D. (2010) Hypothesis: soluble a β oligomers in association with redox active metal ions are the optimal generators of reactive oxygen species in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimer Dis* 2011:546380.
- ¹¹² Behl C., Davis J.B., Lesley R., Scubert D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77:817-827.
- ¹¹³ Milton N.G. (2004) Role of hydrogen peroxide in the aetiology of Alzheimer's disease: implications for treatment. *Drugs Aging* 21:81-100.
- ¹¹⁴ Bondy S.C., Guo-Ross S.X., Truong A.T. (1998) Promotion of transition metal-induced reactive oxygen species formation by β -amyloid. *Brain Res*799:91-96.
- ¹¹⁵ Liu S.T., Howlett G., Barrow C.J. (1999) Histidine-13 is a crucial residue in the zinc ion-induced aggregation of the A β peptide of Alzheimer's disease.*Biochemistry* 38:9373-9378.

-
- ¹¹⁶ Manthey P.W., Ghilardi J.R., Rogers S., De Master E., Allen C.J., Stimson E.R., Maggio J.E. (1993) Aluminum, iron and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of β -amyloid peptide. *J Neurochem* 61:1171-1174.
- ¹¹⁷ Bush A.I., Lynch T., Cherny R.C., Atwood C.S., Goldstein L.E., Moir R.D.(1999) Alzheimer A β functions as a superoxide antioxidant in vitro and in vivo. *Soc Neurosci Abstr* 25:14.
- ¹¹⁸ Yatin S.M., Aksenova M., Aksenov M., Butterfield D.A. (1999) Effect of transglutaminase on A β (1-40) fibril formation and neurotoxicity. *Alzheimer's Rep* 2:165-170.
- ¹¹⁹ Atwood C.S., Huang X., Moir R.D., Bacarra N.M., Romano D., Tanzi R.E.(1998) Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem* 273:12821-1286.
- ¹²⁰ Mattson M.P., Mattson E.P. (2002) Amyloid peptide enhances nail rusting: novel insight into mechanisms of aging and Alzheimer's disease. *Aging Res Rev* 1:327-330.
- ¹²¹ Johnstone E.M., Chaney M.O., Norris F.H., Pascual R., Little S.P.(1991) Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. *Brain Res* 10:299-305.
- ¹²² Atwood C.S., Huang X., Moir R.D., Bacarra N.M., Romano D., Tanzi R.E.(1998) Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem* 1998;273:12821-1286.
- ¹²³ Walter J., Grunberg J., Capell A., Pesold B., Schindzielorz A., Citron M. (1997) Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin- 1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5349-5354.
- ¹²⁴ Varadarajan S., Yatin S.M., Aksenova M., Butterfield D.A. (2000) Alzheimer's amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol* 130:184-208.
- ¹²⁵ Butterfield D.A., Varadarajan S., Aksenova M., Link C., Yatin S.M.(1999) On methionine and Alzheimer's amyloid β -peptide (1-42)-induced oxidative stress. *Neurobiol Aging* 1999;20:339-342.
- ¹²⁶ Vogt W. (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins. Tools, targets, and reversal. *Free Rad Biol Med* 18:93-105.
- ¹²⁷ Naslund J., Schierhorn A., Hellman U., Lanfelt L., Roses A.D., Tjernberg L.O.(1994) Relative abundance of Alzheimer A β amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8378-382.
- ¹²⁸ Rensink A.A.M., deWaal M.W., Kremer B., Verbeek M.M. (2003) Pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy. *Brain Research Reviews* 43, 207-223.

-
- ¹²⁹ Rauk A. (2008) Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? Dalton transactions, 1273-1282.
- ¹³⁰ Chen J.X., Yan S.D. (2007) Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction. Journal of Alzheimer's disease 12, 177-184.
- ¹³¹ Gandy S. (2005) The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. J Clin Invest. 115: 1121-1129.
- ¹³² Boots AW, Li H, Schins RP, Duffin R, Heemskerk JW, Bast A, Haenen GR. (2007). The quercetin paradox. Toxicol Appl Pharmacol 222:89-96.
- ¹³³ Boots AW, Li H, Schins RP, Duffin R, Heemskerk JW, Bast A, Haenen GR. (2007). The quercetin paradox. Toxicol Appl Pharmacol 222:89-96.
- ¹³⁴ Gutteridge JMC, Quinlan GJ.(1985) Free radical damage to deoxyribose by anthracycline, aureolic acid and aminoquinone antitumor antibiotics. An essential requirement for iron, semiquinones and hydrogen peroxide. Biochem Pharmacol 34.
- ¹³⁵ Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M.(2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interactions. 160:1-40.
- ¹³⁶ Sohal RS, Weindruch R. (1996) Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. Science 273:59-63.
- ¹³⁷ Chance B, Sies H, Boveris A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organisms. Physiol. Rev. 59:527-605.
- ¹³⁸ Prior RL, Wu X, Schaich K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem 43: 4290 - 4302.
- ¹³⁹ Stéphane Caillet, Stéphane Salmiéri and Monique Lacroix.(2006) Evaluation of free radical scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. Food chemistry. Volume 95, Issue 1, March 2006, Pages 1-8.
- ¹⁴⁰ Cheynier, V.(2005) Polyphenols in food are more complex than often thought. Am Clin Nutr. 81:223S-229S.
- ¹⁴¹ Scalbert A, Manach C., Morand C., Remesy C., Jiménez L., (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit Rev Food Sci Nutr. 45:287-306.
- ¹⁴² Cody V. (1988) Crystal and molecular structures of flavonoids. Prog Clin Biol Res. 280:29-44.
- ¹⁴³ Ahn, J., Grün, L. U. and L. N. Fernando. (2002) Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. Journal of Food Science. Vol. 67, N° 4, 1364-1369.

-
- ¹⁴⁴ Manach C., Mazur A. & Scalbert A. (2005) Polyphenols and prevention of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 16:77-84.
- ¹⁴⁵ Manach C., Mazur A. & Scalbert A. (2005) Polyphenols and prevention of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 16:77-84.
- ¹⁴⁶ Sánchez Moreno, C.; Larrauri, J. y F. Saura-Calixto. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food research international.* Vol. 32 (407-412).
- ¹⁴⁷ Frankel, E.; Waterhouse, A. and P. Teissedre (1995) Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43, 890-894.
- ¹⁴⁸ Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., Jiménez L., (2005) Dietary polyphenols and the prevention of disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 45:287-306.
- ¹⁴⁹ Okushio K, Suzuki M, Matsumoto N, Nanjo F, Hara Y (1999) Identification of (-)-epicatechin metabolites and their metabolic fate in the rat. *Drug Metab Dispos* 27:309-16.
- ¹⁵⁰ Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz Harold H, Kelm Malte. (2006)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavonol-rich cocoa on vascular function in humans. *PNAS*;103(4):1024-1029
- ¹⁵¹ Ding EL, Hutfless SM, Ding X, Girotra S(2006). Chocolate and prevention of cardiovascular disease: A systemic review. *Nut & Metab.*2006;3:1743-7075.
- ¹⁵² Innes AJ, Kennedy G, McLaren M, Bancroft AJ, Belch JJ. (2005) Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers. *Platelets.* 14(5):325-327.
- ¹⁵³ Benito S, Lopez D, Sáiz MP, Buxaderas S, Sánchez J, Puig-Parallada P, Mitjavila MT.(2002) A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *British J Pharm.* 135:910-916.
- ¹⁵⁴ Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Nagai R (2009). Tea polyphenols regulate key mediators on inflammatory cardiovascular diseases. *Mediators of inflammation.* 2009.
- ¹⁵⁵ Yang CS, Lambert JD, Sang S.(2009) Antioxidative and anti carcinogenic activities of tea polyphenols. *Arch Toxicol.* 2009;83(1):11
- ¹⁵⁶ Frémont L.(2000) Biological effects of resveratrol. *Life Sci.*66 (8):663-673.
- ¹⁵⁷ Alarcón de la Lastra C, Villegas I(2007)Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Transact.* 35(5):1156-1160.
- ¹⁵⁸ Alarcón de la Lastra C., Villegas I. (2005) Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Mol Nut.Food Re.* 49;405-430.

-
- ¹⁵⁹ Cucciolla V., Borriello A., Oliva A., Galletti P., Zappia V., Della Ragione F., (2007) Resveratrol: from basic science to the clinic. *Cell Cycle*. 6:20, 2495-2510.
- ¹⁶⁰ Zini R., Morin C., Bertelli A.A. and Tillement J.P. (1999) Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp Clin Res*. 25:87-97.
- ¹⁶¹ Alarcon de la Lastra., Villegas I.(2005) Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Mol. Nutr. Food Res*. 2005;49:405–430
- ¹⁶² Bhat K.P., Kosmeder J.W. and Pezzuto J.M.(2001) Biological effects of resveratrol. *Antiox Redox Signal*. 3:1041-1064.
- ¹⁶³ Das D.K., Maulik N. (2006) Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Molecular Intervention*.6(1):36-47.
- ¹⁶⁴ Chen D, Wang MW (2005) Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*.7:307-317
- ¹⁶⁵ Dai Q, Borenstein AR, Wu Y, Jackson JC, Larson EB. (2006) Am J Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. *Med* 119(9): 751-9
- ¹⁶⁷ Paxino G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- ¹⁶⁸ Lowry O.H., Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem*. 193: 265-275
- ¹⁶⁹ Milne A, Culverwell A, Guss R, Tuppen J, Whelton R. (2008) Screening for dementia in primary care: a review of the use, efficacy and quality of measures. *International Psychogeriatrics* 20:911–926.
- ¹⁷⁰ Cuevas E, Limón D, Pérez-Severiano F, Díaz A, Ortega L, Zenteno E, Guevara J (2009) Antioxidant effects of epicatechin on the hippocampal toxicity caused by amyloid-beta 25-35 in rats. *Eur J Pharmacol* 616, 122-127.
- ¹⁷¹ Butterfield D., Castegna A., Lauderback C and Drake J. (2002) Evidence that amyloid beta-peptide-induced neuronal lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiology of Aging* 23:655-664.
- ¹⁷² McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W. (1999) Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol*, 46(6):860-866.
- ¹⁷³ Bastianetto, S., Krantic, S., Quirion, R., (2008) Polyphenols as potential inhibitors of amyloid aggregation and toxicity: possible significance to Alzheimer's disease. *Min. Rev. Med. Chem*. 8, 429–435.
- ¹⁷⁴ Harkany, T., Abraham, I., Konya, C. (2000), Mechanisms of beta-amyloid neurotoxicity: perspectives of pharmacotherapy. *Rev Neuroscience*, 11(4):329-382.

-
- ¹⁷⁵ Ishige, K., Schubert, D., Sagara, Y. (2001) Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 433–446.
- ¹⁷⁶ Schmidt, G.A., G. Hoffmann, D.T. Shindell, and Y. Hu. (2005) Modelling atmospheric stable water isotopes and the potential for constraining cloud processes and stratosphere-troposphere water exchange. *J. Geophys. Res.*, 110
- ¹⁷⁷ Sies H. (1991) *Oxidative Stress II. Oxidants and Antioxidants*. London: Academic Press.
- ¹⁷⁸ Halliwell B., Gutteridge JM (1985) *Lipid peroxidation, a radical chain reaction in Free Radicals in Biology and Medicine*. London: Clarendon Press.
- ¹⁷⁹ Hermes Lima M.(2004) *Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals* . In: Storey K.B.Ed. *Functional Metabolism: regulation and Adaptation*. Washington:John Wiley & Sons, Inc. 319-368.
- ¹⁸⁰ Cuevas E. (2010) Efecto de la fracción 25-35 del amiloide beta, en el hipocampo de rata: Implicaciones del estrés oxidativo. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Medicina. UNAM.
- ¹⁸¹ Polazzi E., Monti E. (2010) Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications, *Prog. Neurobiol.* 92 : 293–315.
- ¹⁸² Li C., Zhao R., Gao K., Wei Z., Yin M. Y., Lau L.T., Chui D., Hoi Yu A.C. (2011) Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease, *Curr. Alzheimer Res.* 8: 67–80.
- ¹⁸³ Limón D., Díaz A., Mendieta L., Chamorro G., Espinosa B., Zenteno E. and Guevara J. (2009) Amyloid-b25–35 impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats
- ¹⁸⁴ Diaz A, De Jesús L, Mendieta L, Calvillo M, Espinosa B, Zenteno E, Guevara J, Limón ID (2010) The amyloid-beta25-35 injection into the CA1 region of the neonatal rat hippocampus impairs the long-term memory because of an increase of nitric oxide. *Neurosci Lett* 468, 151-155.
- ¹⁸⁵ Diaz A., Limon D., Chávez R., Zenteno E. and Guevara J. (2012) A β ₂₅₋₃₅ Injection into the TemporalCortex Induces Chronic Inflammation that Contributes to Neurodegeneration and Spatial Memory Impairment in Rats. *Journal of Alzheimer's Disease* 30:505–522
- ¹⁸⁶ Heneka MT, O'Banion MK (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 184, 69-91.
- ¹⁸⁷ Miossec P, Korn T, Kuchroo VK (2009) Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 361, 888-898.
- ¹⁸⁸ Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ, Valdivia-Velázquez M, Acosta-Martínez JP, Ortiz GG (2004) Kinetics of the neuroinflammation-oxidative stress correlation in rat brain

following the injection of fibrillar amyloid-beta onto the hippocampus in vivo. *J Neuroimmunol* 150, 20-28.

¹⁸⁹ Norenberg M.D., Rama Rao K.V. and Jayakumar A.R. (2005). Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metabolic Brain Disease*. 20(4), 303-318.

¹⁹⁰ Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.

¹⁹¹ Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C (2002) The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 202, 13-23.

¹⁹² Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.

¹⁹³ Giulian D (1998) A strategy for identifying immunosuppressive therapies for Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12, S7-14.

¹⁹⁴ Mc Geer PL, Schulzer M, McGeer EG (1996) Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: A review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 47, 425-432.

¹⁹⁵ Heneka MT, O'Banion MK (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 184, 69-91.

¹⁹⁶ Rossi F, Bianchini E (1996) Synergistic induction of nitric oxide by beta-amyloid and cytokines in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 474-478.

¹⁹⁷ Heneka MT, O'Banion MK (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 184, 69-91.

¹⁹⁸ Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, Gold R (2005) Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* 237, 123-130.

¹⁹⁹ Ishizu T, Osoegawa M, Mei FJ, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, Minohara M, Murai H, Mihara F, Taniwaki T, Kira J (2005) Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in optospinal multiple sclerosis. *Brain* 128, 988- 1002

²⁰⁰ McGeer PL, McGeer EG (2006) NSAIDs and Alzheimer disease: Epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging* 28, 639-647.

²⁰¹ Spencer, J.P.E. (2008) Flavonoids. *Br. J. Nutr.* 99 :ES60–ES77

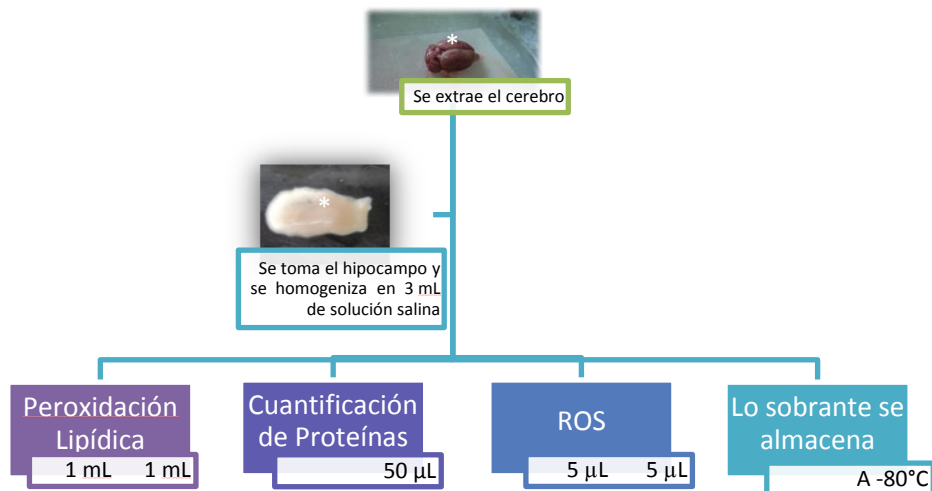
²⁰² Diaz A, Mendieta L, Zenteno E, Guevara J, Limon ID (2011) The role of NOS in the impairment of spatial memory and damaged neurons in rats injected with amyloid beta 25-35 into the temporal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 98, 67-75.

XIV. ANEXOS

Técnica del Ensayo de Peroxidación Lipídica.

1. Las muestras de los tejidos se homogenizan en 3mL de solución salina (7-8 golpes en el sistema de vidrio teflón).

Los 3mL del homogenizado se dividen de la siguiente manera:



2. A las alícuotas de 1mL del homogenizado se les adiciona 4mL de una mezcla cloroformo/metanol (2:1), se cubren de aluminio para no estar expuestos a la luz.
3. Los tubos se agitan vigorosamente durante 10-15 segundos en el vortex.
4. Se conservan en hielo durante 30 minutos para permitir la separación de fases.
5. La fase acuosa sobrenadante se desecha (se aspira la fase cuidadosamente, circundando por las paredes hasta el botón, con cuidado de no aspirar la fase orgánica).
6. Se toman 2mL de la fase clorofórmica, se transfiere a una celda de Cuarzo y a esta se le adiciona 200µL de metanol. (Son 100µL por cada 1mL).

7. La fluorescencia se mide en un espectrofotómetro de luminiscencia LS50β Perkin-Elmer a 370nm de excitación y 430nm de emisión.
8. La sensibilidad de fluorescencia se ajusta a unidades de fluorescencia con un estándar de quinina.

Especies Reactivas de Oxígeno

1. Del homogenizado se toman 10μL y se colocan 2 dos tubos eppendorf (cada uno con 5μL)
2. A cada tubo se le agregan 45μL de Buffer Hepes:Tris (18:1)
3. Posteriormente se procede a preparar la Diclorofluoresceina (DCF) y La Diclorofluoresceina Diacetato (DCF-DA).

DCF

DCF (1)	Se toma 4.0121 mg de DCF y se le agrega 1mL MeOH	Colocar en un tubo eppendorf de 2mL (negro)
DCF (2)	Tomar 50ml Buffer Hepes:Tris (9:1) a este se le quita 500μL y se le agregan 500μL de MeOH. Posteriormente se le quitan 5μL y se le agregan 5μL de DCF(1).	Colocar en un matraz aforado de 50mL.
DCF (3)	Tomar 100μL de DCF(2) y agregarle 900μL del Buffer Hepes:Tris (9:1)	Colocar en un tubo eppendorf de 2mL (negro)

DCF-DA

DCF-DA(1)	Tomar 4.87mg de DCF-DA a este se le agrega 1mL de MeOH.	Colocar en un tubo eppendorf de 2mL (negro)
DCF-DA(2)	Tomar 50μL de DCF-DA(1) y se le adicionan 950μL de MeOH.	Colocar en un tubo eppendorf de 2mL (negro)
DCF-DA(3)	Tomar 300μL de DCF-DA (2) y adicionar 2700μL del buffer Hepes:Tris (18:1)	Colocar en un tubo eppendorf de 2mL (negro)

4. Una vez preparadas las soluciones, se procede a realizar el llenado de la placa de 96 pozos, de la siguiente manera:

Curva estándar

	Buffer (9:1)	DCF (3)	[ng/200µL]
Blanco	198µL	2µL MeOH	0
1	198µL	2µL	0.08
2	195µL	5µL	0.2
3	190µL	10µL	0.4
4	180µL	20µL	0.8
5	160µL	40µL	1.6
6	140µL	60µL	2.4
7	120µL	80µL	3.2
8	100µL	100µL	4
9	80µL	120µL	4.8

Muestras:

145µL del Buffer Hepes:Tris (18:1) + 50µL de DCF-DA (3) + 5µL de la muestra (1:10)

Soluciones:

Buffer Hepes

- 120mM NaCl.....7.0138g.
- 2.5mM KCl.....0.1864.
- 1.2mM NaH₂PO₄.....0.1656.
- 0.1mM MgCl₂.....0.02033 (hidratado)
.....0.00952 (anhidrico)
- 5.0mM NaHCO₃.....0.4200
- 6.0mM Glucosa.....1.0812
- 1.0mM CaCl₂.....0.1110
- 10.0mM Hepes.....2.3830

Disolver en 1litro de agua desionizada.

Buffer Tris

Disolver 4.84g. de Tris base en 1 Litro de agua desionizada y ajustar el pH a 7.4.

Cuantificación del contenido de Proteínas por el método de Lowry et al 1951.

1. Tomar 50µL del homogenizado de la muestra.
2. Diluir el homogenizado en 950µL de agua destilada.
3. Colocar 200µL de la muestra diluida en un tubo de ensayo.
4. Agregar 1mL de la solución C, mezclar y dejar 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Agregar 200µL del reactivo Folin 1:1 (con agua destilada), mezclar y dejar 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Leer las muestras a 550nm

Soluciones

- **Solución C.**

Agregar Na₂CO₃ 2% (2g) en una solución de NaOH 0.1N mas 1mL de una solución de CuSO₄ al 1% mas 1mL de una solución de tartrato de Na⁺/K⁺ al 2%.

- **Folín 1:1** (Folín + agua)

- **NaOH 0.1N**

- **Sulfato de Cobre**

10mL de sulfato de Cobre 1%

Técnica de ELISA para cuantificar citocinas

Primera Etapa: Fijación del antígeno

- 1.- Agregar 100 µL de solución de fijación a cada pozo
- 2.- Agregar 5 µL de la muestra para fijar el antígeno a la placa e incubar por una hora con agitación.
- 3.- Retirar el líquido residual
- 4.-Bloquear la placa con 300 µL de ASB a cada pozo e incubar por 15 minutos con agitación a temperatura ambiente.
- 5.- Retirar el líquido residual

Segunda Etapa: Reacción antígeno- anticuerpo

1. Agregar 100 µL de solución fijadora
2. Agregar 100 µL de anticuerpo primario e incubar por una hora con agitación a temperatura ambiente.
3. Retirar el líquido residual
4. Llenar cada pozo con solución para lavado y agitar durante 5 minutos (3 veces)
5. Añadir 100 µL de anticuerpo secundario e incubar por una hora con agitación a temperatura ambiente
6. Retirar el líquido residual
7. Añadir solución para lavar a cada pozo durante 5 minutos.
8. Retirar el líquido residual
9. Añadir 100microlitros de ABTS (A+B 1:1)
10. Desarrollar el color (azul- verde)
11. Añadir 100 microlitros de solución de paro para la enzima peroxidasa
12. Leer en el lector de micro-placas a 450nm.

Preparación de las soluciones

- Solución coating (1/ 10)
- ASB (1/20)
- Anticuerpo secundario (1/5000)
- Solución de lavado (1/10)