



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

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA EPICATEQUINA Y EL RESVERATROL SOBRE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE  
TÉRMICO EN UN MODELO DE TOXICIDAD INDUCIDO POR LA FRACCIÓN A $\beta$  (25-35)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

**CORTÉS TORRES ESTEPHANIA**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA  
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**MÉXICO, D.F. AGOSTO, 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

**EFFECTO DE LA EPICATEQUINA Y EL RESVERATROL SOBRE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE**  
**TÉRMICO EN UN MODELO DE TOXICIDAD INDUCIDO POR LA FRACCIÓN A $\beta$  (25-35)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

**CORTÉS TORRES ESTEPHANIA**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

**MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2013**

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del 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 **CORTÉS TORRES ESTEPHANIA** con número de cuenta **301217125** con la tesis titulada **"EFECTO DE LA EPICATEQUINA Y EL REVERATROL SOBRE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EN UN MODELO DE TOXICIDAD INDUCIDO POR LA FRACCIÓN A $\beta$  (25-35)"** realizada bajo la dirección de la **DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA:**

Presidente: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA  
Vocal: DRA. LAURA COLÍN BARENQUE  
Secretario: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
Suplente: DRA. FRANCISCA PÉREZ SEVERIANO  
Suplente: DRA. MARÍA BLANCA ESPINOSA MANCILLA

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

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



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

## AGRADECIMIENTOS



*Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por apoyar mi desarrollo y formación para poder obtener el grado académico de Maestra en Ciencias Biológicas.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero brindado para realizar mis estudios en el programa Maestría en Ciencias Biológicas en la Facultad de Medicina. Con número (CVU/Becario): 365627/251626.*

*A mi tutor Principal el Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca, por su asesoramiento y por permitirme trabajar y desarrollar este proyecto en su grupo de investigación.*

*A los **Miembros del Comité Tutor:***

- *Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo*
- *Dr. Luis Felipe Jiménez García*

*Por guiarme y asesorarme durante toda la realización de mi proyecto de Maestría.*

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL



*A los miembros del jurado:*

- *Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia*
- *Dra. Laura Colín Barenque*
- *Dr. Luis Felipe Jiménez García*
- *Dra. Francisca Pérez Severiano*
- *Dra. María Blanca Espinosa Mancilla*

*Por concederme un espacio y tiempo para leer mi trabajo. Gracias por sus comentarios y asesoría.*

*A la Dra. Francisca Pérez Severiano, por permitirme trabajar en colaboración en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Manuel Velasco Suárez.*

*Le agradezco todo su apoyo, orientación y consejos para poder realizar mi maestría.*

*A la M. en C. Minerva E. Calvillo por su apoyo y enseñanza en el área de histología.*

*Al Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Manuel Velasco Suárez y al Bioterio de la Facultad de Medicina. UNAM.*

*Por último un agradecimiento especial a Nallely Cervantes Piza, mi amiga de la carrera y compañera de trabajo. Gracias por la amistad y apoyo que me has brindado durante toda la maestría, así como en todos los demás proyectos que hemos realizado juntas...Espero vengan más.*

## DEDICATORIA



***E**sta tesis se la dedico con mucho cariño a mi mamá y hermanos.*

*Gracias por todo su cariño y apoyo en este y  
todos los proyecto de mi vida.*

# ÍNDICE

	PÁG.
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>ABREVIATURAS</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER</b>	
1.1 Marco Histórico.....	7
1.2 Definición y Clasificación.....	7
1.3 Neuropatología.....	8
<b>2. MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS</b>	
2.1 Marañas Neurofibrilares.....	10
2.2 Placas Neuríticas.....	11
2.3 Proteína Precursora Amiloidea (PPA).....	11
2.3.1 Vía no Amiloidogénica.....	12
2.3.2 Vía Amiloidogénica.....	12
<b>3. PÉPTIDO AMILOIDE <math>\beta</math></b>	
3.1 Dominio Neurotóxico A $\beta$ (25-35).....	15
3.2 Mecanismos Neurotóxicos del A $\beta$ .....	16
3.2.1 Procesos Inflamatorios.....	16
3.2.2 Alteraciones en el Metabolismo del Calcio.....	18
<b>4. ESTRÉS OXIDANTE</b>	
4.1 Peroxidación Lipídica.....	19
4.2 Estrés Oxidante y EA.....	22

	PÁG.
<b>5. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO</b>	
5.1 Regulación de la expresión de las HSPs.....	26
5.2 Activación del HSF1.....	27
5.3 Clasificación y estructura de las HSP.....	28
5.3.1 Proteína de choque térmico 60 (HSP60).....	29
5.3.2 Proteína de choque térmico 70 (HSP70).....	30
5.3.3 Proteína de choque térmico 90 (HSP90).....	30
5.3.4 Proteína de choque térmico 27 (HSP27).....	31
<b>6. GLICOSILACIÓN</b>	
6.1 Lectinas.....	34
6.2 Glicosilación y EA.....	35
<b>7. FLAVONOIDES</b>	
7.1 Actividad Antioxidante.....	38
7.2 Metabolismo de los Flavonoides.....	38
7.3 Antioxidantes y EA.....	39
7.3.1 Epicatequina.....	40
7.3.2 Resveratrol.....	41
<b>8. HIPÓTESIS.....</b>	<b>43</b>
<b>9. OBJETIVOS</b>	
9.1 Objetivo General.....	43
9.2 Objetivos Particulares.....	43
<b>10. MATERIA Y MÉTODOS</b>	
10.1 Grupo Experimental.....	43
10.2 Administración de Antioxidantes (epicatequina y resveratrol).....	44
10.3 Preparación de la Fracción A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> .....	44
10.4 Cirugía Estereotáxica.....	45
10.4.1 Esquema General Cirugía Estereotáxica.....	45
10.5 Medición de Peroxidación Lipídica.....	46
10.6 Medición de la formación EROs.....	46

10.7 Inmunohistoquímica.....	47
10.8 Histoquímica para Lectinas.....	47
10.9 Microscopía de Fluorescencia.....	47
10.10 Análisis Estadístico.....	48
<b>11. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>49</b>
<b>12. RESULTADOS</b>	
12.1 Cuantificación de la Peroxidación Lipídica.....	50
12.2 Concentración de EROs.....	52
12.3 Inmunofluorescencia HSP60.....	54
12.4 Inmunofluorescencia HSP70.....	58
12.5 Inmunofluorescencia HSP90.....	62
12.6 Inmunofluorescencia HSP27.....	65
12.7 Histoquímica ALL.....	68
12.8 Histoquímica MRL.....	71
<b>13. DISCUSIÓN</b>	
13.1 Fracción A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> y Estrés Oxidante.....	74
13.2 HSP y Estrés Oxidante.....	77
13.3 Glicosilación y A $\beta$ .....	80
13.4 Epicatequina y Resveratrol.....	82
<b>14. CONCLUSIONES.....</b>	<b>85</b>
<b>15. RECAPITULACIÓN.....</b>	<b>86</b>
<b>16. ANEXOS (TÉCNICAS)</b>	
16.1 Técnica Peroxidación lipídica.....	93
16.2 Técnica ROS.....	94
16.3 Técnica Inmunohistoquímica para microscopía de fluorescencia. Proteínas de Choque Térmico.....	95
16.4 Técnica Histoquímica para microscopía de fluorescencia. Lectinas ALL ( <i>Amaranthus leucocarpus</i> ) y MRL ( <i>Macrobrachium rosebergii</i> ).....	97

17. REFERENCIAS.....98

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo. Sus marcadores histopatológicos son las marañas neurofibrilares y las placas neuríticas. El principal componente de estas placas es el péptido amiloide  $\beta$ . Su dominio neurotóxico, la fracción  $A\beta_{(25-35)}$ , ejerce daño a través del mecanismo de estrés oxidante. En este trabajo se evaluó el efecto antioxidante de la epicatequina y el resveratrol (30mg/kg) en ratas inyectadas con la fracción  $A\beta_{(25-35)}$  (100 $\mu$ M), en el hipocampo. Se determinó niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs), peroxidación lipídica. Adicionalmente se hizo detección inmunohistoquímica de proteínas de choque térmico (HSP) y de las lectinas *ALL* y *MrL*. Los animales inyectados con la fracción  $A\beta_{(25-35)}$  incrementan los niveles de EROs, peroxidación lipídica, aumento en la inmunoreactividad contra HSP y modificaciones en los patrones de glicosilación. El pretratamiento con epicatequina y resveratrol disminuye significativamente la peroxidación lipídica, las especies reactivas de oxígeno y la inmunoreactividad de las HSP. Los resultados demuestran que la administración de la epicatequina y el resveratrol evitan el daño producido por la fracción  $A\beta_{(25-35)}$ .

## ABSTRACT

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disruption. Its histopathological hallmarks are neurofibrillary tangles (NFTs) and neuritic plaques (NPs). The main component of these plaques is beta amyloid peptide ( $A\beta$ ). Its neurotoxic domain, the fraction (25-35), exerts damage through oxidative stress mechanism. This research evaluated the antioxidant effect of epicatechin and resveratrol (30mg/kg) in rats injected in the hippocampus with the fraction  $A\beta_{(25-35)}$  (100 $\mu$ M/ $\mu$ L). The study examined reactive oxygen species and lipid peroxidation levels. In addition we made immunohistochemical detection of heat shock protein (HSP) and *ALL*, *MrL* lectins. In animal injected with the fraction  $A\beta_{(25-35)}$ , there was an increase in lipid peroxidation, reactive oxygen species, immunoreactivity against HSP and modifications of glycosylation patterns. Pretreatment with epicatechin and resveratrol produced a significant decrease in LP, ROS and HSP immunoreactivity. These results showed that administration of epicatechin and resveratrol prevents damage induced by the fraction  $A\beta_{(25-35)}$ .

---

## ABREVIATURAS

---

**A $\beta$**  amiloide  $\beta$

**AD** dominio de activación (inglés: activation domain)

**AGE** productos de glicación avanzada (inglés: advanced glycation endproducts)

**AICD** dominio intracelular de la PPA (inglés: APP intracelular domain)

**ALL** lectina *Amaranthus Leucocarpus*

**APoE** apolipoproteína E

**CA** cuerno de Amón

**CTF** fragmento carboxilo terminal (inglés: carboxy-terminal fragment)

**CTR** región carboxilo terminal (inglés: C-terminal region)

**DAPI** diclorhidrato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol

**DBD** dominio de unión al ADN (inglés: DNA-binding domain)

**DCF** diclorofluoresceína

**DCF-DA** diclorofluoresceína diacetato

**EA** enfermedad de Alzheimer

**ERNs** especies reactivas de nitrógeno

**EROs** especies reactivas de oxígeno (inglés ROS: reactive oxygen species)

**FHAs** filamentos helicoidales apareados

**GFAP** proteína fibrilar glial ácida (Inglés: glial-fibrilar acid protein)

**GSH-Px** glutatión peroxidasa

**GST** glutatión transferasa

**HIP** proteína de interacción-HSP70 (inglés: HSP70-interacting protein)

**HOP** proteína de organización HSP70-HSP90 (inglés: HSP70-HSP90 organizing protein)

**HSE** elemento de choque térmico (inglés: heat shock element)

**HSF** factor de choque térmico (inglés: heat shock factor)

**HSP** proteínas de choque térmico (inglés: heat shock protein)

**IL** interleucina

**LDL** (inglés: related receptor protein)

**MAPs** proteínas asociadas a microtúbulos

**MDA** malondialdehído

**MrL** lectina *Macrobrachium Rosenbergii*

**NBD** dominio de unión del nucleótido (inglés: nucleotide binding domain)

**NFT** marañas neurofibrilares (inglés: neurofibrillary tangles)

**NO** óxido nítrico (inglés: nitric oxide)

**NOS** óxido nítrico sintasa (inglés: nitric oxide synthase)

**PPA** proteína precursora amiloide (inglés APP: amyloid precursor protein)

**PL** peroxidación lipídica

**PNS** placas neuríticas seniles

**PSEN** presenilina

**PUFA** ácido graso poliinsaturado (inglés: polyunsaturated fatty acids)

**RAGE** (inglés: receptor for advanced glycation endproducts)

**RD** dominio de regulación (inglés: regulatory domain)

**RO·** radical alcoxilo

**ROO·** radical peroxilo

**SBD** dominio de unión al sustrato (inglés: substrate binding domain)

**SOD** superóxido dismutasa

**TNF- $\alpha$**  factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**4-HNE** 4 hidroxinonenal

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que se relaciona con el envejecimiento y se caracteriza por la pérdida de la memoria, deterioro intelectual y trastorno de la personalidad y del comportamiento. Estos síntomas se deben a la alteración estructural y bioquímica de las áreas o centros cognitivos: el hipocampo, el lóbulo temporal, áreas de corteza frontal y parietal (Zhiyou *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2007).

La EA se caracteriza por la presencia de 2 marcadores histopatológicos: las **placas neuríticas** que consisten en grupos de neuronas distróficas que rodean un núcleo de proteína amiloide, dicho péptido proviene de un fragmento proteico de mayor tamaño, denominado proteína precursora de amiloide (PPA) y las **marañas neurofibrilares**, que se producen cuando la proteína Tau es hiperfosforilada, lo que desestabiliza a los microtúbulos favoreciendo la agregación de la proteína y alterando el transporte intracelular (Limón *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2009). Adicionalmente se propone que uno de los mecanismos neurotóxicos de estos marcadores es la presencia del estrés oxidante.

El estrés oxidante es un proceso fisiopatológico que se caracteriza por un desbalance entre las especies reactivas y los sistemas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc.). En la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer el estrés oxidante participa activamente en el desarrollo de la enfermedad, ya que desencadena daño y muerte celular (peroxidación de lípidos y proteínas de la membrana, alteración de canales iónicos, aumento en la liberación de calcio, producción de óxido nítrico, etc.) generando un proceso neurodegenerativo (Rivas *et al.*, 2001).

A nivel celular, se ha comprobado que un mecanismo de supervivencia es la expresión de proteínas de choque térmico (HSP) (Luo *et al.*, 2010). Las proteínas de choque térmico son chaperonas que participan en el ensamble, transporte y degradación de proteínas tanto en condiciones normales, como en condiciones de

estrés: radiaciones, diversas drogas, infecciones virales, etc. Un evento importante en el sistema nervioso es la glicosilación de proteínas y lípidos (Stetler *et al.*, 2010).

Algunos grupos han demostrado que existen alteraciones en la glicosilación de las proteínas y se propone que las HSP pueden ser reguladas positivamente en esta enfermedad, ya que están involucradas en la formación y agregación de proteínas. (Vidyasagar *et al.*, 2012; Di Domenico *et al.*, 2010).

Nuestro grupo de trabajo ha propuesto a las lectinas (proteínas que reconocen modificaciones en la glicosilación) como herramientas para identificar estructuras sacarídicas como marcadores de la EA. (Espinosa *et al.*, 2003; Guevara *et al.*, 1998).

Las alteraciones en la glicosilación y el estrés oxidante, producen defectos en el metabolismo oxidativo y la compensación de las enzimas antioxidantes (Cascales *et al.*, 2009). Se ha propuesto el uso de los flavonoides para la prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Haque *et al.*, 2008; Cuevas *et al.*, 2009). Cuevas y colaboradores han evaluado el efecto antioxidante de la epicatequina sobre el efecto neurotóxico de la fracción  $A\beta_{(25-35)}$ , así como el efecto neuroprotector de la  $\alpha$ -asarona que permite bloquear el incremento de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Limón *et al.*, 2009). Otro compuesto polifenólico que ha sido examinado es el resveratrol.

Este trabajo se enfocó en analizar el efecto de los antioxidantes epicatequina y resveratrol sobre la expresión de las HSP y la glicosilación de proteínas en un modelo de toxicidad inducido por la fracción  $A\beta_{(25-35)}$ .

# 1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

## 1.1 Marco Histórico

En el año de 1907, el médico alemán Alois Alzheimer describió por primera vez la neuropatología de esta enfermedad. Él realizó un cuadro clínico de su paciente Auguste D., una mujer de 51 años que presentaba un deterioro cognitivo y de comportamiento. Alois Alzheimer examinó el cerebro de esta paciente (*post mortem*) identificando placas neuríticas seniles (PNS), marañas neurofibrilares (NFT), atrofia del cerebro y la corteza cerebral, así como pérdida neuronal (O'Brien *et al.*, 2011; Troncoso *et al.*, 2006).

Para el año de 1910, el alumno de Alois Alzheimer, Emil Kraepelin (identificó los síntomas de la enfermedad) acuñó el nombre de esta enfermedad en honor a su maestro.

## 1.2 Definición y Clasificación

La enfermedad de Alzheimer (EA) se define como un desorden neurodegenerativo del sistema nervioso central que se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria, así como la disminución de las funciones cognoscitivas (Zhiyou *et al.*, 2011).

La EA es considerada la forma más común de demencia en adultos mayores. De acuerdo a la edad de aparición de los síntomas, la enfermedad se clasifica en (Sánchez *et al.*, 2007; Guimerà *et al.*, 2002):

- **EA presenil o de inicio temprano:** los síntomas aparecen antes de los 65 años. Constituye el 5 al 10% de los casos. Por lo general este grupo es del tipo familiar (factor genético).
- **EA senil o de aparición tardía:** los síntomas aparecen después de los 65 años, es considerada del tipo esporádico. Representa el 90 al 95% de los casos.

En la EA de tipo familiar o de inicio temprano se han logrado identificar tres genes autosómicos dominantes: el gen de la proteína precursora amiloide (*PPA*), que está localizada en el cromosoma 21, el gen de la presenilina 1 (*PSEN1*), ubicado en el cromosoma 14 y el gen de la presenilina 2 (*PSEN2*), ubicado en el cromosoma 1 (Bernhardi, 2005). Un cuarto gen se ha identificado como factor de riesgo para el desarrollo de la EA de tipo esporádica, es el gen que codifica para la apolipoproteína E (*ApoE*). Este gen se ubica en el cromosoma 19 y es reconocido por su participación en el metabolismo de lípidos y el transporte del amiloide  $\beta$ . Actualmente se le atribuye un papel en funciones sinápticas, así como molécula de señalización intracelular (Schellenberg & Montine, 2012).

El ApoE tiene tres isoformas (ApoE2, ApoE3 y ApoE4) que tienen afinidad por el amiloide  $\beta$ , sin embargo, la isoforma ApoE4 incrementa los depósitos de amiloide  $\beta$  intracelular. Asimismo es considerado como el principal factor de riesgo en la EA esporádica (Viana *et al.*, 2012).

El gen *SORL1* también se propone como factor de riesgo, ya que participa en el transporte de vesículas de la superficie celular al retículo endoplasmático y al aparato de Golgi, una vía importante en el procesamiento de la PPA y la generación del amiloide  $\beta$  (Schellenberg & Montine, 2012).

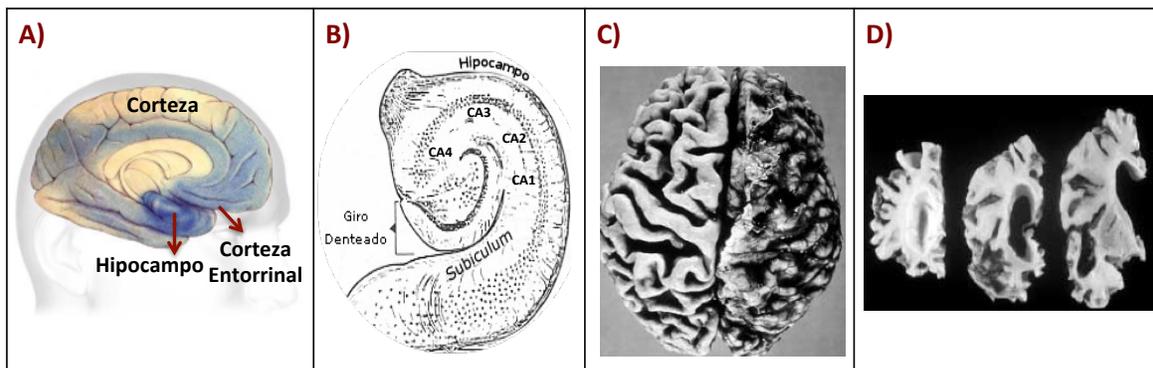
### **1.3 Neuropatología**

El cuadro clínico que presentan los individuos que padecen este desorden neurodegenerativo se caracteriza por la pérdida de la memoria (deterioro en la memoria inmediata, verbal, visual y episódica), desorientación en tiempo y espacio y deterioro cognoscitivo progresivo (Romano *et al.*, 2007; Pasantes *et al.*, 1999).

Los cambios estructurales en pacientes con EA están tipificados en atrofia cortical y subcortical, disminución del espesor de las circunvoluciones, aumento en la profundidad de los surcos y dilatación del sistema ventricular. Lo anterior se

manifiesta en la disminución del peso y volumen cerebral (Fig. 1 panel C y D) (Guimerà *et al.*, 2002).

Estos cambios estructurales afectan con mayor severidad a la corteza entorrinal, el hipocampo (en particular la región de CA1) y el subiculum (Fig. 1 panel A y B). También se ve afectada la amígdala y áreas de asociación neocorticales (Guimerà *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Panel A y B) áreas del cerebro que son afectadas en la EA. Panel C) Cerebro de paciente con EA. El hemisferio izquierdo se presenta sin aracnoides, obsérvese la atrofia cerebral y el aumento de la profundidad de los surcos. Panel D) Cortes coronales en los que se observa dilatación de las cavidades ventriculares (Tomado de Guimerà *et al.*, 2002).

A nivel microscópico los cambios que se describen son: pérdida de poblaciones neuronales en hipocampo y corteza cerebral. Se estima que hay una pérdida del 40% de neuronas piramidales en la corteza y un 68% de neuronas en la región CA1 del hipocampo (Esiri, 2007). Se presenta pérdida de sinapsis y reducción en la actividad colinérgica. Asimismo hay alteraciones pseudo-espongiformes (tejido con aspecto de esponja), presencia de cuerpos de Hirano (inclusiones citoplasmáticas formadas principalmente por filamentos de actina) e hilos del neurópilo (estructuras filamentosas dispersas en el neurópilo) y aumento de células de la microglía. También se presentan los 2 marcadores clásicos de la EA, placas neuríticas y las marañas neurofibrilares (Blennow *et al.*, 2006).

## 2. MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS

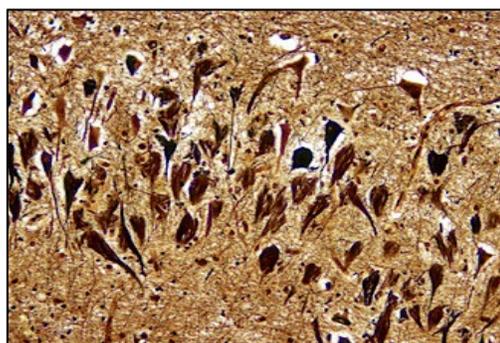
### 2.1 Marañas Neurofibrilares

Las marañas neurofibrilares son depósitos celulares que están constituidos por filamentos helicoidales apareados (FHAs), que se pueden encontrar de manera intracelular y extracelular (cuando la neurona muere). Estas marañas están formadas por un componente no protéico (glucosaminoglicanos) y otro protéico, cuyo elemento principal es la proteína Tau (Agamanolis, 2012).

La proteína Tau es una proteína neural que forma parte de la familia de las MAPs (proteínas asociadas a microtúbulos). El gen de esta proteína se ubica en el cromosoma 17 y el procesamiento alternativo de su RNAm produce 6 isoformas distintas (Skrabana *et al.*, 2006).

Tau se localiza predominantemente en el axón de la neurona, en menor grado en los cuerpos celulares y rara vez en dendritas. Sólo en condiciones patológicas se encuentra en células de la glía (Quadros *et al.*, 2007). Su principal función es regular el ensamble de los microtúbulos, así como dotarlos de estabilidad; esto permite el adecuado funcionamiento del transporte axoplásmico y el contacto entre las neuronas (Mena *et al.*).

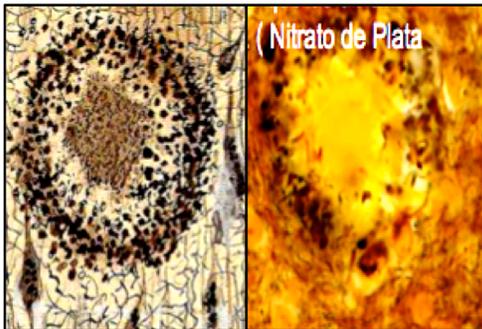
En la EA la proteína Tau se hiperfosforila y se agrega consigo misma, lo que ocasiona una disminución en su capacidad para unirse a los microtúbulos y promover su ensamble. Esto aumenta su resistencia a la proteólisis, favoreciendo la agregación de filamentos helicoidales, resultando en la formación de la maraña neurofibrilar (Fig. 2) (Mandelkow & Mandelkow, 2012).



**Figura 2.** Maraña neurofibrilar en el hipocampo. Tinción de Bielschowski (Tomado de Agamanolis, 2012).

## 2.2 Placas Neuríticas

Las placas neuríticas son estructuras complejas que están constituidas por depósitos extracelulares insolubles, cuyo principal componente es el amiloide  $\beta$  (forma su núcleo). Asimismo, la placa neurítica contiene proteína Tau, ubiquitina,  $\alpha$ 1-antiquimotripsina, ApoE, presenilina 1 y 2, enzimas como la acetilcolinesterasa y una proteína denominada componente no amiloide (Sánchez *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Placa neurítica clásica en la corteza cerebral. Técnica Nitrato de plata reducido. Tomado de S. Ramón y Cajal 1918.

De acuerdo a su asociación con otros elementos neuronales las placas son clasificadas como difusas o clásicas. Una placa difusa se forma de agregados amorfos de amiloide  $\beta$  que no están asociados con neuronas distróficas o neuritas anormales. Mientras que una placa clásica se conforma de agregados fibrilares del amiloide  $\beta$  rodeados con neuritas distróficas, astrocitos y microglía (Fig. 3). El diámetro de estas placas es variable, pueden llegar a medir de 5-200  $\mu$ m (Cascales *et al.*, 2009).

El componente amiloide de las placas está formado por filamentos extracelulares de 7 a 10 nm, lo que se conoce como fibrillas amiloideas. El núcleo de las placas se forma con el  $A\beta$  (1-42), donde se van agregando los depósitos de  $A\beta$  (1-40) (O'Brien *et al.*, 2011). Estos fragmentos se derivan del procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide.

## 2.3 Proteína Precursora Amiloide (PPA)

La proteína precursora amiloide (PPA) es una glicoproteína transmembranal de tipo I, de aproximadamente 695 a 770 aminoácidos, que se localiza en el

cromosoma 21 (Viana *et al.*, 2012). Existen tres isoformas de esta glicoproteína: PPA<sub>770</sub>, PPA<sub>751</sub> y PPA<sub>695</sub>. Las dos primeras se expresan tanto en neuronas como en células no neuronales, mientras que la última es la isoforma predominante en las neuronas y en el sistema nervioso central. A nivel celular la PPA se expresa en membrana plasmática, en el retículo endoplásmico, en el aparato de Golgi y en los endosomas (Manzano & Mas, 2006).

Se ha especulado sobre las funciones que desempeña la PPA. Existe evidencia de su participación en la adhesión celular, ya que interactúa con varios componentes de matriz como la heparina, el colágeno tipo I y la laminina. Por otro lado, puede participar como factor neurotrófico en las neuronas y las sinapsis; experimentos *in vitro* demuestran que una delección o reducción de la PPA, reduce la viabilidad neuronal y disminuye la actividad sináptica. También interviene en funciones de neuroprotección, ya que la PPA evita la degeneración dendrítica y la muerte neuronal producida por estrés proteosomal (Müller & Zheng, 2012; Zhou *et al.*, 2011).

La PPA es hidrolizada por tres enzimas la  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -secretasa. El procesamiento de la PPA se puede llevar a cabo por 2 vías, una no amiloidogénica y otra que si lo es.

### **2.3.1 Vía no Amiloidogénica**

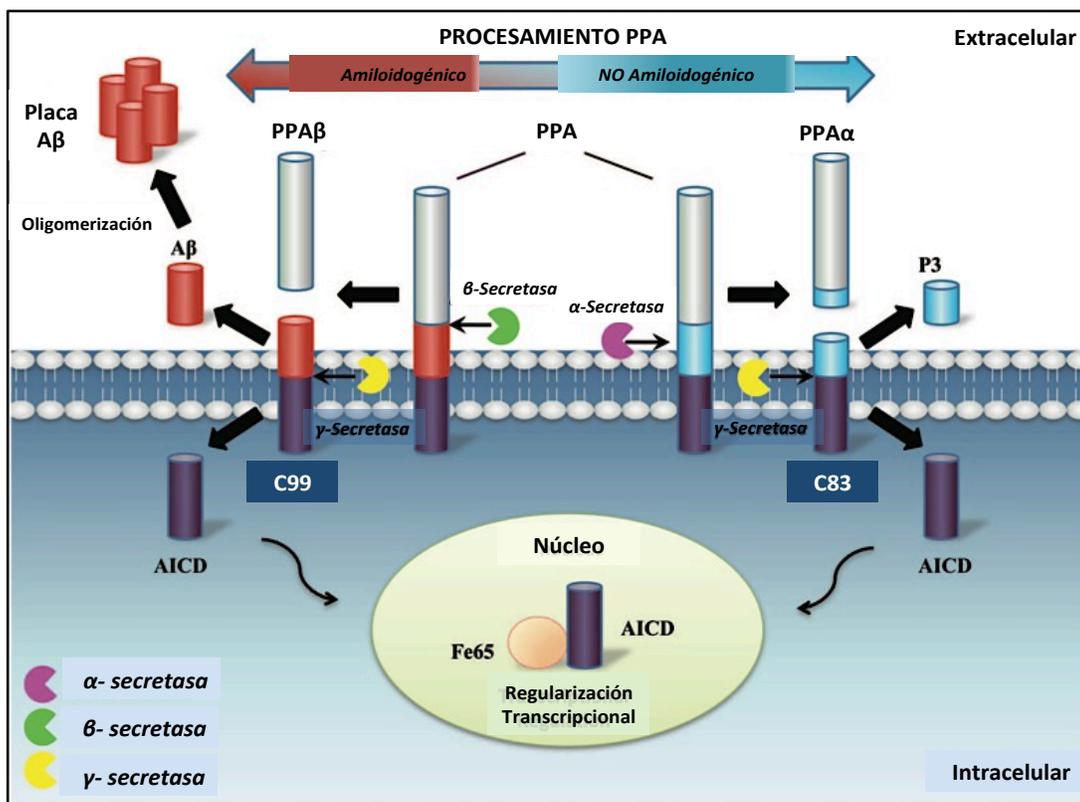
La PPA es hidrolizada por la  $\alpha$  secretasa, provocando la ruptura de la porción extracelular de la molécula, lo que genera un fragmento denominado  $\alpha$ -soluble de la PPA ( $\alpha$ PPA), que es secretado al espacio extracelular. Se queda un fragmento carboxilo terminal (C83) en la membrana que es hidrolizado por la  $\gamma$ -secretasa, dando lugar al fragmento A $\beta$  (17-42) o P3 (fragmento de 3kDa) y al dominio intracelular de la PPA (AICD) (Fig. 4) (O'Brien & Wong, 2011; Zhou *et al.*, 2011).

### **2.3.2 Vía Amiloidogénica**

En este caso la PPA es hidrolizada por la  $\beta$ -secretasa, realiza un corte en el extremo N-terminal, lo que da lugar a la porción  $\beta$ -soluble de la PPA ( $\beta$ PPA). De igual forma que en la vía no amiloidogénica, se queda una porción en la

membrana que corresponde al carboxilo terminal C99, este fragmento también es hidrolizado por la  $\gamma$ -secretasa originando el fragmento A $\beta$  (40-42) (que puede oligomerizarse y formar las fibras amiloideas) y al dominio intracelular de la PPA (Fig. 4) (O'Brien & Wong, 2011; Zhou *et al.*, 2011).

En ambos caso el AICD es liberado al citosol, donde puede actuar como regulador transcripcional, por ejemplo el  $\alpha$ PPA podría promover la neurogénesis y la supervivencia celular (Zhou *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Metabolismo de la PPA. Se muestra la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica. (Tomado de Zhou *et al.*, 2011).

Se ha comprobado que individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer, tienen altos niveles de  $\beta$ -secretasa, lo que promueve la formación del péptido amiloide (Zhou *et al.*, 2011).

### 3. PÉPTIDO AMILOIDE $\beta$

El péptido amiloide  $\beta$  es una proteína hidrofóbica de 4.3 kDa, está formado por una secuencia de 39 a 43 aminoácidos. Este péptido es secretado en neuronas y células no neuronales, como las de la piel y el intestino. En concentraciones bajas circula en el líquido cerebrospinal, plasma y sangre (Tillement *et al.*, 2011).

Al igual que la PPA, se especula mucho sobre el papel fisiológico que desempeña en el organismo. Diversos estudios muestran que el A $\beta$  promueve la proliferación y adhesión celular (Tillement *et al.*, 2011). Por otro lado, los depósitos de A $\beta$  pueden atrapar iones metálicos evitando la formación de radicales libres. En concentraciones bajas protege a las neuronas del daño oxidante (Manzano & Mas, 2006).

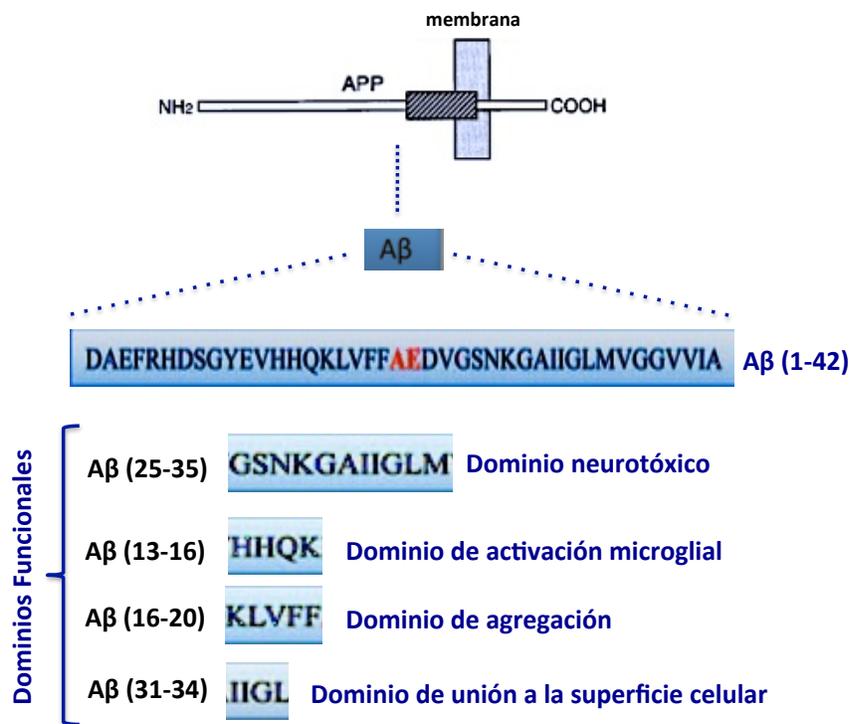
El A $\beta$  se metaboliza normalmente en el cerebro, reconoce a los receptores LDL (related receptor protein) y a los receptores RAGE (receptor for advanced glycation endproducts). Por medio de estos receptores es transportado a través de la barrera hematoencefálica. En algunos casos esta interacción le permite al A $\beta$  poder internalizarse y acumularse dentro de las neuronas. En los cerebros de pacientes con EA, estos receptores se encuentran alterados, lo que resulta en la acumulación y agregación del péptido (Tillement *et al.*, 2011).

El A $\beta$  es secretado de manera monomérica ( $\alpha$  soluble), sin embargo, en condiciones patológicas estos monómeros adquieren la estructura  $\beta$ -plegada, que forma oligómeros que interaccionan entre sí, formando protofibrillas denominadas fibras amiloideas (polímero insoluble) que se agrupan para constituir parte de la placa neurítica (Rosenblum, 2002).

Como ya se había mencionado, las placas neuríticas están integradas por el péptido A $\beta$  (1-42) y el péptido (1-40). El primer fragmento es menos soluble y tiene mayor capacidad de agregación, se ha reportado que este fragmento se deposita

inicialmente funcionando como núcleo, posteriormente el fragmento 1-40 se agrega formando la placa neurítica (Catricala *et al.*, 2012).

Los estudios de la estructura primaria del péptido A $\beta$  (1-42) han determinado la presencia de dominios funcionales entre los que destacan: el dominio de agregación A $\beta$  (16-20) cuya secuencia de aminoácidos es *KLVFF*; el dominio de activación microglial A $\beta$  (13-16), secuencia de aa *HHQK*; el A $\beta$  (31-34) que es el dominio de unión a la superficie celular, su secuencia de aminoácidos es *IIGL* y el dominio neurotóxico, el A $\beta$  (25-35) (Fig. 5) (Yamada & Nabeshima, 2000).



**Figura 5.** Secuencia del péptido A $\beta$  (1-42). Se muestran los dominios funcionales del péptido A $\beta$  (Imagen modificada de Zhou *et al.*, 2011; Yamada & Nabeshima, 2000).

### 3.1 Dominio Neurotóxico A $\beta$ (25-35)

El dominio neurotóxico del péptido amiloide  $\beta$  pesa 160 kDa, está conformado por 11 aminoácidos, su secuencia es *GSNKGAIIGLM*. Este fragmento tiene la capacidad de agregarse y de ser tóxico de manera inmediata (Zhao *et al.*, 2012).

La metionina en la posición 35 del péptido A $\beta$  25-35 se ubica en la región C-terminal, es una posición importante ya que este residuo se vincula con la formación de fibrillas y generación de estrés oxidante. Se sabe que la metionina es el residuo más susceptible a la oxidación mediada por estrés. En experimentos en los que se ha sustituido este aminoácido en la fracción A $\beta$  25-35, no se produce toxicidad, ni oxidación de proteínas en neuronas del hipocampo en ratas (Manzano & Mas, 2006; Zhao *et al.*, 2012).

Nuestro grupo ha demostrado que la inyección intrahipocampal de la fracción A $\beta$  (25-35) en ratas wistar, aumenta la formación de EROs, genera peroxidación lipídica e induce alteraciones en la memoria espacial (Cuevas *et al.*, 2009). También se ha reportado incremento en los niveles de óxido nítrico en corteza temporal e hipocampo (Limón *et al.*, 2009). Otra evidencia del daño neuronal es el aumento en la inmunoreactividad por la 3-nitrotirosina y la proteína fibrilar glial acídica (GFAP) y daño en la citoarquitectura del hipocampo y corteza (Díaz *et al.*, 2010).

En resumen, el péptido amiloide  $\beta$  tiene la capacidad de producir efectos adversos, los tres mecanismos neurotóxicos propuestos son: procesos inflamatorios, estrés oxidante y alteraciones en el metabolismo del calcio.

## **3.2 Mecanismos Neurotóxicos del A $\beta$**

### **3.2.1 Proceso Inflamatorio**

El cerebro está dotado de un sistema inmune que se encarga de modular la homeostasis y metabolismo celular, la función y plasticidad sináptica y la transmisión sináptica (Bernhardi, 2007). En respuesta a daño neuronal, se induce una rápida proliferación de glía y microglía reactiva, con la finalidad de restablecer la integridad del organismo. Por lo tanto, un blanco importante del péptido amiloide  $\beta$  es el sistema inmune. Esta teoría establece que los agregados de A $\beta$  promueven un daño persistente que causa una reacción inflamatoria crónica en el cerebro, que puede ocasionar muerte neuronal (Bharathi *et al.*, 2006).

En la EA, la inflamación está involucrada como mecanismo patológico, se propone que en estadios tempranos la inflamación juega un papel neuroprotector. Sin embargo, una respuesta inflamatoria crónica estimula la activación de moléculas pro-inflamatorias como la interleucina-  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), interleucina- $1\alpha$  (IL- $1\alpha$ ), la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). En la EA hay un incremento de estas citocinas, así como de mediadores inflamatorios como la prostaglandina E2, el óxido nítrico (formador de ERNs) y el factor estimulante de macrófagos, entre otros. Por el contrario, se ha reportado una disminución en la activación de moléculas antiinflamatorias como la interleucina 10 (IL-10), la interleucina 4 (IL-4) y la interleucina 13 (IL-13) (Tripathy *et al.*, 2007; Azizi & Mirshafiey, 2012).

Dentro de las moléculas pro-inflamatorias, la IL-1 juega un papel predominante como modulador de daño en la EA, esta interleucina (vía estrés oxidante) sobreexpresa la APP generando más péptido amiloide (Zhiyou *et al.*, 2011).

Es importante destacar que las placas neuríticas promueven una reacción inflamatoria alrededor de los depósitos de amiloide  $\beta$ . La glía que rodea las placas secreta moléculas pro-inflamatorias, además se sabe que tanto los astrocitos como la microglia pueden producir APP (Glass *et al.*, 2010).

En un proceso inflamatorio se producen el óxido nítrico y las EROs que pueden inhibir la respiración mitocondrial en las neuronas, liberando glutamato y estimulando a los receptores NMDA, lo que dispara la entrada masiva de calcio a las neuronas (Dorado *et al.*, 2003).

### 3.2.2 Alteraciones en el Metabolismo del Calcio

Las concentraciones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en las células son reguladas por transportadores específicos en las mitocondrias y el retículo endoplasmático.

En el sistema nervioso este ión participa en la transmisión y plasticidad sináptica, en la activación de neurotransmisores y en la supervivencia celular. Se ha comprobado que el amiloide  $\beta$  causa alteraciones en la homeostasis del calcio. El aumento de este ión activa a la sintasa del óxido nítrico (NOs) que genera aumento en la concentración de óxido nítrico (NO), lo que contribuye a la formación de especies reactivas como el peroxinitrito, un potente oxidante que también puede estimular la respuesta inflamatoria (Azizi & Mirshafiey, 2012).

Aunado a lo anterior, el incremento masivo de calcio intracelular contribuye a la apertura del poro de transición mitocondrial, lo que puede colapsar el potencial de membrana, esto conduce a la activación de la cascada pro-apoptótica (mediada por caspasas) y la generación de EROs (Tillement *et al.*, 2011).

Tanto la alteración del metabolismo del calcio, como la respuesta inflamatoria refuerzan el entorno oxidante.

## 4. ESTRÉS OXIDANTE

Los organismos necesitan el oxígeno para obtener la energía necesaria para llevar a cabo los procesos celulares. Cada uno de estos procesos implica reacciones de óxido-reducción (Pérez *et al.*, 2008). Sin embargo, no todo el oxígeno que se utiliza es reducido a agua. Se estima que del 2 al 4% del oxígeno que se consume durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, origina especies reactivas de oxígeno (Addabbo *et al.*, 2009).

El oxígeno se encuentra de manera habitual en su estado fundamental o basal ( $\text{O}_2$ ), la primera reacción de reducción del oxígeno a agua genera al radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), a este radical se le adiciona un electrón más, creando peróxido

de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), este  $H_2O_2$  (por medio de la reacción de Fenton) forma el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el ión hidroxilo ( $OH^-$ ). Posteriormente hay una última reducción hasta formar agua (Pérez *et al.*, 2008).

La célula tiene mecanismos que ayudan a neutralizar el daño oxidante, entre ellos se encuentran las enzimas como la glutatión peroxidasa (GSH-Px), la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión transferasa (GST) y la catalasa. Además de los antioxidantes primarios existen compuestos que se encuentran de manera endógena en los organismos o son incorporados mediante la dieta, los llamados antioxidantes secundarios, como las vitaminas A, C y E, el ácido úrico y los carotenoides. Cuando los niveles de especies reactivas y radicales libres sobrepasan las defensas antioxidantes de la célula, se produce el proceso denominado estrés oxidante, que puede dañar al ADN, proteínas y lípidos (Almaguer & Almaguer, 2006).

#### **4.1 Peroxidación Lipídica**

Los lípidos son moléculas hidrofóbicas que constituyen aproximadamente el 50% de la masa de la mayoría de las membranas celulares animales. La composición lipídica de las membranas le confiere a la célula las características de fluidez y selectividad. Los lípidos también participan en la señalización celular, pueden actuar como mediadores intracelulares de vida corta y controlar la actividad de enzimas ligadas a ellas (Alberts *et al.*, 2002).

Los radicales libres y las EROs pueden dañar las membranas biológicas alterando su selectividad y fluidez, lo que compromete la función celular. Por ejemplo, la membrana neuronal posee grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, su estructura tiene hidrógenos de doble ligadura, que son un blanco de los radicales libres, ocasionado la peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica se lleva cabo en tres etapas (Fig. 6) (Konigsberg, 2008):

**Iniciación:** Esta etapa se inicia cuando un residuo de un ácido graso poliinsaturado (PUFA) es atacado por un radical libre, que es capaz de secuestrar o sustraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-). Al retirar el átomo de hidrógeno, el residuo de ácido graso queda como radical libre. El carbono que ha perdido el átomo de hidrógeno es estabilizado mediante un arreglo molecular, produciendo un dieno conjugado que reacciona con el oxígeno molecular formando el radical peroxilo (ROO·).

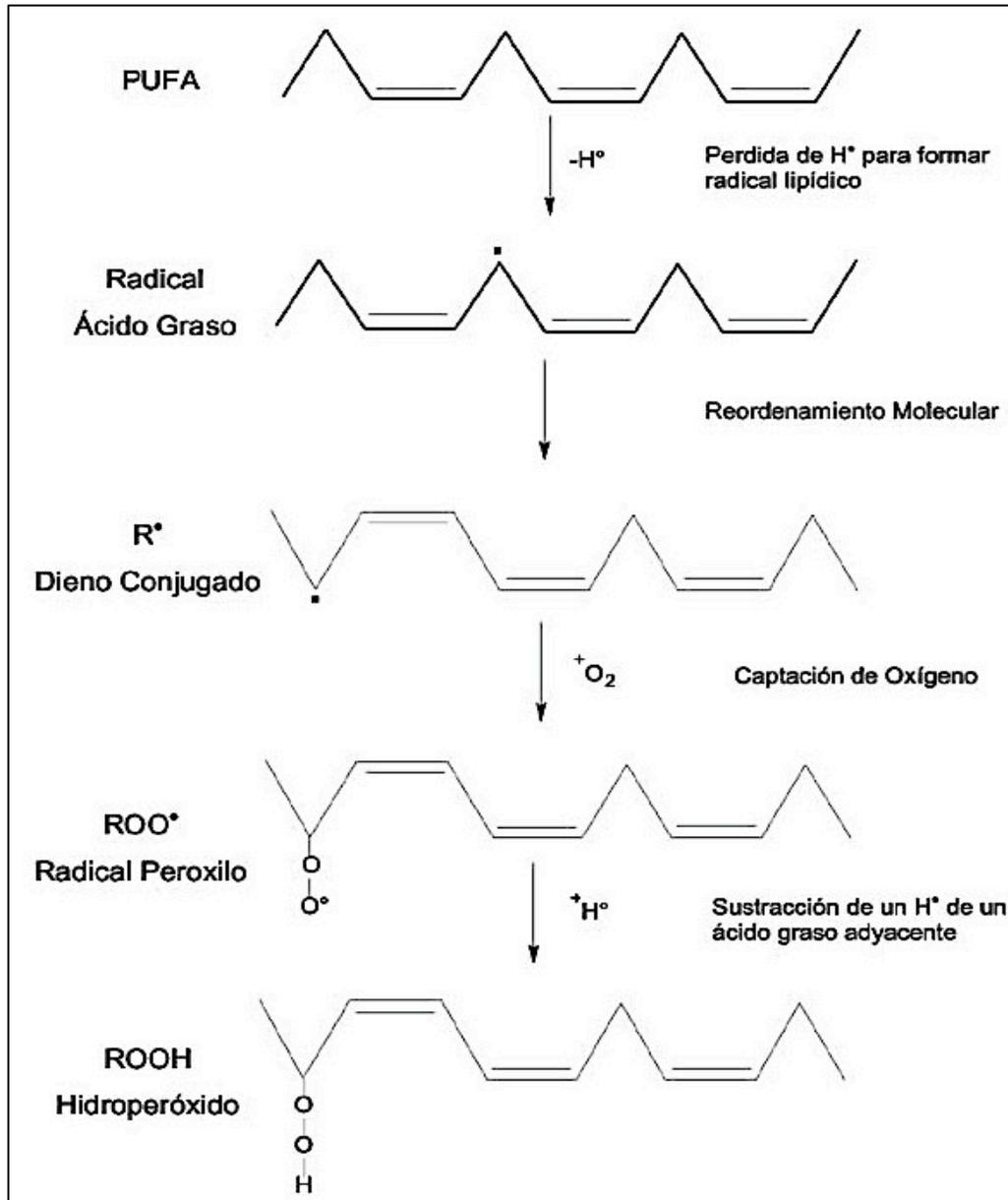
**Propagación:** La molécula a la cual se le ha sustraído un átomo de hidrógeno, hará lo mismo con la molécula de ácido graso poliinsaturado adyacente, estableciendo una reacción en cadena.

La etapa de propagación también se puede dar cuando un lipoperóxido (ROOH) reacciona con un metal de transición (Fe o Cu), originando un radical peroxilo (ROO·), que puede fraccionarse y formar al radical alcoxilo (RO·). Ambos radicales pueden abstraer un átomo de hidrógeno de la cadena adyacente y continuar con la etapa de propagación.

**Terminación:** Esta etapa se puede llevar a cabo cuando el radical lipídico reacciona con otra molécula (un segundo radical) formando un dímero que se queda dentro de la membrana, lo que puede alterar su fluidez y permeabilidad.

Otro mecanismo es la ciclización, en donde la molécula de oxígeno queda englobada dentro de la cadena poliinsaturada, este mecanismo es muy poco estable.

La secuencia de reacciones puede terminarse cuando el radical peroxilo (ROO·) encuentra una molécula que le dona un átomo de hidrógeno, conocido como antioxidante. Esto neutraliza al radical formado un hidroperóxido (ROOH).



**Figura 6.** Esquema de las etapas de la peroxidación lipídica. Se representa el mecanismo de inicio (extracción de un átomo de hidrógeno), propagación (la molécula a la que se le ha extraído un átomo de hidrógeno, hará lo mismo al PUFA adyacente) y terminación (el radical lipídico formado reacciona con otra molécula que lo estabiliza) (Tomada de Adriazola et al., 2005).

De esta manera los productos de la etapa de terminación en la oxidación de lípidos son los hidroperóxidos, mismos que se descomponen en productos terminales tóxicos como el malondialdehído (MDA), el hexanal, la acroleína y el 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Angoa et al., 2007).

En cerebros de pacientes con EA se ha mostrado aumento de estos productos, incluidas sustancias reactivas al ácidos tiobarbitúrico y algunos isopropanos, en especial en la corteza temporal e hipocampo (Addabbo *et al.*, 2009).

## 4.2 Estrés Oxidante y EA

El tejido nervioso es uno de los más vulnerables al estrés oxidante. Esto se debe a su alto consumo de oxígeno, alto contenido en lípidos, alta tasa metabólica, bajos niveles de superóxido-dismutasa y glutatión peroxidasa y casi ausencia de catalasa (Rivas *et al.*, 2001).

Está comprobado que los procesos oxidantes intervienen en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas. Algunas evidencias que corroboran esta teoría en la enfermedad de Alzheimer son las siguientes:

- En cerebros de pacientes con EA hay elevada concentración de productos finales de oxidación: incremento de proteínas modificadas (productos terminales de glicación avanzada (AGE)), aumento en la oxidación de ADN y de lípidos de membrana (Axelsen *et al.*, 2011). El 4-HNE es uno de los marcadores de la EA, se reporta que el aumento de este aldehído puede favorecer la agregación del A $\beta$  por modificaciones covalentes (Siegel, 2007).
- Se presenta una respuesta inflamatoria en las áreas afectadas (principalmente hipocampo y corteza temporal). El amiloide  $\beta$  recluta y activa las células de la microglia, que cambian su morfología ramificada a ameboidea (estado activo). Se presenta un incremento de astrocitos alrededor de las placas neuríticas, así como elevados niveles de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y de sus receptores. Todo lo anterior genera grandes cantidades de especies reactivas y radicales libres (Glass *et al.*, 2010).
- Se ha reportado el daño mitocondrial como evento temprano de la progresión de la EA. La disminución en la actividad respiratoria puede reducir la eficacia de

la transferencia de electrones, lo que resulta en el decremento de la producción de ATP y en la generación de EROs (Tillement *et al.*, 2011).

- El estrés oxidante ejerce un efecto adverso en la capacidad de los sistemas antioxidantes de la célula. En pacientes con la EA hay disminución en la actividad y expresión de la superóxido dismutasa dependiente de Manganeso (MnSOD), se propone que la supresión de la expresión de esta enzima puede estar regulada por el gen P53 y en la EA hay una sobreexpresión de este gen (Sompol *et al.*, 2008).
- El A $\beta$  es capaz de producir radicales libres por medio de su interacción con metales de transición. En la EA existe evidencia de la acumulación de metales como Fe, Cu, Zn y Al. La fracción A $\beta$  (25-35) en presencia de hierro puede disparar eventos apoptóticos, algunos estudios muestran que la cascada de señalización pro-apoptótica vía estrés oxidante activa moléculas como ERK, JNK-SAP y P38 (Bharathi *et al.*, 2006). También se sabe que el A $\beta$  puede producir liberación del citocromo C, estos eventos pueden activar caspasas y causar muerte neuronal (Tillement *et al.*, 2011).

El estrés oxidante puede contribuir a los cambios conformacionales de las proteínas que se observan en la EA (placas neuríticas y marañas neurofibrilares). Una de las teorías propuestas es que los mecanismos de degradación de proteínas, es decir, el proteosoma están alterados. Lo que permite que las proteínas se agreguen y pierdan su función biológica. La célula responde a estos efectos neurotóxicos activando mecanismos de supervivencia, uno de ellos es la activación de las proteínas de choque térmico (Kalmar & Greensmith, 2009).

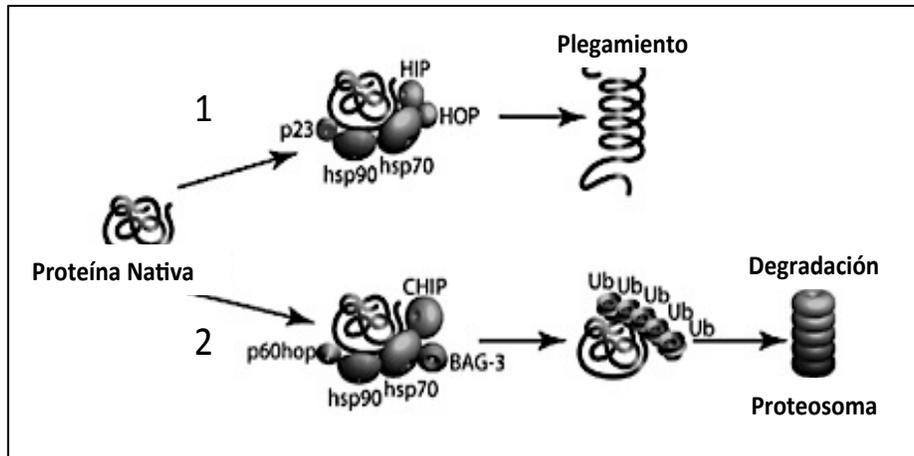
## 5. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Las proteínas de choque térmico (HSP) se expresan en todas las células procariotas y eucariotas, son consideradas como un mecanismo de defensa intracelular bajo condiciones fisiológicas y ambientales adversas, donde se induce su activación (Stetler *et al.*, 2010).

En el año de 1974 Tissière y colaboradores purificaron por primera vez estas proteínas a partir de la larva de *Drosophila melanogaster* como consecuencia del estrés calórico (aumento de temperatura 25° a 30°C), motivo por el que fueron denominadas como proteínas de choque térmico (Chávez & Sáenz, 2009).

Las HSP se definen como chaperonas moleculares que participan en el ensamble y transporte de proteínas. Las funciones que desempeñan las HSP en relación al plegamiento son las siguientes (Fig. 7) (Kalmar & Greensmith, 2009; Coronato *et al.*, 1999):

- Se unen a las cadenas nacientes de polipéptidos retardando su plegamiento, hasta que la síntesis del mismo se complete.
- Es chaperona del polipéptido. Permiten el ensamble correcto y eficaz (conformación nativa) de las cadenas polipeptídicas, para su translocación a través de las membranas de cada organelo.
- Impiden la agregación de las proteínas. Un mecanismo es asegurar a los polipéptidos en estados intermedios para promover el plegamiento correcto.
- Degradan proteínas de vida media corta y proteínas que son mal plegadas. Las proteínas se degradan a través de un complejo proteico nombrado proteosoma. Este complejo reconoce a la proteína destinada a la degradación por medio de la ubiquitina, la cual se une covalentemente y será detectada por receptores específicos del proteosoma.



**Figura 7.** Esquema de la participación de HSP en el plegamiento de las proteínas. **1:** El plegamiento de una proteína naciente activa a la HSP70, que forma un complejo con la HSP90 y sus co-chaperonas HIP (proteína de interacción-HSP70) HOP (proteína de organización HSP70-HSP90) y P23. **2:** Degradación de las proteínas. El complejo HSP70-HSP90 se une con CHIP y BAG que se encargan de inhibir la actividad ATPasa para la subsecuente adición de la ubiquitina y su degradación por el complejo proteico denominado proteosoma (Tomado de Kalmar et al., 2009).

En adición a su función como asistentes de plegamiento, se les adjudica la función citoprotectora, es decir, se encargan de minimizar los daños producidos por cualquier tipo de estímulo que pudiera producir daño. Cuando la célula se expone a cualquier factor estresante, las HSPs se activan, no obstante, si el estímulo de daño se vuelve constante su actividad se ve sobrepasada y se detiene su expresión, activando la apoptosis.

Las razones por las cuales las HSPs pueden elevar su expresión se engloba en 4 categorías generales (Barragán et al., 2007):

- En condiciones normales: participan en el plegamiento de proteínas, en el ciclo celular (degradación de ciclinas).
- Estrés ambiental: se activan en presencia de choque térmico, estrés oxidante, tóxicos y algunos fármacos.

- Estrés fisiológico: hay un incremento de estas proteínas en respuesta al daño y reparación tisular. Por ejemplo, cuando se activa la respuesta inflamatoria, infecciones virales y bacterianas, isquemia, reperfusión, cáncer, entre otras.
- Enfermedades de agregación proteica: Destacan las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington y Esclerosis Lateral Amiotrófica.

### **5.1 Regulación de la expresión de las HSPs**

La respuesta al estrés constituye un mecanismo esencial por el cual las células modifican su expresión génica. Cambios en el medio extracelular e intracelular activan un factor de transcripción denominado factor de choque térmico 1 (HSF1).

El HSF1 pertenece a la familia de HSF. En los humanos se han descrito 6 isoformas (incluyendo HSF1) denominadas HSF2, HSF4, HSF5, HSFX y HSFY que varían en longitud y en los sitios de modificación de algunos aminoácidos. Existe otra isoforma que no se expresa en humanos sólo en ratones, la HSF3 (Xu *et al.*, 2012). Sin embargo, el HSF1 es el miembro más estudiado y caracterizado hasta el momento.

El HSF1 se expresa constitutivamente en casi todos los tejidos y en todos los tipos de células. Existen 2 isoformas, la primera constituida por 529 aa y la segunda conocida como isoforma corta que posee 489 aa (Anckar & Sistonen, 2011).

Los miembros de esta familia comparten una estructura general conformada por 3 dominios: un dominio de unión al ADN (DBD), que contiene una región cierre de leucina. El dominio regulatorio (RD), que abarca del aminoácido 297-304 y cuya secuencia es V-K-X-E-X-X-S-P, la cual está implicada en la represión de la actividad del HSF1. Y el último dominio, el dominio de activación (AD) (Fig. 8) (Xu *et al.*, 2012; Anckar & Sistonen, 2011).



**Figura 8.** Estructura general de HSF1. Se observa el dominio de unión al ADN (DBD), con su región cierre de leucina (LZ1-3), el dominio regulatorio (RD) asociado a otra región zipper leucina (LZ4) y el dominio de activación (AD) (Imagen modificada Neef *et al.*, 2011).

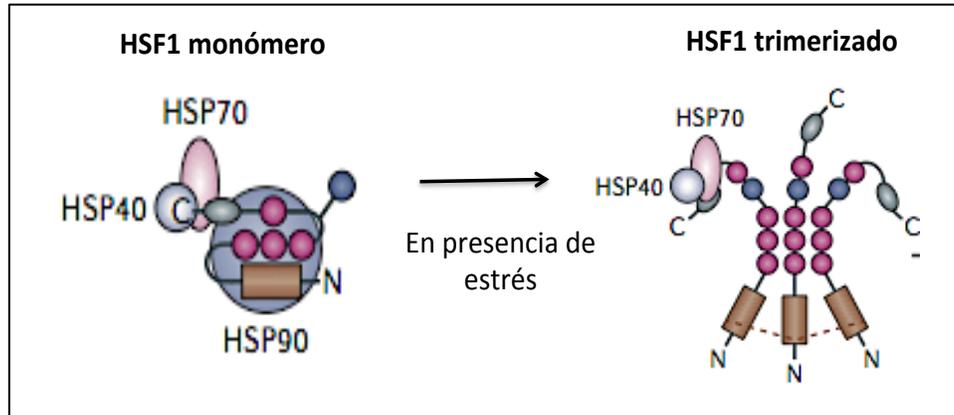
## 5.2 Activación del HSF1

En las células el HSF1 se encuentra en el citoplasma como zimógeno, su activación requiere de su trimerización (depende de una región cierre de leucina) y su translocación al núcleo (Neef *et al.*, 2011). Este factor se une al elemento de choque térmico (HSE) que se encuentra en las secuencias reguladoras 5' de los genes de las HSP, para su activación. Este proceso requiere la presencia de niveles altos de  $\text{Ca}^{2+}$  así como la fosforilación de una tirosina cinasa (Rodríguez *et al.*, 1996).

En su estado inactivo el HSF1 se encuentra asociado a las HSP70, 40 y 90. En presencia de cualquier tipo de estrés, el monómero cambia su conformación y la HSP90 se disocia conservando a la HSP70 y 40 (Fig. 9). Los cambios conformacionales se llevan a cabo en el citoplasma. Posteriormente, (ya trimerizado) es exportado al núcleo donde se une con el elemento de choque térmico (HSE) para completar la activación transcripcional de las HSP (Neef *et al.*, 2011).

La inhibición transcripcional se da cuando las HSP70 y 40 se vuelven a unir al HSF1. El siguiente paso es su disociación del ADN, que se lleva a cabo por acetilación. Existen dos hipótesis de lo que sucede con este trímero después de cumplir con su función. El primer camino que puede seguir es su degradación. Se piensa que el trímero es separado nuevamente y los monómeros son degradados en el citoplasma. Existe evidencia nueva de que el HSF1 puede ser sustraído por autofagia. El segundo camino es su reutilización. Los monómeros regresan a un

estado inactivo en el citoplasma, donde la HSP90 se vuelve a asociar al dominio regulatorio para su inactivación (Neef *et al.*, 2011; Anckar & Sistonen, 2011).



**Figura 9.** Se muestra la forma inactiva del HSF1 (monómero) con sus co-chaperonas HSP40, HSP70 y HSP90 y su cambio conformacional al activarse en presencia de cualquier tipo de estrés. El HSF1 adquiere una conformación trimerizada. En color rosa se muestra la región cierre de leucina y en azul los sitios de fosforilación. Las líneas punteadas representan puentes disulfuro (Imagen modificada Neef *et al.*, 2011).

### 5.3 Clasificación y estructura de las HSP

La superfamilia de las HSP son clasificadas dentro de subfamilias de acuerdo a su peso molecular. Dentro de esta clasificación se ubica la familia de la HSP40, 60, 70, 90, 110 y la familia de las HSP pequeñas, que incluye los miembros que tienen un peso molecular que oscila entre los 15 y 30 kDa. En este grupo se encuentra la HSP22, 25 y 27. Esta clasificación es la más utilizada, no obstante, hay autores que las clasifican en 2 grupos, las que son dependientes de ATP (HSP40, 60, 70, 90, 110) y las que no (tienen pesos moleculares menores a 40 kDa) (Chávez & Sáenz, 2009).

En general, todas las proteínas de choque térmico comparten 3 dominios funcionales: un dominio amino terminal, denominado NBD (dominio de unión del nucleótido). Un dominio de unión al sustrato (SBD) y una región carboxilo terminal (CTR), que tiene alta capacidad para la interacción proteína-proteína. Este dominio es necesario para la dimerización de la proteína y la unión del sustrato.

También posee un segmento extremo, denominado MEEV que es relevante para la unión de co-chaperonas (como HOP) y fosfatasa.

Las chaperonas que requieren de ATP para su funcionamiento tienen un dominio AAA<sup>+</sup> (actividad celular asociada a ATPasas). Hay otras HSP que tienen dominios adicionales como regiones ricas de glicina y fenilalanina ó repetidos de cisteína (Stetler *et al.*, 2010).



**Figura 10.** Estructura general de las proteínas de choque térmico. Se muestra los tres dominios generales: NBD (dominio de unión al nucleótido), SBD (dominio de unión al sustrato) y CTR (región carboxilo terminal) (Stetler *et al.*, 2010).

### 5.3.1 Proteína de choque térmico 60 (HSP60)

La HSP60 se expresa en la matriz mitocondrial y en el citosol. En el cerebro la podemos encontrar en astrocitos, neuronas, microglia, oligodendrocitos y células ependimales.

Se encarga de facilitar el ensamble y transporte de proteínas mitocondriales; desempeña una función citoprotectora (Stetler *et al.*, 2009).

La HSP60 forma un complejo con la HSP70 y 90 para preservar la producción de ATP a través de la protección del complejo IV (citocromo c oxidasa) de la cadena respiratoria. En cultivos de neuronas corticales que fueron expuestas al A $\beta$  (1-42) se observó una sobreexpresión de esta HSP y disminución en la formación de especies reactivas de oxígeno. Es decir, el buen funcionamiento de la cadena respiratoria mantiene la generación de ATP, disminuyendo la formación de EROs, la liberación del citocromo c y la activación de caspasas (Veereshwarayya *et al.*, 2006).

### **5.3.2 Proteína de choque térmico 70 (HSP70)**

La HSP70 es la proteína más conservada en la evolución. En contraste con otras HSP, esta chaperona se expresa en casi todos los compartimentos intracelulares. La encontramos en el citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático y mitocondrias (Turturici *et al.*, 2011).

Como hemos revisado esta proteína facilita el plegamiento de las proteínas nacientes, coadyuva a las proteínas dañadas para que puedan plegarse nuevamente, degrada y previene la agregación de proteínas. Por otro lado, participa en la activación del HSF1 (Di Domenico *et al.*, 2010).

La HSP70 es una proteína multifacética que es capaz de proteger a las células por varios mecanismos. Sin embargo, el efecto neuroprotector se debe principalmente a su papel de chaperona. Otros mecanismos son la inhibición de la muerte celular, por un incremento en la expresión de Bcl-2. Suprime la activación de la microglia y reduce la expresión de metaloproteasas (Brown, 2007).

Algunos autores muestran que la HSP70 puede evitar la agregación del A $\beta$  en estados tempranos (formación de oligómeros), para evitar la formación de las fibras amiloideas. Esta función la realiza conjuntamente con la HSP40 y 90 (Evans *et al.*, 2006).

Además esta chaperona puede activar células presentadoras de antígenos mediante los receptores Toll 2, Toll 4 y CD14, induciendo la activación de moléculas pro-inflamatorias (Fiorentino *et al.*, 2007).

### **5.3.3 Proteína de choque térmico 90 (HSP90)**

Esta chaperona es una de las proteínas más abundantes en la célula, comprende del 1- 2% de las proteínas celulares. A nivel intracelular se localiza en citosol y núcleo.

La HSP90 se expresa constitutivamente en casi todos los tipos neuronales. El mRNA de esta proteína se encuentra de manera abundante en estructuras como el hipocampo, amígdala, cuerpos mamilares y la capa de las células de Purkinje en el cerebelo. En las neuronas se encuentra primordialmente en los somas y en menor grado en las dendritas (Stetler *et al.*, 2010).

Es requerida para el plegamiento y mantenimiento de otras proteínas que incluye receptores de hormonas esteroideas, proteínas cinasas y factores de transcripción. Sirve como elemento de unión de la actina y la tubulina para su activación (Neef *et al.*, 2011).

La HSP90 forma parte del HSF1, donde ejerce una función inhibitoria (Fig. 9). Por lo tanto, al inhibir a la HSP90 se activa al HSF1; incrementando la producción de chaperonas como la HSP70 y 40, que promueven la disgregación y degradación de las proteínas.

En modelos celulares y animales de Taupatías, la inhibición de esta proteína resulta en la disminución de los agregados de Tau, lo que disminuye la producción de moléculas como la GSK3 (glucógeno sintasa cinasa 3), cdk5 (cinasa dependiente de ciclina) y MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) (Luo *et al.*, 2008).

#### **5.3.4 Proteína de choque térmico 27 (HSP27)**

La HSP27 fue originalmente llamada como 24 K o 28 K. Se encuentra presente en forma de oligómeros en el citoplasma y núcleo de todos los tejidos y células. Cuando es activada (se fosforila) cambia su conformación a un tetrámero para poder interactuar con otras proteínas. Su activación es regulada por condiciones celulares (Vidyasagar *et al.*, 2012).

Dentro de las funciones que se le adjudican está la participación en la proliferación celular, resistencia a drogas y en eventos de termotolerancia. Puede actuar como

molécula antioxidante, puede inhibir o promover la apoptosis y también funciona como co-chaperona (Vidyasagar *et al.*, 2012; Stetler *et al.*, 2009).

En la EA, hay una sobreexpresión de esta proteína, ya que la HSP27 participa en la dinámica del metabolismo de la actina y la organización del citosqueleto, importante en la formación de las marañas neurofibrilares. Se reportó que esta chaperona se une a Tau hiperfosforilada y a los filamentos helicoidales para intentar evitar su agregación; si no lo logra puede promover la muerte neuronal (Vidyasagar *et al.*, 2012). Se propone que la HSP27 desempeña un papel neuroprotector en todas la Taupatologías (Stetler *et al.*, 2009; Shimura *et al.*, 2004).

La HSP27 puede afectar la cascada de señalización apoptótica, su efecto es dual, ya que puede promover o inhibir la apoptosis. Sin embargo, el mecanismo no está dilucidado por completo. Una teoría es que la HSP27 se activa por la MAPKAP cinasa 2, que se encarga de fosforilarla, lo que promueve una respuesta inflamatoria. A su vez puede inhibir enzimas pro-apoptóticas (Stetler *et al.*, 2009).

El incremento de la HSP27 puede inhibir la liberación del citocromo c y la translocación de moléculas pro-inflamatorias a la mitocondria (Stetler *et al.*, 2009).

La HSP27 tiene funciones antioxidantes, porque puede disminuir los niveles de EROs mediante el incremento de los niveles de glutatión intracelular y la consiguiente disminución  $Fe^{2+}$  (Vidyasagar *et al.*, 2012).

En las enfermedades neurodegenerativas se reporta un incremento de las proteínas de choque térmico como un mecanismo neuroprotector. En la EA las proteínas sufren modificaciones postraduccionales como la fosforilación sulfatación e isomerización y otra modificación menos explorada la glicosilación.

## 6. GLICOSILACIÓN

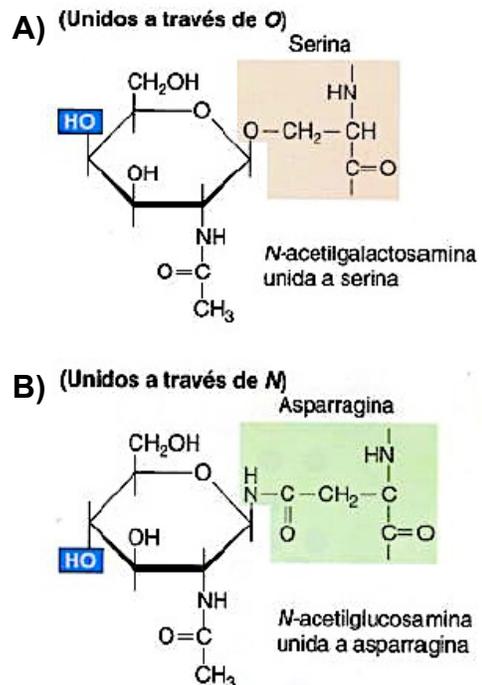
Las proteínas que están destinadas a ser secretadas ya sea a la membrana citoplasmática o bien a los distintos organelos, sufren un proceso denominado glicosilación. La glicosilación es un proceso postraduccional que se lleva a cabo en el lumen del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi de los eucariotes. Se define como el proceso de adición de uno o más azúcares (oligosacáridos) a una molécula proteica o lipídica (Jiménez *et al.*, 2002).

La adición de los oligosacáridos (glicanos) es de vital importancia por su participación en el control, calidad, supervivencia y función de las proteínas glicosiladas (Martínez *et al.*, 2008).

De acuerdo al sitio de adición o región de unión de los carbohidratos a la proteína, las glicoproteínas se clasifican en O-glicanas y N-glicanas (Fig. 11) (Cooper *et al.*, 2009; Jiménez *et al.*, 2002):

**O-glicosilación:** La proteína se modifica mediante la adición de carbohidratos al grupo hidroxilo de las cadenas laterales de residuos de serina y treonina. Estas modificaciones se llevan a cabo exclusivamente en el aparato de Golgi. En este proceso la serina y la treonina se unen al monosacárido N-acetilgalactosamina, a la que después se le añaden otros azúcares (Figura 11, A).

**N-glicosilación:** Este proceso se lleva a cabo primero en el retículo endoplasmático y continúa en el aparato de Golgi.



**Figura 11.** Tipos de glicosilación. A) O-glicosilación, B) N-glicosilación (Cooper *et al.*, 2009)

Se denomina así porque el carbohidrato se une con el grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparagina (Figura 11, B).

Los N-oligosacáridos se procesan en el aparato de Golgi mediante una serie de reacciones que incluyen procesos de adición y eliminación de residuos de azúcares. Las enzimas que los adicionan se denominan glicosiltransferasa, mientras que la eliminación es llevada a cabo por las glicosidasas.

Existen proteínas que son capaces de enlazarse de forma específica a los carbohidratos, las llamadas lectinas.

## 6.1 Lectinas

El término lectina (latín *legere*, leer o seleccionar) fue acuñado por Boyd en el año de 1954. Hace referencia a un grupo variado de proteínas que se encuentran en plantas, animales y organismos inferiores. El término lectina se aplica a proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular. Pueden tener 1 o 2 sitios de reconocimiento a carbohidratos (Hernández *et al.*, 2005).

La función de una lectina es facilitar el contacto intercelular. Los sitios de unión de la lectina interaccionan con los carbohidratos que se encuentran en la superficie de otra célula. El tipo de unión es débil, lo que permite asegurar la especificidad (Berg *et al.*, 2007).

El campo de aplicación de las lectinas es prolijo. Se pueden utilizar para estudiar cambios estructurales en los glicoconjugados, detectar cambios morfológicos, analizar la distribución subcelular de epitopes y terminales glicoproteicos entre otros (Hernández *et al.*, 1999). Espinosa y Colaboradores proponen el uso de las lectinas como marcadores tempranos de la EA. Por ejemplo, la lectina *Amaranthus leucocarpus* (ALL), es una lectina purificada a partir de la semilla del amaranto. Interacciona con el monosacárido N-acetilgalactosamina. Es específica para Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1,0 Ser/Thr y GalNAc $\alpha$ 1,0 Ser/Thr. Mientras que la lectina

Macrobrachium rosebergii (MrL), es una lectina purificada de la hemolinfa del langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (MrL). Es específica para el ácido 9,8,7-0-acetil siálico o NeuAc<sub>3</sub>

## **6.2 Glicosilación y EA**

Errores en la glicosilación puede producir condiciones patológicas. En la enfermedad de Alzheimer, las marañas neurofibrilares y las placas neuríticas sufren glicación (proceso no enzimático) que origina productos terminales de glicación avanzada (AGE). Asimismo se ha demostrado procesos de N y O-glicosilación.

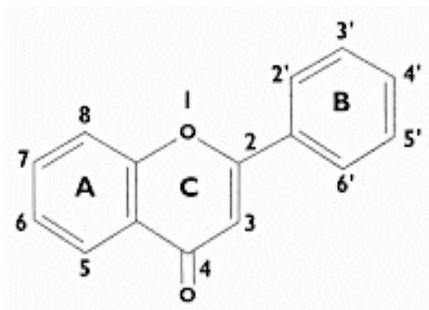
Nuestro grupo de investigación ha utilizado las lectinas para mostrar modificaciones postraduccionales (debidas a la glicosilación) de la proteína Tau y del amiloide  $\beta$ . Algunos de los hallazgos encontrados son los siguientes:

Modelo y objetivo	Resultados	Cita
<p>Cortes de cerebro de pacientes con EA.</p> <p>Comparar la plasticidad reactiva entre cerebros normales y con EA relacionada con O-glicanos por medio de las lectinas <i>ALL</i> y <i>MrL</i>.</p>	<p>Se mostró que el procesos de plasticidad reactiva (meganeuritis, terminales sinápticas peri-neurales) es exclusivo de la EA. Estos cambios se asocian a la presencia de O-glicanos, determinados con un marcaje positivo para <i>ALL</i> y <i>MrL</i>.</p>	<p>Guevara <i>et al.</i>, 2004</p>
<p>Cortes y extractos de cerebro (corteza) de autopsias de pacientes con EA.</p> <p>Caracterizar la glicoproteína de 90 kDa (Azgp 90) reconocida con la lectina <i>ALL</i> en las placas neuríticas.</p>	<p>Se encontró secuencias tipo mucina en la placas neuríticas.</p> <p>Por medio de microscopia electrónica de transmisión, se confirmó que el receptor de <i>ALL</i> es procesado en el aparato de Golgi de neuronas con EA.</p> <p>Los resultados sugieren que la proteínas O-glicosiladas participan en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas con EA.</p>	<p>Espinosa <i>et al.</i>, 2003</p>
<p>Cortes de cerebro de autopsias de pacientes con EA.</p> <p>Identificar el papel de la glicosilación de proteínas en la EA, usando las lectinas <i>ALL</i> y <i>MrL</i> como marcadores de la plasticidad reactiva.</p>	<p>Se observó aumento de O-glicanos en las ramificaciones neuríticas de cerebros con EA.</p> <p>Los resultados demuestran la especificidad de las lectinas para el reconocimiento de procesos de plasticidad reactiva.</p>	<p>Espinosa <i>et al.</i>, 2001</p>
<p>Cortes de cerebro de autopsias de pacientes con EA.</p> <p>Determinar los cambios postraduccionales (glicosilación de proteínas) en cerebros con EA, usando lectinas.</p>	<p>Los resultados indican incremento significativo de O-glicanos en las placas neuríticas y en las marañas neurofibrilares. Las lectinas son específicas para estos dos marcadores histopatológicos.</p> <p>Las lectinas sólo marcan la microvasculatura en los cerebros normales.</p> <p>Esto sugiere un procesamiento anormal de las proteínas en la EA.</p>	<p>Guevara <i>et al.</i>, 1998</p>

El estrés oxidante y todos los cambios que se producen de manera directa e indirecta (activación de HSP, cambios en el procesamiento de proteínas) alteran el metabolismo celular, causando daño a los sistemas antioxidantes. Por lo que se propone el uso de flavonoides como estrategia terapéutica.

## 7. FLAVONOIDES

Los flavonoides son un grupo de pigmentos aromáticos heterocíclicos que se encuentran presentes en los vegetales, semillas, frutos y bebidas como el vino, té, cacao y la cerveza. Se sintetizan a partir de unidades de acetato y de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina (Escamilla *et al.*, 2009).



**Figura 12.** Estructura básica de los flavonoides (Pérez, 2003).

Los flavonoides comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), es decir, 2 anillos fenilos (A y B) unidos mediante un anillo pirano (C) (Fig. 12).

El anillo A proviene de la vía de la malonilcoenzima A y el anillo B y la cadena C3 proviene de la vía del ácido shikímico (Konigsberg, 2008).

De acuerdo a su estructura química (variación del anillo pirano) se pueden clasificar en los siguientes grupos (Drago, 2007; Martínez *et al.*, 2002):

- **Flavanos:** grupo que posee un –OH en la posición 3 del anillo pirano. En esta clasificación se encuentra la catequina.
- **Flavonoles:** tienen un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C. Como representantes está la quercitina, kaemferol y la rutina.

- **Flavonas:** este grupo tiene un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C, a diferencia de los otros 2 grupos no tiene el hidroxilo en la posición C3. Algunos compuestos que forman parte de este grupo son la diosmetina, peonina, la malvidina y la petunidina.
- **Antocianidinas:** aunado al grupo hidroxilo en la posición C3, tienen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.
- **Isoflavonas:** grupo que tiene 2 grupos –OH unidos en la posición 1 y 3 del anillo C. Como representantes tiene a la genisteina y la daidzeina.

### 7.1 Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante de los flavonoides está determinada por su estructura molecular, algunos de los mecanismos propuestos son los siguientes (Konigsberg, 2008; Williams *et al.*, 2004):

- Los grupos hidroxilos pueden incrementar la actividad antioxidante.
- La ortodihidroxiestructura en el anillo B confiere estabilidad a la forma radical.
- Pueden quelar iones metálicos como el  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , por medio de los grupos ortodihidroxifenil.
- Los grupos 3 y 5 de los anillos A y C pueden inhibir radicales libres.
- Catalizan el transporte de electrones y depuran radicales libres.
- Pueden inhibir enzimas como las hidrolasas, liasas, transferasas, hidroxilasas y oxidorreductasas. Algunas ejemplos de estas enzimas son la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa.
- Estimulan la actividad de enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa.

### 7.2 Metabolismos de los Flavonoides

La transformación de los flavonoides se lleva a cabo en dos fases: La fase I tiene lugar en el hígado, las reacciones que se llevan a cabo son la introducción o exposición de grupos polares. En la fase II, los microorganismos intestinales (colon) degradan los flavonoides no absorbidos. Los flavonoides y sus metabolitos

son conjugados con el ácido glucurónico, sulfatos y glicina. Una parte de los flavonoides se excreta por la orina (conjugados solubles en agua) y otros por la bilis (no solubles en agua). Los flavonoides que son glucuronidados son excretados por vía renal, mientras que los metilados y sulfatados se excretan por la vía hepática (Escamilla *et al.*, 2009; Pérez, 2003).

La biodisponibilidad de cada grupo depende de factores como la estructura química, absorción, la distribución y su eliminación, así como el tipo de metabolito que forman, lo que repercute en su vida media en el organismo (Pérez, 2003).

Debido a todas las propiedades antioxidantes que tienen estos compuestos, se utilizan como un tratamiento alternativo en diversas condiciones patológicas, una de ellas es la enfermedad de Alzheimer.

### **7.3 Antioxidantes y EA**

La evidencia experimental corrobora la hipótesis del estrés oxidante en el desarrollo y etiología de la enfermedad de Alzheimer. El uso de compuestos antioxidantes se ha explorado ampliamente. Algunos de los antioxidantes utilizados son la vitamina A, C, E, el  $\beta$ -caroteno, el ginkgo biloba entre otros:

**Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol):** Antioxidante liposoluble que protege a las neuronas de las reacciones tóxicas del A $\beta$ . Estabiliza los radicales libres e inhibe la peroxidación lipídica. Su uso retrasa los eventos patológicos y ayuda a los pacientes con un grado moderado de EA (Ono *et al.*, 2006).

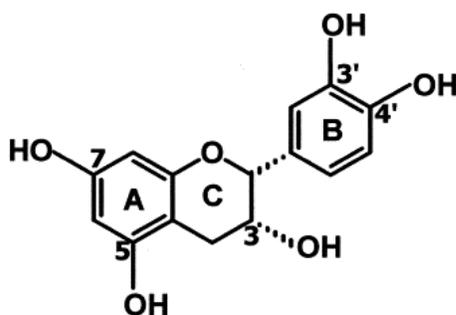
**Ginkgo biloba:** El uso de extractos de la planta ginkgo biloba mostró un efecto positivo sobre la función cognitiva en voluntarios sanos y personas que padecían demencia (Abd *et al.*, 2002).

**Ginseng:** El ginseng reduce la neurotoxicidad producida por glutamato en cultivo de células neuronales. El pretratamiento inhibe la producción de óxido nítrico, malondialdehído y el flujo de calcio intracelular (Grundman & Delaney, 2002).

Nuestro grupo ha evaluado en pruebas de memoria y aprendizaje el efecto de la catequina, vitamina E, quercitina y la epicatequina en ratas inyectadas con la fracción  $A\beta_{25-35}$ . Se mostró que todos los compuesto producen un efecto benéfico, sin embargo, la epicatequina aumentó el porcentaje de aciertos en la evaluación de memoria y aprendizaje. Asimismo la administración oral de la epicatequina evita la formación de EROs y la peroxidación lipídica (Cuevas *et al.*, 2009).

### 7.3.1 Epicatequina

La epicatequina es un flavano que pertenece a la familia de las catequinas (Fig. 13). Se encuentra presente en sus formas oligoméricas o monoméricas en el té verde, en el vino rojo, en productos derivadas de la cocoa y en varios frutos (Abd *et al.*, 2002).



**Figura 13.** Estructura química de la epicatequina (Abd *et al.*, 2002).

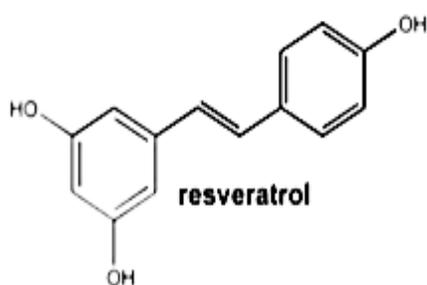
El metabolismo de la epicatequina se lleva a cabo en el intestino delgado. Kuhnle y colaboradores, demuestran que en la primera fase, la epicatequina es O-metilada en su transferencia al yeyuno, ya que aquí hay alta actividad de metiltransferasas. Estudios *in vivo*, muestran niveles bajos en la absorción de la epicatequina, mientras que las formas metiladas, sulfatadas y glucuronidadas se encuentran en circulación (Abd *et al.*, 2002).

La epicatequina es metilada y glucuronidada. Los metabolitos identificados en orina y plasma de humanos son: epicatequina-3'-O-glucuronidada, 4'-O-metil-epicatequina-5. En la sangre y cerebro de roedores también se detectan metabolitos metilados y glucuronidados (Blout *et al.*, 2012). En experimentos en ratas a las que se les administró epicatequina (100mg/kg), se hallaron los metabolitos epicatequina-3'-O-glucuronidada y 4'-O-metil-epicatequina-5 en plasma y en extracto de cerebro, 2 horas después de su administración. Lo

anterior demuestra que la epicatequina tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Abd *et al.*, 2002).

La epicatequina puede proteger a las neuronas del daño oxidante por medio de sus mecanismos clásicos y por su interacción con cascadas de señalización intracelular, como las MAP cinasas. Lo que puede promover la supervivencia neuronal (Blout *et al.*, 2012).

### 7.3.2 Resveratrol



**Figura 14.** Estructura química del resveratrol (Rocha *et al.*, 2008).

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxistilbeno) es un polifenol que pertenece a la familia de los stilbenos (Fig. 14). Se encuentra principalmente en la piel de las uvas y en el vino, en las frambuesas, zarzamoras, cacahuates y pistaches. Además de estar presente en más de 72 plantas comestibles y medicinales (Rocha *et al.*, 2008). La concentración de los niveles de resveratrol varía, sin embargo, es más abundante en las uvas y el vino rojo (Huang *et al.*, 2011; Vingtdoux *et al.*, 2008).

Este polifenol puede ser encontrado como oligómero, tetrámero, trímero, y oxiresveratrol. Además su estructura tiene 2 isoformas: *cis* y *trans* resveratrol. La primera isoforma era considerada inactiva, actualmente se sabe que ambas tienen actividad biológica, la forma *trans* siendo la más potente (Rocha *et al.*, 2008). En humanos el *trans*-resveratrol se absorbe bien, sin embargo, su biodisponibilidad es relativamente baja por sus rápida metabolización y eliminación renal. Su vida media es de aproximadamente 8 horas (Millán *et al.*, 2008).

Francois y colaboradores realizaron una cinética de la biodisponibilidad del *trans*-resveratrol en plasma de ratas a las que se les administró 50 mg/kg de este

compuesto (vía oral). Sus resultados demuestran que el resveratrol se encuentra biodisponible a partir de la primera hora; pero incrementa abruptamente en la circulación en el intervalo de 4 a 8 horas. A las 10 y 12 hrs la concentración en plasma es casi nula (0.02  $\mu\text{mol/L}$ ).

A diferencia de la epicatequina, la biodisponibilidad del resveratrol es más baja. Esto se debe a su rápida excreción y a las conjugaciones que sufre: glucuronidación y sulfatación. Los principales metabolitos que se han identificado en la orina humana son: resveratrol monosulfatado, 2 isoformas de resveratrol monoglucuronidado, el monosulfato dihidroresveratrol y el monoglucuronidado dihidroresveratrol. El resveratrol en su gran mayoría es transformado a metabolitos por reacciones de sulfatación, mientras que sólo un 20% es glucuronidado (Vingtdeux *et al.*, 2008).

Se ha demostrado en diversas investigaciones el papel benéfico del resveratrol. Se le adjudica efectos antiinflamatorios, antitumorales, antimicrobianos, así como neuroprotector en enfermedades neurodegenerativas. Se ha comprobado que puede inhibir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, inhibe enzimas como la ciclooxigenasa, la lipooxigenas y la iNOS (Huang *et al.*, 2011; Vingtdeux *et al.*, 2008).

Por lo tanto, esta investigación se enfocada en analizar el efecto de la epicatequina y el resveratrol sobre la expresión de las HSP y la glicosilación de proteínas en un modelo de toxicidad inducido por la fracción  $\text{A}\beta_{(25-35)}$ .

## 8. HIPÓTESIS

- La capacidad antioxidante de la epicatequina y el resveratrol pueden disminuir el daño oxidante producido por la administración intrahipocampal de la fracción  $A\beta_{(25-35)}$  en la rata, lo que modificará los patrones de expresión de las proteínas de choque térmico.

## 9. OBJETIVOS

### 9.1 Objetivo General

- Evaluar el papel de la epicatequina y el resveratrol sobre el daño oxidante generado por la fracción  $A\beta_{(25-35)}$  y correlacionar su efecto con la concentración de las proteínas de choque térmico.

### 9.2 Objetivos Particulares

- Cuantificar los niveles de especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica en hipocampo de ratas.
- Cuantificar la concentración de las HSPs 60, 70, 90 y 27 en hipocampo de ratas.
- Identificar por medio de lectinas: ALL (*Amaranthus leucocarpus*) y MrL (*Macrobrachium rosebergii*) la glicosilación de proteínas en hipocampo de ratas.

## 10. MATERIAL Y MÉTODOS

### 10.1 Grupo Experimental

Se utilizaron 180 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 280-300 g, con libre acceso de alimento y agua.

Los animales fueron obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, MVS y del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Los grupos experimentales formados fueron los siguientes:

- 🧠 **Primer grupo:** Controles (administración de solución salina)
- 🧠 **Segundo grupo:** Animales inyectados con la fracción  $A\beta_{(25-35)}$ .
- 🧠 **Tercer grupo:** Animales administrados con epicatequina.
- 🧠 **Cuarto grupo:** Animales fracción  $A\beta_{(25-35)}$  + epicatequina.
- 🧠 **Quinto grupo:** Animales administrados con resveratrol.
- 🧠 **Sexto grupo:** Animales fracción  $A\beta_{(25-35)}$  + resveratrol.

El número utilizado para cada prueba fue:

- 🧠 **PL y ROS:** 6 animales por cada grupo experimental
- 🧠 **Inmunohistoquímica de HSPs:** 4 animales por cada grupo experimental
- 🧠 **Histoquímica para lectinas:** 4 animales por cada grupo experimental.

El periodo de evaluación de los animales expuestos a la fracción  $A\beta_{(25-35)}$  fue a las **2 horas, 4 horas y 30 días**.

### **10.2 Administración de Antioxidantes (epicatequina y resveratrol)**

La dosis utilizada para ambos antioxidantes fue de 30 mg/kg de peso, disuelto en 1 mL de solución salina que se inyectó con una cánula de administración oral. Al grupo control se le administró el vehículo (solución salina). La administración se realizó 5 horas previas a la microinyección del péptido  $A\beta_{(25-35)}$  (para su biodisponibilidad).

### **10.3 Preparación de la Fracción $A\beta_{(25-35)}$**

El péptido  $A\beta_{(25-35)}$  (NH-GSNKGAIIGLM-OH) se solubilizó en solución salina isotónica (0.9%). La concentración utilizada fue de 100  $\mu$ M. La solución de  $A\beta_{(25-35)}$  se incubó a 37°C durante 24 horas, para favorecer su agregación.

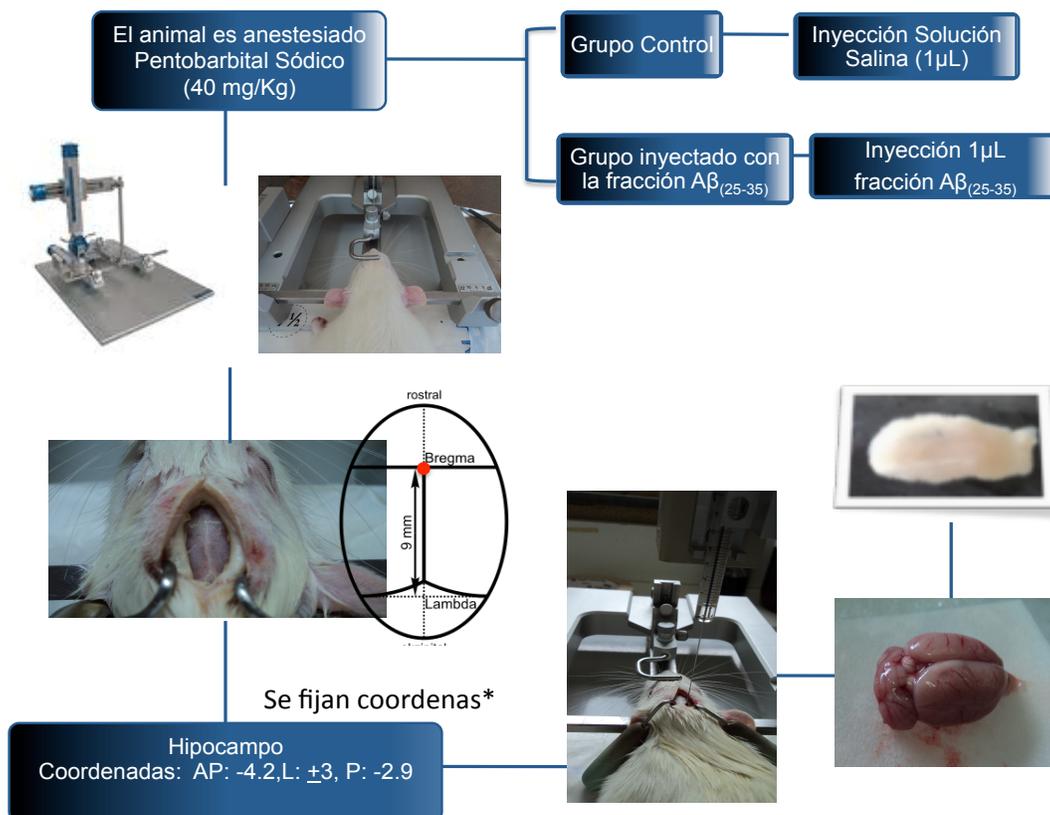
## 10.4 Cirugía Estereotáxica

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg) para la cirugía estereotáxica. El grupo control recibió una dosis de solución salina (1  $\mu$ L) y el grupo experimental 2, se le administró la fracción  $A\beta_{(25-35)}$ , la administración se realizó en un intervalo de 5 minutos con una jeringa Hamilton.

La administración intrahipocampal se hizo utilizando las siguientes coordenadas:

AP: -4.2, L:  $\pm$ 3, P: -2.9 (tomando como referencia estereotáxica el bregma) (Paxinos & Watson; 1998).

### 10.4.1 Esquema General Cirugía Estereotáxica



### **10.5 Medición de la Peroxidación Lipídica**

Para cuantificar el grado de peroxidación de lípidos, se obtuvo el hipocampo en fresco y se homogenizó en 3 mL de solución salina. De esta solución se toma 1 mL y se le agrega una mezcla de cloroformo/metanol (2:1), se agita vigorosamente durante 10 segundos y se deja reposar 30 minutos para favorecer la separación de fases, acuosa y clorofórmica. Posteriormente la fase acuosa se elimina.

Se tomaron 2 mL de la capa clorofórmica de cada muestra y se le adicionó 200  $\mu$ L de metanol.

La sensibilidad del espectrofotómetro se ajustó a 140 unidades de fluorescencia con un estándar de quinina (100 mg/mL), preparada en ácido sulfúrico 0.05 M.

Para hacer las lecturas con el espectrofotómetro de luminiscencia se ocupó el programa de WinLab programándolo con las siguientes características: Excitación 370 nm, Emisión 430 nm.

Los resultados son expresados como Unidades Relativas de Fluorescencia por mg de proteína. Todos los ensayos se hicieron por duplicado (Ver anexo 16.1).

### **10.6 Medición de la formación de EROs 2,7, DCF diacetato**

Para esta técnica se tomaron 5  $\mu$ L del homogenizado preparado con anterioridad para la técnica de peroxidación lipídica y se colocaron en un vial con una solución amortiguadora de Tris-Hepes relación 18:1.

Para la cuantificación de ROS se utiliza una placa de 96 pozos, se preparó una curva estándar que contiene buffer Tris-Hepes en relación 9:1 + Diclorofluoresceína (DCF). Las muestras se prepararon con 145  $\mu$ L de Tris-Hepes en relación 18:1 + 50  $\mu$ L de DCF-Diacetato + 5  $\mu$ L de la muestra antes preparada. La lectura se realiza en un periodo de una hora (Ver anexo 16.2).

La cuantificación se realizó con el programa GEN5 y los resultados se expresan en nmol de DCF/mg de proteína/h.

## 10.7 Inmunohistoquímica

Los tejidos utilizados para la inmunohistoquímica e histoquímica provienen de animales que se perfundieron vía aorta con paraformaldehído al 4%.

Los cerebros fueron procesados con la técnica histológica ordinaria. Posteriormente el tejido se corta con 5  $\mu\text{m}$  de espesor, se desparafina y se rehidrata para hacer la recuperación antigénica. Se hace inmersión en solución de albúmina y se incuba con el anticuerpo primario correspondiente (HSP60, 70 y 90 monoclonal de ratón y HSP27 policlonal de cabra) (1:100) (Santa Cruz, Co CA). Después las laminillas son lavadas con buffer de fosfatos. Se hace la incubación del anticuerpo secundario conjugado con FITC contra IgG de ratón e IgG de cabra (Jackson InmunoResearch). Para finalizar, las laminillas se montaron con Vectashield-DAPI (Vector) (Ver anexo 16.3).

## 10.8 Histoquímica para Lectinas

Se utilizaron las lectinas de ALL (*Amaranthus leucocarpus*) y MrL (*Macrobrachium rosebergii*) acopladas a biotina, las cuales reconocen GalNaC y ácido siálico respectivamente. Se empleó la misma técnica utilizada para las proteínas de choque térmico.

El reconocimiento de la lectina se realizó indirectamente con extravidina-FITC (Sigma) (Ver anexo 16.4).

## 10.9 Microscopía de Fluorescencia

Para hacer la cuantificación de células marcadas positivamente para proteínas de choque térmico y lectinas, se capturaron imágenes de la región CA1 del hipocampo de 4 animales diferentes, para cada uno de nuestros grupos experimentales (el conteo celular se hace por duplicado). Todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo 40x. Cada campo fue tomado en dos canales (verde para FITC y azul para DAPI).

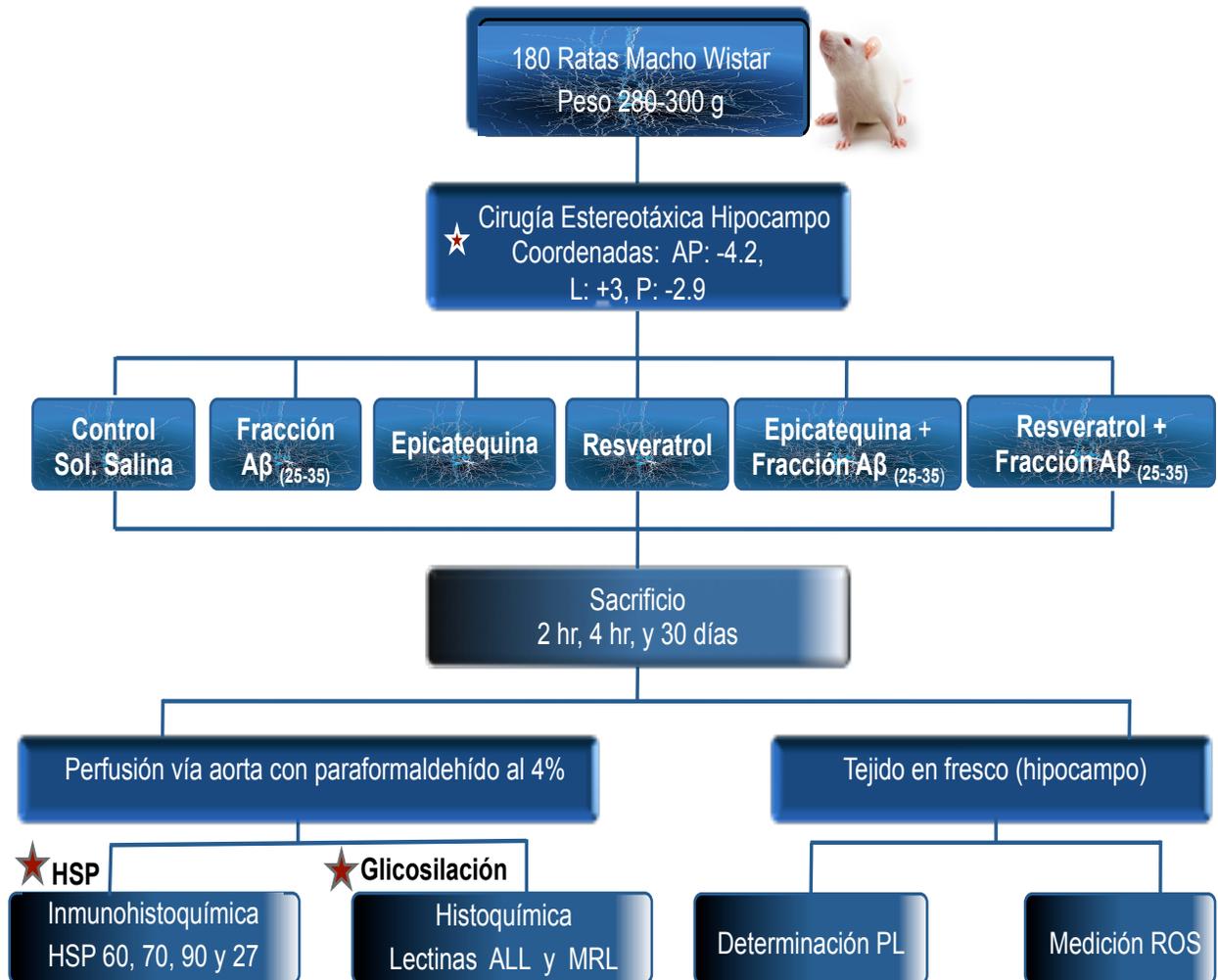
El programa que se utilizó para el análisis fue el IM1000 de Leica.

### **10.10 Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos del análisis bioquímico (PL, ROS) y del conteo celular (marca de proteínas de choque térmico y lectinas) fueron utilizados para hacer un análisis de varianza de una vía, con una post-prueba de Tukey. Las gráficas se realizaron utilizando la media de cada grupo experimental  $\pm$  error estándar de la media, con una diferencia significativa de  $p < 0.05$ .

El programa utilizado para el análisis fue GraphPad Prism versión 5.0b.

## 11. Diseño Experimental



## 12. RESULTADOS

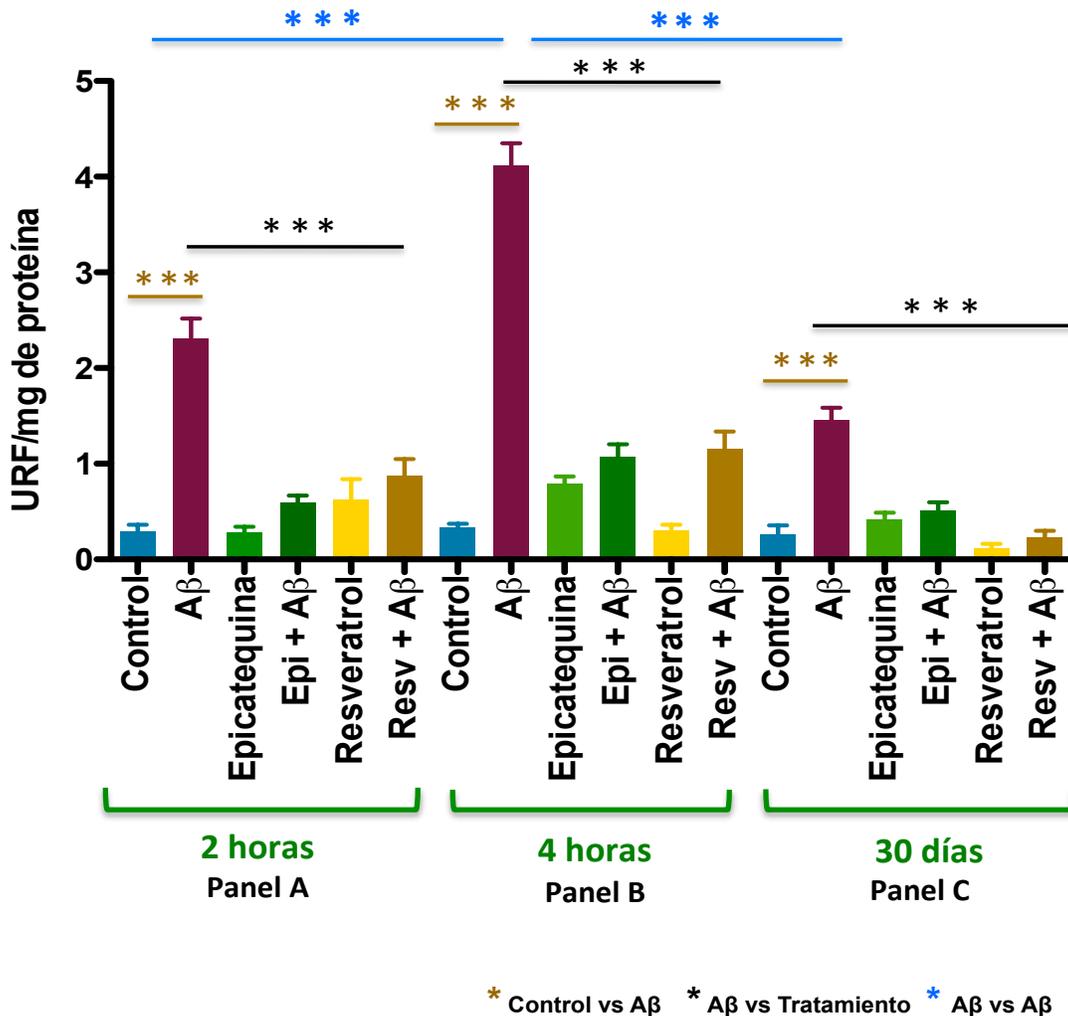
### 12.1 Cuantificación de la Peroxidación Lipídica

Los datos obtenidos de la cuantificación de la peroxidación lipídica se muestran en la figura 15. Los resultados obtenidos muestran un aumento de PL 6.9 veces más respecto al control a las 2 horas de la microinyección del A $\beta$ <sub>25-35</sub>. A las 4 horas obtuvimos la mayor concentración de peroxidación lipídica, 11.4 veces más respecto al control y a los 30 días la PL disminuyó 4.6 veces más respecto al control.

La administración de la epicatequina produjo una disminución del 74% de PL a las 2 y 4 h y un 65% a los 30 días. Por otro lado el resveratrol disminuye el daño en un 63 y 72% a las 2 y 4 horas respectivamente, y un 84% a los 30 días.

Estos resultados demuestran que la fracción A $\beta$ <sub>25-35</sub> es capaz de producir daño a las membranas celulares en tiempos cortos (2 horas) y que el daño puede persistir un mes después de su administración. Esta disminución en el daño no sólo se puede deber al pretratamiento con los flavonoides si no a los sistemas antioxidantes endógenos.

La epicatequina y el resveratrol evitan el daño producido por el péptido A $\beta$ , sin embargo, no se obtuvo un efecto estadísticamente significativo.



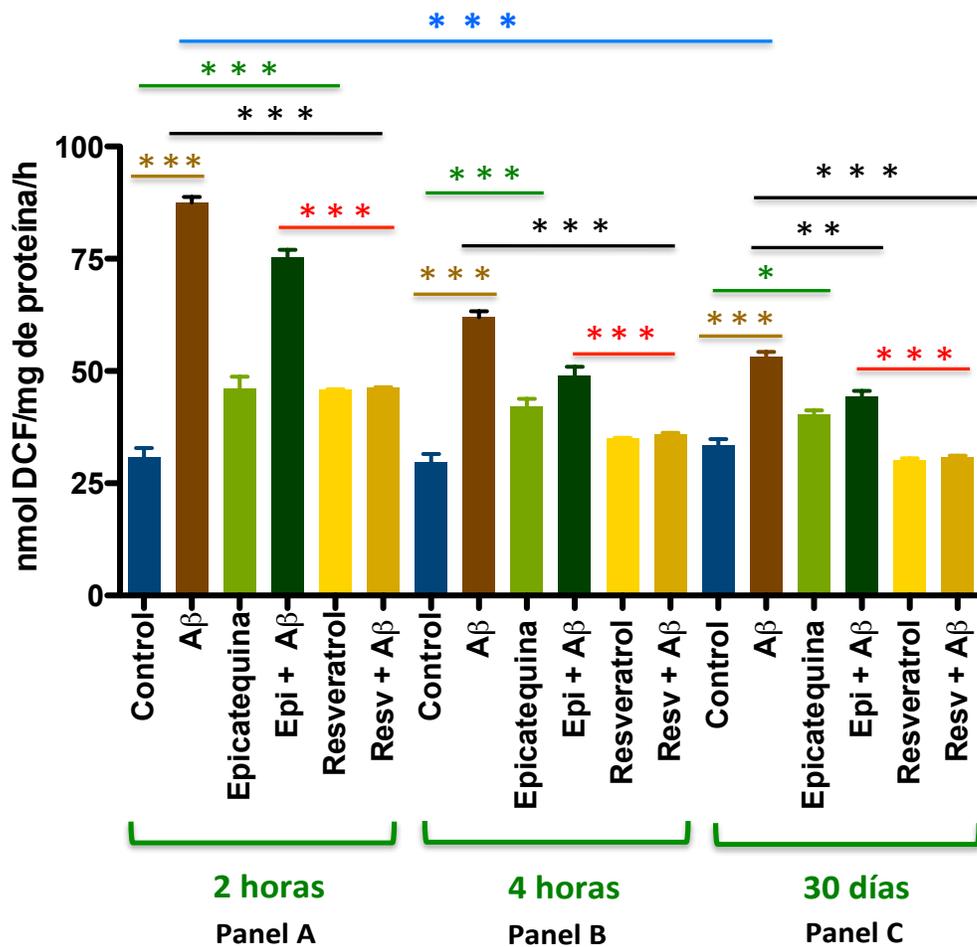
**Figura 15. PL a las 2 horas, 4 horas y 30 días en el hipocampo.** Los datos muestran la media  $\pm$  ESM de las unidades relativas de fluorescencia (UFR) por miligramo de proteína. El panel A muestra el grado PL a las 2 horas. El panel B muestra la PL a la 4 horas, se observa la mayor concentración de peroxidación lipídica respecto a los otros tiempos evaluados. En el panel C se observa disminución de la PL. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una post- prueba de Tukey's,  $P < 0.05$ ,  $N = 6$ .

## 12.2 Concentración de EROs

La figura 16 muestra la concentración de ROS a las 2, 4 horas y 30 días después de la inyección de la fracción A $\beta$  25-35. Podemos observar que a las 2 horas el amiloide  $\beta$  produce un incremento en la concentración de ROS (183%). La concentración mínima de ROS se produjo también a los 30 días, con un porcentaje del 58% respecto al control. A las 4 horas la concentración de ROS aumentó 108%. El pretratamiento con epicatequina disminuye los niveles de ROS en un 13.9% (2 horas), 21% (4 horas) y 16% (30 días). Ahora bien, el tratamiento con resveratrol reduce el concentración de ROS producido por el A $\beta$  25-35 en un 47%, 42% y 41% a las 2, 4 horas y 30 días respectivamente.

En este caso sí se produjo un efecto estadísticamente significativo entre pretratamientos. El resveratrol disminuyó la concentración de especies reactivas a niveles similares a los de los grupos controles (figura 16).

Los resultados bioquímicos obtenidos (PL y ROS) muestran que el A $\beta$  genera incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno que dañan las membranas celulares, lo que produce más EROs y por lo tanto mayor peroxidación lipídica (4 horas, gráfica PL). A los 30 días los sistemas antioxidantes y el tratamiento con la epicatequina y el resveratrol disminuyen la concentración de EROs lo que se traduce en menor daño a las membranas.



\* Control vs Aβ    \* Control vs Tratamiento    \* Aβ vs Tratamiento    \* Aβ vs Aβ  
 \* Tratamiento vs Tratamiento

**Figura 16. Concentración de ROS a las 2 horas, 4 horas y 30 días en el hipocampo de ratas.** Los datos muestran la media  $\pm$  ESM de unidades de diclorofluoresceína (DCF) por miligramo de proteína. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una post- prueba de Tukey's,  $P < 0.05$ ,  $N = 6$ .

## INMUNOFLUORESCENCIA DE HSPs

La inmunolocalización de todas las proteínas de choque térmico y la glicosilación se hizo en la estructura del hipocampo en la región de CA1. Asimismo podemos observar las regiones citoarquitectónicas del hipocampo: CA2, CA3 y giro dentado. (Fig. 1 Estructura del hipocampo). Esta micrografía fue tomada con el objetivo 5X. Se observan los núcleos marcados con DAPI.

### 12.3. Proteína de Choque Térmico 60

La HSP60, es una proteína que se expresa constitutivamente en la mitocondria y en el citosol (tipo de marca recuadro 1.1).

Las imágenes fueron tomadas en dos canales, verde para la HSP60 y azul para los núcleos. Las imágenes mostradas del panel A al F fueron capturados con un objetivo 40X.

**Micrografía A:** Imagen del grupo control. Se observa marca de la HSP60, ya que se expresa de manera endógena.

**Micrografía B:** Grupo inyectado con la fracción  $A\beta_{25-35}$  a las 2 horas. Nótese aumento en la marca para esta proteína, en comparación con el grupo control.

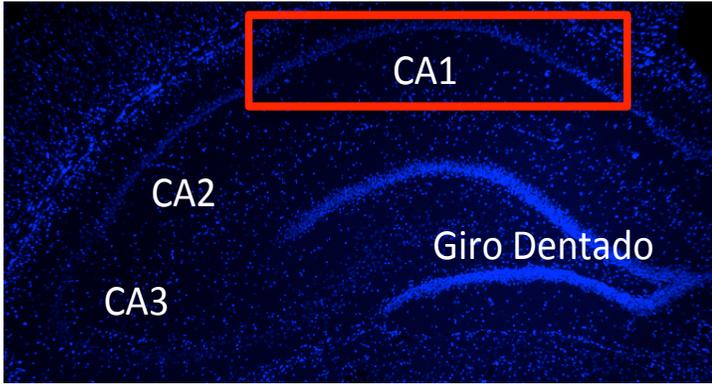
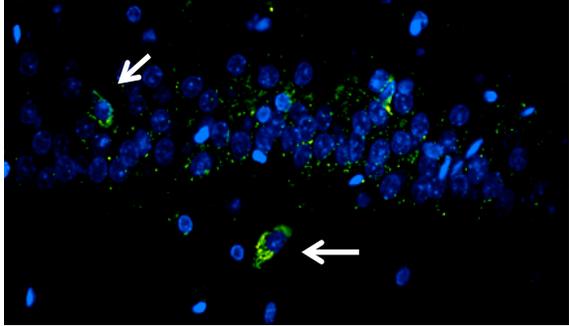
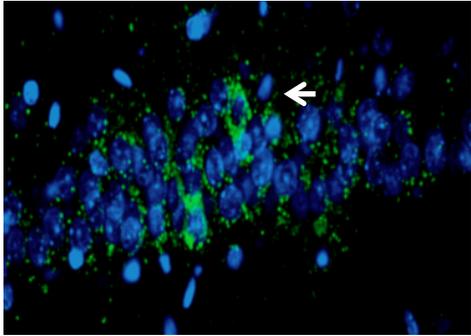
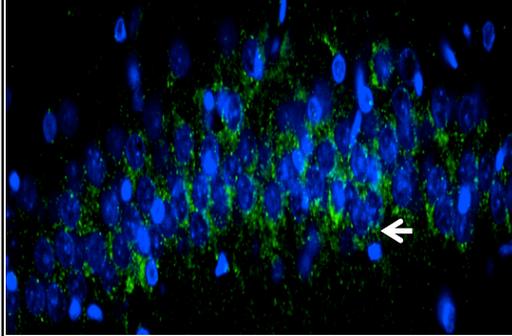
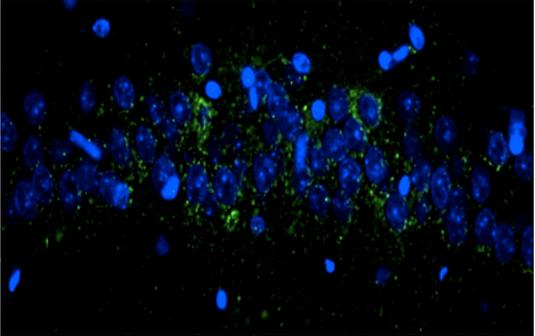
**Micrografía C:** En la inmunofluorescencia se observa mayor inmunoreactividad para la HSP60 a las 4 horas de exposición al péptido.

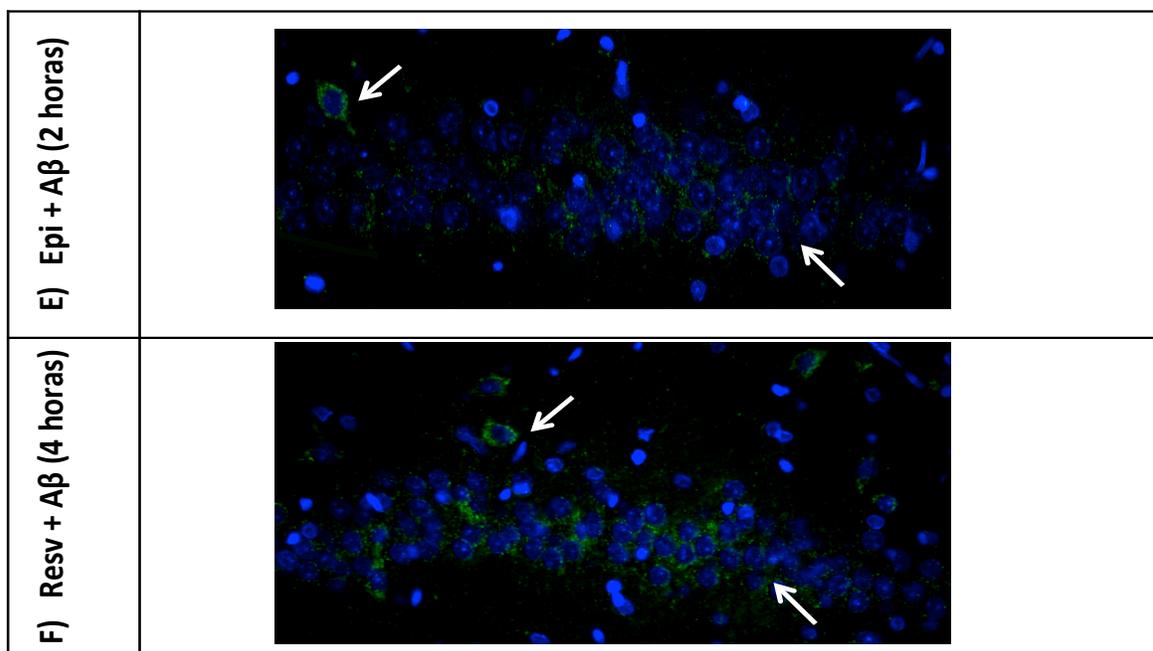
**Micrografía D:**  $A\beta$  a los 30 días. La marca disminuye en comparación del grupo inyectado con  $A\beta$  a las 4 horas.

**Micrografía E y F:** Micrografía de cortes histológicos de los animales a los que se les administró la epicatequina (Epi +  $A\beta$  2 horas) y el resveratrol (Resv +  $A\beta$  4 horas). En comparación a la imagen D, observamos disminución en la marca.

La comparación entre los grupos experimentales queda ejemplificado con la figura 17 para esta proteína de choque térmico.

### 12.3 Proteína de Choque Térmico 60

<p>1. Estructura del Hipocampo</p>			
<p>DAPI</p>  <p>HSP60</p>  <p>1.1</p>	<p>A) CONTROL</p>		
<p>B) A<math>\beta</math> (2 horas)</p>		<p>C) A<math>\beta</math> (4 horas)</p>	
<p>D) A<math>\beta</math> (30 días)</p>			

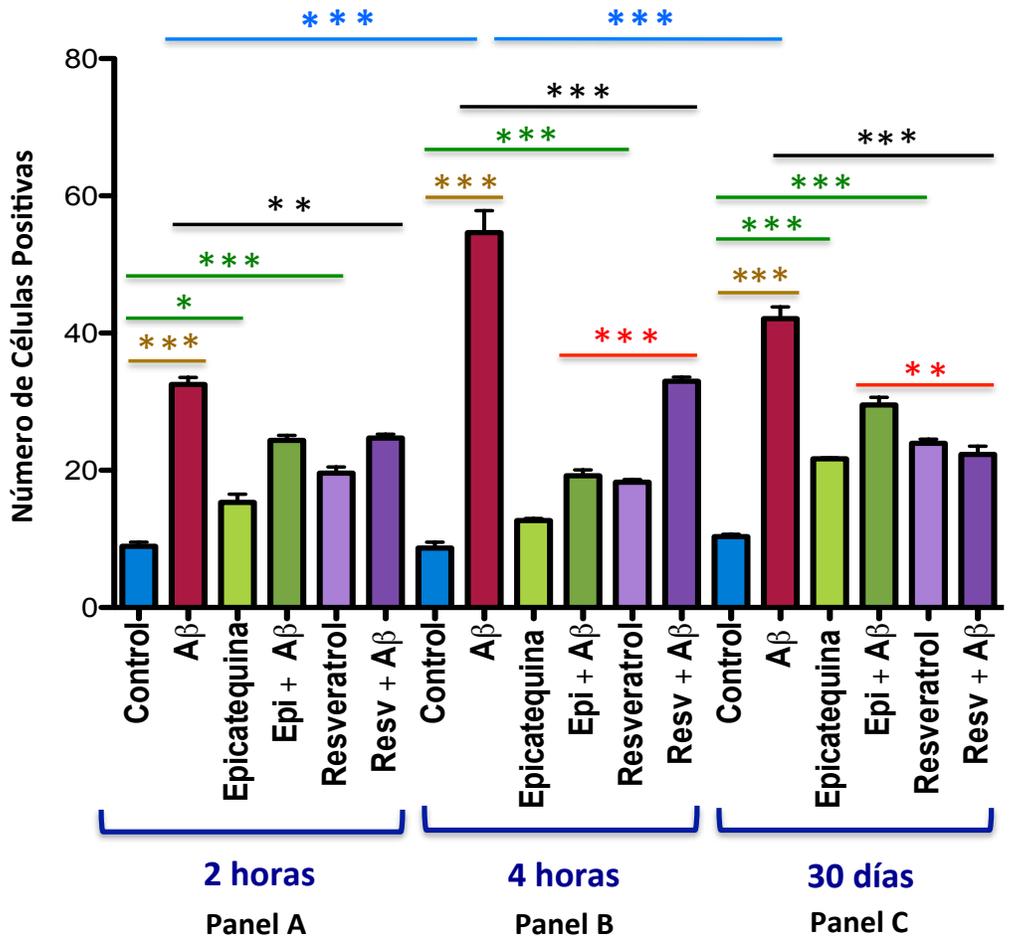


### 12.3.1 Gráfica de la HSP60.

La figura 17 representa el número de células marcadas para la HSP60. Los resultados muestran aumento significativo en el número de células marcadas a las 2, 4 horas y 30 días de la administración del péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> respecto al grupo control. A las 4 horas hubo mayor inmunoreactividad para esta HSP, lo que se puede vincular con el daño bioquímico (PL y ROS) antes reportado.

El tratamiento con resveratrol y epicatequina reduce significativamente la expresión de la HSP60 con respecto al grupo inyectado con el péptido A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> (ver tabla de porcentajes). Sin embargo, no se obtuvieron datos constantes de que tratamiento produce mayor efecto benéfico.

Tiempo	Epi + A $\beta$	Resv + A $\beta$	P<0.05
2 horas	24.9 %	24%	
4 horas	64.8%	39.5%	***
30 días	25.8%	44.19%	**



**Figura 17. Comparación entre grupos para la HSP60.** Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una post- prueba de Tukey's,  $P < 0.05$ ,  $N = 4$ .

## 12.4 Proteína de Choque Térmico 70

La proteína de choque térmico 70 se localiza en el citoplasma, núcleo y mitocondria (Tipo marca 1.2).

Las imágenes fueron tomadas en dos canales, verde para la HSP70 y azul para los núcleos. Las imágenes mostradas del panel A al F fueron capturados con un objetivo 40X.

**Micrografía A:** Micrografía del grupo control. Se observa marca de la HSP70, ya que se expresa de manera endógena. Nótese la citoarquitectura celular de la región CA1, vemos núcleos centrados y organizados.

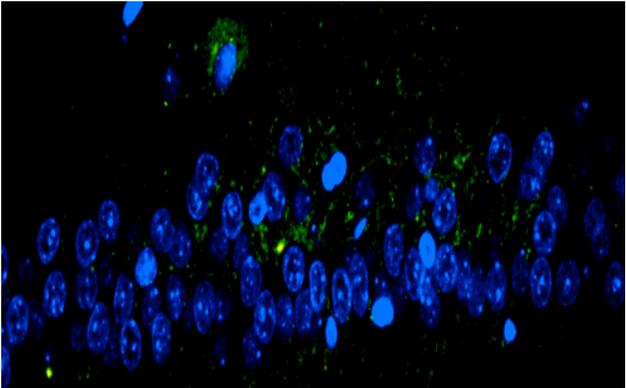
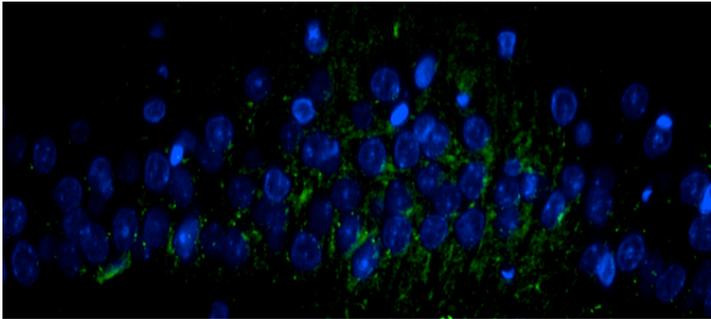
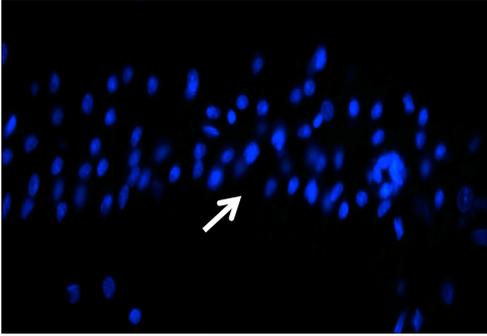
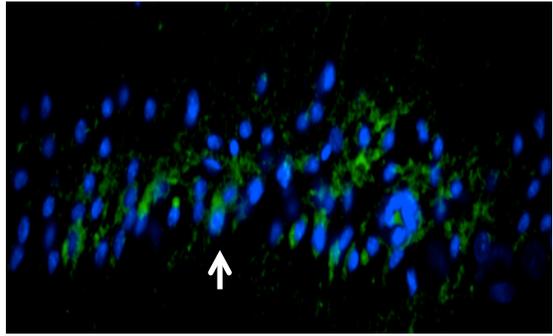
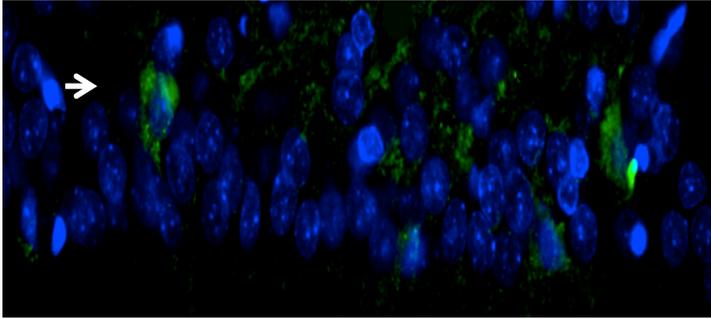
**Micrografía B:** Grupo inyectado con la fracción  $A\beta_{25-35}$  a las 2 horas. Nótese aumento en la marca para esta proteína, en comparación con el grupo control. Se sigue conservando la estructura de la región CA1.

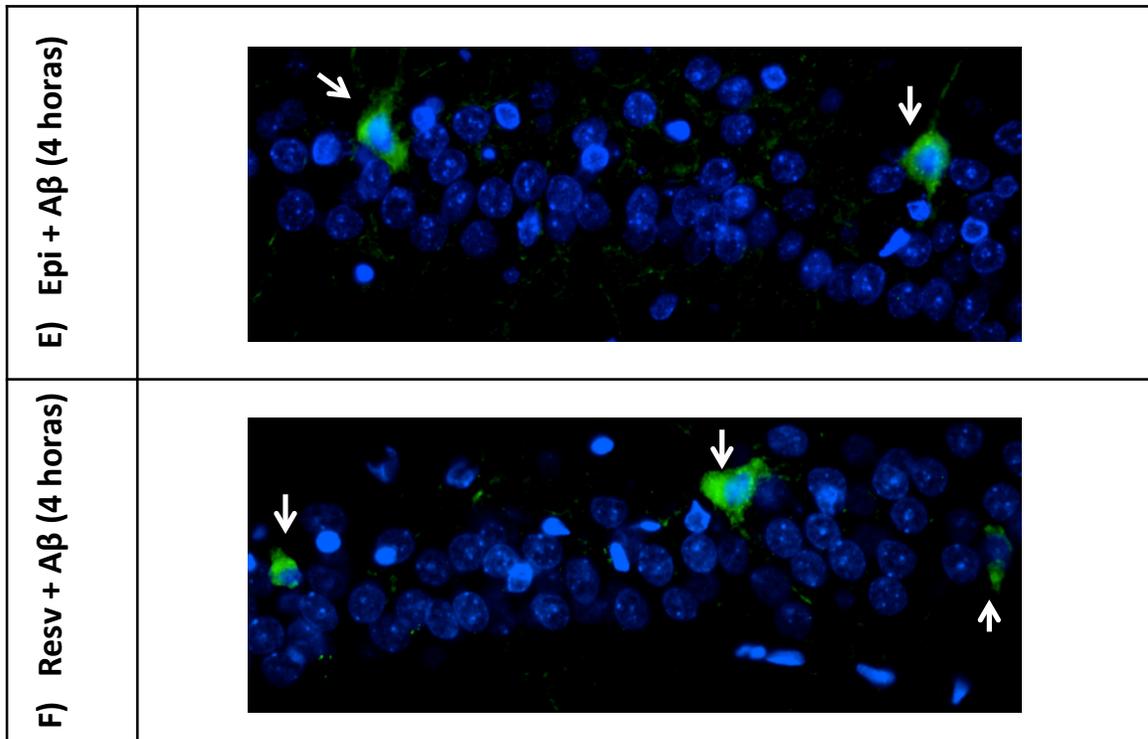
**Micrografía C:** Grupo inyectado con la fracción  $A\beta_{25-35}$  a las 4 horas. En este panel se muestra el mismo campo. La imagen de la izquierda sólo muestra los núcleos marcados con DAPI, con el objetivo de mostrar las modificaciones estructurales: Núcleos que se encuentran en la periferia (ya no están centrados), pérdida de los estratos celulares (espongiosis). La imagen de la derecha muestra la marca para la HSP70. Se observa aumento significativo en el número de células marcadas.

**Micrografía D:** Grupo inyectado con la fracción  $A\beta_{25-35}$  a los 30 días. En este grupo ya no se observa la descomposición en la citoarquitectura reportada a las 4 horas. No obstante, hay aumento significativo en el número de células marcadas.

**Micrografía E y F:** Micrografía de cortes histológicos de los animales a los que se les administró la epicatequina ( $A\beta$  + Epi 4 horas) y el resveratrol ( $A\beta$  + Resv 4 horas). En comparación a la imagen D, observamos disminución en la marca.

# 12.4 Proteína de Choque Térmico 70

 <p>DAPI</p> <p>HSP70</p>	<p>A) Control</p>	
<p>B) Aβ (2 horas)</p>		
<p>C) Aβ (4 horas)</p>		
<p>D) Aβ (30 días)</p>		

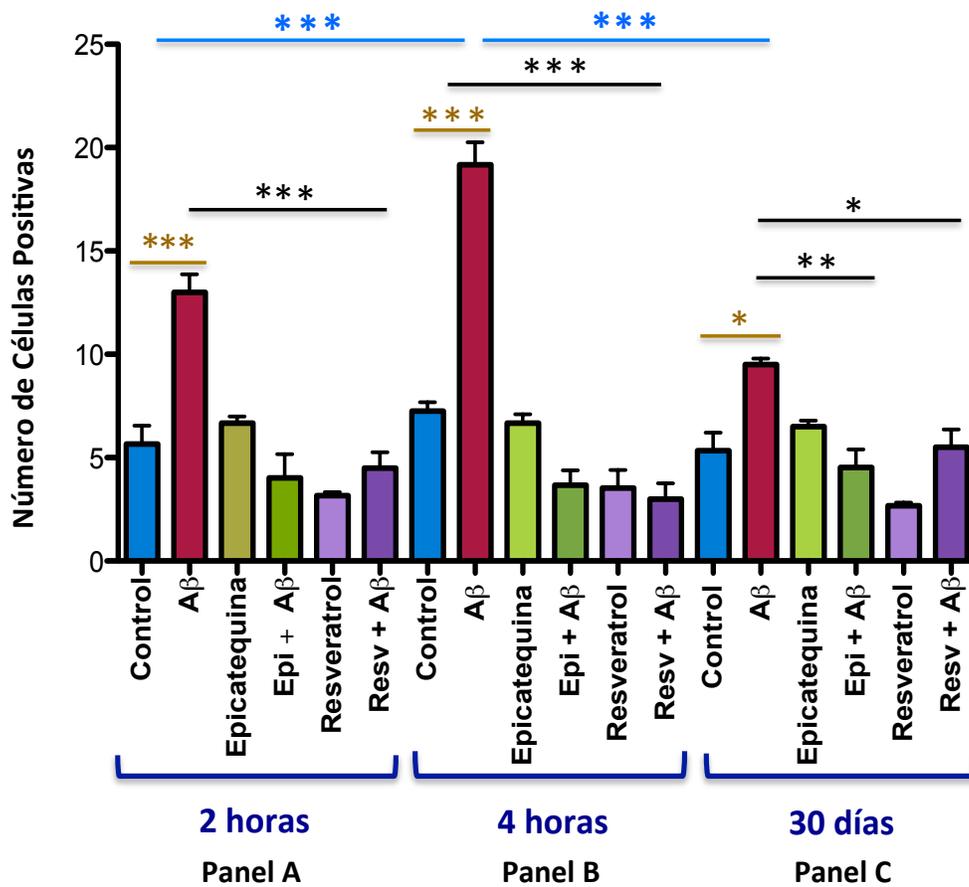


#### 12.4.1 Gráfica de la HSP70.

La figura 18 representa el número de células marcadas para la HSP70. Los resultados muestran aumento significativo en el número de células marcadas a las 2, 4 horas y 30 días de la administración del péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> respecto al grupo control. A las 4 horas hubo mayor inmunoreactividad para esta HSP, pero la expresión no es tan alta como para la HSP60.

El tratamiento con resveratrol y epicatequina reduce significativamente la expresión de la HSP70 con respecto al grupo inyectado con el péptido A $\beta$ <sub>(25-35)</sub>. Los porcentajes entre tratamientos varía, sin embargo, ninguno es estadísticamente significativo (Comparando entre grupos).

Tiempo	Epi + A $\beta$	Resv + A $\beta$
2 horas	69.2%	66.9%
4 horas	81.1%	84.2%
30 días	52.6%	42.1%



\* Control vs Aβ \* Aβ vs Tratamiento \* Aβ vs Aβ

**Figura 18. Comparación entre grupos para la HSP70.** Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una post-prueba de Tukey's,  $P < 0.05$ ,  $N = 4$ .

## 12.5 Proteína de Choque Térmico 90

La proteína de choque térmico 90 se localiza en el citosol y núcleo (Tipo marca 1.3).

**Micrografía A:** Micrografía del grupo control. Se observa marca mínima de la HSP90.

**Micrografía B:** Grupo inyectado con la fracción A $\beta$ <sub>25-35</sub> a las 2 horas. Nótese aumento significativo en la marca para esta proteína, en comparación con el grupo control.

**Micrografía C:** Grupo inyectado con la fracción A $\beta$ <sub>25-35</sub> a las 4 horas. Se observa aumento significativo en el número de células marcadas. Se presenta desarreglo citoarquitectónico.

**Micrografía D:** Grupo inyectado con la fracción A $\beta$ <sub>25-35</sub> a los 30 días. En este grupo hay aumento significativo en el número de células marcadas con respecto a su control. Sin embargo, la inmunoreactividad es menor que a las 2 y 4 horas.

**Micrografía E y F:** Inmunofluorescencia de los animales a los que se les administró la epicatequina (Epi + A $\beta$  30 días) y el resveratrol (Resv + A $\beta$  4 horas). El tratamientos disminuye significativamente la marca positiva para la HSP90.

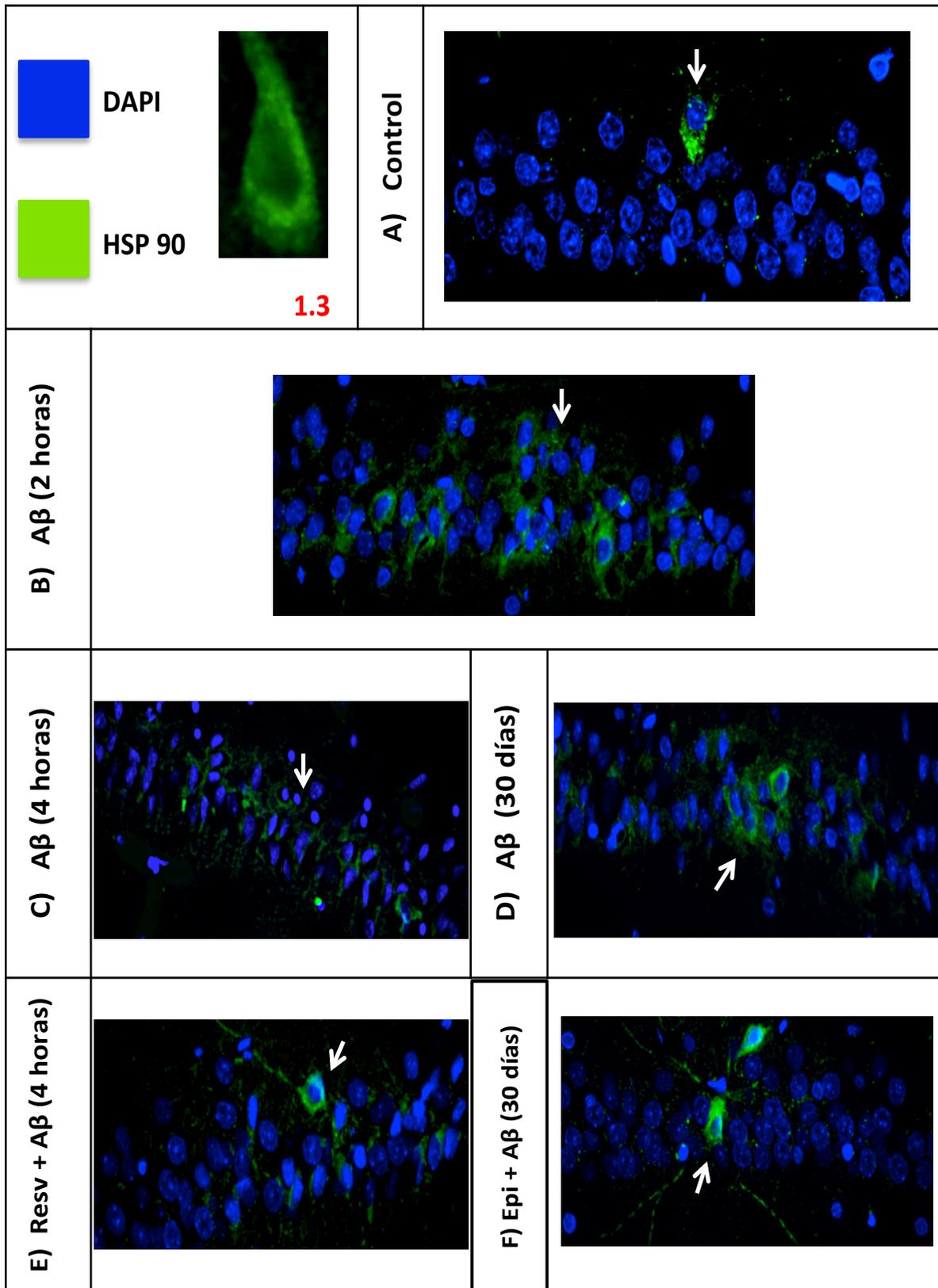
### 12.5.1 Gráfica de la HSP90.

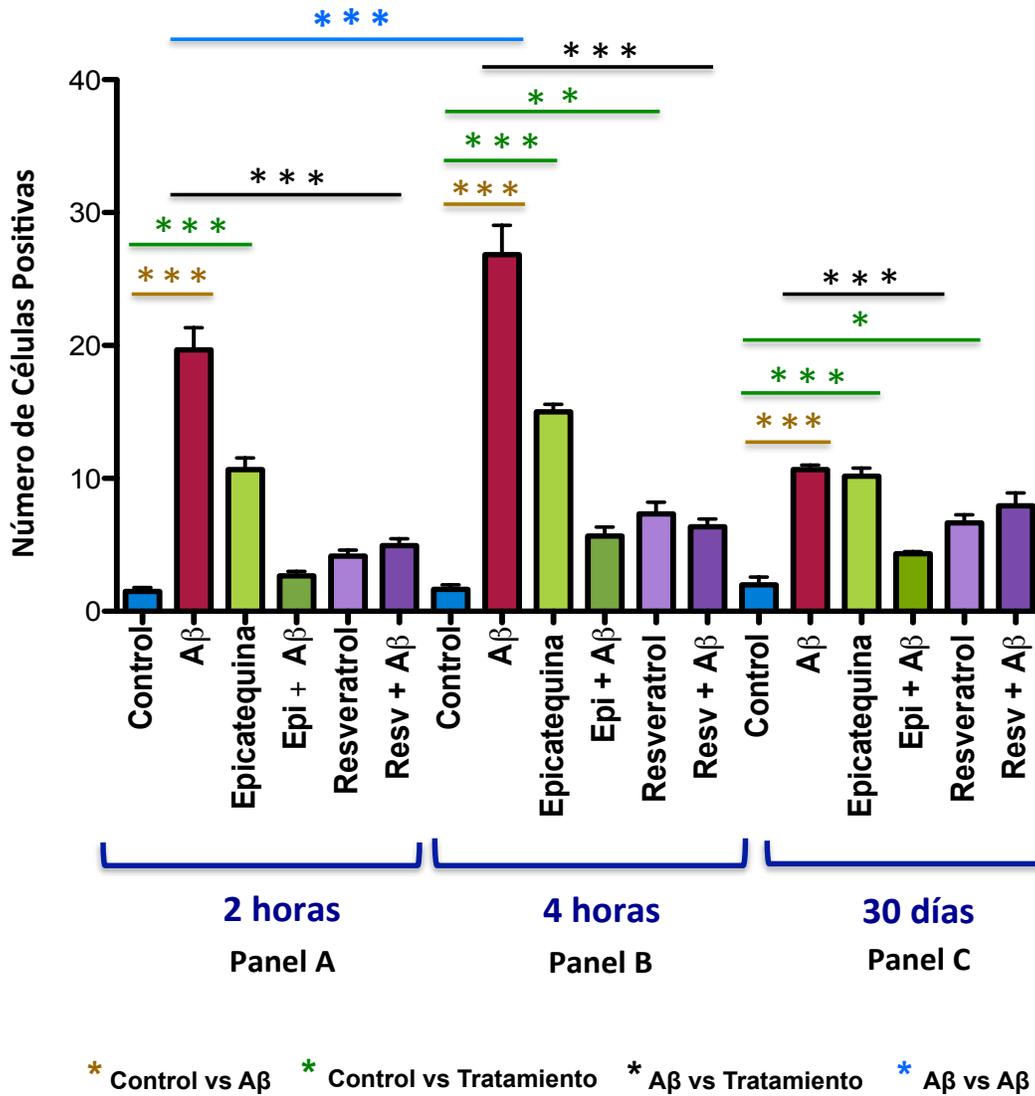
La figura 19 representa el número de células marcadas para la HSP90. Los resultados muestran aumento significativo en el número de células marcadas a las 2, 4 horas y 30 días de la administración del péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> respecto al grupo control. A las 4 horas, se presenta mayor expresión de esta HSP.

El tratamiento con resveratrol y epicatequina reduce significativamente la expresión de la HSP90 con respecto al grupo inyectado con el péptido A $\beta$ <sub>(25-35)</sub>. Entre tratamientos no hay diferencia significativa.

Tiempo	Epi + A $\beta$	Resv + A $\beta$
2 horas	86.7%	75%
4 horas	79%	76.4%
30 días	59.4%	25.4%

## 12.5 Proteína de Choque Térmico 90





**Figura 19. Comparación entre grupos para la HSP90.** Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una post-prueba de Tukey's,  $P < 0.05$ ,  $N = 4$ .

## 12.6 Proteína de Choque Térmico 27

La proteína de choque térmico 27 se localiza en el núcleo y citoplasma (Tipo marca 1.4).

**Micrografía A:** Micrografía del grupo control. Las células marcadas son muy pocas.

**Micrografía B:** Grupo inyectado con la fracción  $A\beta_{25-35}$  a las 2 horas. Nótese aumento en la marca para esta proteína, en comparación con el grupo control.

**Micrografía C y D:** Micrografía de cortes histológicos de los animales a los que se les administró la epicatequina (Epi +  $A\beta$  4 horas) y el resveratrol (Resv +  $A\beta$  4 horas). El tratamiento disminuye significativamente la marca de la HSP27.

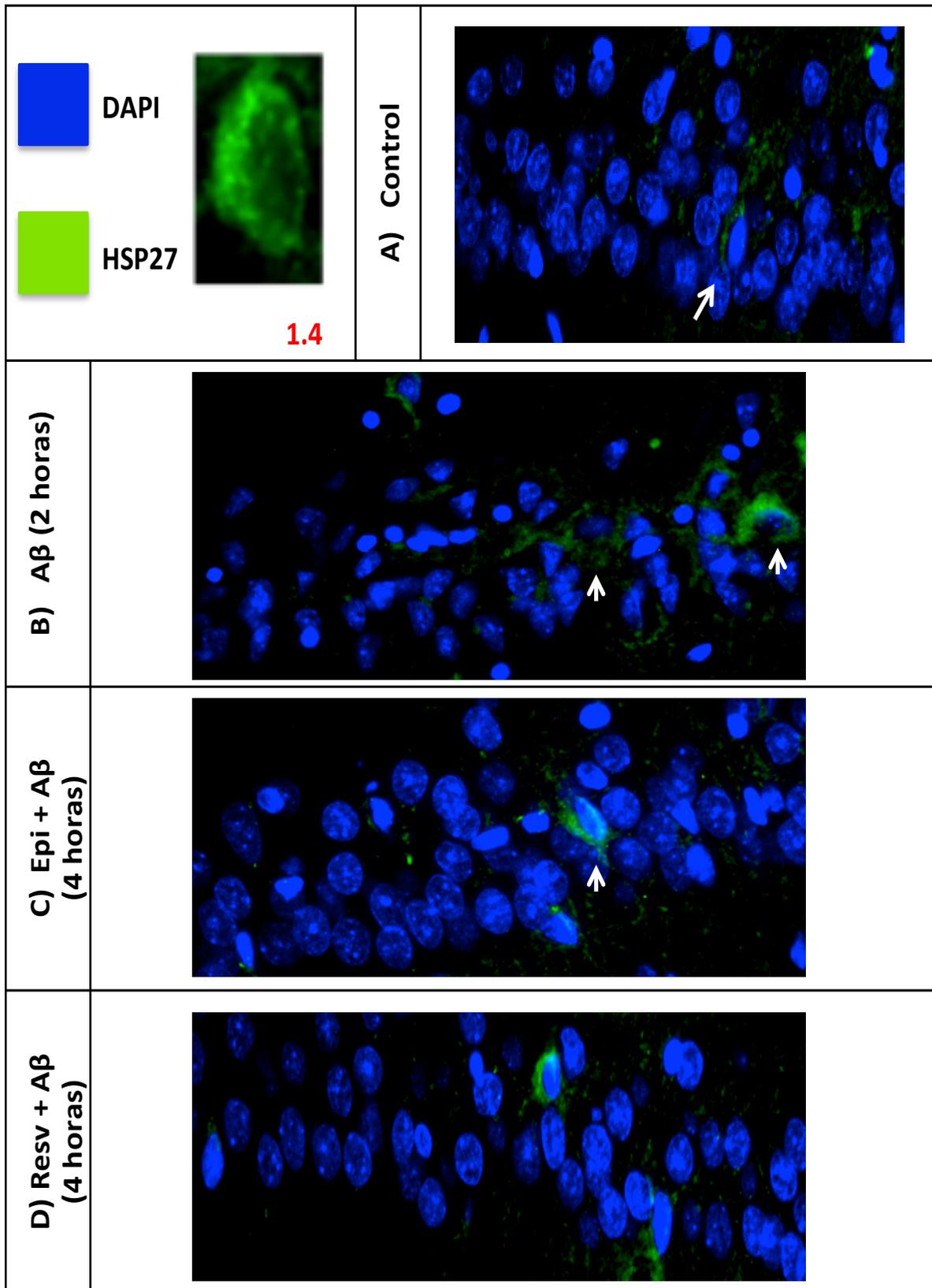
### 12.6.1 Gráfica de la HSP27.

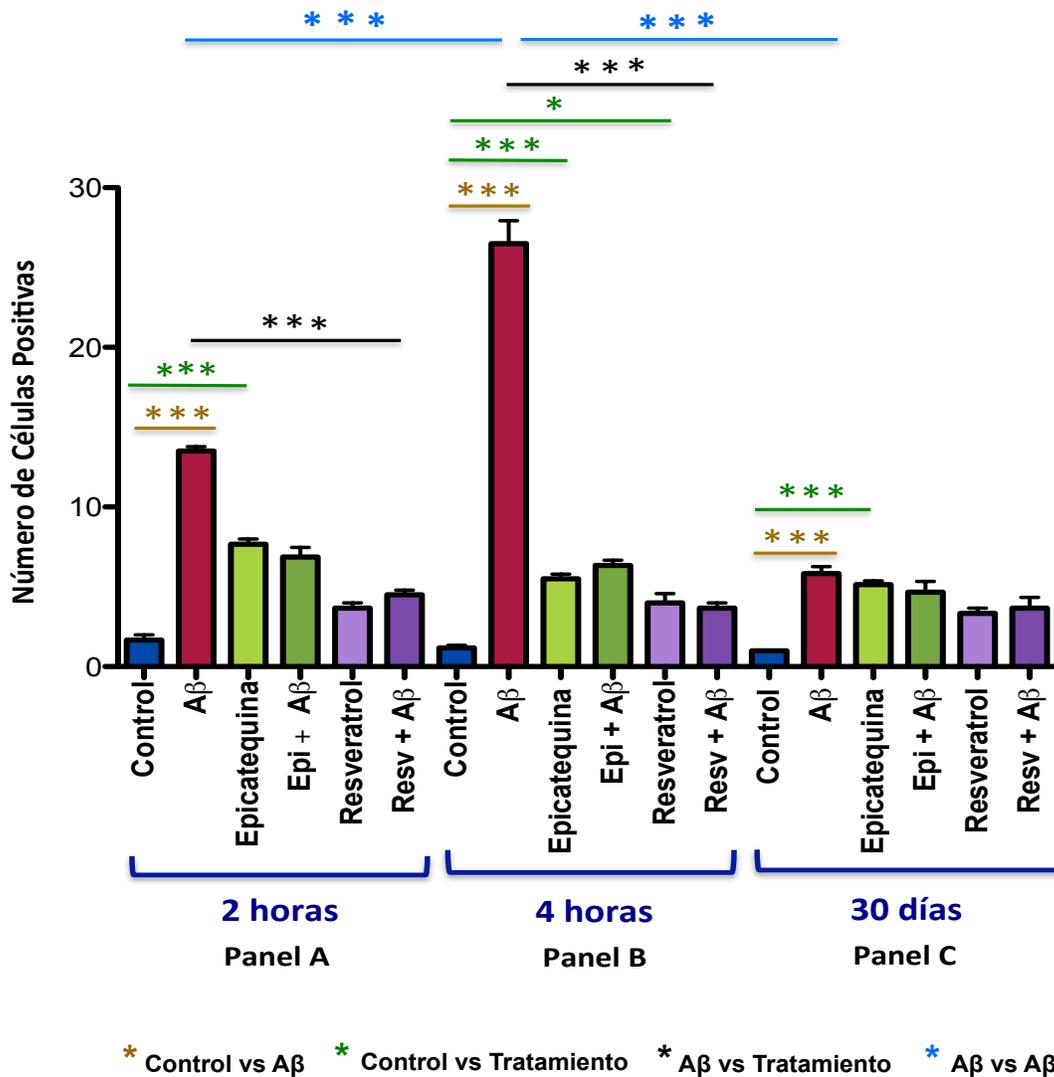
La figura 20 representa el número de células marcadas para la HSP27. Los resultados muestran aumento significativo en el número de células marcadas a las 2, 4 horas y 30 días de la administración del péptido  $A\beta_{25-35}$  respecto al grupo control.

El tratamiento con resveratrol y epicatequina reduce significativamente la expresión de la HSP27 con respecto al grupo inyectado con el péptido  $A\beta_{(25-35)}$ . Entre tratamientos no hay diferencia significativa.

Tiempo	Epi + $A\beta$	Resv + $A\beta$
2 horas	49.6%	67%
4 horas	76.2%	86%
30 días	18.9%	36.2%

## 12.6 Proteína de Choque Térmico 27





**Figura 20. Comparación entre grupos para la HSP27.** Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una post-prueba de Tukey's, P<0.05, N=4.

## 12.7 ALL (*Amaranthus leucocarpus*)

Lectina *Amaranthus leucocarpus*. Se ubica en membrana y se puede estar sintetizando en el aparato de Golgi (Tipo marca 1.5).

Las imágenes fueron tomadas en dos canales, verde para la lectina ALL y azul para los núcleos.

**Micrografía A:** Micrografía del grupo control. Se observa marca alrededor de la membrana para esta lectina.

**Micrografía B:** Grupo inyectado con la fracción  $A\beta_{25-35}$  a las 2 horas. El número de marca disminuye significativamente en comparación al grupo control.

**Micrografía C:** Grupo inyectado con la fracción  $A\beta_{25-35}$  a los 30 días. Hay aumento en la marca en comparación de las 2 y 4 horas. Sin embargo hay disminución significativa respecto a su control (ver gráfica G).

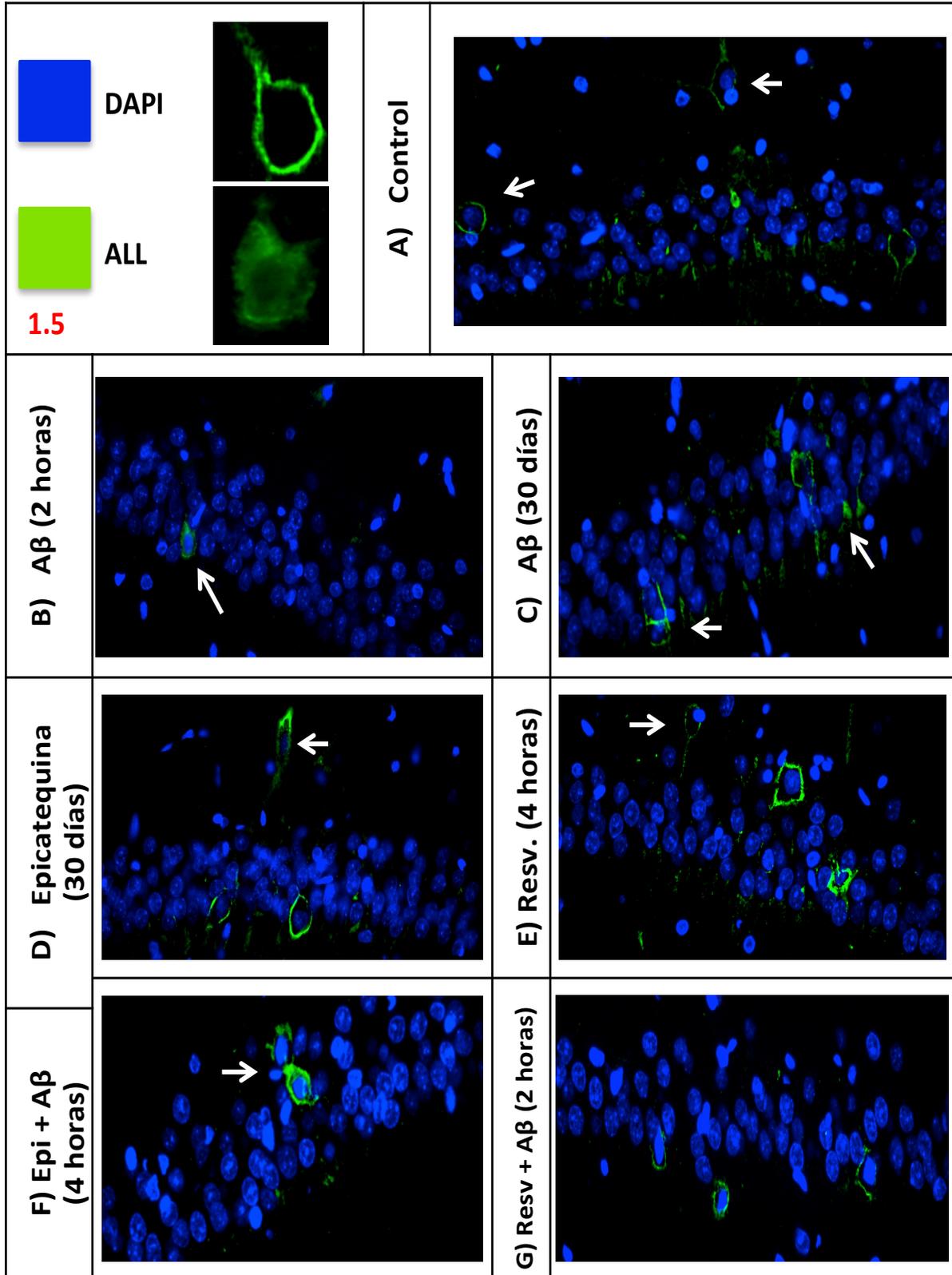
**Micrografía D y E:** Grupo al que se le administró epicatequina (30 días) y resveratrol (4 horas). Nótese que los grupos administrados sólo con el tratamiento tienen expresión similar a los controles para esta lectina (todos los tiempos).

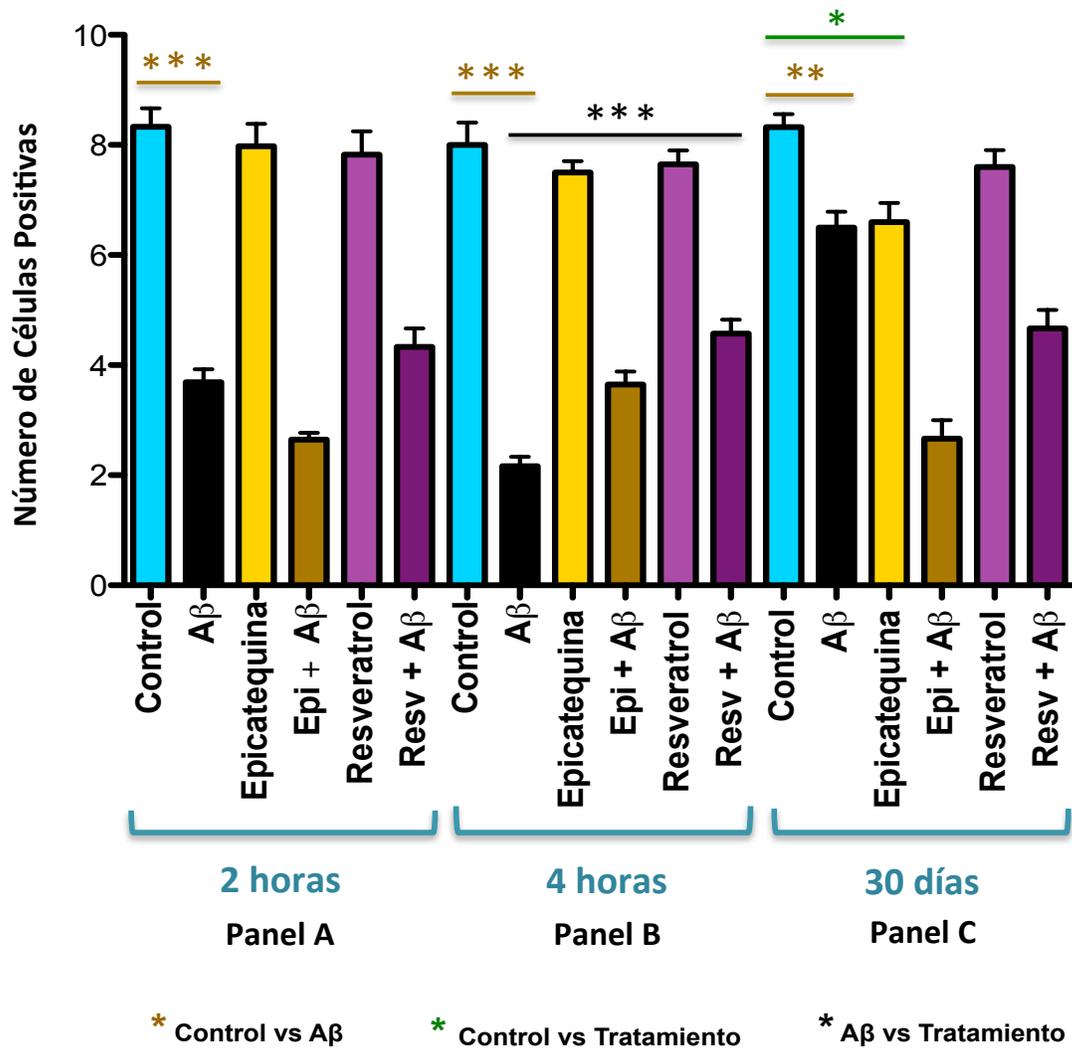
**Micrografía F y G:** Grupo Epicatequina +  $A\beta$  a las 4 horas y Resv +  $A\beta$  a las 4 horas. Sólo a las 4 horas se obtuvo aumento significativo en la expresión de esta lectina.

### 12.7.1 Gráfica de lectina ALL.

La figura 21 representa el número de células marcadas para la lectina ALL. Los datos muestran disminución significativa en el número de células marcadas en un 55%, 73% y 21% a las 2, 4 horas y 30 días, después de la administración del péptido  $A\beta_{25-35}$ . La marca celular en los grupos a los que se les administró epicatequina y resveratrol es similar a los grupos controles. Sin embargo, el tratamiento no aumentó la expresión de la lectina ALL. Sólo se presentó diferencia significativa a las 4 horas.

## 12.7 ALL (*Amaranthus leucocarpus*)





**Figura 21. Comparación entre grupos para la lectina ALL (*Amaranthus leucocarpus*)**  
 Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una post- prueba de Tukey's, P<0.05, N=4.

## 12.8 MrL (*Macrobrachium rosebergii*)

Lectina *Macrobrachium rosebergii*. Se ubica en membrana (Tipo marca 1.6).

**Micrografía A:** Micrografía del grupo control. A diferencia de la lectina ALL, los grupos controles presentan muy poca marca.

**Micrografía B:** Grupo inyectado con la fracción  $A\beta_{25-35}$  a las 2 horas. El número de células marcadas aumenta significativamente en comparación al grupo control.

**Micrografía C y D:** Grupo inyectado con la fracción  $A\beta_{25-35}$  a las 4 horas. El panel C muestra el tipo marca para esta lectina. El panel D muestra el merge de los 2 canales (ALL y DAPI). En la inmunofluorescencia se observan los mismo cambios estructurales mencionados en las micrografías de las HSP, lo que aumenta la inmunoreactividad para esta lectina.

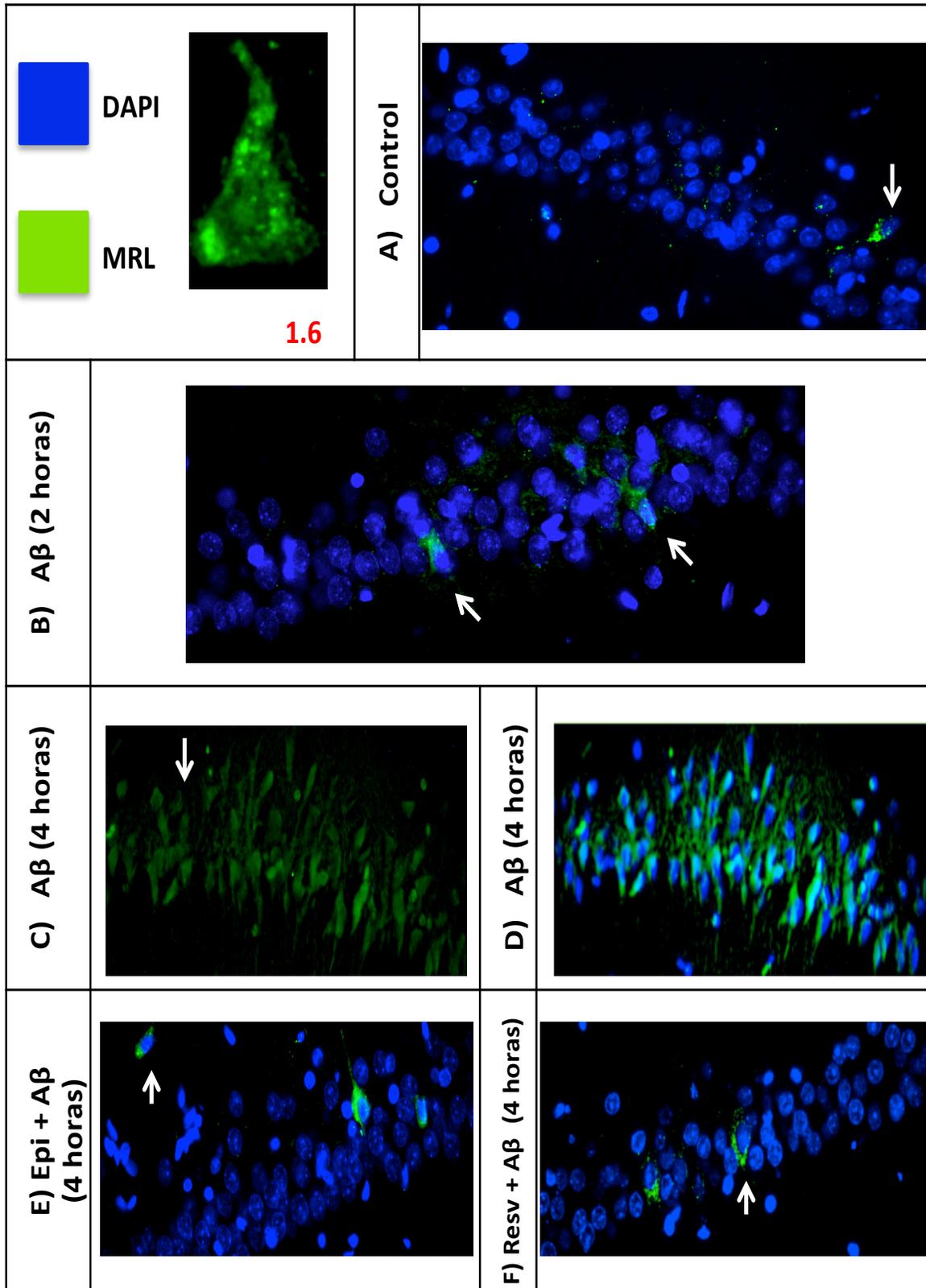
**Micrografía E y F:** Grupo Epicatequina +  $A\beta$  a las 4 horas y Resv +  $A\beta$  a las 4 horas. Se ve disminución significativa en la marca, similar al grupo control.

### 12.8.1 Gráfica de lectina MrL.

La figura 22 representa el número de células marcadas para la lectina MrL. Los datos muestran aumento significativo en el número de células marcadas a las 2 horas (1.4 veces), 4 horas (19.6 veces) y 30 días (1.3 veces) de la administración del péptido  $A\beta_{(25-35)}$  respecto al grupo control. El tratamiento disminuye significativamente el número de células marcadas tanto para la epicatequina como para el resveratrol. Comparando la acción de los tratamientos, no hay diferencia significativa entre ellos (ver tabla de porcentajes).

Tiempo	Epi + $A\beta$	Resv + $A\beta$
2 horas	60.3%	68.2%
4 horas	94%	95%
30 días	61.6%	-

## 12.8 MRL (*Macrobrachium rosebergii*)



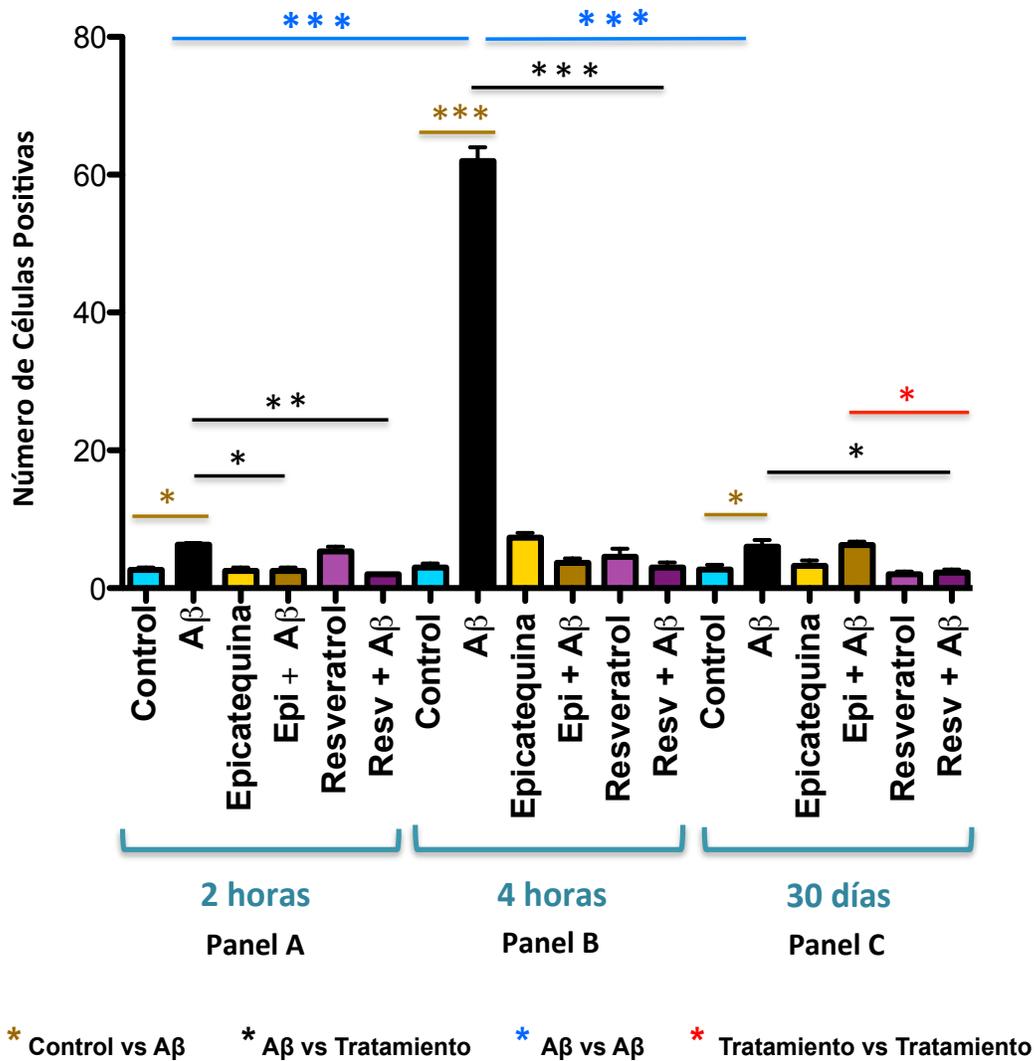


Figura 22. Comparación entre grupos para la lectina MrL (*Macrobrachium rosebergii*) Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una post- prueba de Tukey's, P<0.05, N=5.

## 13. DISCUSIÓN

La fracción  $A\beta_{(25-35)}$  generó aumento significativo en la concentración de especies reactivas de oxígeno y en los niveles de peroxidación de lípidos en el hipocampo, lo que refuerza un ambiente oxidante. El estrés intracelular estimuló la activación de las proteínas de choque térmico y modificó los patrones de glicosilación. La administración de la epicatequina y el resveratrol coadyuvan a restablecer la homeostasis celular, lo que se refleja en la concentración de las HSP.

### 13.1 Fracción $A\beta_{(25-35)}$ y Estrés Oxidante

El estrés oxidante se propone como un factor importante en la patogénesis de la EA (Axelsen *et al.*, 2011). Se han propuesto diversos mecanismos de cómo el péptido amiloide  $\beta$  contribuye a este evento.

La fracción  $A\beta_{(25-35)}$  se agrega en la membrana celular alterando la estructura de las capas lipídicas (aumento de lipoperoxidación a las 2 y 4 horas). Para poder lograrlo, es necesario que el  $A\beta$  se agregue para poder ejercer su función neurotóxica e interactuar con la membrana celular. Como fue mencionado anteriormente, esta interacción no es un evento al azar, sino que es llevado a cabo mediante los receptores RAGE. Estudios reportan que concentraciones micromolares de este péptido causan oxidación de los lípidos de membrana, lo que puede causar alteración de la membrana neuronal y en última instancia lisis celular (Ono *et al.*, 2006).

Las alteraciones en la membrana celular inducen disfunción en los canales iónicos y transportadores, lo que podría afectar la regulación de  $Ca^{2+}$  neuronal. El aumento intracelular de este ión contribuye a que las neuronas sean más vulnerables a los estímulos ambientales y se pueda activar la cascada de señalización pro-apoptótica (Tillement *et al.*, 2011). Un mecanismo propuesto por la alteración del gradiente de calcio, es cuando la enzima calcio-ATPasa pierde su actividad catalítica, debido a la oxidación de sus grupos tioles (Viana *et al.*, 2012).

Asimismo, la neurotoxicidad del A $\beta$  incrementa el estrés oxidante a través de receptores NMDA (Mattson, 2008). Los productos de la peroxidación lipídica pueden reaccionar con estos receptores. Por ejemplo, el 4HNE puede alterar el transportador de glutamato (GLT1), cuya función es regular los niveles de este aminoácido dentro de la célula. Una excesiva liberación de glutamato permite la entrada de Ca<sup>2+</sup> que se une a la calmodulina que activa a la óxido nítrico sintasa (NOS), encargada de catalizar la formación de óxido nítrico. En presencia del ión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el NO forma peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que daña a las proteínas (Azizi & Mirshafiey, 2012). Se comprobó que la neurotoxicidad provocada por aminoácidos excitatorios (glutamato) y por el A $\beta$  se inhibe en medios de cultivo deficientes en calcio. (Mattson, 2008).

Otra fuente importante de especies reactivas de oxígeno, es la unión del A $\beta$  con metales de transición. En cerebros de pacientes con EA, en particular corteza, amígdala e hipocampo hay incremento de 3 a 5 veces en los niveles de iones metálicos (Al<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>) en comparación con los grupos controles (Manzano *et al.*, 2006).

Cuando este péptido se une con Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ó Zn<sup>2+</sup> se favorece su agregación y se incrementa la producción de OH $\bullet$ . Por otro lado, la fracción A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> en presencia de hierro puede disparar eventos apoptóticos. (Bharathi *et al.*, 2006). Esto condujo a la teoría de que el A $\beta$  es una metaloproteína que puede unirse a estos metales por medio de las histidinas que forman parte de su estructura. Sin embargo, en nuestro modelo se carece de estas histidinas, pero la metionina 35 puede interaccionar con estos metales (Manzano *et al.*, 2006).

El péptido A $\beta$  también puede activar a la microglía que libera productos citotóxicos (EROs, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $\bullet$ NO) que provocan daño y muerte neuronal; ya que funcionan como mediadores de procesos inflamatorios. El incremento excesivo de óxido nítrico y EROs puede inhibir la respiración mitocondrial en la neuronas, estimulando a los receptores de NMDA (Azizi & Mirshafiey, 2012).

Los mecanismos mencionados, describen como el A $\beta$  genera toxicidad a nivel extracelular, no obstante, este péptido puede internalizarse y acumularse, ocasionado impacto en los organelos celulares. El A $\beta$  tiene la capacidad de formar canales en la bicapa lipídica. Su interacción con componentes de la membrana le permiten formar canales multiméricos con estructura de poro central. La formación de estos canales puede ser irreversible y no son selectivos. Estos canales han sido descritos en neuronas, liposomas y fibroblastos (Tillement *et al.*, 2011).

El A $\beta$  intracelular también puede dañar las membranas de los organelos celulares: mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, etc. Lo que genera más peroxidación lipídica y especies reactivas.

El A $\beta$  intracelular puede interaccionar de manera directa con la mitocondria ya que tiene la habilidad de atravesar la membrana por medio de translocadores, el TOM40 (translocase of the outer membrane) y TIM22 (translocase of the inner membrane). Esto le permite interaccionar con las proteínas que forman parte del poro de transición, lo que incrementa la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

El poro de transición está acoplado a la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplasmático (RE). El A $\beta$  también interacciona con este organelo, incrementando el flujo de calcio intracelular, lo que contribuye a la apertura del poro de transición (MPTP). Esto se vincula con la liberación del citocromo c y la disminución de ATP (Tillement *et al.*, 2011).

Finalmente, el A $\beta$  dentro de las neuronas puede alterar el metabolismo de la APP. El estrés oxidante incrementa la actividad de la  $\beta$  secretasa y sobreexpresa la presenilina 1, favoreciendo la producción del péptido y su consecuente agregación (Rosenblum, 2002).

Por lo tanto, la generación de EROs que se observó desde las 2 horas de administración del A $\beta_{(25-35)}$  en el hipocampo se puede deber a cualquiera de los

mecanismos antes descritos. No obstante, qué sucede con los sistemas antioxidantes de la célula.

Se ha comprobado que el A $\beta$  daña una amplia gama de proteínas. El grupo de investigación de Butterfield's ha identificado la oxidación de 16 proteínas vinculadas con el metabolismo oxidante, la función del proteosoma y los sistemas antioxidantes: ATPasa, glutamato deshidrogenasa, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del proteosoma, la glutatión transferasa, SOD, entre otras (Zhiyou *et al.*, 2011). Por ejemplo, el 4HNE inhibe la actividad de la glutatión-S-transferasa (GST), que se encarga de metabolizar a los lipoperóxidos en alcoholes.

En consecuencia, la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas pueden activar o disparar más eventos relacionados con el estrés oxidante. Esto explicaría por qué a las 2 y 4 horas el incremento de EROs no puede ser compensado por los sistemas antioxidantes. A los 30 días el daño generado por la fracción A $\beta_{(25-35)}$  es significativamente menor, lo que se puede deber a el efecto conjunto de los sistemas antioxidantes endógenos y la administración de la epicatequina y resveratrol.

Todos los mecanismos neurotóxicos antes explorados promueven un ambiente oxidante, que altera la función y estructura celular. Estos cambios estructurales los observamos a las 4 horas de la administración de la fracción A $\beta_{(25-35)}$ , donde no sólo hay cambios a nivel bioquímico, sino que hay alteraciones en la citoarquitectura del hipocampo (espongiosis y desorganización).

Los cambios en la homeostasis celular pueden activar a las proteínas de choque térmico.

### **13.2 HSP y Estrés Oxidante**

Las especies reactivas tienen la capacidad de activar proteínas sensoras de estrés oxidante. Se ha propuesto una amplia gama de proteínas que activan factores de transcripción que regularán genes blanco. Algunas de ellas son las proteínas

cinasas C (PKC) que se activan en presencia de  $H_2O_2$ , factores de transcripción como P53, Akt, JNK, NF- $\kappa$ B, Nrf2, entre otros. En este grupo se propone la activación del factor de choque térmico (HSF), que como ya mencionamos activa a las proteínas de choque térmico (Konigsberg, 2008).

Los cambios neurotóxicos que se producen por la fracción  $A\beta_{(25-35)}$  pueden promover el cambio conformacional del HSF. Como ya se mencionó, este factor se encuentra como monómero inactivo en el citoplasma, la HSP90 que forma parte de su complejo se disocia del monómero para permitir el cambio conformacional (se trimeriza). Ya trimerizado puede ser exportado al núcleo donde se une a la cadena de ADN para la activación transcripcional de las proteínas de choque térmico (Stetler *et al.*, 2010).

Las HSPs son activadas como mecanismo neuroprotector de la célula. En este trabajo, nosotros demostramos aumento en los niveles de EROs y peroxidación lipídica desde las 2 horas de administración del  $A\beta_{(25-35)}$ . Esto se puede correlacionar con el incremento de todas las HSPs (60, 70, 90 y 27) en el mismo periodo de tiempo (Anckar & Sistonen, 2011).

Cabe destacar que la activación de las HSPs puede ser directa o indirectamente. Es decir, EROs puede oxidar grupos tioles de las proteínas y inducir el cambio conformacional o activar otras proteínas que las activen, por ejemplo el factor Nrf2 (factor de supervivencia) promueve a estas chaperonas (Konigsberg, 2008).

En eucariotes se han descrito 2 sensores de cambio redox; la Hemooxigenasa 1 (HO-1) también nombrada como HSP32 y la HSP72. En condiciones fisiológicas, ambas proteínas se encuentran en niveles muy bajos. En presencia de estrés, estas proteínas se activan, lo que podría inducir el cambio conformacional del HSF-1. Otro factor importante en la activación de estos sensores son los niveles de glutatión, ya que su disminución induce su activación (Kalmar & Greensmith, 2009).

Modelos *in vivo* e *in vitro* muestran que cada una de las proteínas de choque térmico desempeñan funciones específicas en las células en presencia de estrés oxidante:

La HSP70 y 90 al ser chaperonas de plegamiento, previenen la agregación del péptido A $\beta$  y promueven su degradación. Se vincula directamente con el mantenimiento de la solubilidad.

En un modelo transgénico de *Caenorhabditis elegans*, se observó aumento en la expresión de la HSP70 y que esta puede interactuar con el A $\beta$  intracelular. Se especula que esta chaperona puede secuestrar a este péptido, para evitar su interacción con otras proteínas (Magrané *et al.*, 2004).

La HSP70 no sólo es una proteína intracelular, sino que también se puede expresar extracelularmente donde puede activar a la microglia, producir y liberar citocinas y estimular la fagocitosis. Existe evidencia de que puede ser internalizada e importada al citoplasma y núcleo para promover la supervivencia celular (Turturici *et al.*, 2011). Esto lo puede llevar a cabo porque interfiere con la cascada de muerte celular (Li *et al.*, 2007).

Asimismo, esta HSP participa en procesos inflamatorios. Existe evidencia de que hay una regulación complementaria entre la HSP70 y mediadores inflamatorios como COX2 y NF $\kappa$ B. La sobreexpresión de la HSP70, reduce los niveles de COX2 y la producción de óxido nítrico; su unión con NF $\kappa$ B permite su inhibición y por lo tanto su translocación al núcleo, donde activa la transcripción de otros mediadores inflamatorios (Kalmar & Greensmith, 2009).

Aunado a las funciones mencionadas esta HSP, así como la HSP27 y 60 pueden evitar la liberación del citocromo C en la mitocondria, lo que evitaría la formación del apoptosoma, la activación de caspasas y por lo tanto la muerte celular. La actividad del complejo IV de la mitocondria es inhibido por la toxicidad del péptido A $\beta$ , se ha demostrado que la HSP60 puede inhibir este daño (Veereshwarayya *et al.*, 2006).

Si no se evita la liberación del citocromo C, la HSP27 puede inhibir a la caspasa 9 y 3 (Vidyasagar *et al.*, 2012).

La función principal de la HSP27 es auxiliar a las proteínas mal plegadas durante eventos de estrés oxidante. Esto se debe a su habilidad para resguardar al glutatión en su forma reducida y en condiciones de estrés liberarlo para restablecer la homeostasis redox, es decir, como agente antioxidante (Vidyasagar *et al.*, 2012).

La HSP27 también participa en la homeostasis de los niveles de  $Fe^{2+}$ . El aumento de esta HSP, así como de la HSP70 atenúa el incremento de hierro en las células.

En general, todas las HSPs tienen funciones citoprotectoras que actúan en los distintos compartimentos celulares. Pueden interferir en los procesos inflamatorios o en la cascada de señalización apoptótica, ya sea activando o inhibiendo a los mediadores de estos eventos.

### **13.3 Glicosilación y A $\beta$**

Nuestro grupo de investigación mostró en cerebros con EA, que las placas neuríticas y las marañas neurofibrilares presentan un incremento en O-glicanos que difiere de los grupos controles. Estos hallazgos sugieren que los marcadores histopatológicos de la EA poseen sitios de adición de glicanos anormales (Guevara *et al.*, 2004; Guevara *et al.*, 1998). Es decir, el procesamiento de las proteínas en esta enfermedad sufre alteraciones.

En esta investigación, utilizando el modelo de microinyección de la fracción A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> mostramos que los patrones de glicosilación son diferentes entre grupo control y grupo tratado con el A $\beta$ , para ambas lectinas.

Como ya se ha mencionado, el proceso de glicosilación es llevado a cabo en el retículo endoplasmico y en el aparato de Golgi. La O-glicosilación es exclusiva del aparato de Golgi, mientras que la N-glicosilación se lleva a cabo en retículo

endoplasmico y se concluye en el aparato del Golgi. Investigaciones demuestran que el A $\beta$  puede alterar los componentes de estos organelos (Li *et al.*, 2007).

En un modelo de ratas mutantes (APP PS1) se observó una sobreexpresión de A $\beta$  intracelular en el aparato de Golgi, principalmente en lisosomas y gránulos secretorios en el hipocampo (Li *et al.*, 2007). Esto podría modificar los procesos de glicosilación.

Las modificaciones en la glicosilación afecta a las proteínas. Los cambios que se producen pueden hacer que las estructuras glicosiladas sean más rígidas, lo que podría alterar la comunicación célula-célula (Guevara *et al.*, 1998). También se ha reportado que los glicoconjugados que contienen ácidos siálico están involucrados en eventos patológicos como tumores, metástasis e inflamación y que los residuos de ácido siálico juegan un papel importante en el reconocimiento célula-célula, lo que también alteraría la comunicación neuronal (Kazuya *et al.*, 2009).

Se ha propuesto que los receptores O-glicosilados en la neuronas con EA podrían participar en la organización de los microtúbulos y microfilamentos (Guevara *et al.*, 2004).

Los cambios en los patrones de glicosilación que observamos con las lectinas ALL y MrL en el modelo de microinyección con A $\beta$ , nos indican alteraciones en el sistema de procesamiento de proteínas. Por un lado se comprueba la interacción del A $\beta$  intracelular con los organelos donde se lleva a cabo el proceso de glicosilación; aunado a que en la enfermedad de Alzheimer se reporta decremento en la actividad de sialiltransferasas, enzimas que se encargan de la adición de los residuos de azúcar. Estos cambios podrían estar generando una glicosilación anormal.

### 13.4 Epicatequina y Resveratrol

La administración de la epicatequina y el resveratrol disminuyeron la concentración de especies reactivas de oxígeno, los niveles de peroxidación lipídica y la expresión de las proteínas de choque térmico. Los mecanismos de acción propuestos son los siguientes:

Los flavonoides pueden eliminar los procesos de peroxidación lipídica retirando el oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), peróxidos lipídicos o hidroperóxidos ( $ROO\bullet$ ). Esto bloquea su acción tóxica en la célula (Konigsberg, 2008). Por otro lado, pueden estabilizar radicales libres ya que la presencia del grupo catecol en su estructura, le confiere la capacidad de donar un hidrógeno (Williams *et al.*, 2004).

Los flavonoides como la epicatequina, se proponen como moduladores de cascadas de señalización celular. Pueden activar cinasas con Akt (tirosina cinasa A), PKC (proteína cinasa C) y MAP cinasas, que intervienen en la activación de factores transcripción y en la señalización pro-apoptótica (Williams *et al.*, 2004).

Existe evidencia de que los flavonoides puede unirse a sitios específicos de proteínas. Sabemos que el péptido  $A\beta$  puede interactuar con componentes de la mitocondria, como lo es el poro de transición que se vincula a la liberación del citocromo C. Los flavonoides también pueden unirse al poro de transición e influir en la apertura del poro y en la liberación del citocromo C .

Tanto la epicatequina como el resveratrol comparten mecanismos de acción. Ambos ejercen funciones antioxidantes, antiinflamatorias, también son quelantes de metales. La estructura de la epicatequina y el resveratrol es diferente lo que les confiere una efectividad distinta. La epicatequina tiene una vida media mayor al resveratrol, sin embargo, este último sufre mayor cantidad de reacciones de conjugación, lo que incrementa su solubilidad y por lo tanto su biodisponibilidad.

Sin embargo, nosotros no tuvimos resultados concluyentes sobre que tratamiento tiene una mayor efectividad protectora. Sólo podemos concluir que ambos ejercen una función neuroprotectora.

Como se mencionó, la epicatequina interfiere en procesos inflamatorios. Pruebas demuestran que la epicatequina también puede secuestrar al radical hidroxilo generado en un sistema Fenton en un rango de 100 a 300 veces superior, por ejemplo, a los del manitol. Lo anterior lo puede llevar a cabo gracias al grupo catecol del anillo B, el grupo carbonilo en la posición 4 y una región 5-hidroxi que pueden aumentar la quelación del  $Fe^{2+}$  (Pérez, 2003).

Un mecanismo de acción del resveratrol es prevenir la formación de oligómeros y protofibrillas intermediarias. No obstante, no puede inhibir la producción de  $A\beta$  porque no tiene efecto sobre la actividad de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas, pero estimula indirectamente su degradación proteosomal (Vingtdeux *et al.*, 2008).

Se postula que el resveratrol también puede estimular la actividad de la glutatión peroxidasa, lo que disminuiría el daño oxidante (Rocha *et al.*, 2008).

El resveratrol es capaz de estimular la activación de genes SIRT, encargados de codificar las sirtuinas. Estos miembros regulan procesos celulares como proliferación y apoptosis a través de la deacetilación de proteínas como P53 y  $NF\kappa B$ , lo que podría reducir la activación de mediadores como la sintasa del óxido nítrico (NOS) y COX2. Proteínas que pueden ser activadas por el péptido  $A\beta$  (Millán *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2008).

Como analizamos anteriormente un sensor redox es la hemoxigenasa 1 (HO-1) que se relaciona con la activación de las HSPs. Evidencia *in vitro* demuestra que el resveratrol puede activar a esta enzima a través de procesos de señalización que involucran a Nrf2. Sin embargo, el mecanismo no está dilucidado por completo (Huang *et al.*, 2011).

Un estudio demostró que derivados de flavonoides pueden inhibir a las sialiltransferasas. La interacción se da por medio de la doble ligadura entre el C2 y C3 del anillo C, que es esencial para la inhibición de estas enzimas. Los grupos hidroxilos del anillo A aumentan la inhibición. Esto podría modificar los patrones de glicosilación (Kazuya *et al.*, 2009).

## 14. CONCLUSIONES

- 🧠 La fracción  $A\beta_{(25-35)}$  a una concentración de  $100\mu\text{M}$  genera daño oxidante. Esto se refleja en el incremento de las especies reactivas de oxígeno y el aumento en la peroxidación lipídica en el hipocampo, a partir de las 2 horas.
- 🧠 La neurotoxicidad ocasionada por la fracción  $A\beta_{(25-35)}$  activa al factor de choque térmico, lo que induce la expresión de las HSP. Los resultados demuestran aumento significativo en todas las proteínas de choque térmico, lo que se correlaciona con el incremento de EROs y peroxidación lipídica en el mismo periodo de tiempo. Su expresión es un mecanismo neuroprotector.
- 🧠 La fracción  $A\beta_{(25-35)}$  altera el procesamiento de las proteínas. El uso de las lectinas ALL y MrL demostraron cambios en los patrones de glicosilación.
- 🧠 El tratamiento con la epicatequina y el resveratrol disminuyen significativamente el daño inducido por la fracción  $A\beta_{(25-35)}$ . Asimismo hay reducción significativa en la expresión de las HSP. Sin embargo, no hubo resultados concluyentes comparando los 2 tratamientos.

## 15. RECAPITULACIÓN

### ESQUEMA 1: Fracción A $\beta_{(25-35)}$ y Estrés Oxidante

La fracción A $\beta_{(25-35)}$  se agrega en la membrana celular alterando la estructura de las capas lipídicas. Lo que podría generar disfunción en los canales iónicos y transportadores, esto afectaría la regulación de Ca<sup>2+</sup> neuronal.

El péptido A $\beta$  también puede activar a la microglia que libera más productos citotóxicos (EROs, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, •NO). Asimismo se puede unir con metales de transición como Fe, Cu ó Zn, lo que favorece su agregación e incrementa el daño oxidante.

Los productos de la peroxidación lipídica (en particular 4HNE) pueden reaccionar con receptores tipo NMDA, su interacción con los componentes de estos receptores alteran su función, afectando la homeostasis del calcio intracelular. Este calcio se une a la calmodulina (cdm) que activa a la óxido nítrico sintasa (NOS), promoviendo la formación de óxido nítrico. En presencia del ión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el NO forma peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que daña proteínas y produce más daño oxidante.

El A $\beta$  se puede internalizar en la célula por medio de canales multiméricos con estructura de poro central. Esto le permite interactuar con los componentes de los organelos celulares.

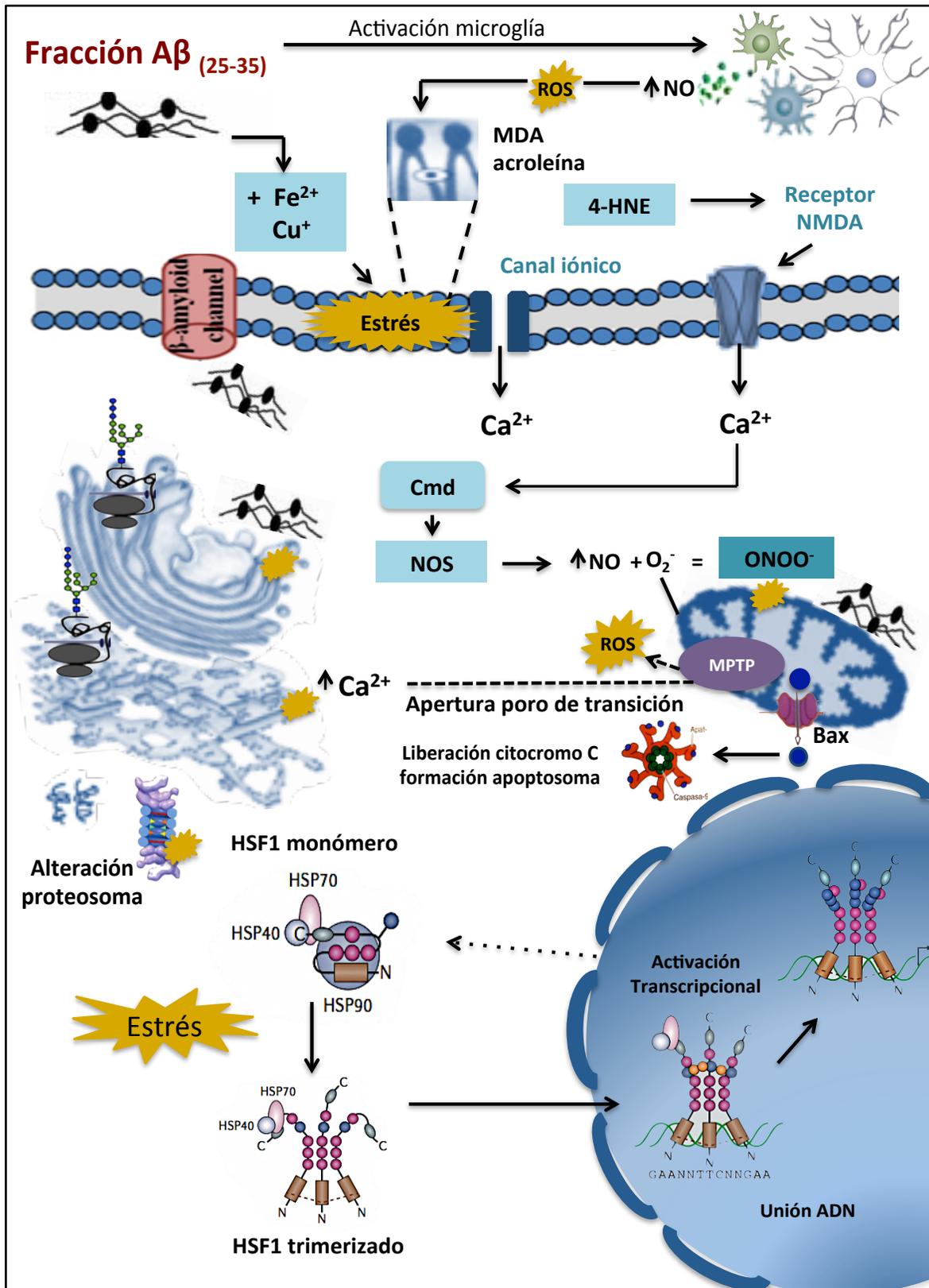
A nivel mitocondrial puede atravesar la membrana por medio de los translocadores TOM40 y TIM22. Esto le permite interactuar con elementos de la mitocondria como el multidominio Bax y el poro de transición.

El poro de transición está acoplado a la liberación de calcio del retículo endoplasmático (RE), induciendo su apertura. Mientras que la formación del dominio BAX en la membrana mitocondrial, producen la liberación del citocromo C que desencadena la formación del apoptosoma y la activación de caspasas. Estos eventos pueden inhibir la respiración mitocondrial y disminuir el ATP.

El A $\beta$  intracelular también puede interactuar con componentes del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, incrementando la peroxidación lipídica y oxidando proteínas vinculadas con el metabolismo oxidante, la función del proteosoma y los sistemas antioxidantes.

Alteraciones del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, podría modificar el procesamiento de proteínas, ocasionando cambios en los patrones de glicosilación.

# ESQUEMA 1: Fracción Aβ<sub>(25-35)</sub> y Estrés Oxidante



## ESQUEMA 2: Estrés Oxidante y HSP

El factor de choque térmico (HSF) se encuentra como monómero inactivo en el citoplasma. Los cambios en la homeostasis celular pueden promover su trimerización. Factores de transcripción como Nrf2 pueden activar a las HSP. Se especula que la hemoxigenasa 1 (HO-1) es un sensor redox que también promovería el cambio conformacional.

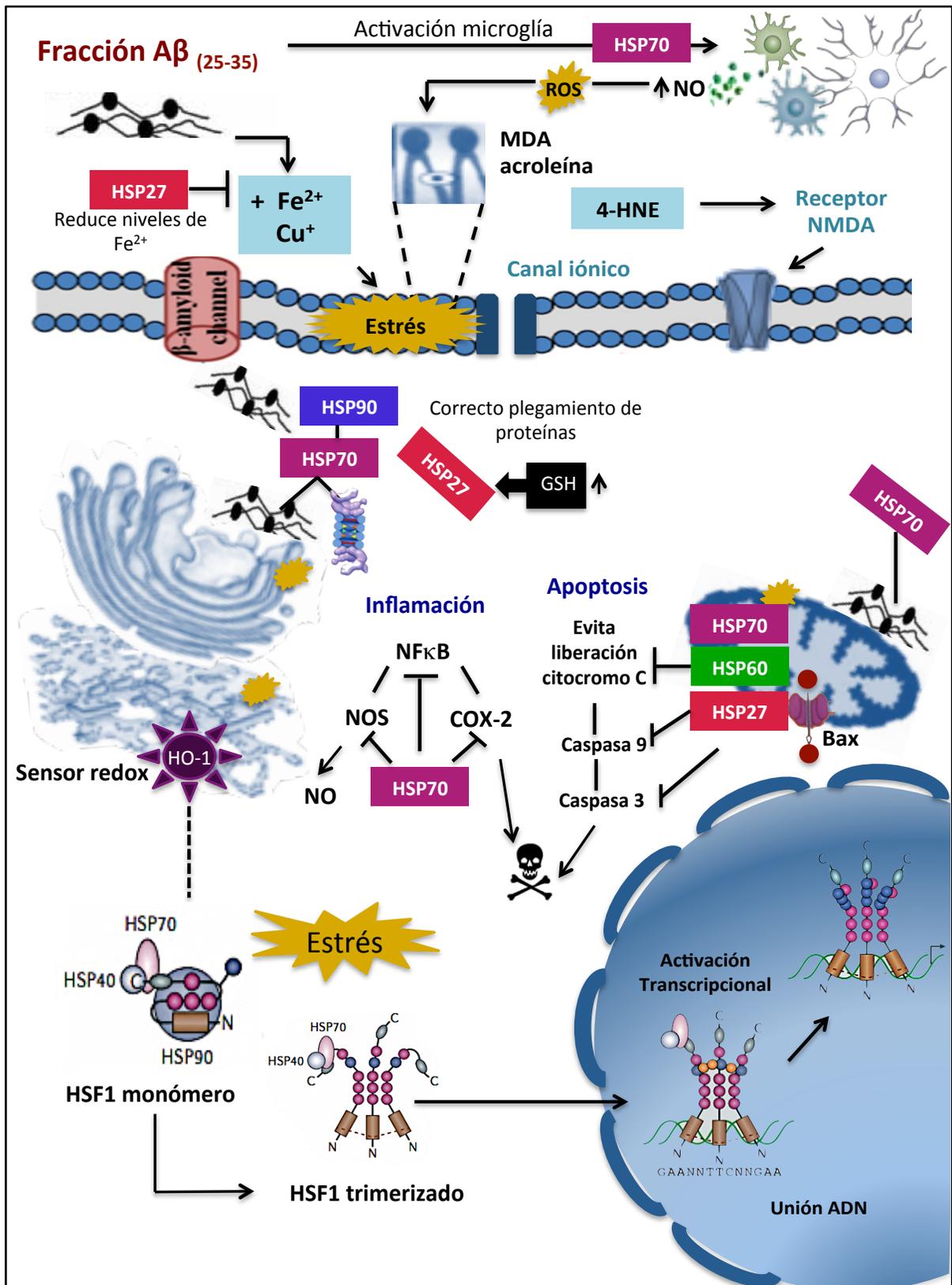
Al estar trimerizado es exportado al núcleo donde se une a la cadena de ADN para la activación transcripcional de las proteínas de choque térmico (HSP60, 70, 90 y 27).

La HSP70 y 90 son chaperonas de plegamiento que previenen la agregación del péptido A $\beta$  y promueven su degradación. La HSP70 puede secuestrar al A $\beta$  intracelular para evitar que interaccione con otras proteínas. Asimismo ejerce una función extracelular como activadora de la microglia y citocinas. Si ya no es requerida puede ser internalizada e importada al citoplasma y núcleo para promover la supervivencia celular. Puede inhibir la liberación del citocromo C. También participa en procesos inflamatorios; se puede unir a NF $\kappa$ B para evitar su translocación al núcleo y que active a otros mediadores inflamatorios. Reduce los niveles de COX2 y la producción de óxido nítrico.

La HSP60 tiene como función principal ser chaperona de plegamiento de las proteínas a nivel mitocondrial. Como la HSP70, inhibe la liberación del citocromo C y puede suprimir el daño ocasionado por el A $\beta$  intracelular al complejo IV de la cadena respiratoria.

Por otro lado la HSP27 puede actuar después de la formación del apoptosoma inhibiendo a las caspasas 3 y 9. Sin embargo, su papel principal es auxiliar a las proteínas más plegadas durante eventos de estrés. Otra habilidad importante, es su capacidad para resguardar glutatión para restablecer la homeostasis redox. Además puede interaccionar con el hierro y evitar su incremento.

## ESQUEMA 2: Estrés Oxidante y HSP



### **ESQUEMA 3: Estrés Oxidante y Antioxidantes (Epicatequina y Resveratrol)**

La epicatequina y el resveratrol pueden mediar los efectos neurotóxicos de la fracción  $A\beta_{(25-35)}$  por medio de:

Su estructura química les permite eliminar los procesos de peroxidación lipídica, ya sea estabilizando radicales libres o retirando el oxígeno reactivo. Asimismo pueden modular cascadas de señalización celular (activación de factores de transcripción y señalización pro-apoptótica). También son quelantes de metales.

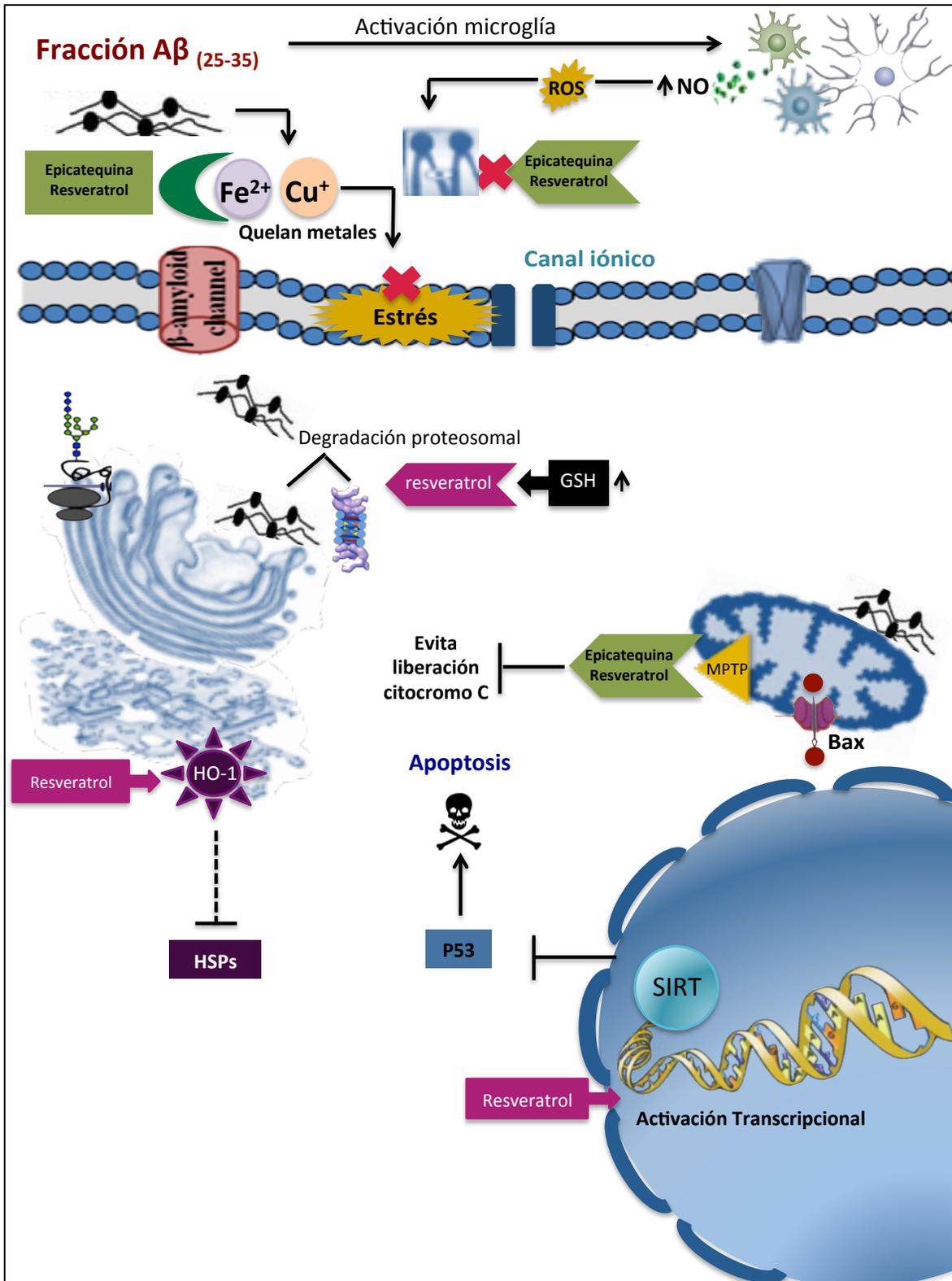
Los flavonoides puede unirse a sitios específicos de proteínas; pueden unirse al poro de transición e influir en la apertura del poro y en la liberación del citocromo C.

El resveratrol puede prevenir la formación de oligómeros y protofibrillas intermediarias estimulando indirectamente su degradación proteosomal. También es capaz de estimular la actividad de la glutatión peroxidasa.

El resveratrol puede estimular la activación de la hemoxigenasa 1 que se relaciona con la activación de las HSPs. También activan genes SIRT (regulan procesos celulares como proliferación y apoptosis) a través de la deacetilación de proteínas como P53 y  $NF\kappa B$ , lo que podría reducir la activación de mediadores como la óxido nítrico sintasa (NOS) y COX2. Proteínas que pueden ser activadas por el péptido  $A\beta$ .

Por otro lado los flavonoides pueden inhibir a las sialiltransferasas por medio de la doble ligadura entre el C2 y C3 del anillo C, que es esencial para la inhibición de estas enzimas.

**ESQUEMA 3: Estrés Oxidante y Antioxidantes (Epicatequina y Resveratrol)**



## **16. ANEXOS (TÉCNICAS)**

### **16.1 Técnica Peroxidación Lipídica**

1. El tejido (hipocampo) se homogeniza en 3 mL de solución salina.
2. De este homogenizado se hacen 2 alícuotas de 1 mL.
3. A cada una de esta alícuotas se le adiciona 4 mL de una mezcla cloroformo metanol (2:1). Los tubos utilizados deben estar cubiertos de la luz.
4. Esta mezcla se agita vigorosamente durante 10 segundos en un vortex y se conserva en hielo durante 30 minutos para permitir la separación de fases.
5. La fase acuosa (sobrenadante) se desecha y 2 mL de la fase clorofórmica se transfiere a una celda de cuarzo, a la cual se le adiciona 200 mL de metanol.
6. La fluorescencia se mide en un espectrofotómetro de luminiscencia a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión.

### **Soluciones**

#### **Ácido Sulfúrico [0.05M]**

- Se mezcla 1.38 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 500 mL de agua desionizada.

#### **Quinina**

- Pesar 10 mg de quinina y colocarla en un matraz aforado de 100 mL cubierto de la luz.
- Se afora con 100 mL del ácido sulfúrico preparado.
- Se toma 100 µl de la solución anterior y se coloca en un matraz aforado cubierto de la luz. La dilución se realiza al aforar con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## 16.2 Técnica ROS 2,7, DCF diacetato

Para esta técnica se utiliza el homogenizado hecho para la determinación de la peroxidación lipídica.

1. Se toman 5  $\mu\text{L}$  del homogenizado y se colocan en un tubo eppendorf al que se le adicionan 45  $\mu\text{L}$  del buffer TRIS:HEPES (18:1).
2. En una placa de 96 pozos se prepara la curva estándar, empleando las siguientes concentraciones:

	Buffer (9:1)	DCF
Blanco	198 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$ MeOH
1	198 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
2	195 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
3	190 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
4	180 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
5	160 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$
6	140 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$
7	120 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$
8	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
9	80 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$

3. Al terminar de preparar la curva estándar se cubre de la luz, en lo que se cargan las muestras.
4. Para las muestras se coloca 145  $\mu\text{L}$  de buffer 18:1 + 50  $\mu\text{L}$  de DCF-DA + 5  $\mu\text{L}$  de la muestra, previamente preparada (paso 1).
5. La lectura de la placa se hace con una longitud de onda de 525 nm de excitación y 470 nm de emisión, utilizando el programa GEN 5. El análisis se realiza en una hora.

## **16.3 Técnica Inmunohistoquímica para microscopía de fluorescencia. Proteínas de Choque Térmico**

### **1. Desparafinado y rehidratación de los cortes del tejido.**

- Xilol por 15 minutos.
- Xilol por 15 minutos.
- Xilol/alcohol (100%) por 3 minutos (1:1).
- Alcohol 100% por 3 minutos.
- Alcohol 96% por 3 minutos.
- Alcohol 70% por 3 minutos.
- Agua destilada (no más de tres minutos máximo 5 minutos).

### **2. Enjuague con buffer de fosfatos (pH 7.4) por 5 minutos.**

### **3. Recuperación antigénica**

- Colocar las laminillas en un Köplin de plástico, agregar 500 mL de buffer de citratos (100 mM, pH 6).
  - Solución stock ácida: 0.1 M de ácido cítrico.
  - Solución stock básica: 0.1 M de citrato de sodio.
- Hasta que el agua esté hirviendo, colocar el köplin y dejar durante 15 minutos.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente.

### **4. Enjuague con buffer de fosfatos, por 5 minutos.**

### **5. Inmersión en solución de albúmina, libre de IgG 2%.**

- Sacudir y secar las laminillas alrededor del corte, marcar con un plumón hidrofóbico alrededor de la muestra.

- Colocar dentro de la cámara húmeda
- Colocar 150  $\mu$ l de albúmina por cada tejido que se tenga en la laminilla.
- Dejar 20 minutos en la cámara húmeda cerrada a temperatura ambiente.

**6. Enjuague con buffer de fosfatos por 5 minutos.**

**7. Inmersión en solución de tritón 0.2%.**

- Colocar 50 mL de PBS y 100  $\mu$ l de tritón.
- Dejar 10 minutos en la cámara húmeda.

**8. Enjuague con buffer de fosfatos por 5 minutos.**

**9. Incubación del anticuerpo primario (1:100). Se prepara en PBS 1X .**

- Secar las laminillas y colocar 150  $\mu$ l del anticuerpo por cada corte.
- Colocar en la cámara húmeda.
- Si se realiza la inmunohistoquímica en un día, se deja el anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche en refrigeración a 4°C.

**10. Enjuague con buffer de fosfatos por 5 minutos. Hacer 2 lavados.**

**11. Incubación del anticuerpo secundario (1:60) por 1 hora a 37°C. Se prepara en PBS 1X.**

**12. Enjuague con buffer de fosfatos por 5 minutos.**

**13. Montaje con Vectashield-DAPI**

- Secar las laminillas y colocar 15  $\mu$ l de DAPI por cada tejido que se tenga.

**14. Sellar con barniz de uñas alrededor del cubre-objetos.**

#### **16.4 Técnica Histoquímica para microscopía de fluorescencia. Lectinas ALL (*Amaranthus leucocarpus*) y MrL (*Macrobrachium rosebergii*)**

Los pasos enlistados del 1 al 7 para la inmunohistoquímica de las proteínas de choque térmico también se realizan para las lectinas.

Nota: A partir de este momento los lavados de PBS se hacen con PBS<sup>Ca<sup>++</sup></sup> \*

- \*0.05 gr. de CaCl<sub>2</sub> en 500 mL de PBS.

**8. Enjuague con PBS Ca<sup>++</sup> por 5 minutos. Hacer 2 lavados.**

**9. Incubación con la lectina respetiva (1:100). Se prepara en PBS 1X .**

- Secar las laminillas y colocar 150 µl del anticuerpo por cada corte.
- Colocar en la cámara húmeda.
- Si se realiza la inmunohistoquímica en un día, se deja el anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche en refrigeración a 4°C.

**10. Enjuague con PBS Ca<sup>++</sup> por 5 minutos. Hacer 2 lavados.**

**11. Incubación con extravidina-FITC (1:100) por 1 hora a 37°C.**

**12. Enjuague con PBS Ca<sup>++</sup> por 5 minutos. Hacer 2 lavados.**

**13. Montaje con Vectashield-DAPI**

- Secar las laminillas y colocar 15 µl de DAPI por cada tejido que se tenga.

**14. Sellar con barniz de uñas alrededor del cubre-objetos.**

Nota: A partir del paso 11 para la técnica de inmunohistoquímica e histoquímica la cámara húmeda debe ser cubierta de la luz.

## 17. REFERENCIAS

- Abd M., G. Kuhnele, A. R. Rechner, H. Schroeter, S. Rose, P. Jenner, C. A. Rice. (2002). Uptake and metabolism of epicatechin and its Access to the brain after oral ingestión. Free Radical Bio Med. 33(12): 1693-1702.
- Addabbo F., M. Montagnani, M. S. Goligorsky. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. Hyper. 53: 885-892.
- Alberts B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. (2002). Biología molecular de la célula. Ed. Omega, 4<sup>ta</sup> Edición. Barcelona. Pág. 1463.
- Almaguer D., L. Almaguer. (2006). Estrés oxidativo y muerte neuronal. Una visión biomolecular. Rev Mex Neuroci. 7(4): 330-337.
- Anckar J., L. Sistonen. (2011). Regulation of HSF1 function in the heat stress response: Implications in aging and disease. Annu Rev Biochem. 80: 1089-1115.
- Angoa M., S. Rivas. (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia?. Arch Neuroci. 12(1): 45-54.
- Axelsen P., H. Komatsu, I. Murray. (2011). Oxidative Stress and Cell Membranes in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Physiol. 26: 54-69.
- Azizi G., A. Mirshafiey. (2012). The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 1-15.
- Barragán E. (2007). Proteínas de choque térmico (HSP). Expre Med. 3(12): 13-17.
- Berg J., J. L. Tymoczko, L. Stryer. (2007). Bioquímica. Ed. Reverté, S.A. 6<sup>ta</sup> edición. Barcelona-España. Pp. 316-323.
- Bernardi R. (2007). La neuroinflamación en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. 4-15.

- Bernhardt R. (2005). Mecanismos neurobiológicos de la enfermedad de Alzheimer. Rev Chil Neuro-Psiquiat. 43(2): 123-132.
- Bharathi., R. David, K.S. Jagannathan. (2006). Role of metals in Neuronal Apoptosis: Challenges associated with neurodegeneration. Curr Alzheimer Res. 3: 311-326.
- Blennow K., M. de Leon, H. Zetterberg. (2006). Alzheimer disease. Seminar. 368: 387-403.
- Blount J., M. Ferruzzi, D. Raftery, G. M. Pasinetti, R. Dixon. (2012). Enzymatic synthesis of substituted epicatechins for bioactivity studies in neurological disorders. Biochem Biophys Res Commun. 417: 457-461.
- Brown I. (2007). Heat shock proteins and protection of the nervous system. Ann NY Acad Sci. 1113: 147-158.
- Cascales M., P. González. (2009). Factores implicados en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Estrés oxidativo. Mon de la Real Acad de Farmacia. XXIV: 417-466.
- Catricala S., M. Torti, G. Ricevuti. (2012). Alzheimer disease and platelets: how's that relevant. Immunity & Ageing. 9(20).
- Chávez A., H. Sáenz. (2009). Implicaciones de las proteínas de choque térmico (sHsp/HSPB) en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Universitas Scientiarum. 14 (x, xx-xx).
- Cooper G. M., R. Hausman. (2009). La célula. Ed. Marbán, 5<sup>ta</sup> edición. Whashington D.C. USA. Pág. 818.
- Coronato S., W. Di Girolamo, M. Salas, O. Spinelli, G. Laguens. (1999). Biología de las proteínas del shock térmico *in* Medicina. 59(5): 477-486.
- Cuevas E., D. Limón, F. Pérez, A. Díaz, L. Ortega, E. Zenteno, J. Guevara. (2009). Antioxidant effects of epicatechin on the hippocampal toxicity caused by amyloid-beta 25-35 in rats. E J of Pharm. 616: 122-127.

- Díaz A., L. De Jesús, L. Mendieta, M. Calvillo, B. Espinosa, E. Zenteno, J. Guevara, D. Limón. (2010). The amyloid- $\beta_{25-35}$  injection into the CA1 region of the neonatal rat hippocampus impairs the long-term memory because of an increase of nitric oxide. Neurosci Let. 468: 151-155.
- Di Domenico F., R. Sultana, G. F Tiu, N. N. Scheff, M. Perluigi, C. Cini, A. Butterfield. (2010). Protein levels of heat shock proteins 27, 32, 60, 70, 90 y thioredoxin-1 in amnesic mild cognitive impairment: An investigation on the role of celular stress response in the progression of Alzheimer disease. Brain Res. 1333: 72-81.
- Dorado C., C. Rugerio, S. Rivas. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. Rev Fac Med UNAM. 146(6): 229-235.
- Drago M. E. (2007). Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. Rev Mex de Ciencias Farmacéuticas. 38(4): 42-46.
- Escamilla C., E. Cuevas, J. Guevara. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev Fac Med UNAM. 52(2): 73-75.
- Esiri M. (2007). The neuropathology of Alzheimer's disease. Molecular and celular neurobiology. Ed. Oxfor University: 37-58.
- Espinosa B., J. Guevara, P. Hernández, M. C. Slomianny, A. Guzmán, S. Martínez, E. Zenteno. (2003). Characterization of an O-glycosylated plaque-associated protein from Alzheimer disease brain. J Neuropathol Exp Neurol. 62(1): 34-41.
- Espinosa B., R. Zenteno, R. Mena, Y. Robitaille, E. Zenteno, J. Guevara. (2001). O-Glycosylation in sprouting neurons in Alzheimer disease, indicating reactive plasticity. J Neuropathol Exp Neurol. 60(5): 441-448.
- Evans C., S. Wisén, J. E. Gestwicki. (2006). Heat shock proteins 70 y 90 inhibit early stages of amyloid  $\beta$ -(1-42) agregation in vitro. J Biol Chem. 281(44): 33182-33191.

- Fiorentino S., A. Barreto, A. Asea. (2007). Proteínas de choque térmico, muerte celular y respuesta antitumoral. Universitas Scientiarum. 12(2): 5-22.
- Francois J., P. Vachon, A. Gritsas, J. Zhang, J-P. Moreau, M. P. Ducharme. (2002). Metabolism and disposition of resveratrol in rats: Extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. J Pharma & Exp Therapeutics. 302(1): 369-373.
- Glass C., K. Saijo, B. Winner, M. C. Marchetto, F. Gage. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. Cell. 140(6): 918-934.
- Grundman M., P. Delaney. (2002). Antioxidant strategies for Alzheimer's disease. P Nutrition Society. (61): 191-202.
- Guevara J., B. Espinosa, E. Zenteno, L. Vázquez, J. Luna, G. Perry, R. Mena. (1998). Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer Disease. J Neuropathol Exp Neurol. 57(10): 905-914.
- Guevara J., H. Dilhuydy, B. Espinosa, A. Delacourte, R. Quirion, R. Mena, Y. Joannette, E. Zenteno, Y. Robitaille. (2004). Coexistencia of reactive plasticity and neurodegeneration in Alzheimer diseased brains. Histol Histopathol. 19: 1075-1084.
- Guimerà A., X. Gironès, F. F. Cruz. (2002). Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer. Rev Esp Patol. 35(1): 21-48.
- Haque A., M. Hashimoto, M. Katakura, Y. Hara, O. Shido. (2008). Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by 1-40 in rats. J Nutr Biochem. 19: 619-626.
- Hernández P., E. Pérez, L. Martínez, B. Ortiz, G. Martínez. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de las interacciones proteína-carbohidrato. REB. 24 (1): 21-27.
- Hernández P., O. González, Y. Rodríguez, F. Ganem. (1999). Aplicaciones de las Lectinas. Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter. 15(2): 91-95.

- Huang T., K. Tung, Y. Peter, Y. Wu, Y. Yang. (2011). Resveratrol protects rat from A $\beta$ -induce neurotoxicity by the reduction of iNOS expression and lipid peroxidation. PloS ONE. 6(12): 1-8.
- Jiménez M., H. Trejo, A. Herrera, J. L. Romero, R. Chávez, R. Lascurain, E. Zenteno. (2002). Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 15(1): 39-47.
- Kalmar B., L. Greensmith. (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. ADDR. 61: 310-318.
- Kazuya H., K. Oyama, G. Ito, M. Nakayama, M. Inai, S. Goto, Y. Kanai, K. Watanabe, K. Yoshida, T. Furuta, T. Kan, T. Suzuki. (2009). Identification and characterization of flavonoids as sialytransferase inhibitors. Biochem Biophys Res Commun. 382: 609-613.
- Konigsberg M. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Ed. Manual Moderno. México, D.F. Pág 636.
- Kuhnle G., J. P. Spencer, H. Schroeter H. B. Shenoy, E. S. Debnam, S. Kaila, C. Rice, U. Hahn. (2000). Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. Biochem Biophys Res Commun. 277(2): 507-512.
- Li M., L. Chen, D. Hong, L. Chuan, Y. Zhang. (2007). The role of intracellular amyloid  $\beta$  in Alzheimer's disease. P Neurobiol. 83: 131.139.
- Limón D., A. Díaz, L. Mendieta, G. Chamorro, B. Espinosa, E. Zenteno, J. Guevara. (2009). Amyloid- $\beta_{25-35}$  impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats. Neurosci Res. 63: 129-137.
- Luo W., A. Rodina, G. Chiosis. (2008). Heat shock protein 90: translation from cancer to Alzheimer's disease treatment. BMC Neurosci. 9(2): 2-8.
- Luo W., W. Sun, T. Taldone, A. Rodina, G. Chiosis. (2010). Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases. Mol Neurodegener. 5(24): 1-8.

- Magrané J., R. C. Smith, K. Walsh, H. W. Querfurth. (2004). Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed  $\beta$ -amyloid in neurons. J Neurosci. 24(7): 1700-1706.
- Mandelkow E., E. Mandelkow. (2012). Biochemistry and cell biology tau protein in neurofibrillary degeneration. Cold Spring Harb Perspect Med. 2: 1-25.
- Manzano N., J. Mas. (2006). Estrés oxidativo, péptido  $\beta$ -amiloide y enfermedad de Alzheimer. Gac Méd Méx. 142(3): 229-238.
- Martínez I., L. Palomares, D. Sánchez, R. Mollicone, I. Ibarra. (2008). Trastornos congénitos de la glicosilación: abordaje clínico y de laboratorio. Acta Pediatr Mex. 29 (2): 78-88.
- Martínez S., J. González, J. M. Culebras, M. Tuñón. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr Hosp. 17(6): 271-278.
- Martín S., P. Bermejo, J. Benedí. E. Felici, P. Gil, J. M. Ribera, Á. Villar. (2009). Metalloproteasas's activity and oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Neurochem Res. 34. pp. 372-378.
- Mattson M. (2008). Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. Ann N Acad Sci. 97-112.
- Millán F., G. Serrano, I. L. Expósito. (2008). Resveratrol. Nuevos retos en el tratamiento antienvjecimiento. Dossier. 66-70.
- Müller U., H. Zheng. (2012). Physiological functions of APP family proteins. Cold Spring Harb Perspect Med. 4: 1-17.
- Neef D., A. M. Jaeger, D. J. Thiele. (2011). Heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. Nature. 10: 930-941.
- O'Brien R., P. Wong. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. Annu Rev Neurosci. 34: 185-204.

- Ono K., T. Hamaguchi, H. Naiki, M. Yamada. (2006). Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. Biochi Biophys Acta. 1762: 575-586.
- Pasantes H., C. Arias. L. Massieu, A. Zentella, R. Tapia. (1999). Enfermedades neurodegenerativas. Mecanismos celulares y moleculares. Ed. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. Pp. 133-160.
- Pérez A., J. Abilés, J. Castaño. (2008). Estrés oxidativo y su implicación en distintas patologías. Nutr Clin Med. 2(2): 45-64.
- Pérez G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev Cubana Invest Biomed. 22(1): 48-57.
- Quadros A., O. I. Weeks, G. Ait-Guezala. (2007). Role of tau in Alzheimer's dementia and other neurodegenerative diseases. J Appl Biomed. 5: 1-12.
- Rivas S., L. Colín, C. Dorado, T. Fortoul (2001). Estrés oxidativo y neurodegeneración. Temas Selectos de Neurociencias II. 351-366.
- Rocha H., M. Ambriz, V. Granados. (2008). Resveratrol: A natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases. CNS Neurosci Therapeutics. 14: 234-247.
- Rodríguez J., L. Rivas, M. A. Carrillo, M. A. Oroza, A. Toledano. (1996). Proteínas de shock térmico (HSPs) en el sistema nervioso central. Implicaciones en procesos neurodegenerativos. Patología. 29: 333-341.
- Romano M., M. D. Nissen, N. M. Del Huerto, C. Parquet. (2007). Enfermedad de Alzheimer. Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina. 175: 9-12.
- Rosenblum W. (2002). Structure and location of amyloid beta peptide chains and arrays in Alzheimer's disease: new findings require reevaluation of the amyloid hypothesis and of test of the hypothesis. Neu Aging. 23:225-230.

- Sánchez E., A. E. Ramírez, L. Vázquez, B. I. Cabrales, M. A. Domínguez, M. E. González. (2007). Mecanismos de daño celular en enfermedades neurodegenerativas. Medigraphic Artemisa. Vol. IX (3): 205-213.
- Schellenberg G., T. J. Montine. (2012). The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 124: 305-323.
- Shimura H., Y. Miura, K. Kosik. (2004). Binding of tau to heat shock protein 27 leads to decreased concentration of hyperphosphorylated tau and enhanced cell survival. J B Chemistry. 279(17): 17957-17962.
- Siegel S. (2007). The oxidative stress metabolite 4-hidroxynonenal promotes Alzheimer protofibril formation. Biochem. 46: 1503-1510.
- Skrabana R., M. Skrabanova, N. Csokova, J. Sevcik, M. Novak. (2006). Intrinsically disordered tau protein in Alzheimer's tangles: a coincidence or a rule?. Bratisl Lek Listy. 107 (9-10): 354-358.
- Sompol P., W. Ittarat, J. Tangpong, Y. Chen, I. Doubinskaia, I. Batinic-Haberle, M. Abdul, D. A. Butterfield, D. Clair. (2008). A neuronal model of Alzheimer's disease: An insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. Neurosci. 153: 120-130.
- Stetler A., A. Signore, Y. Gao, G. Cao, J. Chen. (2009). HSP27: Mechanism of celular protection against neuronal injury. Curr Mol Med. 9 (7): 863-872.
- Stetler R., Y. Gan, W. Zhang, A. K. Liou, Y. Gao, G. Cao, J. Chen. (2010). Heat shock proteins: Cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. P Neurobiol. 92: 184-211.
- Tillement L., L. Lecanu, V. Papadopoulos. (2011). Alzheimer's disease: Effects of  $\beta$ -amyloid on mitochondria. Mito. 11: 13-21.
- Tripathy D., D. Thirumangalakudi, P. Grammas. (2007). Expression of macrophage inflammatory protein 1-alpha is elevated in Alzheimer's vessels and is regulated by oxidative stress. J of Alzheimer's Disease. 11: 447-455.

- Troncoso J., C. H. Kawas, C. A. Pardo, F. Aguilar. (2006). Lesiones precoces en la enfermedad de Alzheimer. Plast & Rest Neurol. 5(2): 129-135.
- Turturici G., G. Sconzo, F. Geraci. (2011). Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. Biochem Res International. 1-10.
- Veereshwarayya V., P. Kumar, K. Rosen, R. Mestril, H. Querfurth. (2006). Differential effects of mitochondrial heat shock protein 60 and related molecular chaperones to prevent intracellular  $\beta$ -amyloid-induced inhibition of complex IV and limit apoptosis. J of Biol Chem. 281(40): 29468-29478.
- Viana R. J., A. F. Nunes, C. M. Rodrigues. (2012). Endoplasmic reticulum enrollment in Alzheimer's disease. Mol Neurobiol.
- Vidyassagar A., N. Wilson, A. Djamali. (2012). Heat shock protein 27 (HSP27): Biomarker of disease and therapeutic target. Fibrogenesis & Tissue Repair. 5: 1-7.
- Vingdoux V., U. Dress-Werringloer, H. Zhao, P. Davies, P. Marambaud. (2008). Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. BMC Neurosci. 9(2): 1-5.
- Williams R., J. Spencer, C. Rice. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. Free Rad Biomed. 36(7): 838-849.
- Xu Y., D. Huang, J. Chiu, A. T. Y. Lau. (2012). Post-translational modification of human heat shock factors and their functions: A recent update by proteomic approach. J Proteome Res. 11: 2625-2634.
- Yamada K., T. Nabeshima. (2000). Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. Pharma & Therapeutics. 88: 93-113.
- Zhao L., H. Wai, Y. Mu, L. Yue. (2012). The toxicity of amyloid  $\beta$  oligomer. Int J Mol Sci. 13: 7303-7327.
- Zhiyou C., B. Zhao, A. Ratka. (2011). Oxidative stress and  $\beta$ -amyloid protein in Alzheimer's disease. Neuromol Med. 13: 223-250.

- Zhou Z., C. Hui-shan, Q. Ma, X. Xu, Z. Xiao, E. Tan. (2011). The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis, implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease (AD). Cell Adhesion & Migration. 5(4): 280-292.

### **Páginas de Internet**

- **Revista Digital Universitaria:** Mena R., J. Luna, F. García, M. Hernández. Histopatología Molecular de la Enfermedad de Alzheimer. *revista.unam.mx*
- **Neuropathology Test.** Agamanolis D. (2012). Degenerative Diseases. Alzheimer Disease. <http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9bAD.html>
- Adriazola M., P. L. Olivera. (2005). Enzimas antioxidantes eritrocitarias en sujetos de altura. [http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2005/adriazola\\_jm/html/sdx/adriazola\\_jm\\_TH.2.html](http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2005/adriazola_jm/html/sdx/adriazola_jm_TH.2.html)