



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**EFECTO DE LA FRACCION 25-35 DEL AMILOIDE-  
BETA, EN EL HIPOCAMPO DE RATA: IMPLICACIONES DEL  
ESTRÉS OXIDATIVO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS**

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

**Elvis Yane Cuevas Martínez**

**Director de Tesis: Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca**

**MÉXICO, D.F.**

**ENERO, 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Agradecimientos**

**Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo.**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por haber otorgado la beca para la realización del Doctorado en Ciencias Biológicas.**

**A los miembros del Comité Tutorial, Dr. Abel Santamaria del Angel y Dr. Edgar Zenteno Galindo, mil gracias por toda su valiosa crítica.**

**Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por el apoyo no. 1883473743 otorgado para la realización de este trabajo**

**Al Dr. Enrique Pinzón Estrada y a los integrantes del Bioterio de la Facultad de medicina de la UNAM, por facilitarnos las ratas Wistar, para la realización de este trabajo.**

**Al Dr. Daniel Limón, por el apoyo de las instalaciones del H. Laboratorio de Neurofarmacología de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.**

**A la Dra. Francisca Pérez Severiano, por el apoyo otorgado para la realización de la parte bioquímica de este trabajo.**

**A los miembros del Comité de Candidatura, Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Dra. Lourdes Massieu Trigo, Dra. Rosalinda Guevara, Dr. Alfonso Romo y Romo.**

**A los sinodales de examen de grado, Dra Lourdes Massieu Trigo, Dr. Gabriel Gutierrez Ospina, Dr. Abel Santamaria Del Ángel, Dr. Luis Felipe Jimenez García, Dr. Benjamin Floran Garduño Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo.**

**Al director de esta tesis, Dr. Jorge Guevara Fonseca.**

Este trabajo está dedicado a:

Mis Padres; Antonio Cuevas y Sofia Martínez,

Mis hermanos: Juan, Eulalia, Rodrigo, Roque, Mario, Aida y Fabiola,

Y mi compañero de vida: Pepé

	ÍNDICE	Pág.
Abreviaturas y acrónimos		
I. RESUMEN		1
II. INTRODUCCIÓN		3
III. ANTECEDENTES		5
3.1 La enfermedad de Alzheimer (EA)		5
3.1.1 Prevalencia de la EA		6
3.1.2 Factores de riesgo asociados a la EA		7
3.1.3 Neuropatología de la EA		8
3.1.4 El péptido A $\beta$		11
3.1.4.1 Procesamiento de la proteína precursora del amiloide beta o APP para la generación del péptido A $\beta$		11
3.1.4.2 La hipótesis de la cascada del amiloide		13
3.1.4.3 Toxicidad del A $\beta$		15
3.1.4.3.1 Actividad oxido-reductura del A $\beta$		18
3.1.5 Tratamiento de la EA		19
3.2 Estrés oxidativo		20
3.2.1 Estrés oxidativo y EA		20
3.2.1.1 Antioxidantes en la EA		21
3.2.1.2 Antioxidantes en modelos experimentales de la EA		22
3.3 Los flavonoides		23
3.3.1 Estudios de los flavonoides como posibles neuroprotectores		24
IV. JUSTIFICACIÓN		25
V. HIPÓTESIS		26
VI. OBJETIVOS		26
VII. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO		27
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS		28
8.1 Animales		28
8.2 Administración de los Antioxidantes		28
8.3 Microinyección del péptido		28
8.4 Cuantificación de la peroxidación de lípidos (PL)		29
8.5 Cuantificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS)		30
8.6 Evaluación del aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto radial de ocho brazos		31
8.7 Inmunohistoquímica para GFAP		33

IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
X. RESULTADOS	36
10.1 <i>Efecto del péptido Amiloide-beta 25-35 en la prueba del aprendizaje y la memoria espacial</i>	36
10.2 <i>Efecto de los flavonoides en el modelo de microinyección con el péptido A<math>\beta</math>25-35, en la prueba del aprendizaje y la memoria espacial</i>	37
10.3 <i>Concentraciones de ROS a las 2 y 24 horas en el hipocampo</i>	39
10.4 <i>PL a las 2 y 24 horas en el hipocampo</i>	40
10.5 <i>Concentraciones de ROS y PL, después de realizar la prueba de la memoria espacial, determinadas en el hipocampo.</i>	41
10.6 <i>Presencia y localización de GFAP</i>	42
XI. DISCUSIÓN	44
11.1 <i>Efecto del péptido Amiloide-beta 25-35 y del pretratamiento con los flavonoides en la prueba del aprendizaje y la memoria espacial</i>	44
11.2 <i>Concentraciones de ROS Y PL a los diferentes tiempos, determinadas en el hipocampo</i>	46
11.3 <i>Presencia y localización de GFAP</i>	48
XII. CONCLUSIÓN	50
XIII. PERSPECTIVAS	51
XIV. APENDICE	52
14.1 Artículo	52
XV. BIBLIOGRAFÍA.	58

## Abreviaturas y acrónimos

A	Alanina
ADAM	<i>A desintegrin and metalloproteins</i>
AICD	<i>APP intracelular domain</i>
AMPA	<i>alfa-amin-3-hidroxi-5-metil-4-iso-xasoll-propionic acid</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
aph1	<i>Anterior pharaniux</i>
ApoE	<i>Apolipoprotein E</i>
APP	<i>Amyloid beta precursor protein</i>
APPL1 y APPL2	<i>Amyloid beta precursor protein-like 1 y 2</i>
AVISA	Años de vida saludable
A $\beta$ 1-42	Péptido amiloide beta de 42 aminoácidos
A $\beta$ 25-35	Péptido del aminoácidos 25 al 35 del A $\beta$
BACE	<i><math>\beta</math>-site APP Cleaving Enzyme</i>
C	Calmodulina
CA1	Cuerno de Ammnos
CAT	Catalasa
CH	Cuerpos de Hirano
D	Ácido aspártico
DCF-DA.	Diclorofluoresceína- diacetato
2,7, DCF	2,7, diclorodihidrofluoresceina
DGC	Degeneración granulovacuolar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxirribunucleic acid</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAE	Enfermedad de Alzheimer esporádica
EAF	Enfermedad de Alzheimer familiar
EC	Epicatequina
EGb 761	Extracto del ginkgo biloba
EGCG	Epigalocatequinagalato
EO	Estrés oxidativo
ESM	Error estándar de la media
FCT	Fragmento C-terminal
FITC	<i>Flourescein isotiocianate</i>
GABA	<i>Gamma amino butiric acid</i>
GluT	Glutación transferasa
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
H	Hidrolasa
4-HNE	4-hidroxinonenal
HO-1	Hemooxigenasa-1,
I	Isoleucina
icv	Intra cerebro-ventricular
IDE	<i>Insulin degrading enzyme</i>
K	Lisina

L	Leucina
M	Metionina
MDA	Malondialdehído
MMP9	<i>Matrix Metalloprotein-9</i>
N	Nicastrina
NEP	Neprelisina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	<i>Nitric oxide</i>
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
NPS	Nitroprusiato de sodio
NT	Nitrotirosina
O <sub>2</sub> -	Ión anión superóxido
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehído
pH	Potencial de hidrógeno
phen-2	<i>Presenelin enhancer-2</i>
PKC	Proteinkinasa C
PL	Peroxidación de lípidos
PLC	Fosfolipasa C
PNs	Placas neuríticas
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation endproducts</i>
RL	Radicales libres
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SABE	Salud, bienestar y envejecimiento
SAC	S-alilcisteína
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SSI	Solución salina isotónica
T	Treonina
TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
V	Valina
$\alpha$ - $\beta$ - y $\gamma$ - secretasas	Enzimas alfa- beta- y gamma- secretasa



## I. RESUMEN

El péptido amiloide beta (A $\beta$ ) - componente principal de las placas neuríticas (PN) - está involucrado en la pérdida de la memoria y la neurodegeneración que se observa en cerebros de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer. Se ha postulado que los agregados del A $\beta$ , ejercen efectos tóxicos sobre las neuronas, vía estrés oxidativo. La forma más tóxica del A $\beta$ , es la que está formada de 42 aminoácidos (A $\beta$ 1-42). Las evidencias apuntan que la fracción 25-35 del A $\beta$  (A $\beta$ 25-35), es el dominio funcional neurotóxico. Estudios in vitro sugieren que la metionina localizada en la posición 35 es la responsable del daño oxidativo. El uso de antioxidantes, como los flavonoides, evita el daño que causa el A $\beta$ 25-35. Nosotros proponemos que el A $\beta$ 25-35 produce deterioro cognitivo mediado por el estrés oxidativo. De ahí que, en este trabajo evaluamos el efecto del A $\beta$ 25-35, inyectado en el hipocampo de ratas. Realizamos la prueba del aprendizaje y la memoria espacial; cuantificamos la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y peroxidación de lípidos (PL) a diferentes tiempos y realizamos inmunohistoquímica para GFAP, como marcador de gliosis. Además, utilizamos un pretratamiento con flavonoides. Los resultados muestran que el A $\beta$ 25-35, produce pérdida del aprendizaje y la memoria, incrementa la formación de ROS y PL; aumenta el número de astrocitos reactivos. El pretratamiento con la Epicatequina (EC) - la EC fue el flavonoide con mejor protección al daño producido por el A $\beta$ 25-35 - evitó la pérdida del aprendizaje y la memoria, disminuyó la formación de ROS y PL y disminuyó el número de astrocitos reactivos. Los resultados sugieren que el A $\beta$ 25-35, causa la pérdida del aprendizaje y la memoria, a través de daño oxidativo mediado por el estrés oxidativo. El efecto protector de la Epicatequina sustenta esta hipótesis.

*Palabras clave: enfermedad de Alzheimer, estrés oxidativo, amiloide beta (25-35), Epicatequina.*

## **Abstract**

Beta amyloid peptide (A $\beta$ ), the main component of neuritic plaques (NP), is involved in memory loss and neurodegeneration seen in the brains of Alzheimer's patients. It has been postulated that A $\beta$  aggregates exert toxic effects on neurons via oxidative stress, the most toxic form of A $\beta$  consisting of 42 amino acids (A $\beta$ 1-42). Evidence suggests that the sequence A $\beta$  25-35 (A $\beta$ 25-35) is the neurotoxic functional domain. In vitro studies also suggest that methionine located at position 35 is responsible for oxidative damage. The use of antioxidants such as flavonoids, have been shown to prevent damage caused by A $\beta$ 25-35. We propose that the A $\beta$ 25-35 produces cognitive impairment mediated by oxidative stress. In this study, the effects of A $\beta$ 25-35 were evaluated after its injection into the rat hippocampus. Spatial learning and memory were tested, the formation of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation (PL) at different times was quantified, and immunohistochemistry for GFAP, as a marker of gliosis, was performed. The effects of pretreatment with flavonoids were also investigated. The results indicate that A $\beta$ 25-35 was able to produce learning impairment and memory loss, increased the formation of ROS and PL, and increased the number of reactive astrocytes. Pretreatment with the flavonoid Epicatechin (EC) provided significant protection from the damage caused by A $\beta$ 25-35; learning and memory were not affected and the formation of ROS and PL decreased, as well as the number of reactive astrocytes. In conclusion, results suggest that A $\beta$ 25-35 causes learning impairment and memory loss, through oxidative damage to the hippocampus, that its effects can be counteracted by flavonoids, specifically Epicatechin.

*Keywords: Alzheimer's disease, oxidative stress, amyloid beta (25-35), Epicatechin.*

## II. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA), es una enfermedad neurodegenerativa que clínicamente se caracteriza por la pérdida de la memoria. Existen dos tipos de EA, la familiar y la esporádica. La familiar, representa menos del 10 % del total de casos, la mayoría de estos casos presenta mutaciones en tres genes localizados en los cromosomas 21, 14 y 1. El 90 % de los casos de EA es de origen desconocido. Se han determinado diversos factores de riesgo involucrados, por lo que se dice que es de tipo multifactorial.

Independientemente del tipo de EA que se presente en los pacientes, se han encontrado dos características que son los indicadores claves de la patología; la placa neurítica, formada por agregados del péptido A $\beta$  y la maraña neurofibrilar, compuesta de agregados intraneuronales de proteína tau hiperfosforilada.

La forma más tóxica del A $\beta$ , es la que está formada de 42 aminoácidos (A $\beta$ 1-42). Se ha demostrado que el A $\beta$ 1-42, produce deterioro cognitivo. Las evidencias apuntan que la fracción 25-35 del A $\beta$  (A $\beta$ 25-35), es el dominio funcional neurotóxico. Uno de los mecanismos implicados, en el proceso de neurotoxicidad del A $\beta$ 25-35, es el estrés oxidativo (EO), sugiriéndose que la metionina -localizada en la posición 35 - es la responsable del daño oxidativo de esta fracción. El uso de moléculas con actividad antioxidante disminuye el efecto tóxico de este péptido, indicando de manera indirecta la participación del EO en el mecanismo de daño. Sin embargo, no es clara la relación entre el deterioro cognitivo y el estrés oxidativo que genera esta fracción.

En este trabajo utilizamos el modelo de inyección intrahipocampal del A $\beta$ 25-35, en ratas Wistar. Evaluamos el aprendizaje y la memoria como indicadores de deterioro cognitivo; cuantificamos las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la peroxidación de

lípidos (PL), como marcadores de estrés oxidativo, e inmunohistoquímica para GFAP, como marcador de astrocitos reactivos. Además utilizamos pretratamiento con flavonoides, como inhibidores del estrés oxidativo, y con ello demostrar el efecto prooxidante del A $\beta$ 25-35.

Los datos presentados en este trabajo, demuestran que el péptido A $\beta$ 25-35 produce deterioro en el aprendizaje y la memoria; aumenta la formación de ROS y PL, además de astrocitosis. Estos resultados sugieren que el péptido A $\beta$ 25-35 ejerce daño vía estrés oxidativo. El pretratamiento con los flavonoides, demostró que la Epicatequina, fue la molécula que inhibió mejor el deterioro cognitivo. La Epicatequina inhibió el estrés oxidativo y disminuyó la activación de los astrocitos.

Los resultados que mostramos dan evidencia de que el péptido A $\beta$ 25-35 produce deterioro cognitivo mediado por el estrés oxidativo. Este efecto se puede prevenir con antioxidantes como la Epicatequina.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 La enfermedad de Alzheimer (EA)

Hace un poco más de 100 años, Alois Alzheimer dio lectura a la descripción del primer caso de la enfermedad de Alzheimer en un congreso en Tübingen Alemania. El caso que describió Alzheimer fue de una paciente femenina, de 51 años (August D.), la cual mostraba deterioro en la memoria, principalmente. Las muestras del cerebro, de la autopsia realizada a Auguste D, mostraron los dos marcadores histopatológicos característicos de la enfermedad: las placas neuríticas (PNs) y las marañas neurofibrilares (MNFs). Estos hallazgos fueron publicados en 1907, y más tarde Kraepelin refirió este caso como “enfermedad de Alzheimer”, en su publicación sobre demencias en 1910 (Allen, 2007).

Los síntomas iniciales de la EA con frecuencia son sutiles y un deterioro intermitente en la realización de tareas de la vida cotidiana. En estados avanzados de la enfermedad, se desarrolla una demencia profunda, los pacientes están desorientados en el tiempo y espacio, y a veces, no pueden identificar aún miembros cercanos a la familia. La muerte ocurre, en promedio, a los 9 años después del diagnóstico clínico inicial y es causado principalmente por complicaciones respiratorias como aspiración o neumonía (Maurer y cols, 1997). El diagnóstico definitivo de la EA sólo podrá efectuarse a través de un estudio neuropatológico *post mortem* (De León y cols, 1999).

Hasta ahora los criterios que definen a la EA son escasos: la presencia de una demencia progresiva, y de las PNs y las MNFs. Debido a la presencia de alteraciones en moléculas tales como: la proteína precursora del amiloide, la proteína *tau* hiperfosforilada, las enzimas alfa- beta- y gamma- secretasas ( $\alpha$ -  $\beta$ - y  $\gamma$ - secretasas), la apolipoproteína E, neurotransmisores, receptores, entre otras, probablemente, la enfermedad se describa mejor como un síndrome, que resulta de la alteración de diferentes vías.

### 3.1.1 Prevalencia de la EA

La EA es la forma más común de demencia, abarca entre el 50 % y 60 % de todos los casos. La prevalencia de la EA, incrementa con la edad, afecta aproximadamente entre el 1 % y el 3 % de la población de 60 años de edad, del 3% al 12% de la población entre 70 y 80 años, y por arriba del 25 % al 35 % a la población de 85 años o más (Walsh y Selkoe, 2004). Considerando que la esperanza de vida se incrementa constantemente no sólo en los países industrializados, se estima que para el 2020 aproximadamente el 70 % de la población mayor de 60 años pertenecerá a países en vías de desarrollo, lo que podría incrementar la prevalencia de la EA (López-Pousa 2002).

En México aún no existen estudios epidemiológicos que demuestren la prevalencia de la EA. En 1999 se realizó una encuesta sobre salud y bienestar (SABE) y se encontró que el 10.8 % de la población de adultos mayores tuvieron padecimientos neurológicos. En la **tabla 1**, se observan las diez principales causas de años de vida saludable (AVISA) perdidos tanto para mujeres como para hombres. Las mujeres presentan dentro de sus principales problemas de salud, demencia y enfermedad de Alzheimer. A diferencia de las mujeres, los hombres mostraron depresión unipolar mayor o accidentes vehiculares (Lozano y cols, 2006).

Principales causas de AVISA perdidos por sexo, México 2005

MUJERES		HOMBRES	
CAUSA	%	CAUSA	%
Depresión unipolar mayor	6.5	Afecciones originadas en el periodo perinatal	5.9
Diabetes mellitus	6.3	Cirrosis y otras enf. crónicas del hígado	5.1
Afecciones originadas en el periodo perinatal	5.3	Uso de alcohol	4.8
Anomalías congénitas	4.3	Agresiones (homicidios)	4.6
Enf. Isquémicas del corazón	2.8	Accidentes de vehículos de motor (tránsito)	4.6
Osteoartritis	2.3	Diabetes mellitus	4.5
Cataratas	2.2	Anomalías congénitas	4.0
Enf. cerebrovascular	2.2	Enfermedades Isquémicas del corazón	3.5
Demencia y enf. Alzheimer	2.1	Depresión unipolar mayor	2.6
Asma	2.0	Peatón lesionado enAVM	2.2
Total (millones)	6.9	Total (millones)	8.4

**Tabla 1.** El peso de la Enfermedad de las Mujeres en México, 2005. Dirección General de Información en Salud. Secretaría de Salud.

### **3.1.2 Factores de riesgo asociados a la EA**

La edad sigue siendo el principal factor de riesgo, la prevalencia se duplica cada 5 años después de los 60 años de edad (Launer y cols 1999; Walsh y Selkoe, 2004).

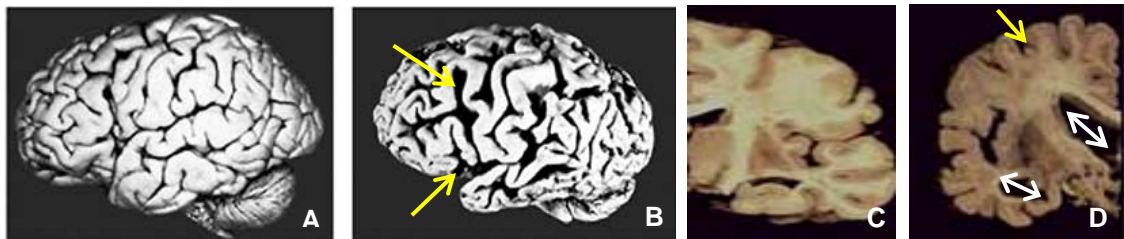
El género femenino se asocia con un riesgo mayor de padecer la EA. En la encuesta SABE se confirmó que las mujeres presentan mayor longevidad (77.1 años) con respecto a los hombres (72.5 años). Se ha sugerido que los estrógenos, al estar disminuidos en la etapa post-menopáusica hacen vulnerables a las neuronas frente a diferentes agentes tóxicos (Kolsh y Rao, 2002). Se sabe que los estrógenos a nivel cerebral tienen actividad antioxidante, participación en la actividad y expresión de enzimas colinérgicas y el factor de crecimiento nervioso (Hebert y cols, 2001; Alberca y cols, 2002; Lambert y cols, 2004).

La EA familiar (EAF), es hereditaria en forma autosómica dominante y está ligada a mutaciones en los cromosomas 21, 14 y 1 (Selkoe, 2001). En el cromosoma 21, se encuentra el gen que codifica para la proteína precursora del amiloide (APP, Amyloid beta Precursor Proteín), en el cromosoma 14 está el gen que codifica para la presenilina 1 (PS1), y en el cromosoma 1, se encuentra el gen que codifica para la PS2 (Sherrington y cols 1995; Ling y cols 2007; Bertram y Tanzi, 2008). Las PS son componentes de la gama secretasa y se presume que son las responsables del corte de la APP. Otro gen de riesgo es el que codifica para la ApoE se localiza en el cromosoma 19, teniendo tres variantes polimórficas ApoE2, ApoE3 y ApoE4. La ApoE4, incrementa tres veces el riesgo de padecer la EA en individuos heterocigotos y 15 veces en homocigotos (Zannis y cols. 1981; Holtzman 2001). La ApoE esta involucrada en el transporte del colesterol, se sugiere que ApoE4 facilita la acumulación del A $\beta$ .

Algunos estudios epidemiológicos, sugieren el traumatismo craneoencefálico, una dieta de alto contenido calórico, un estilo de vida sedentario y la exposición a metales pesados, pueden incrementar el riesgo de padecer la EA (Schmand y cols, 1997; Mayeux, 2003; Mattson, 2003; Bush y cols, 2003).

### 3.1.3 Neuropatología de la EA

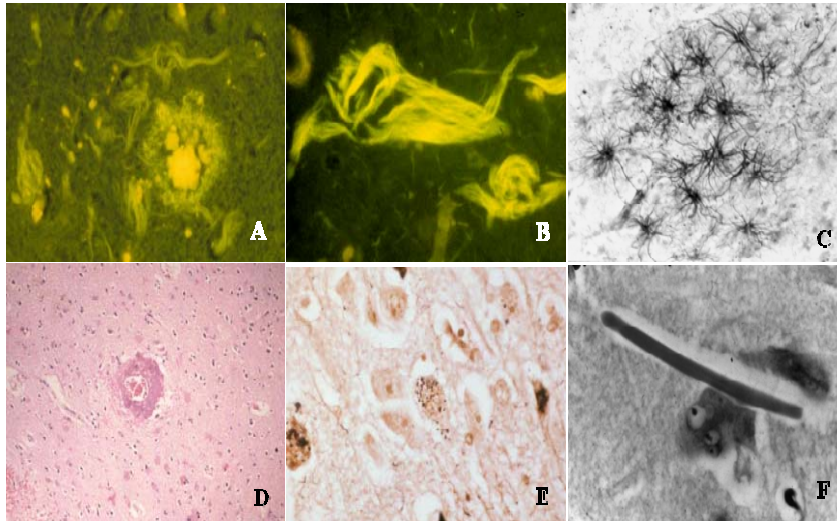
El análisis macroscópico post-mortem de los cerebros de pacientes con EA severa, revela una reducción significativa en el tamaño del cerebro, adelgazamiento de los giros corticales, agrandamiento de los surcos y dilatación de los ventrículos (**Fig. 1**). Se estima una pérdida del 40 % de neuronas piramidales en la corteza, del 68 % de neuronas en la región CA1 del hipocampo y del 40 al 70 % en núcleos sub-corticales como el núcleo dorsal de rafe, *locus coeruleus* y núcleos basales (Esiri, 2007).



**Fig 1.** En el cerebro de un paciente con EA (B) se observa una disminución del tamaño y un adelgazamiento de los giros en el lóbulo temporal y frontal (flechas en amarillo) en comparación con el cerebro de una persona normal (A). Los cortes coronales del cerebro de pacientes con EA (D), muestra un aumento en la profundidad de los surcos, se observa dilatación de los ventrículos (flechas en blanco), comparado con un cerebro normal (C). (Imágenes tomadas de Mattson, 2004).

Existen diferentes componentes a nivel microscópico (**Fig. 2**), las lesiones más distintivas observables son las PNs y MNFs. Se observa degeneración neuronal, gliosis, degeneración granulovacuolar (DGC), angiopatía amiloide o congofila e inclusiones citoplasmáticas eosinófilas denominados cuerpos de Hirano (CH). Es importante aclarar que la DGV y los CH no son marcadores específicos de la EA (Esiri, 2007).





**Fig. 2.** Lesiones microscópicas observada en la EA. Las PNs (A) y MNFs (B) teñidas con Thioflavin S. La astroci-tosis se observa con una inmunohistoquímica para GFAP (C). Los vasos sanguíneos también muestran depósitos del A $\beta$ , principal mente en la pared de los vasos (D). Se puede apreciar la DGV (E) y los CH (F). (Fotos tomadas de, Mann 1985; Terry y cols 1991,1999, excepto la C que corresponde al Lab. Experimental de Enfermedades neurodegenerativas).

Las placas pueden tener un “núcleo” denso de proteína amiloide, en forma de hojas beta plegadas, tienen tamaño variable, de 5-200 $\mu$ m de diámetro, éstas pueden ser de naturaleza “neurítica” (PNs, rodeadas e infiltradas por neuritas degeneradas) o difusas. En las placas difusas, las cuales son más abundantes, los amiloides no están en hojas beta plegadas y requieren de anticuerpos para ser visualizados (Ghisso y Frangione, 2002). La naturaleza y el desarrollo preciso de las placas han sido de gran interés, dado que se conoce que las mutaciones que causan la EAF, involucran alteraciones en la APP, favoreciendo la generación del A $\beta$ . Aunque, se sabe que el A $\beta$  es el principal constituyente de las PNs, se han encontrado otras proteínas asociadas, incluyendo enzimas como acetilcolinesterasa y  $\alpha$ -1-antiquimotripsina, el componente P amiloide, apolipoproteína E y J, entre otras.

Las MNF se observan al microscopio como una maraña compuesta por fibrillas entrelazadas, insolubles, conocidas como filamentos helicoidales apareados (FHA), su principal constituyente es la proteína *tau* hiperfosforilada. Se sabe que la función normal de la proteína *tau* es unir y estabilizar a los microtúbulos, los cuales forman el citoesqueleto de la neurona y es importante en el transporte de proteínas en la neurona. Este proceso de unión y estabilidad de los microtúbulos se da mediante un proceso de

fosforilación y defosforilación mediado por la acción enzimática de cinasas y fosfatas (Alonso, 1997). Si la proteína tau fosforilada no se defosforila es incapaz de unirse a los microtúbulos, generando así la polimerización de la proteína tau fosforilada en filamentos enrollados, los filamentos enrollados se entrelazan, formando así los FHA de tau (Goedert, 1993; Lee, 1995; Iqbal y cols, 1998; Brion y cols 2001). Los FHA, son estructuras anormales intracelulares que se forman en el pericario de la neurona. Al igual que las placas, se observan con tioflavina S o anticuerpos específicos para la proteína tau hiperfosforilada. Su tamaño está en relación al tipo neuronal en la que se encuentran. Las MNFs no sólo están presentes la EA, sino también en otras enfermedades demenciales. Una de las hipótesis que contrapone a la hipótesis amiloide, sugiere que el primer evento es la hiperfosforilación de la proteína tau, lo que conlleva a la despolimerización de los microtúbulos, generando así los FHA - constituyentes principales de las MNFs -, lo que da como resultado la muerte neuronal (Iqbal y cols, 1989).

Wilcock y Esiri (1982) reportaron una correlación entre la demencia con la formación de MNFs y una asociación menor con las PNs. Pero, desde que se sabe que las mutaciones en APP, causan un incremento en la formación del A $\beta$  y que también conlleva a la formación de MNFs, se sugiere que puede darse una asociación entre estos dos marcadores. Esto aún está en discusión en términos de la patología molecular; sin embargo, en términos de conexiones anatómicas hay evidencias que sugieren que las PNs se encuentran en las terminaciones de los axones y las dendritas de las neuronas con MNFs. Esto sugiere una situación en donde los axones de las neuronas están afectados retrógradamente por depósitos de A $\beta$  u oligómeros de A $\beta$ , impidiendo la sinapsis. En este sentido se están realizando modelos, que involucra alteraciones de A $\beta$  y tau, para esclarecer la interacción entre el péptido A $\beta$  y la proteína *tau* (Lewis y cols, 2001; Gotz y cols, 2004).

### **3.1.4 El péptido A $\beta$**

El término amiloide es utilizado para algunos péptidos que bajo condiciones fisiológicas se agregan para formar filamentos insolubles de 7-9 nm de diámetro, y están constituidas por hojas anti-paralelas  $\beta$ -plegadas; al unirse al rojo congo exhiben birrefringencia verde observadas en microscopia de luz polarizada (Klunk y cols 1989).

#### **3.1.4.1 Procesamiento de la proteína precursora del amiloide beta o APP para la generación del péptido A $\beta$**

Los depósitos proteicos presentes en tejido de cerebros humanos con EA, son agregados multiméricos de un polipéptido de 4KDa, de aproximadamente 40 residuos de aminoácidos, conocido como el péptido amiloide-beta (A $\beta$ ) (Glener y Won, 1984, Masters y cols 1985). Tras la identificación de la secuencia de aminoácidos del A $\beta$ , se demostró que este péptido se derivaba de una proteína precursora mucho más larga, la APP. La APP tiene características de una glicoproteína de membrana tipo 1, con un dominio largo hidrofóbico amino-terminal, extracelular, un sólo dominio hidrofóbico transmembranal y un dominio corto hidrofóbico carboxilo-terminal citoplasmático (Turner y cols 2003). Es codificada por un sólo gen y se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 21 (21q21), éste gen contiene 19 exones y existen al menos 8 variantes por *splicing* alternativo de los exones 7, 8 y 15, que tienen un patrón de expresión específico celular, las formas más comunes son de 695, 751 y 770 residuos de aminoácidos. La APP se expresa en todos los tejidos; la APP de 695 aminoácidos, es la forma más común en el cerebro (Kang y cols, 1987; Patterson y cols, 1988; Yoshikai y cols, 1990).

En los mamíferos existe la APP y otras proteínas relacionadas con esta como APPL1 y APPL2 (*Amyloid beta Precursor Proteína-Like 1 y 2*). Ésta familia de proteínas, así como sus productos de secreción, han sido relacionadas con funciones celulares

importantes, como moléculas de adhesión celular, el crecimiento neurítico, la arborización neurítica, la sinaptogénesis, la plasticidad sináptica, la excitabilidad neuronal, el transporte axonal, como reguladoras de la división celular en el tallo cerebral, reguladoras de vías de señalización a receptores acoplados a proteínas G, como elementos de cascadas de señalización reguladas por cinasas, como inductor de la transcripción de genes, reguladoras de la homeostasis de calcio y de cobre, así como actividades neurotróficas y neurotóxicas (Reinhard y cols, 2005, Cappai y cols, 2007).

El proceso de corte de APP sigue dos rutas: la no amiloidogénica, se da por la acción de la  $\alpha$ - y  $\gamma$ -secretasa. La  $\alpha$ -secretasa corta entre lisina (K) 687 y (L) leucina 688 secretando una APP- $\alpha$  soluble, N-terminal y un fragmento C-terminal (FCT) de 83 aminoácidos (C83). La acción de la  $\alpha$ -secretasa inhibe la formación del A $\beta$ , debido a que corta en K17 y L18 de dicho péptido. La  $\gamma$ -secretasa corta el FCT dentro del dominio trans-membrana entre valina (V) 711 e isoleucina (I) 712 o alanina (A) 713 y treonina (T) 714, generando el péptido p3 y un dominio intracelular de APP (DICP). La otra vía alterna denominada amiloidogénica, se da por la acción de la  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa. La  $\beta$ -secretasa corta entre metionina (M) 671 y ácido aspártico (D) 672 para formar PPA $\beta$  soluble y un FCT unido a la membrana de 99 aminoácidos (C99), la  $\gamma$ -secretasa corta el FCT en el mismo sitio descrito en la vía no amiloidogénica, generando el péptido A $\beta$  de 40 a 43 aa (Evin y Weidemann 2001; Turner y cols, 2003). Se ha sugerido que la familia de las ADAM (*a disintegrin and metalloproteins*) tienen actividad  $\alpha$ -secretasa (Buxbaum y cols, 1998; Lammich y cols, 1999). Las que tienen actividad  $\beta$ -secretasa han sido denominadas como BACE ( *$\beta$ -site APP Cleaving Enzyme*) (Lin y cols 2000; Sinha y cols, 1999). La  $\gamma$ -secretasa es un complejo multimérico y comprende presenilinas (PS1 y PS2), nicastrina, aph1 (*anteriux pharinge-1*) y phen-2 (*presenilin enhancer-2*) (Nunan y Small 2000, **Fig. 3**).

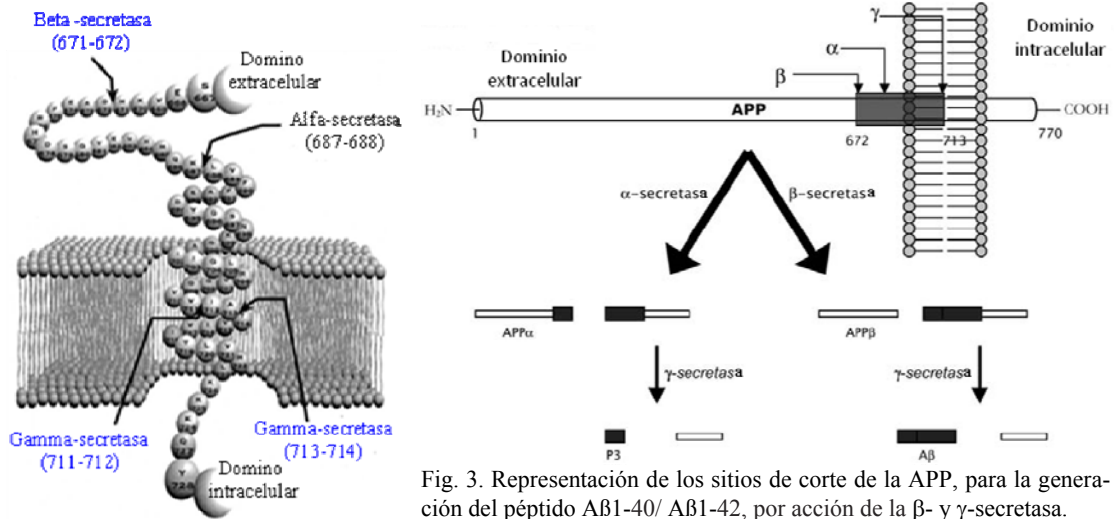


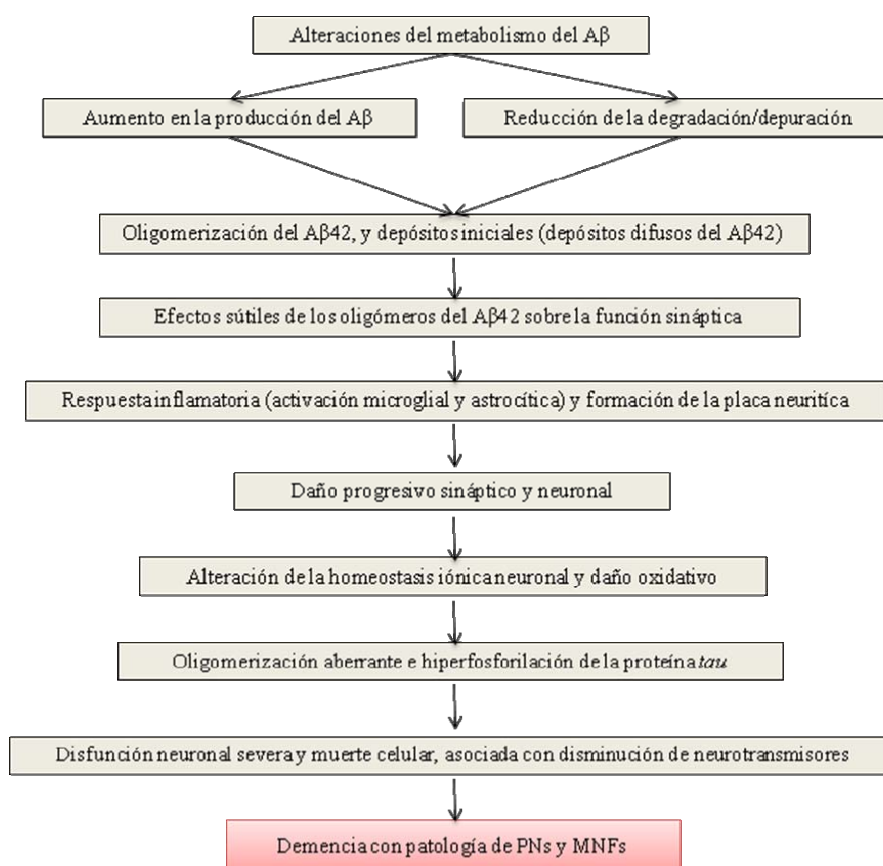
Fig. 3. Representación de los sitios de corte de la APP, para la generación del péptido Aβ1-40/ Aβ1-42, por acción de la β- y γ-secretasa.

El vínculo genético que existe en la EA, es el argumento más fuerte para considerar que el Aβ, juega un papel central en la patogénesis de la EA y no es solo un epifenómeno. Esto dio pie a postular “la hipótesis del amiloide” (Hardy y Selkoe, 2002).

### 3.1.4.2 La hipótesis de la cascada del amiloide

La hipótesis de la cascada del amiloide es una de las mejores sustentadas acerca de la génesis de la EA. En resumen, se sugiere que los cambios graduales en la regulación de la concentración del péptido Aβ en el cerebro, inician la cascada amiloide. Las concentraciones del péptido Aβ pueden incrementarse por un aumento de su producción o una disminución en la depuración. La relación Aβ1-42/1-40 puede aumentar por mutaciones en tres diferentes genes APP, PS1 y PS2, los cuales causan EAF. Este incremento relativo de Aβ1-42 aumenta la formación de oligómeros, el cual causa cambios sutiles en la función sináptica que luego se tornan severos y permanentes. En paralelo, el Aβ1-42 forma depósitos visibles al microscopio en el parénquima cerebral, primero como placas difusas, que más tarde comienzan a adquirir la forma fibrilar del Aβ, coincidiendo con la presencia de una respuesta inflamatoria local, la pérdida de espinas dendríticas y la formación de neuritas distroficas. Al paso del tiempo, estos eventos resultan en estrés oxidativo, alteraciones en la homeostasis de iones como el calcio, y un gran

número de cambios bioquímicos adicionales. Las MNFs se pueden inducir por la actividad alterada de cinasas y fosfatasas y contribuir a los defectos adicionales, incluyendo algunos del transporte axonal. La cascada termina afectando gran parte de la función sináptica y neuronal culminado en la muerte celular, lo que se refleja en la demencia progresiva asociada con una severa patología de A $\beta$  y tau (Hardy y Higgins 1992; Selkoe, 1999; Selkoe 2000; Hardy y Selkoe, 2002. **Fig 4**).



**Fig 4.** Diagrama de la hipótesis de la “cascada del amiloide”, en la EA (Hardy y Selkoe, 2002)

A pesar de que algunas veces los hallazgos se consideren contradictorios para la hipótesis del A $\beta$ , existe la evidencia genética indiscutible de que la APP está asociada al desarrollo de la EAF que es difícil de contradecir. En este sentido, se han diseñado experimentos, para establecer y validar modelos de toxicidad con el A $\beta$ , para entender que papel juega en la EA. Existen un gran número de evidencias que apuntan a que el péptido

do amiloide beta (A $\beta$ ) juega un papel etiológico en el desarrollo de la EA, resumido en los siguientes puntos:

- 1) Los depósitos del péptido A $\beta$  están universalmente asociados con casos clínicos de la EA y parecen ser proporcionales a la severidad del déficit cognitivo (Dickson y cols, 1995)
- 2) El cromosoma 21, contiene el gen que codifica a la APP, la trisomía 21 (síndrome de Down) genera la formación excesiva de la APP, lo que conlleva a depósitos tempranos e inicio temprano de demencia (Lemere y cols, 1996).
- 3) Los casos familiares de Alzheimer frecuentemente tienen una mutación en la APP (Ling y cols 2007).
- 4) Numerosos estudios han mostrado que los péptidos amiloideos pueden ser tóxicos para las neuronas y otras células, pueden inhibir procesos involucrados en la memoria tal como la potenciación a largo plazo (Walsh y cols 2002).
- 5) La infusión de A $\beta$  o su sobreexpresión en ratones causa un síndrome en animales con depósitos de amiloide, pérdida sináptica, déficit cognitivo. Sin embargo, la pérdida neuronal franca no se ha visto (Cullen y cols, 1997; Nalbantoglu y cols 1997).
- 6) Vacunas contra la A $\beta$  previenen o revierten el síndrome tipo Alzheimer en ratones transgénicos (Schenk y cols, 1999).

### **3.1.4.3 Toxicidad del A $\beta$**

Un factor común involucrado en el mecanismo de toxicidad del A $\beta$  es la formación de dímeros, oligómeros y polímeros (Roher y cols 1996; Harper y cols, 1999; Pike y cols 1993; Lorenzo y Yankner 1994). Los primeros estudios realizados en cultivo primario de células corticales e hipocampales, expuestas a el A $\beta$  mostraron tanto efectos tróficos como tóxicos del péptido (Withson y cols, 1989, Yankner y cols, 1990). La razón de este efecto dual, se debió a que las condiciones de los cultivos eran variables.

En general, en los cultivos celulares, se han podido describir los parámetros que influyen el grado de toxicidad del A $\beta$ , entre ellos son: la alta densidad celular exhibió un índice más lento de muerte celular, comparado con cultivos de baja densidad celular, la degeneración ocurre durante 24-96 h, a concentraciones relativamente altas del péptido (10 a 100 $\mu$ M) y el factor quizás más importante, fue el estado de agregación del péptido A $\beta$  (Pike y cols, 1991, Pike y cols, 1993; Delobette y cols, 1997). Se sugiere que existe una vulnerabilidad selectiva del péptido A $\beta$  al incremento del estrés oxidativo y al deterioro en el metabolismo energético, que conlleva a la oxidación de lípidos, proteínas y DNA (Mattson, 2004), alteración en la homeostasis del calcio (Mattson y cols, 2002; Mattson y Chang 2003). Se dice que la secuencia de aminoácidos del 25 al 35 es el dominio funcional neurotóxico (Yankner y cols, 1990). Se demostró que la forma agregada del A $\beta$ 25-35, produce una apertura irreversible de los canales que transportan calcio<sup>2+</sup> (Blanchard y cols, 1997). Estos datos apoyaron la idea del efecto tóxico a nivel celular del A $\beta$  y dieron pie a la utilización de modelos animales.

Se han utilizado ratones transgénicos que sobreexpresan la APP, o algunas de las PS. En estos modelos transgénicos se generan características similares a una EAF (Wong y cols 2002; Oddo y cols, 2003). La mayoría de ellos reproducen anomalías neuroquímicas y estructurales como el depósito del péptido A $\beta$ , neuritas distróficas (Games y cols, 1995; Gordon y cols, 2002), neuroinflamación (Frautschy y cols, 1998) y deterioro cognitivo (Hsiao y cols 1996, Irizarry y cols 1997). Un incremento en la producción de A $\beta$  o la microinyección intracerebral de A $\beta$ , aumenta la patología de *tau* en ratones transgénicos que sobreexpresan una *tau* mutante (Gotz y cols, 2004; Lewis y cols, 2001), Sin embargo, las MNFs no se inducen en estos modelos a pesar de la abundancia del A $\beta$  cerebral.



En el modelo de neurotoxicidad inducido por la microinyección intracerebral de los péptidos amiloideos (**Tabla 2**), se ha demostrado que el A $\beta$  causa muerte neuronal colinérgica (Yamaguchi y Kawahima, 2001), inflamación (Shen y cols 2007), estrés oxidativo, incremento de óxido nítrico (NO), deterioro cognitivo (Olariu y cols, 2001; Stepanichev y cols, 2003; Limón y cols, 2009) alteraciones en los neurotransmisores (Cheng y cols, 1996) y aminoácidos (Yenkoyan y cols 2009), entre otros.

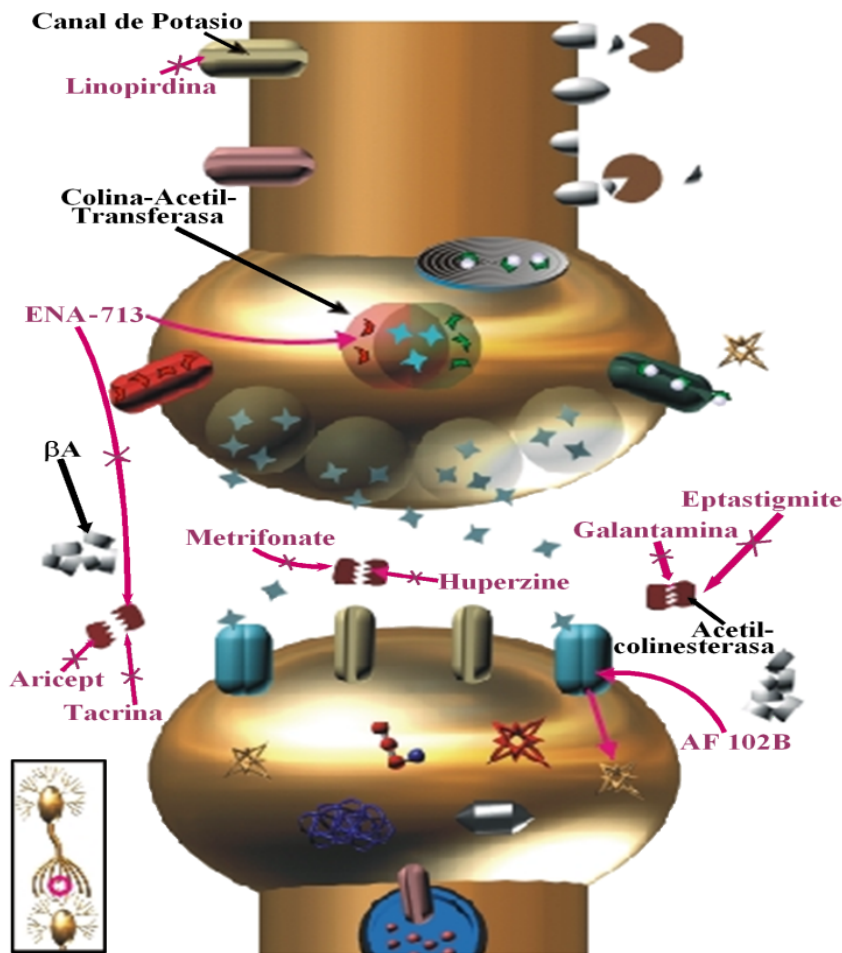
Sitio de inyección	Condiciones del péptido	Resultados	Cita
Microinyección en el hipocampo. Ratas Sprague-Dawley	AB1-40 y AB25-35 en 10% dimetil sulfóxido, 3nmol en 1 $\mu$ l	Daño tisular y neurodegeneración	Rush y cols 1992
Infusiones continuas icv. Ratas Wistar (280-320g)	AB en 35% acetonitrilo/0.1% ácido trifluoacético (TFA). 0.3, 3, 30, 300 pmol/día/2 semanas	Deterioro del aprendizaje y degeneración colinérgica	Nitta y cols 1994
Una sola dosis en el hipocampo. Ratas Sprague-Dawley (380 g)	AB1-40 en 35% de metilcianida. 2 $\mu$ L, 10 $\mu$ M	la consolidación de la memoria se encontró deteriorada	McDonal y cols 1994
Inyección en el septum medial. Ratas Wistar (250-300 g)	AB1-42, AB1-40, AB40-1, en 40% acetonitrilo/0.1% TFA. AB25-35 o AB35-25 en agua destilada, 0.75, 1.5 y 3 nmol	Deterioro en la memoria de corto plazo	Terranova y cols 1996
Dosis continuas icv. Ratas Wistar (250 g)	AB25-35 en agua estéril, 5 o 20 mg/día/7 días	Disminuye la receptores muscarínicos en la corteza cerebral	Pavia y cols 2000
Inyección icv. Ratas Wistar (150–200 g)	AB15-25, AB25-35 y AB35-25, 100 o 10 nmol en 5 $\mu$ L.	Inhiben la potenciación a largo plazo en la región CA1 del hipocampo.	Freire y cols 2001
Inyección en el hipocampo. Ratas Wistar (250–320 g)	AB 25–35 en 10 mM PBS. 1 $\mu$ g/ $\mu$ l	Sólo en condiciones de inhibición de la glicolisis y fallo mitocondrial el AB25-35 es capaz de inducir neurodegeneración.	Arias y cols 2002
Infusiones continuas icv. Ratas Wistar (200–225 g)	AB1-40 o AB40-1 en 35% acetonitrilo/0.1% TFA, 0.3 nmol/día/14 días.	Reduce la actividad de la PKC en el hipocampo y deterioro en la memoria	Olariu y cols 2002
Dosis única icv. Ratones	AB25-35 en agua estéril, 5 nmol, se incubó a 37°C/4 días.	Pérdida de la memoria, atrofia axonal, pérdida sináptica, estos efectos fueron contrarrestados con el uso de Ginsen.	Tohda y cols 2004
Dosis única icv. Ratones	AB1-40 o AB40-1 en PBS, 400 pmol, se incubó a 37°C/4día.	Cambios en el sistema antioxidante (GSH), pérdida del aprendizaje y la memoria especial.	Prediger y cols 2007
Inyección bilateral en el hipocampo. Ratas Sprague Dawley	AB25-35 en solución salina estéril, 10 $\mu$ M, se incubó a 37°C/7 días	La pérdida del aprendizaje y la memoria se le atribuye a la activación glial inducida por el AB25-35, la melatonina ayuda a contrarrestar estos efectos.	Shen y cols 2007
Inyección bilateral en la corteza entorrinal Ratas Wistar (300–350 g)	AB1-42 en agua destilada, 10 $\mu$ M	Induce astrocitosis, y depósitos tipo placas en la corteza entorrinal y pérdida de la memoria	Sipos y cols 2007
Dosis única icv. Ratones	Peroxinitrito (144 mM) con AB25–35 en agua bidestilada, 3 $\mu$ M	Deterioro en la memoria, nitración de proteína. Inhibidos con el ácido rosmarinico	Alkama y cols, 2007

**Tala 2.** Estudios realizados con microinyección intracerebral de los péptidos del A $\beta$ .

### 3.1.4.3.1 Actividad oxido-reductora del A $\beta$

La neurotoxicidad del péptido A $\beta$  se ha asociado a la formación del peróxido de hidrógeno en cultivos celulares, por un mecanismo que involucra la reducción de Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup>, una vez que se da la reducción del Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>+</sup> el oxígeno molecular es entonces atrapado por el A $\beta$  y reducido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una reacción que es dependiente de cantidades estequiométricas de Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>+</sup> (Huang y cols 1999). Se ha demostrado, que el péptido A $\beta$ 1-42 y A $\beta$ 25-35 en presencia de Fe<sup>2+</sup> produce el radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>), a pesar de que el A $\beta$ 25-35 no contiene un sitio de unión fuerte a metales (Tabner y cols, 2002). Se sugiere que la producción de ROS esta mediada por la interacción del A $\beta$  con membranas celulares o bien con proteínas de membrana. Aunque el mecanismo no es claro, se sugiere que depende de la cantidad de iones metálicos, del pH y del colesterol presente en la membrana (Curtain y cols, 2001; Curtain y cols, 2003). Se ha demostrado, tanto in vitro e in vivo, que la metionina 35 presente en el A $\beta$ 1-42 es decisiva para generar estrés oxidativo y las propiedades neurotóxicas del péptido (Yatin y cols 1999). Una explicación de la susceptibilidad de la metionina 35 a la oxidación, es el hecho de que el oxígeno carboxílico de isoleucina 31, se encuentra formando atracciones electrónicas de van der Waals con el átomo de azufre de la metionina 35, la sustitución de norleucina o la eliminación de metionina 35, ha apoyado ésta idea (Butterfield y Boyd-Kimball, 2005).

### 3.1.5 Tratamiento de la EA



En la EA, no existe un tratamiento farmacológico eficaz y esto se debe principalmente a la falta del conocimiento de la etiología de la enfermedad. Entre las estrategias para la prevención y tratamiento de la EA, se encuentran

fármacos como, los inhibidores de la acetilcolinesterasa, los cuales compensan la pérdida de neuronas colinérgicas; agonistas muscarínicos, recuperan la actividad colinérgica; antiinflamatorios, previenen el daño que produce la inflamación en las neuronas y la agregación de la A $\beta$ ; factores del crecimiento neuronal que promueven la supervivencia neuronal; estrógenos que incrementan el flujo sanguíneo cerebral y estimulan la síntesis de acetilcolina; inhibidores de proteasas que previenen la degeneración neuronal causada por la toxicidad del A $\beta$ ; antioxidantes, como las vitaminas A, E y C, que protegen del daño producido por los radicales libres y previenen la agregación de la A $\beta$ , entre otros (Soler, 1997; Gordon y Dawbarn, 2007, Martínez y cols, 2009).

### **3.2 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo se define principalmente como un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno y los sistemas antioxidantes de un organismo, teniendo como resultado el daño oxidativo a biomoléculas importantes para el funcionamiento y homeostasis de la célula. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas que participan en este proceso. Entre todas las ROS, el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), son los más abundantes en los sistemas biológicos (Sies y Cadenas 1985). El origen químico de la formación de la mayoría de las ROS es la reacción del oxígeno molecular con metales de transición como el hierro y el cobre (Halliwell y Gutterer, 1999).

#### **3.2.1 Estrés oxidativo y EA**

Diversos estudios, demuestran la presencia de oxidación de lípidos, proteínas y DNA, como marcadores de daño oxidativo, en tejidos de pacientes con EA y en modelos transgénicos (Chong y cols 2005; Butterfield y cols 2001; Butterfield y cols 2002). En el análisis del suero, proveniente de pacientes con EA, se ha encontrado un incremento en las concentraciones de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  (Praticò y Delanty 2000). En tejido cerebral de pacientes con EA se ha encontrado un aumento en la formación de malondialdehído y 4-hidroxinonanal (4-HNE), estas moléculas son marcadores de daño oxidativo a lípidos, esto sugiere que en el cerebro de pacientes con EA, las ROS pueden inducir lipoperoxidación que conllevan a la formación de aldehídos altamente reactivos que inician una cascada de eventos oxidantes y posiblemente la muerte neuronal (Markesbery y Lovell, 1998; Sayre y cols, 1997; Williams y cols, 2006). En cuanto a los marcadores de daño a proteínas se sabe que los proteincarbonilos - los cuales son el producto de proteínas oxidadas - se han encontrado en concentraciones elevadas en el hipocampo,

que correlacionan muy bien con la neuropatología de la EA (Pamplona y cols, 2005, Hensley y cols, 1995 Butterfield y cols, 1999, Aksenova y cols, 1999, Aksenov y cols 2001, Lyras y cols 1997). La nitrotirosina y ditirosina, derivados de la oxidación de proteínas, se han encontrado incrementadas de 8 y 3 veces en hipocampo y en regiones neocorticales, respectivamente, de pacientes con EA comparado con los controles (Hensley y cols, 1998; Smith y cols, 1997). Se ha encontrado incremento de la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, lo que sugiere daño del DNA mitocondrial y nuclear (Meccoci y cols, 1994).

También, existe evidencia de que el estrés oxidativo en pacientes con EA se da por la baja actividad antioxidante en el cerebro. La tioredoxina, una proteína antioxidante, se ha encontrado disminuída en la amígdala, el hipocampo y giro parahipocampal. De manera inversa la actividad de la tioreductasa, proteína reductasa, se encuentra incrementada (Lovell y cols, 2000). La glutatión transferasa enzima antioxidante, la cual se encarga de la depuración de 4-HNE esta disminuida en varias regiones cerebrales incluyendo el hipocampo (Markesbery y Lovell, 1998). La superóxido dismutasa, la catalasa y la hemooxigenasa-1, también se han encontrado con actividad disminuida (Marcus, y cols, 1998; Smith y cols, 1994), en tejidos de pacientes. Dadas estas evidencias se ha sugerido la utilización de antioxidantes para amortiguar a los radicales libres y con ello disminuir el estrés oxidativo, la muerte celular y la pérdida cognitiva.

### **3.2.1.1 Antioxidantes en la EA**

La alta morbilidad, los costos socio-económicos elevados y la carencia de tratamientos específicos, son algunas de las razones principales para la búsqueda de nuevas fórmulas terapéuticas en la EA. En este sentido los antioxidantes pueden ser moléculas de gran utilidad, pues son moléculas económicas y de fácil accesibilidad.

En el estudio de Sano y cols 1997, se encontró una disminución en la progresión de la EA, al administrar la vitamina E (2000 UI/d) en pacientes con diagnóstico medio y moderado de EA comparado con pacientes que no recibieron el tratamiento. Otro estudio demostró una relación inversa entre la ingesta de flavonoides, pero no de vitamina C, y el riesgo de la incidencia de demencia, realizada en individuos franceses no demenciados, de 65 años, evaluados durante 5 años (Commenges y cols, 2000). Dai y cols, 2004 probaron el consumo de frutas y jugos de vegetales, que contienen una elevada concentración de polifenoles, encontrando una disminución en el riesgo de la incidencia de EA en la cohorte del proyecto Kame. Existen reportes en donde se utilizan suplementos de vitaminas en sujetos jóvenes, como profilácticos de la EA; se encontró que la administración de vitamina C y vitamina E disminuye el riesgo de padecer la EA (Zandi y cols 2004). El uso de moléculas con actividad antioxidante mejora el estado cognitivo en algunos de los pacientes con EA. En algunos casos, los antioxidantes no ejercen un efecto protector (Morris y cols 1998), debido a la administración de dosis bajas. Sin embargo, se ha sugerido que a dosis elevadas pueden causar un efecto prooxidante.

### **3.2.1.2 Antioxidantes en modelos experimentales de la EA.**

Se ha observado la habilidad de la vitamina E para proteger a neuronas del efecto tóxico del glutamato y A $\beta$  (Grundman, 2000). Han demostrado que la combinación de vitamina E, fosfatidil colina y piruvato, ejercen efecto sinérgico de protección en sistemas neuronales, expuestos al péptido amiloide, mejor que la utilización de vitamina E sola, tanto en cultivos celulares como en tejido cerebral *in situ*. También, demostraron que ratones knock-out de ApoE condicionados a restricción de vitaminas son menos capaces de amortiguar las consecuencias del estrés oxidativo (Shea y cols, 2002). La utilización de vitamina E en ratones jóvenes transgénicos de APP, disminuye la lipope-

oxidación, disminuye las concentraciones de A $\beta$ , así como la formación de placas (Sung y cols 2003). El uso del s-alilcisteína en el modelo de neurotoxicidad con el A $\beta$ 25-35, inyectada en el hipocampo, mejoró el aprendizaje y la memoria, redujó los niveles de las ROS y la PL de lípidos (Perez-Severiano y cols, 2004). La vitamina E previene el daño neuronal y la PL inducido por el iodoacetato y el A $\beta$ 25-35 (Montiel y cols, 2006). La administración crónica de ácido alfa lipoico, el cual ha mostrado efectos antioxidantes, reduce el daño sobre la memoria en ratones transgénicos Tg2576 (Quin y cols, 2007). Recientemente, se han utilizado los flavonoides - moléculas con actividad antioxidante - tanto en patologías relacionadas al SNC como en modelos de neurotoxicidad.

### 3.3 Los flavonoides

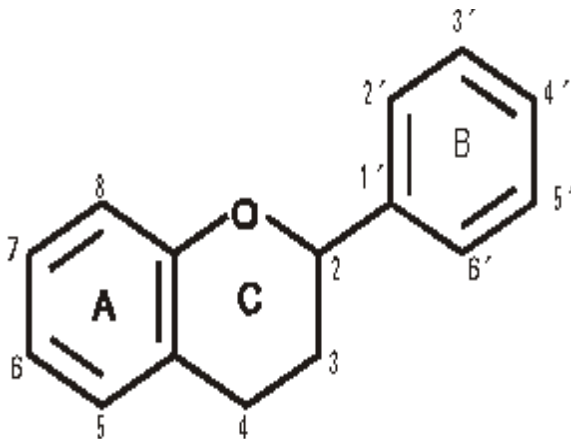


Fig 5. Estructura básica de los flavonoi-

Los flavonoides son un gran grupo de polifenoles naturales, se encuentran presentes casi ubicuamente en todas las plantas. Hay tres subclases con un total de más de cinco mil compuestos, todos presentan un esqueleto hidrocarbonado del tipo C6-C3-C6

(difencilpropano, Fig. 10) derivado del ácido shiquímico y de tres restos de acetato.

La función biológica principal de estos compuestos es como antioxidantes (Pietta, 2000). Los flavonoides más activos como antioxidantes son los que tienen sustituyentes dihidroxílicos en las posiciones 3' y 4' en el anillo B y este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, y un grupo carbonilo en la posición 4. Entre los flavonoides más comunes están: la quercetina y las catequinas.

### 3.3.1 Estudios de los flavonoides como posibles neuroprotectores.

Recientemente se ha sugerido que los flavonoides juegan un papel importante en la neuroprotección (Mandel y Youdim en el 2004, Williams y cols, 2004). Los flavonoides protegen a las neuronas de la apoptosis inducida por la oxidación (Schroeter y cols, 2001), atraviesan la barrera hematoencefálica (Youdim y cols, 2004), la metilación y glucoronidación que sufren en el intestino delgado tras la ingestión favorece su bioactividad y biodisponibilidad (Baba y cols, 2001; Spencer y cols, 2001). El EGb 761 (constituido por 24% de flavonoides como quercetina y epicatequina) fue capaz de atenuar la muerte celular producida por los péptidos amiloideos (A $\beta$ 1-42, A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 25-35) debido, probablemente, a los flavonoides que contiene (Bastianetto y cols, 2000). Al utilizar la quercetina y la catequina, de manera aislada, en cultivo de neuronas hipocampales, se mostró su habilidad neuroprotectora frente a la neurotoxicidad inducida por el nitroprusiato de sodio (SNP) o por los péptidos amiloideos (Bastianetto y cols, 2000; Bastianetto y Quirion, 2002). Las catequinas, inhiben la apoptosis y la formación de oligómeros del A $\beta$  (Bastianetto y cols en el 2006). La catequina y la epicatequina extraídas de *Smilacis Chinae rhizome*, así como el extracto completo, disminuye la concentración de calcio intracelular, inhibe la activación de caspasa-3, la muerte celular y la liberación de glutamato, inducidos por el A $\beta$ 25-35, en cultivo neuronal (Ban y cols, 2006a, 2006b). La administración crónica de las catequinas del te verde, por vía oral, mejora el aprendizaje espacial de ratas jóvenes, comparadas con aquellas que no fueron tratadas con las catequinas (Haque y cols 2006). El mecanismo de protección sobre la utilización de los flavonoides, no es del todo conocido. Para ello es necesario realizar más estudios farmacológicos y toxicológicos de dichas moléculas.



#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

La enfermedad de Alzheimer, es una enfermedad neurodegenerativa, que se caracteriza por la pérdida de la memoria. Desde que se conoce que la forma familiar de la EA involucra la producción masiva y agragación del péptido A $\beta$ , el A $\beta$  es una de las moléculas involucradas en la patogénesis de la EA. Se sabe que la fracción 25-35 del A $\beta$  (A $\beta$ 25-35), ejerce efecto neurotóxico. Uno de los mecanismos implicados, en el proceso de neurotoxicidad, es el estrés oxidativo (EO), donde se sugiere que la metionina - localizada en la posición 35 - es la responsable del daño oxidativo de esta fracción. El uso de moléculas con actividad antioxidante disminuye el efecto tóxico de este péptido, indicando de manera indirecta la participación del EO en la EA. Se ha demostrado que la microinyección de los péptido amiloideos, producen deterioro cognitivo. Sin embargo, no es clara la relación entre el deterioro cognitivo y el estrés oxidativo.

Considerando estas evidencias, utilizamos un modelo de neurotoxicidad con el A $\beta$ 25-35, inyectada en el hipocampo de ratas, con la finalidad de buscar la relación entre el deterioro cognitivo y el estrés oxidativo. Además utilizamos a los flavonoides como inhibidores del estrés oxidativo.

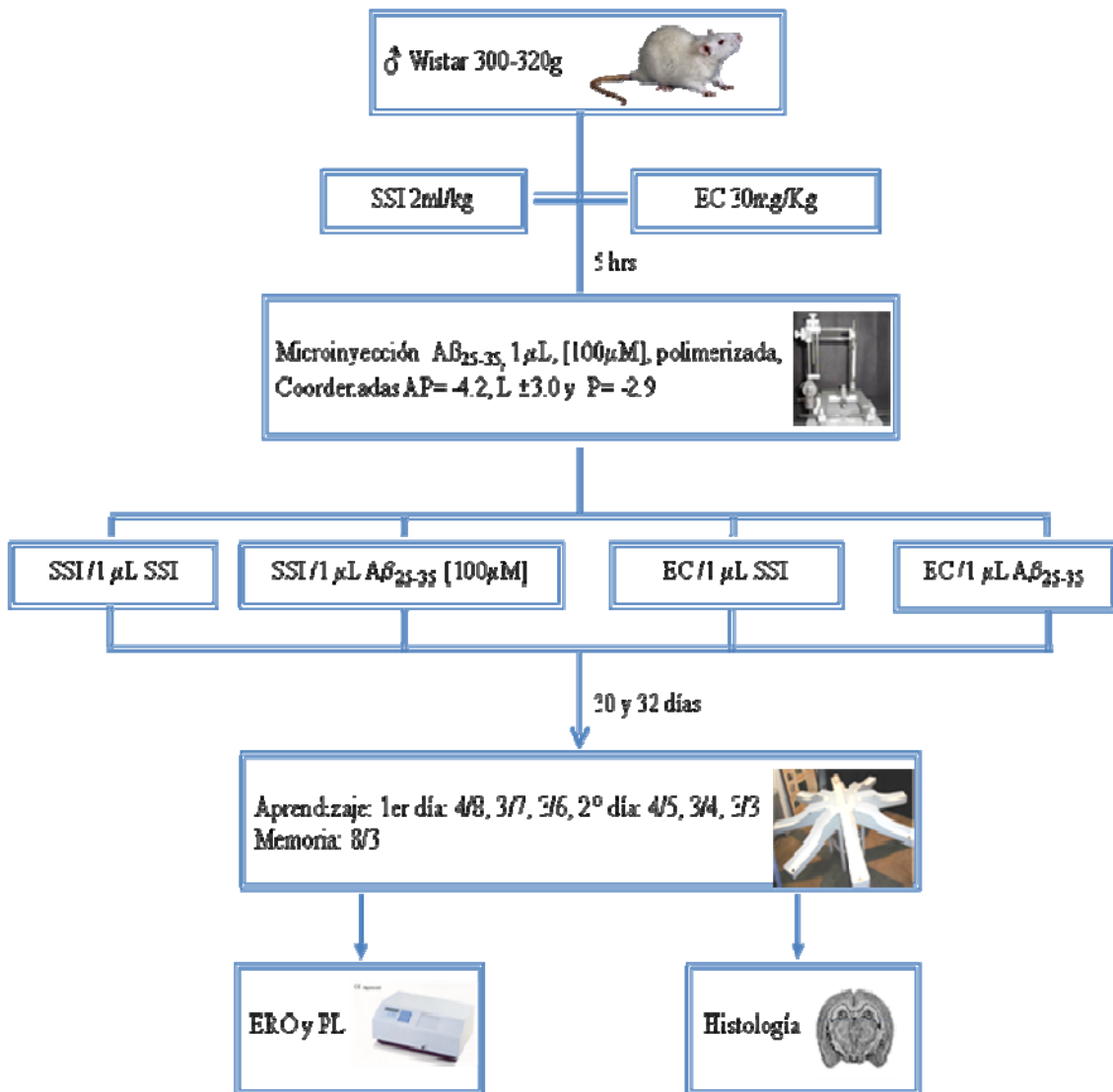
## **V. HIPÓTESIS**

La fracción 25-35 del péptido amiloide-beta, inyectada de manera local en la región CA1 del hipocampo de ratas, produce déficit en el aprendizaje y la memoria que correlaciona con la presencia de estrés oxidativo.

## **VI. OBJETIVOS**

1. Evaluar el aprendizaje y la memoria espacial de ratas, a los 26 y 27 días post-inyección intrahipocampal de la fracción 25-35 del péptido amiloide-beta con y sin pretratamiento de epicatequina, quercetina, catequina y vitamina E.
2. Comparar el efecto, del pretratamiento con Epicatequina, Quercetina, Catequina y Vitamina E, sobre el aprendizaje y la memoria espacial de las ratas, a los 26 y 27 días post-inyección intrahipocampal de la fracción 25-35 del péptido amiloide-beta y utilizar el grupo con pretratamiento de la molécula con mejor respuesta conductual, para los estudios posteriores.
3. Cuantificar los niveles de las especies reactivas de oxígeno y de los lípidos peroxidados, en el hipocampo de rata, tras la inyección intrahipocampal de la fracción 25-35 del péptido amiloide-beta con y sin pre-tratamiento de epicatequina, a las 2h y 24h post-inyección.
4. Determinar los niveles de las especies reactivas de oxígeno y de los lípidos peroxidados en el hipocampo de rata, tras la inyección intrahipocampo de la fracción 25-35 del péptido amiloide-beta con y sin pretratamiento de epicatequina, a los 30 días.
5. Localizar la presencia de astrocitos reactivos en la región CA1 del hipocampo de las ratas, tras la inyección intrahipocampo de la fracción 25-35 del péptido amiloide-beta con y sin pretratamiento de epicatequina, a los 30 días.

## VII. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



**Fig. 6. Diagrama general de trabajo.** Se muestra a manera de diagrama de flujo los pasos que se siguieron durante el experimento. Aunque no incluimos los demás antioxidantes utilizados, la metodología fue la misma para todos los antioxidantes utilizados. Para todos los antioxidantes utilizados se realizó la medición del aprendizaje y la memoria. Con la epicatequina, se realizaron las pruebas histológicas y conductuales.

## **VIII. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **8.1 Animales**

Usamos noventa y ocho ratas macho de la cepa Wistar, de 300-320g de peso, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina-UNAM. Éstas fueron colocadas en grupos de 4-5 ratas por caja, en un cuarto a 23°C de temperatura, ciclo de 12h luz/oscuridad, 60 % humedad, con libre acceso de agua y alimento (DietLab 5800). Todos los experimentos se realizaron con la aprobación del Comité local de Ética sobre el uso de animales de experimentación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “MVS”.

### **8.2. Administración de los antioxidantes**

Se administraron las soluciones vehículo o los antioxidantes (Catequina, Vitamina E, Quecetina o Epicatequina) a una dosis de 30mg/kg de peso (Da Silva y cols 1998; Baba y cols 2001), en un volumen máximo de 1 mL, con una cánula de administración oral (Roboz 20x3” W/2-1/4 mm ball), 5 horas previas a la microinyección del péptido A $\beta$ 25-35.

### **8.3 Microinyección del péptido**

El péptido A $\beta$ 25–35 (NH-GSNKGAIIGLM-OH, Sigma, St. Louis, MO, USA), se disolvió en solución salina isotónica estéril, la cual favorece su agregación (Pike y cols, 1995), a una concentración final de 100 $\mu$ M. Ésta solución se incubó a 37°C durante 24h antes de su aplicación, para garantizar su agregación, pues es un requisito indispensable para que ejerza acción toxica (Maurice y cols, 1996; Delobette y cols, 1997). Los animales (n=10/grupo) se anestesiaron con Hidrato de cloral (350mg/kg) por vía i.p. Las coordenadas donde se inyectó el péptido fueron estandarizadas utilizando como referencia las coordenadas descritas en el atlas de Paxinos y Watson 1998: anteroposterior -4.2mm, lateral  $\pm$ 3.0mm, respecto a bregma y profundidad -2.9mm respecto a la

duramadre. Se inyectó 1  $\mu\text{l}$  de A $\beta$ 25-35, lentamente en un periodo de 5 min, en la región CA1 (Fig. 7) del hipocampo de ambos hemisferios, con una jeringa Hamilton de 5  $\mu\text{l}$ . Al término de la cirugía se esperó a que las ratas se despertaran y fueron regresadas al bioterio, hasta el momento de las siguientes pruebas.



Fig. 7. Trayecto de la cánula. Foto representativa de las ratas utilizadas en los experimentos. Se observa el sitio de microinyección del vehículo o A $\beta$ 25-35, dentro de los límites de la región CA1 del hipocampo.

#### 8.4 Cuantificación de la peroxidación de lípidos (PL)

La medición de PL se hizo a las 2 h y 24 h, así como a los 30 días, después de la inyección del péptido A $\beta$ 25-35. Se determinó la concentración de los productos finales de la lípoperoxidación, como son las bases de Schiff (**Fig. 8**). Las bases de Schiff son productos fluorescentes y pueden ser determinados por métodos espectrofotométricos.

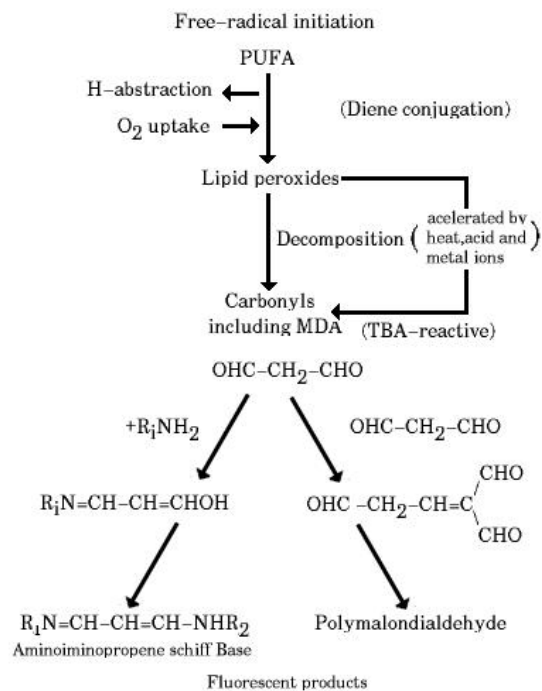
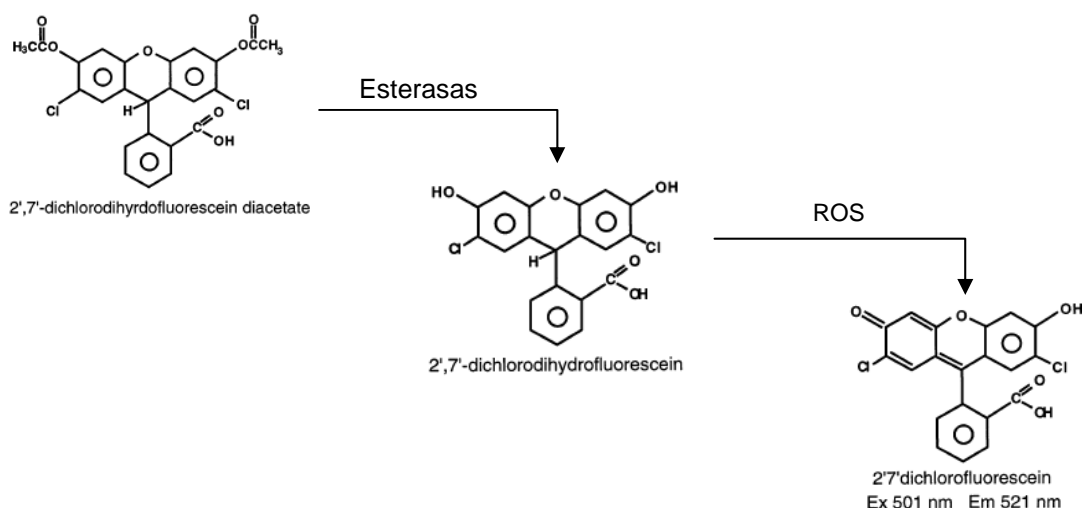


Fig. 8. Mecanismo de la peroxidación lipídica no enzimática

Brevemente, los cerebros de las ratas fueron extraídos por decapitación y se disecó el hipocampo en una cámara fría. El hipocampo se homogenizó en una solución salina isotónica, en frío y protegida de la luz. Los compuestos fluorescentes presentes en cada muestra se extrajeron con una mezcla de cloroformo-metanol (3:1) grado HPLC. Esta reacción se llevo a cabo durante 30 min, en hielo y cámara oscura, al término de la reacción se eliminó la fase acuosa y la mezcla de cloroformo-metanol se utilizó para la cuantificación de los PL presentes en cada muestra. Todas las muestras se hicieron por duplicado y se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro de fluorescencia a longitudes de onda de 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. Para ajustar el blanco de las muestras se utilizó una solución estándar de sulfato de quinina, debido a que autoflorece a longitudes de onda de 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. Los resultados se expresan como unidades de fluorescencia por mg de proteína. La cuantificación de las proteínas se realizó por el método de Lowry. Se hizo una curva estándar de concentraciones conocidas de albúmina (BSA).

### **8.5 Cuantificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Para la determinación de EROS, se utilizó la técnica espectrofluorométrica de la 2,7, DCF diacetato. Brevemente, la H<sub>2</sub>DCFDA, es una molécula capaz de entrar a la célula, donde las esterasas hidrolizan sus grupos acetilos para formar, 2,7, diclorodihidrofluoresceína, la forma deacetilada entonces es susceptible a la oxidación, generando una molécula fluorescente la diclorofluoresceína, que se puede medir a travez de un espectrofotómetro (**Fig. 9**). La acumulación de la diclorofluoresceína indica la producción de sustancias activas redox.



**Fig. 9.** Formación de la 2',7',diclorofluoresceína

Brevemente, los cerebros de las ratas fueron extraídos por decapitación y se disecó el hipocampo en una cámara fría. El hipocampo se homogenizó en una solución salina isotónica, en frío y protegida de la luz. Las EROS presentes en cada muestra, se determinaron al hacerlos reaccionar con la DCF-DA contenida en una solución de HEPES:TRIS (18:1), pH=7.4, durante una hora, a 37°C, con agitación contante y en cámara oscura. (Fig. C, Bass y cols, 1983; Royall y Ischiropoulos, 1993).

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

### 8.6 Evaluación del aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto radial de ocho brazos

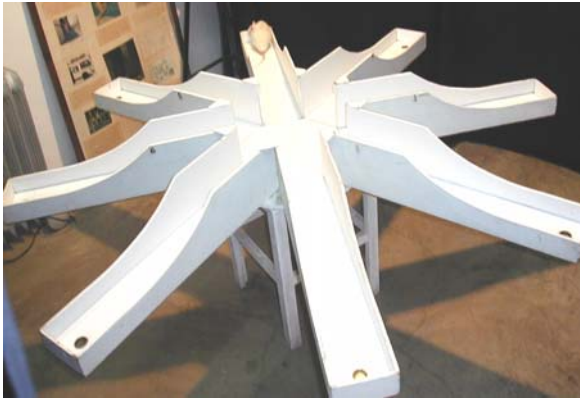
Para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial, se utilizó el laberinto radial de ocho brazos (Olton y cols, 1977, **Fig. 10**). Brevemente, antes de realizar la prueba de aprendizaje los animales fueron sujetas a un proceso de restricción de alimento, con el objeto de disminuir el 15 % de su peso, se hizo de manera lenta y controlada para evitar daño y estrés, durante aproximadamente 10 días previos al experimento. También, se



habituaron al laberinto un día antes del experimento, con la finalidad de que los animales exploraran y se adaptaran al mismo. Cada animal se colocó en el centro del laberinto y se dejó que explorara durante 15 minutos. Esta exploración la realizaron tres veces de forma sucesiva en el mismo día. Registramos durante los 15 minutos el número total de visitas a cada uno de los brazos.

La prueba del aprendizaje espacial en el laberinto radial de 8 brazos, se realizó el día 26 y 27 postcirugía. Consistió en aprender de forma eficiente en que brazos del laberinto se encontraba el alimento (brazos 2, 5 y 6) y comerlo. Cada animal realizó un total de 20 ensayos (10 ensayos por día) con intervalos de 50 minutos entre cada uno de ellos. Cada ensayo duró 200 segundos. Se dio un número determinado de oportunidades en cada ensayo (visitas permitidas a alguno de los brazos), éstas disminuyeron conforme avanzó la prueba. El primer día se realizaron 4 ensayos de 8 oportunidades, 3 ensayos de 7 oportunidades y 3 ensayos de 6 oportunidades. El segundo día, 4 ensayos de 5 oportunidades, 3 ensayos de 4 oportunidades y 3 ensayos de 3 oportunidades. La prueba para evaluar la memoria se realizó 2 días después del aprendizaje (día 30, postcirugía). Sólo se realizó un día, sin la habituación. Cada animal realizó un total de 8 ensayos de 3 oportunidades, bajo las mismas condiciones que en el aprendizaje.

Los parámetros que se midieron tanto para el aprendizaje como para la memoria fueron: **Acierto:** entrada del animal a cualquiera de los brazos donde hubo alimento y lo comió (brazos 2, 5 y 6). **Error:** Entrada del animal a cualquier brazo en donde no hubiera alimento. **Error relativo:** Entrada del animal a los brazos donde anteriormente había entrado e ingerido el alimento. Los parámetros evaluados, son los mismos que se realizaron en el aprendizaje.



**Fig. 10. Laberinto radial de 8 brazos.** Consta de una plataforma central de 30cm de diámetro, con 8 brazos distribuidos radialmente (80x28x20cm), al final de cada brazo hay un contenedor de alimento de 2cm de profundidad. Localizado en un cuarto (2.5x2.5m) a 80cm del piso. Frente a cada brazo hay una señal (Olton y cols, 1977).

Finalizada la prueba de memoria, 6 ratas por grupo se decapitaron y se extrajo el cerebro para las determinaciones de ROS y PL y el resto para la evaluación histológica.

### **8.7 Inmunohistoquímica para GFAP**

Finalizada la prueba de memoria, se anestesiaron con pentobarbital (40mg/Kg de peso, ip) 4 ratas por grupo. Cada animal se perfundió de forma intracardiaca con SSI y posteriormente paraformaldehído al 4 %, en PBS 0.1 M a pH 7.4. Luego se extrajeron los cerebros y fueron cortados en la parte rostral y caudal, para delimitar el área de lesión, tomando 3mm de distancia por lado respecto al sitio de inyección. Las muestras así obtenidas se colocaron en una solución de paraformaldehído al 4%, en PBS 0.1 M a pH 7.4, durante al menos 24 h. Posteriormente, fueron procesados e incluidos en parafina. Se obtuvieron cortes coronales de 5  $\mu$ m, realizados en un micrótopo (Histocut) y se recuperaron con la ayuda de un baño de flotación (Lab-Line) a  $\sim$ 50°C, luego se montaron en portaobjetos, previamente silanizados, para evitar que el tejido se desprendiera durante el proceso inmunohistoquímico.

En la realización de la inmunohistoquímica para GFAP, los cortes se desparafinaron y rehidrataron. Una vez rehidratados, se sometieron a recuperación antigénica (amortiguador de citratos 0.1 M, pH=6). En breve, se siguieron los siguientes pasos: a) incubación con albúmina sérica bovina libre de IgG (0.2%, 30min, Sigma-Aldrich), b) incubación con tritón X-100 (0.2 %, 20 min, Sigma-Aldrich), c) incubación con el anti-

cuerpo primario anti-GFAP (1:100, 120 min, anticuerpo policlonal de conejo, Dako) d) incubación con anticuerpo secundario, acoplado a rodamina-roja-X (Rod-X, 1:100, 90min, anti-conejo, Jackson immunoresearch). Se utilizó PBS 0.1 M a pH 7.4, como diluyente y para los lavados, entre cada paso. Todo el proceso se realizó en una cámara húmeda, oscura y a temperatura ambiente. Al término de la inmunohistoquímica, los cortes se montaron con VectaShield conjugado con DAPI, un fluorocromo que marca a los ácidos nucleicos (Vector Lab), se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con barniz de uñas.

Finalmente, se observaron al microscopio de fluorescencia DM/LS (Leica,) para una evaluación cualitativa de las marcas. El registro de las imágenes se hizo con una cámara de video (Leica, DFC-300FX), adaptada al microscopio. Las imágenes se proyectaron en una computadora mediante el programa Leica IM1000 versión 1.20 release 9 (Imagic Bildverarbeitung). Se capturaron tres imágenes de la región CA1 del hipocampo, por corte, con el objetivo 40X. Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia, del marcado con GFAP, con el programa ImageJ, los intensidad de las marcas fueron normalizadas por el área de cada campo.

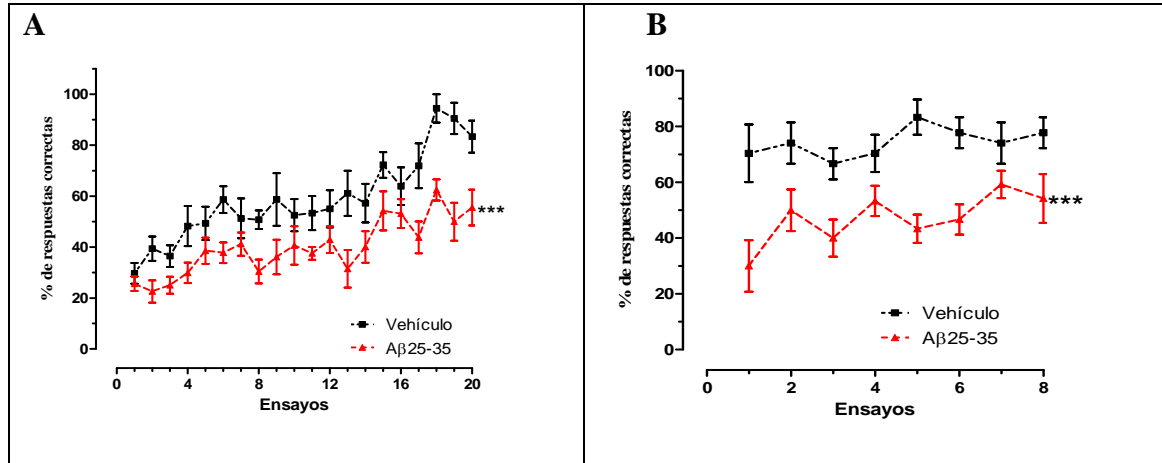
## **IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresaron como media por grupo de cada ensayo  $\pm$  error estándar de la media. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía, con una post-prueba de Tukey. Utilizando el programa GraphPad version 4.0. Se consideró una diferencia significativa con una  $p < 0.05$ .

Para la evaluación de los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, se hizo la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la marca para GFAP; se utilizó el programa ImageJ.

## X. RESULTADOS

### 10.1 Efecto del péptido Amiloide-beta 25-35 en la prueba del aprendizaje y la memoria espacial

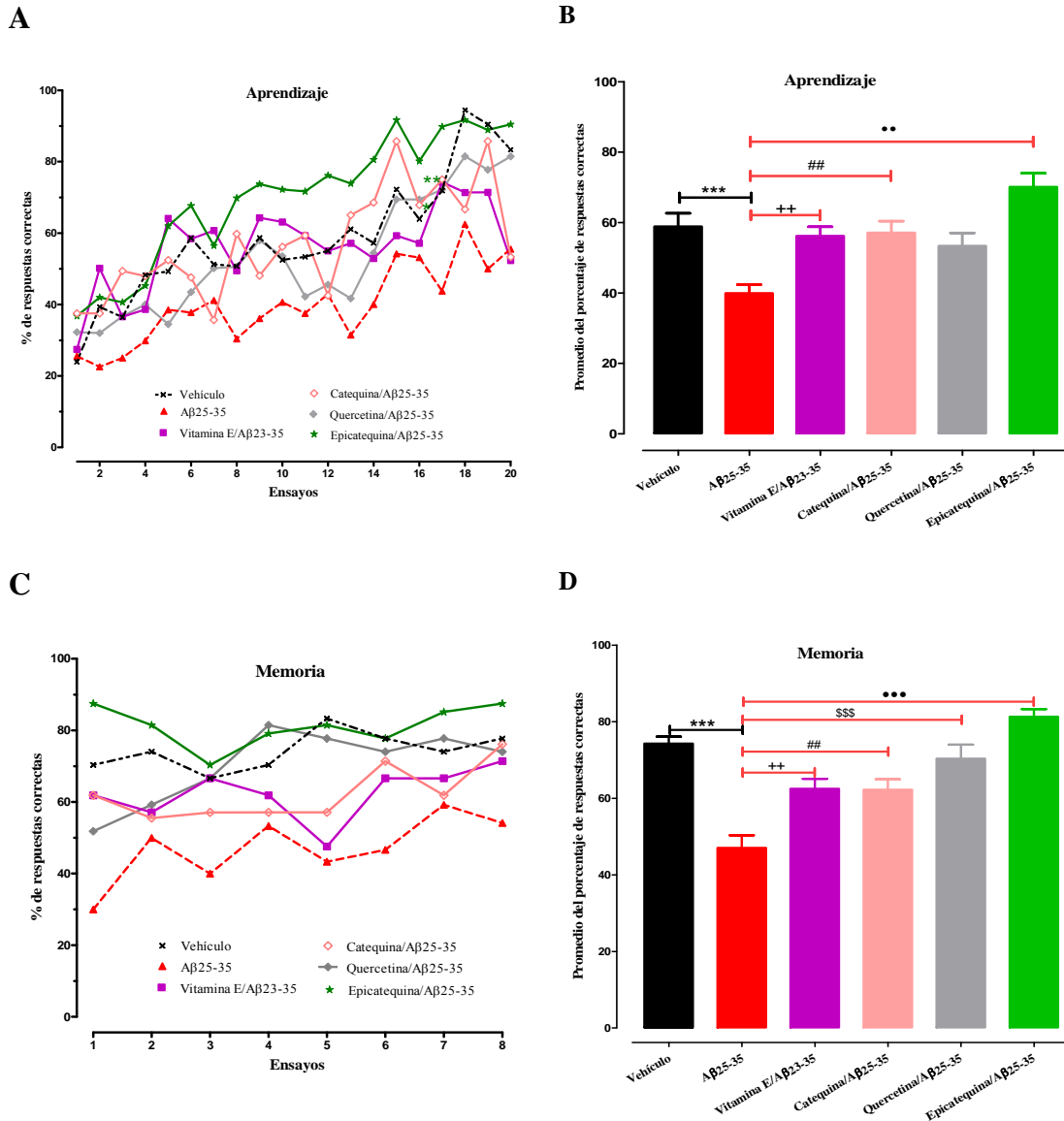


**Gráfica 1. El Aβ25-35 produce pérdida del aprendizaje y la memoria.** En el eje X se muestra el número de ensayos y en el eje Y el porcentaje de respuestas correctas, para el aprendizaje (A) y la memoria (B). Observamos que el Aβ25-35 produce un menor porcentaje de respuestas correctas comparadas con el grupo control tanto en la prueba del aprendizaje (A) como en la memoria (B) espacial. Cada punto corresponde a la media y SEM de los porcentajes de respuestas correctas de cada ensayo por grupo. Los datos fueron analizados con un ANOVA \*\*\* $p < 0.001$ .

En la gráfica 1 podemos observar el porcentaje de respuestas correctas, de las ratas inyectadas con Aβ25-35 o la solución vehículo, por cada ensayo, en la prueba del aprendizaje y la memoria espacial, realizada en el laberinto radial de ocho brazos. Observamos que el grupo de ratas tratadas con la solución vehículo, tuvo un porcentaje promedio de 29 %, al inicio de la prueba, el cual aumenta paulatinamente conforme avanzó la prueba, alcanzó un porcentaje promedio máximo del 94 %. El grupo de ratas tratadas con el péptido Aβ25-35, tuvo un porcentaje promedio del 22 %, al inicio de la prueba, conforme avanzó la prueba hubo un ligero aumento, alcanzó un porcentaje promedio máximo del 62 %. Al analizar todos los datos de la curva, se encontró que el péptido Aβ25-35 produjo una disminución significativa, en el porcentaje de respuestas

correctas respecto al control, tanto en el aprendizaje (-32 %) como en la memoria (-36 %). Por lo tanto, podemos decir que el péptido A $\beta$ 25-35 produce deterioro en el aprendizaje y la memoria espacial.

### 10.2 Efecto de los flavonoides en el modelo de microinyección con el péptido A $\beta$ 25-35, en la prueba del aprendizaje y la memoria espacial

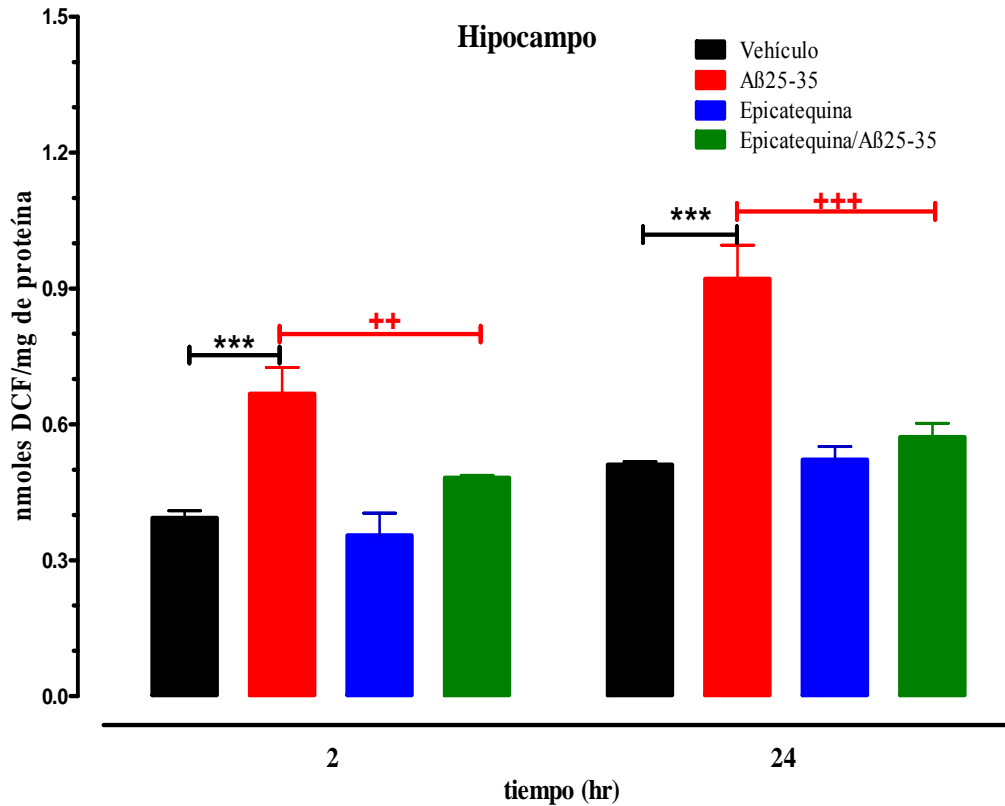


**Gráfica 2. Los flavonoides evitan la pérdida del aprendizaje y la memoria espacial, producido por el A $\beta$ 25-35.** Las ratas pretratadas con Catequina, Vitamina E, Quercetina y Epicatequina mostraron un mayor porcentaje de respuestas correctas comparadas con el grupo tratado con A $\beta$ 25-35, tanto en la prueba del aprendizaje (A y B) y la memoria (C y D) espacial. Cada punto corresponde a la media de los porcentajes de respuestas correctas de cada ensayo por grupo, en el aprendizaje (A) y la memoria (C). Las

barras representan las medias y ESM de las respuestas correctas obtenidas por grupo, en la prueba del aprendizaje (B) y la memoria (D). Los datos fueron analizados con un ANOVA de una vía y con una posprueba de Tukey, ++, \*\*, ##, •• p<0.01, \*\*\*, \$\$\$, ••• p<0.001.

En la grafica 2 observamos los porcentajes de respuestas correctas de las ratas pretratadas con Catequina, Vitamina E, Quercetina y Epicatequina, en la prueba del aprendizaje (**Fig 2A, B**) y la memoria espacial (**Fig 2C, D**). Al comparar las medias de cada uno de los grupos pretratados con los antioxidantes, encontramos que todos ejercieron una actividad biológica positiva, al mostrar mayor porcentaje de respuestas correctas, comparados contra el grupo que fue tratado solo con el péptido A $\beta$ 25-35. Sin embargo, el pretratamiento con Epicatequina mostró una mejor respuesta conductual. Para el aprendizaje encontramos una diferencia del 30.12 % y para la memoria de 34.16 %, comparado contra el grupo tratado con A $\beta$ 25-35. El orden de eficacia quedó de la siguiente manera: Epicatequina > Quercetina > Catequina > Vitamina E, en la prueba del aprendizaje, y Epicatequina > Quercetina > Vitamina E > Catequina, para la prueba de la memoria. Dado que la Epicatequina fue la molécula más eficiente, decidimos seguir el análisis sobre la producción de ROS y PL a diferentes tiempos - como marcadores de daño oxidativo - a corto y a largo plazo. Así como, la presencia y localización de GFAP, como marcador de astrogliosis. Para una mejor comprensión del efecto del A $\beta$ 25-35, y de manera indirecta de la Epicatequina. Cabe mencionar que el tratamiento *per se* de la Catequina, Vitamina E, Quercetina y Epicatequina, produjo un porcentaje de respuestas correctas similares al grupo tratado sólo con la solución vehículo (datos no mostrados).

### 10.3 Concentraciones de ROS a las 2 y 24 horas en el hipocampo

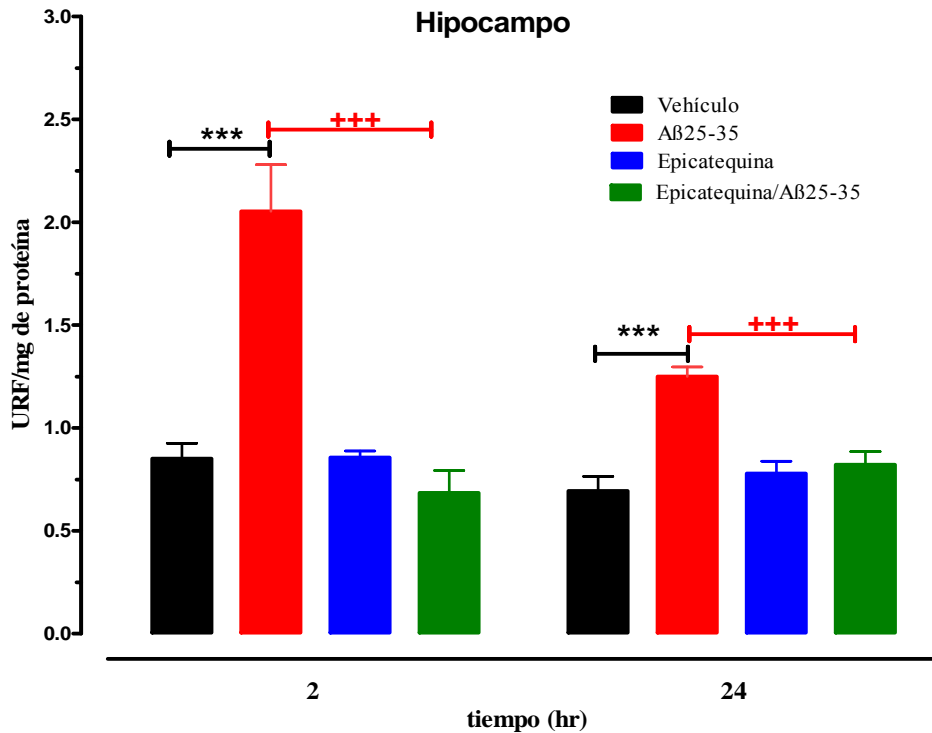


**Grafica 3. El Aβ25-35 produce aumento en la concentración de ROS a las 2 y 24h post-inyección. El pretratamiento con Epicatequina los disminuye.** Las barras representan las medias y ESM por grupo, de la concentración de diclorofluoresceína normalizada por mg de proteínas. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una posprueba de Tukey, ++p<0.01, +++, \*\*\*p<0.001.

La grafica 3 muestra la concentración de la diclorofluoresceína (DCF), como un marcador directo de la formación de ROS, a las 2 y 24 horas después de la microinyección del péptido Aβ25-35. Encontramos que existe un aumento significativo en la formación de ROS por parte del grupo tratado con el Aβ25-35, comparado contra el grupo tratado con la solución vehículo, la diferencia fue del 59 % y 80 %, a las 2 h y 24 h, respectivamente. El grupo pretratado con epicatequina (EC/Aβ25-35), tuvo una disminución del 38 % y 61 % a las 2 h y 24 h, respectivamente, comparado con el grupo tratado con el Aβ25-35. Este dato sugiere que el péptido Aβ25-35 genera daño oxidativo a corto plazo, evidenciado por la formación de ROS.



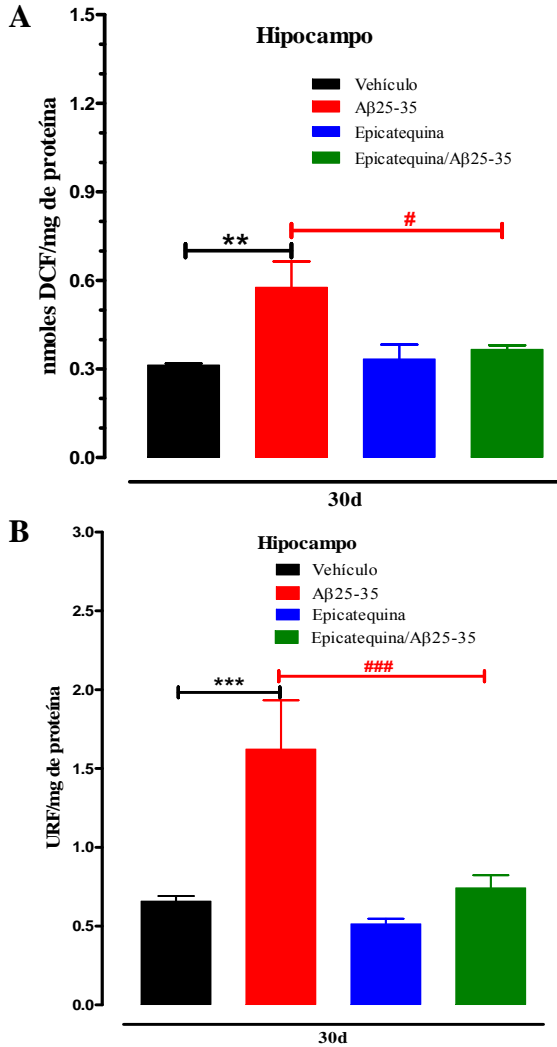
#### 10.4 PL a las 2 y 24 horas en el hipocampo



**Grafica 4.** El Aβ25-35 produce PL. El pretratamiento con Epicatequina los disminuye. Las barras representan las medias y ESM por grupo, de las unidades relativas de fluorescencia normalizadas por mg de proteínas. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una posprueba de Tukey,  $^{+++}.*.*p < 0.001$ .

La grafica 4 muestra la PL, como un marcador de daño oxidativo a membranas celulares, a las 2 y 24 horas después de la microinyección del péptido Aβ25-35. Encontramos que existe un aumento significativo en la PL por parte del grupo tratado con el Aβ25-35, comparado contra el grupo tratado con la solución vehículo, la diferencia fue del 141 % y 80 %, a las 2 h y 24 h, respectivamente. El grupo pretratado con epicatequina (EC/Aβ25-35), tuvo una disminución del 150 % y 52%, a las 2 h y 24 h, respectivamente, comparado con el grupo tratado con el Aβ25-35. Estos resultados en su conjunto indican que la microinyección del péptido Aβ25-35, en el hipocampo, es capaz de producir la formación de ROS de manera temprana, lo cual puede estar oxidando a los lípidos de las membranas celulares. El grupo pretratado con la epicatequina sustenta este hecho, ya que disminuye significativamente la PL.

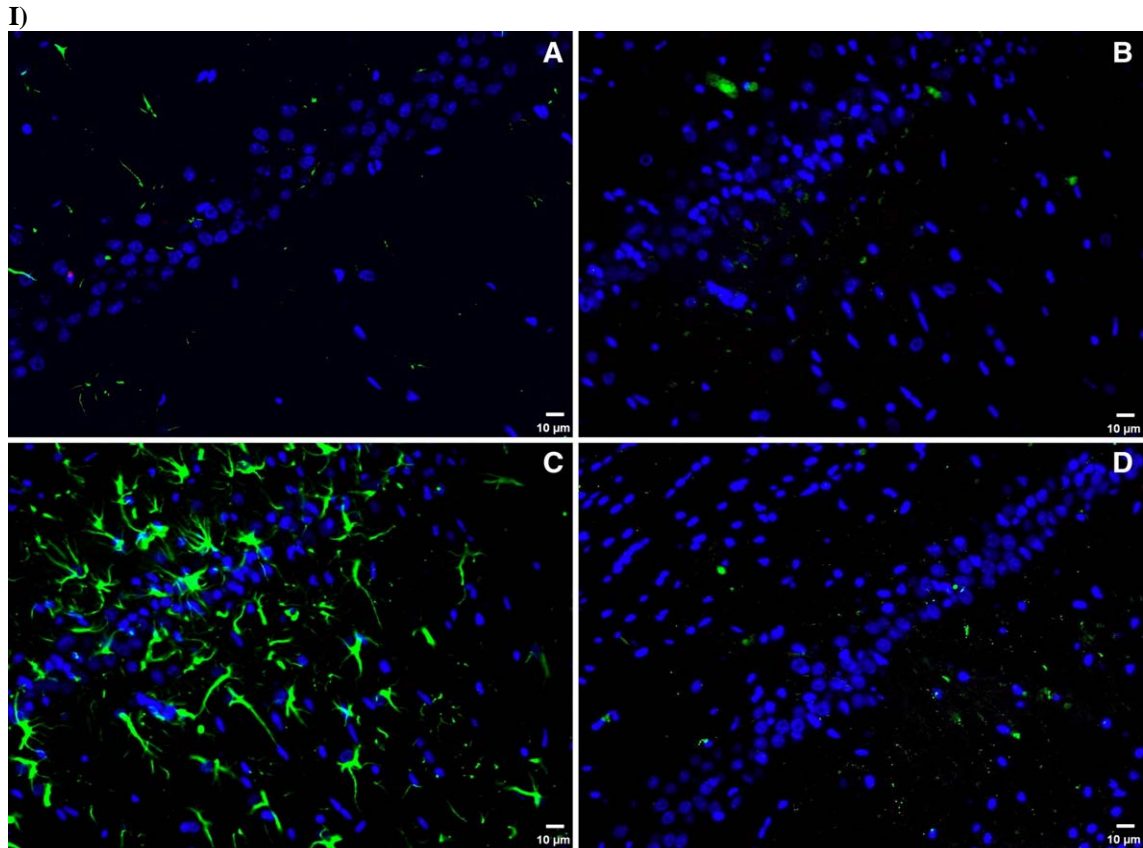
10.5 Concentraciones de ROS y PL, después de realizar la prueba de la memoria espacial, determinadas en el hipocampo.



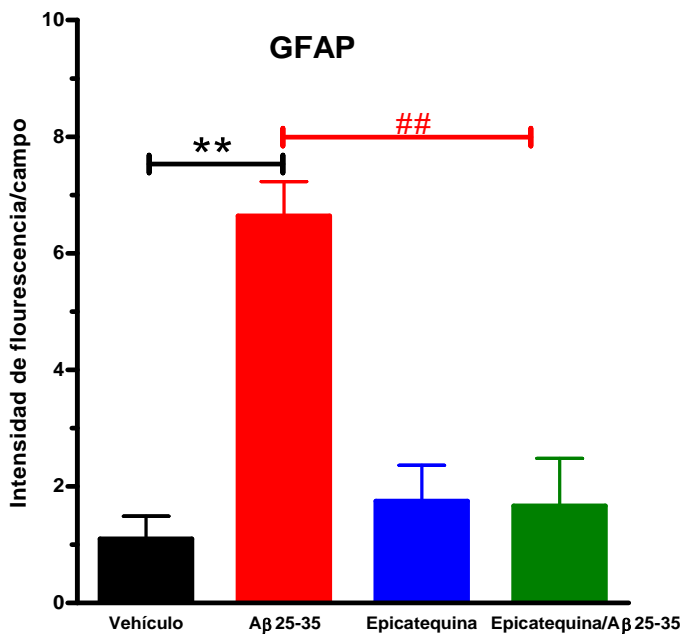
**Gráfica 5. El Aβ25-35 produce ROS y la PL a los 30 días post-inyección. El pretratamiento con Epicatequina, los disminuye.** Las barras representan las medias y ESM por grupo, de la concentración de diclorofluoresceína (A, ROS) o unidades relativas de fluorescencia (B, PL) normalizadas por mg de proteínas. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía y con una posprueba de Tukey, #p<0.05, \*\*p<0.01, ###p<0.001.

La gráfica 5 muestra la concentración de la diclorofluoresceína y la PL, a los 30 días después de la microinyección del péptido Aβ25-35. Encontramos en el grupo tratado con el Aβ25-35, un aumento significativo del 84 % para la formación de ROS y 145 % para la PL, comparado contra el grupo tratado con la solución vehículo. El grupo pretratado con epicatequina (EC/Aβ25-35), tuvo una disminución del 51 % en la formación de ROS y 140 % en la PL, comparado con el grupo tratado con el Aβ25-35. Este resultado nos indica que existe aún daño oxidativo, 30 días después de la inyección del Aβ25-35.

## 10.6 Presencia y localización de GFAP



II)



Grafica 6. El Aβ25-35 produce astrocitosis en la región CA1 del hipocampo, el pretratamiento con la Epicatequina, lo evita. I) se observan las fotomicrografías tomadas de cortes coronales de cerebros de rata. La marca en verde representa la inmunoreactividad para GFAP y en azul los núcleos con DAPI. En II) observamos la cuantificación de la intensidad de fluorescencia para GFAP, normalizadas por área del campo.

La grafica 5 muestra la intensidad de fluorescencia en verde, emitida por la marca con GFAP. Encontramos en el grupo tratado con el A $\beta$ 25-35, un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia 6.8 veces más, comparado contra el grupo control. El grupo pretratado con epicatequina (EC/A $\beta$ 25-35), tuvo una disminución del 6.5 veces, comparado con el grupo tratado con el A $\beta$ 25-35. Este dato sugiere que el péptido A $\beta$ 25-35 produce astrocitosis.

## **XI. DISCUSIÓN.**

Los datos presentados en este trabajo dan evidencia de que el péptido A $\beta$ 25-35, inyectado en la región CA1 del hipocampo de ratas macho, genera daño cognitivo vía estrés oxidativo, dado que induce la formación de especies reactivas de oxígeno, peroxidación de lípidos y astrocitosis. El uso de la Epicatequina, contrarrestó estos efectos.

### *11.1 Efecto del péptido Amiloide-beta 25-35 y del pretratamiento con los flavonoides en la prueba del aprendizaje y la memoria espacial.*

Es bien sabido que el A $\beta$  se acumula extraneuronamente en pacientes con EA, sin embargo, no es clara la relación entre la acumulación del A $\beta$  y la pérdida cognitiva. Se han realizado experimentos, con el uso de animales que sobreexpresan APP para la generación de A $\beta$  (Morgan y cols 2000, Janus y cols 2000), o en modelos de inyecciones intracerebrales del A $\beta$  (Cleary y cols, 2005). En este trabajo valoramos el efecto del péptido A $\beta$ 25-35 inyectado en el hipocampo de ratas en la prueba del aprendizaje y la memoria espacial. Como observamos en la grafica 1, el A $\beta$ 25-35 produjo una disminución significativa del porcentaje de respuestas correctas tanto en el aprendizaje como en la memoria espacial. Este efecto de pérdida del aprendizaje y la memoria concuerda con reportes previos (Tohda y cols 2004, Shen y cols 2007). Se ha demostrado la pérdida de la consolidación de la memoria, al inyectar A $\beta$ 1-40 en el hipocampo de ratas Sprague-Dawley (McDonald y cols 1994), después de la infusión intracerebroventricular (icv) de A $\beta$ 1-40 en concentraciones de nanomoles, durante 14 días en ratas Wistar existe un mayor tiempo de latencia al escape, así como una disminución en la actividad de la acetilcolintransferasa (Nitta y cols, 1994). Existen varios reportes donde señalan que la administración icv del A $\beta$ 25-35 induce una disminución de los procesos de aprendizaje y memoria (Maurice y cols, 1996, Yamaguchi y cols, 2001; Stepanichev y cols, 2003).

El A $\beta$ 25-35 administrado en forma agregada, produce déficit cognitivo de las ratas (De-lobette y cols, 1997), produce pérdida de la memoria a corto plazo (Stepanichev y cols, 2002), que correlaciona con un menor número de neuronas en el hipocampo y un incremento en la peroxidación de lípidos a los 3, 5 y 30 días después de la inyección del péptido (Stepanichev y cols, 2003). La infusión continua del A $\beta$ 1-40, induce la expresión de NOS inducible, produciendo niveles neurotóxicos de NO que puede alterar la transmisión colinérgica y como consecuencia un deterioro en la memoria (Tran y cols, 2001). Se ha demostrado que el péptido soluble del A $\beta$ 25-35 causa pérdida de la memoria espacial, administrada icv en ratas (Holscher y cols, 2007). Estos datos sugieren que los péptidos del A $\beta$  inducen estrés oxidativo.

Desde que se postuló que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos a través del cual actúa el A $\beta$  (Hensley y cols, 1994), se han realizado experimentos con antioxidantes, algunos contenidos en extractos naturales de plantas como los flavonoides, en distintos modelos de neurodegeneración (Ishige y cols, 2000). Los flavonoides pueden ejercer acción protectora o tóxica en las células dependiendo de la concentración utilizada, no solo por su actividad antioxidante, sino también a través de la modulación de las cascadas de señalización de cinasas de lípidos y proteínas (Williams y cols, 2004). El uso de antioxidantes ha ayudado a entender parte del mecanismo de acción del A $\beta$ . En la **grafica 2** podemos observar el efecto del pretratamiento con los flavonoides en el modelo de inyección con el A $\beta$ 25-35. Encontramos que la Catequina, Quercetina y Epicatequina, mostraron un efecto protector frente a la pérdida del aprendizaje y la memoria inducida por el A $\beta$ 25-35, dado que tienen un mayor porcentaje de respuestas correctas. Cuando comparamos el efecto de cada uno de los flavonoides, encontramos que la Epicatequina fue la más eficiente, tanto en la prueba del aprendizaje como la memoria. La Epicatequina pertenece al grupo de las catequinas dentro de la clasificación de los fla-

vonoides, se demostró que la epicatequina, tiene un mayor efecto antioxidante que las demás catequinas (Kondo y cols, 1999). La epicatequina y la catequina protegen a las células PC12, de la apoptosis inducida por el A $\beta$ 25-35 (Jin y Yong, 2005).

La ingesta crónica de catequinas del té verde, mejora el aprendizaje de ratas adultas intactas (Haque y cols 2006). El uso de antioxidantes como el ácido alfa lipoico reduce el daño sobre la memoria en el ratón transgénico Tg2576 (Quinn y cols, 2007). El tratamiento con extracto de te verde, disminuye el deterioro cognitivo y preserva la morfología neuronal, en ratones con vejez acelerada (Chan y cols, 2006). Bastianietto y cols 2006, han demostrado que la epigallocatequinagalato (EGCG, extraída del té verde) ejerce acción antioxidante, antiagregante de los péptidos amiloideos y antiapoptotica, en un modelo in vitro de neurotoxicidad con el A $\beta$ 25-35. Las catequinas del te verde evitan el deterioro cognitivo producido por el A $\beta$ 1-40 (Haque y cols, 2008).

El efecto de los flavonoides sobre los cambios conductuales sustentan la hipótesis de que el A $\beta$ 25-35, puede estar induciendo daño vía estrés oxidativo. En base a estos datos decidimos realizar la búsqueda de marcadores de daño oxidativo como ROS y PL.

#### *11.2 Concentraciones de ROS y PL a los diferentes tiempos, determinadas en el hipocampo.*

En la cuantificación de ROS y PL en el hipocampo, a las 2 y 24 horas (**Grafica 3 y 4**) después de la microinyección del A $\beta$ 25-35, encontramos que existe un aumento significativo en la formación ROS y PL, comparado contra el control. Contrario a lo encontrado en el grupo pretratado con Eicatequina (EC/A $\beta$ 25-35), pues se encontró una disminución significativa tanto en los ROS como en la PL, comparado con el grupo de A $\beta$ 25-35. Estos resultados indican que la microinyección del péptido A $\beta$ 25- 35, en el hipocampo, es capaz de producir ROS de manera temprana, lo cual puede estar oxidando a los lípidos de las membranas celulares, generando así la PL. La formación de ROS

aumenta con respecto al tiempo. A pesar de que esperábamos una correlación directa entre la formación de ROS y PL, es decir; a mayor ROS mayor PL, encontramos que a las 24h existió una menor PL debido probablemente, a la activación de mecanismos antioxidantes celulares. El grupo pretratado con la epicatequina corrobora este hecho, ya que disminuye significativamente tanto la formación de ROS como la PL. Los datos reportados en la literatura sustentan este hecho, desde que se ha demostrado que la A $\beta$  produce la formación de radicales libres y EROs (Behl y cols, 1994, Pike y cols, 1997). Butterfield y Kinsky (2001), proponen que la metionina presente en la posición 35 del A $\beta$ 25-35 es crucial para ejercer estrés oxidativo. Se ha demostrado que el A $\beta$  genera daño oxidativo a corto plazo, evidenciado con el uso de vitamina E en ratones transgénicos jóvenes, donde se encontró que la vitamina E administrada sistémicamente atenúa la lipoperoxidación, disminuye los niveles de A $\beta$  así como la formación de placas. Cuando la vitamina E se administró en ratones viejos, no fue capaz de ejercer efecto protector, por tal razón ellos sugieren que el A $\beta$  este generando estrés oxidativo en etapas tempranas de la enfermedad más no en etapas tardías (Sung y cols en el 2003). La presencia de biflavonoides en cultivos celulares expuestos al nitroprusiato de sodio y A $\beta$ 25-3, reduce el daño oxidativo (Sik y cols 2005). La epicatequina produce una disminución en la formación de ROS y PL en cultivos celulares, después de 24 h de exposición a A $\beta$ 25-35 (Ban y cols 2006b), El epigallocatequina galato inhibe eficientemente la fibrillogénesis de la alfa sinucleína y el péptido A $\beta$ , debido quizás al estado redox del A $\beta$ , evitando así la neurotoxicidad (Ehrnhoefer y cols, 2008).

Al término de la prueba de memoria - día 30 postcirugía -, se realizó la determinación de ROS y PL en el hipocampo (**Grafica 5**). Desde que se han sugerido que el estrés oxidativo, pueden estar presente, durante más tiempo (Stephanichev y cols, 2002, 2004). Nosotros encontramos un aumento significativo en el grupo de ratas tratadas con



el A $\beta$ 25-35, comparado contra el control. Mientras que el grupo pretratado con Epicatequina (EC/A $\beta$ 25-35) mostró una disminución significativa respecto al grupo tratado solo con A $\beta$ 25-35. Este resultado sugiere que existe aún daño oxidativo, persistente aún 30 días después de la inyección. Pensamos que este efecto es debido a un efecto tóxico indirecto del A $\beta$ 25-35, pues se ha propuesto que el A $\beta$ , al estar ocasionando daño neuronal, ocasiona la activación de la glia, la cual libera moléculas pro-inflamatorias como citocinas, interleucinas, además de activar a las sintasa del NO, generando un daño crónico, lo que genera más NO el cual puede ser responsable de “perpetuar” este daño oxidativo (Norenberg, 2005). Para demostrar la activación de los astrocitos decidimos realizar inmunistoquímica contra GFAP.

### *11.3 Presencia y localización de GFAP*

Los astrocitos reactivos son células de la glia, tienen una amplia participación en los procesos inflamatorios, a consecuencia del daño al SNC, originando una astrocitosis. Los astrocitos se vuelven hipertróficos liberando una gran variedad de sustancias químicas como interleucinas, citocinas, TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) y NO (*nitric oxide*). La liberación de NO se debe a que contienen una alta concentración de NOS (*nitric oxide synthase*) de tipo inducible (Eddleston y Mucke, 1993, Ayasolla y cols, 2004). Los astrocitos pueden ser identificados marcando a la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) que se expresa en altas concentraciones cuando los astrocitos reactivos se encuentran activados (Pekny y Nilsson 2005).

Los datos de las inmunohistoquímicas, realizadas en los cortes coronales de los cerebros de las ratas, que fueron extraídos al término de la memoria, muestran que el grupo de A $\beta$ 25-35 aumenta de manera significativa la presencia de astrocitos reactivos comparados con el control, en la región CA1 del hipocampo, sitio de inyección del pép-

tido. En el grupo pretratado con epicatequina y posteriormente inyectado con A $\beta$ 25-35 (EC/A $\beta$ 25-35) disminuyó significativamente la cantidad de astrocitos comparados con el grupo de A $\beta$ 25-35. Se sabe que el A $\beta$  produce activación de la microglia (Dickson 1997), y también se sabe que el estrés oxidativo generado por el A $\beta$ , es causa de activación de los astrocitos (Hu y cols 1998), quizás por estas razones nosotros pudimos observar una gran cantidad de astrocitos reactivos en el grupo de A $\beta$ 25-35. Por el contrario, el grupo de EC/A $\beta$ 25-35, mostró poca actividad astrocítica y esto debido a los efectos que se le han atribuido a la epicatequina como antioxidante y de manera indirecta como antiinflamatoria (Pietta, 2000; Ruso y cols, 2000). Yates en el 2000 reporta que la agregación del A $\beta$ 25-35 puede atraer de sobremanera mediadores de la inflamación, lo que agrava el daño. Esto conduce a la activación de los astrocitos reactivos. Se ha demostrado que el A $\beta$  puede inducir la formación de NO en los astrocitos, a través de la activación de las sintasas de NO de tipo inducible (Torreilles y cols, 1999), que contribuye aún más, con el EO y la degeneración neuronal. También, se ha reportado que el extracto del ginko biloba, el cual contiene 34% de flavonoides (EGb671), protege a las neuronas de hipocampo en cultivo, del daño ejercido por el NO (Bastianetto y Quirion 2002). Se demostró que el pretratamiento con catequina y epicatequina extraída del hipericum, en cultivo celular de microglia, reduce la formación de ROS y mejora la viabilidad microglial, en presencia del A $\beta$ 25-35 y A $\beta$ 1-40 (Kraus y cols 2007). El epigallocatequin galato inhibe significativamente la producción del factor vascular de crecimiento endotelial y prostaglandinas, inducido por la co-administración de interleucina-1 $\beta$  y A $\beta$ 25-35 en cultivos de astrocitoma (Kim y cols, 2007). Estos datos sugieren que el uso de este modelo ayudaría a entender el efecto del A $\beta$ 25-35, y por lo tanto ser un posible modelo para evaluar la EA.

## **XII. CONCLUSIÓN**

Los datos mostrados en este trabajo nos permiten concluir que el A $\beta$ 25-35, induce de manera temprana la formación de ROS, genera daño en las membranas neuronales que se ve reflejado en un aumento en la PL, generando una sobreactivación de la glia y un deterioro en la memoria.

El pretratamiento con la Epicatequina - una molécula a la cual se le han atribuido efectos antioxidantes, principalmente -, disminuye la formación de ROS, PL y la astocitosis. Así como una mejor respuesta en la memoria.

Por lo tanto, podemos sugerir que el A $\beta$ 25-35 produce deterioro cognitivo mediado por lo menos en parte por el estrés oxidativo.

### **XIII. Perspectivas**

Los datos mostrados en este trabajo dan evidencia de que el péptido A $\beta$ , produce daño oxidativo. Es importante tener en cuenta que las ROS además de tener actividad pro-oxidante, también pueden funcionar como moléculas de señalización celular. En este sentido, es necesario profundizar en el mecanismo molecular del A $\beta$ 25-35, ya que sería de gran relevancia poder hacer una búsqueda de las vías de señalización celular involucradas en este proceso.

Sería de gran importancia en este trabajo demostrar si el A $\beta$ 25-35 es capaz de producir muerte neuronal y si la epicatequina previene la muerte neuronal.

Otro mecanismo del A $\beta$  para que se de el estrés oxidativo, es su capacidad de unirse a receptores de membrana celular, como el receptor de productos finales de glicación avanzada, sería bueno identificar si el estrés oxidativo generado en este modelo de microinyección del A $\beta$ 25-35 esta mediado por la unión a este receptor.

Finalmente, no debemos olvidar que el A $\beta$ , no es la única molécula involucrado en la génesis de la EA. En este sentido, debemos ser claros en que debemos realizar un modelo más completo que represente a la patología de la EA.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar



Behavioural Pharmacology

## Antioxidant effects of Epicatechin on the hippocampal toxicity caused by Amyloid-beta 25–35 in rats

Elvis Cuevas<sup>a</sup>, Daniel Limón<sup>b</sup>, Francisca Pérez-Severiano<sup>c</sup>, Alfonso Díaz<sup>a,b</sup>, Laura Ortega<sup>b</sup>, Edgar Zenteno<sup>d,e</sup>, Jorge Guevara<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio Experimental de Encefalopatías Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México D.F. 04500, México

<sup>b</sup> Laboratorio de Neurofarmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, México

<sup>c</sup> Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México D.F. 04500, México

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México

<sup>e</sup> Facultad de Medicina Humana, Universidad Ricardo Palma, Santiago de Surco 0812, Perú

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 February 2009

Received in revised form 26 May 2009

Accepted 8 June 2009

Available online 17 June 2009

**Keywords:**  
Alzheimer's disease  
Epicatechin  
Ravonol  
Amyloid-beta  
Oxidative stress  
Memory

## ABSTRACT

Amyloid-beta is involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease. The Amyloid-beta fraction 25–35 (Amyloid-beta 25–35) is believed to cause neurotoxicity through oxidative stress. We evaluated the antioxidant effects of epicatechin on the Aβ25–35-caused hippocampal toxicity *in vivo*. Biochemical and histological evaluations, and learning and memory tasks, were assessed. Amyloid-beta 25–35 (100 μM/μl) or vehicle was injected into the CA1 hippocampal region of the rat 5 h after a single oral dose of epicatechin (30 mg/kg). Lipid peroxidation and reactive oxygen species formation were measured in Amyloid-beta- and Amyloid-beta-epicatechin-treated groups at 2 h and 24 h after dosing and 6 months of the lesion. There was an increase in lipid peroxidation and reactive oxygen species formation at 2-h and 24-h postlesion. Learning and memory tests were made 27–30 days after surgery in independent groups under the same experimental conditions. Immunohistochemical detection of glial-fibrillar acidic protein (GFAP) was evaluated in hippocampal tissues from the animals 30-days postsurgery. Amyloid-beta 25–35 caused a significant increase in lipid peroxidation and reactive oxygen species and a decrease in memory skills. In addition, hippocampal tissues from Amyloid-beta 25–35-treated animals showed an increased immunoreactivity against GFAP. In contrast, animals pretreated with epicatechin had a significant decrease in lipid peroxidation and reactive oxygen species and an improvement in memory skills. GFAP immunoreactivity was also decreased. Our results showed that Amyloid-beta 25–35-caused oxidative damage of the hippocampus was blocked by the administration of epicatechin.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder and the most common cause of dementia in the elderly (Storey et al., 2001). Alzheimer's disease is a condition with three major defining indicators: the formation of extracellular amyloid plaques (Wisniewski et al., 1996), intracellular neurofibrillary tangles (Iqbal et al., 2005), and dementia. Another histopathological characteristic marker is reactive gliosis (Probst et al., 2001). It has been argued that the accumulation of the amyloid-beta protein is a key step in the pathogenic mechanism of Alzheimer's disease. Amyloid-beta is a 4-kDa polypeptide that is intimately involved in pathogenic cascades. Amyloid-beta peptide is toxic to cells in culture (Yankner, 1998), which toxicity is associated with aggregation of the peptide (Pille et al., 1995). Several mechanisms have

been proposed to explain neurotoxicity, which are 1) production of reactive oxygen species such as hydrogen peroxide, nitric oxide, superoxide anion, and highly reactive hydroxyl radicals, 2) intracellular calcium accumulation, 3) altered membrane fluidity, 4) energy depletion, 5) alteration of cytoskeleton components, and 6) inflammatory processes (Hardy and Selkoe, 2002; Barnham et al., 2004; Drouot et al., 2000; Tomidokoro et al., 2001; Zheg et al., 2002; Pailharand Hemnani, 2004; Vajda, 2002; Saez et al., 2004; Limón et al., 2009a). All of these events converge into similar pathways of loss of specific neuronal-cell populations (Barnham et al., 2004). It is likely that certain neuronal populations are more vulnerable than others in Alzheimer's disease. The selective vulnerability may be partially caused by their susceptibility to insult by oxidative stress (McGeer and McGeer, 2002) and impaired neuronal-energy metabolism, further leading to oxidative damage to proteins, DNA, and lipids (Montes et al., 2008; Wyss-Coray and Mucke, 2002).

Attention has also been focused on the potential neuroprotective effects of flavonoids against the neuronal deficits associated with aging or age-related neurodegenerative diseases (Bartolotto et al., 2008).

\* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Edificio "D", Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Col. Copilco, Del Coacalco, 04510 México D.F., México. Tel.: +52 55 56 23 21 69, E-mail address: jguevara@agora.fmed.unam.mx (J. Guevara).

Catechins have been reported to prevent Amyloid-beta-caused cellular damage in cultured neuronal cells (Choi et al., 2001; Gontier et al., 2003; Hoo and Lee, 2005). Consequently, most of these reports have focused on the antioxidant effect of catechins for neuroprotection (Mandel and Youdim, 2004; Ban et al., 2005b). In addition, several studies *in vitro* and *in vivo* suggest that catechins may affect potential targets associated with the progression of Alzheimer's disease (Mandel et al., 2004; Marambaud et al., 2005; Rezaei-Zadeh et al., 2005). Studies in humans using flavonoid-containing plant extracts, such as *Ginkgo biloba* extracts or pure flavonoid preparations, demonstrate positive effects on cognitive function and memory performance in healthy volunteers, and in those with dementia from all age groups (Ortega et al., 1997).

In our work, we studied the beneficial effects of epicatechin. Epicatechin on Amyloid-beta-caused oxidative damage in the hippocampus of the rat. We also explored the effect of Epicatechin on learning and memory tasks and its immunoreactivity against glial-fibrillar acidic protein (GFAP) as an index of reactive gliosis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Amyloid-beta 25–35 (-GSNKGAIIGLM-), (-)-Epicatechin, albumin free IgG, and Triton X-100 were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) was obtained from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR). The primary polyclonal antibody anti-glial-fibrillary acidic protein (GFAP) was from Dako, Denmark. The secondary anti-rabbit antibody for fluorescein isothiocyanate (FITC) was purchased from Jackson ImmunoResearch Inc. (West Grove, PA). VectaShield plus DAPI was from Vector Lab (Burlington, CA).

### 2.2. Animals

All experiments were made with the approval of the "Local Committee for Ethics on the Use of Animals for Experimentation" from the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía and Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) according to the "Norma Mexicana 062" and strictly according to "the Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research" from the Society for Neuroscience. Male Wistar rats (280–300 g) were provided by the animal facilities of the Facultad de Medicina-UNAM and used throughout the study. Rats were housed in acrylic cages in groups of four to six rats per cage. The room was maintained at standard conditions (23 ± 2 °C, relative humidity at 55 ± 5%, and 12-h light-dark cycles). Food and water were available *ad libitum*. Groups of 6 rats were used for biochemical assays, 10 rats for learning and memory tests, and 4 rats for histological analysis.

### 2.3. Drug administration protocol

Ninety-eight rats were used in our work. Four experimental groups were designed for the study: 1) Sham (control animals given only vehicle, sterile water), Amyloid-beta 25–35 alone, epicatechin alone, and epicatechin plus Amyloid-beta 25–35. A first group of rats was given orally 1-mL vehicle or epicatechin (30 mg/kg) 5 h before stereotaxic surgery. The epicatechin dosage was obtained from previous studies (Da Silva et al., 1998; Piskula and Teran, 1998). The Amyloid-beta 25–35 peptide (100 µM, final concentration) was dissolved in sterile water to assess its aggregation (Pike et al., 1995). The solution was incubated at 37 °C for 24 h before its use to produce insoluble precipitates that were removed. This solution markedly facilitates the appearance of learning deficits in several tasks (Maurice et al., 1996; Debnath et al., 1997). For surgical purposes, animals were anesthetized with chloral hydrate (350 mg/kg) and placed onto a stereotaxic frame (Stoelting Co., Wood Dale, IL). The stereotaxic coordinates to produce a bilateral lesion in the

CA1 region of the hippocampus (-4.2 mm posterior to bregma, ±3.0 mm lateral to bregma, and 2.0 mm ventral to the dura) were standardized from the stereotaxic Atlas of Paxinos and Watson (1997). Injections of Amyloid-beta 25–35 or vehicle (1 µL) per side were infused for 5 min with a Hamilton syringe. After surgery, the animals were returned to their cages and constantly monitored during recovery.

### 2.4. Assay of lipid peroxidation

The formation of lipid-soluble fluorescent compounds was measured using the established method described (Pérez-Severiano et al., 2004). Hippocampal tissue that had a lesion was homogenized in 3-mL saline solution (0.9% NaCl). Aliquots (1 mL) were added to 4 mL of a chloroform-methanol mixture (2:1, v/v). Samples were stirred and placed on ice for 30 min in the dark. The upper phase was discarded and fluorescence of the chloroform phase was determined at 370-nm excitation and 430-nm emission wavelengths in a Perkin Elmer LS50-B luminescence spectrometer. The sensitivity of the equipment was adjusted to a fluorescent signal of 140 fluorescence units (FU) with a standard quinine solution (0.001 mg/mL quinine in 0.05 M H2SO4). The position times for evaluation of the lipid peroxidation were the same as those used for the reactive oxygen species assay (2 h and 4 h). Results were expressed as relative fluorescence units (RFU) per milligram of protein (Pérez-Severiano et al., 2004).

### 2.5. Assay of reactive oxygen species

Reactive oxygen species were evaluated using a reported method (Ali et al., 1993). Briefly, 5 µL of LNQ, i.e. the previous homogenized tissue, was diluted in 9 vol. 40 mM Tris plus HEPES buffer, and then incubated with 5 µM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). The samples were incubated for 1 h at 37 °C under constant shaking. At the end of incubation, fluorescence signals were determined in a Perkin Elmer LS50-B luminescence spectrometer at 488-nm excitation and 525-nm emission wavelengths. Values were obtained by interpolating the readings with a 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) standard curve (Sigma-Aldrich). Results were expressed as nanomoles DCF formed per milligram of protein per minute (Pérez-Severiano et al., 2004).

### 2.6. Learning and memory tests

Animals were tested in the eight-arm radial maze (Olton, 1977; León et al., 2009b), which was located in a room containing many visual cues external to the maze. For this purpose, the body weight of all the animals was controlled for 10 days to achieve 85% of the original weight and this weight was maintained to the end of the behavioral experiments. Before training all animals were habituated to the apparatus and food pellets for 1 day. This 15-min period of habituation was repeated three times a day, at intervals >1 h.

The learning was assessed using 20 trials that were made over 2 days. In each trial the animal was placed on a central platform at the middle of the eight-arm radial maze and was allowed to move freely in the maze until the animal made the attempts allowed or the time has elapsed (200 s). Between each trial there was a 90-min intertrial interval. Only three of the eight arms contained pellets during the entire test. In the first three trials, each rat was allowed to choose 8 arms. During the later trials the number of attempts was reduced, so that by the second day of training the rat was allowed to choose only three arms for each trial, after which the animal was removed from the maze. The number of correct responses, which were defined as choosing the arm that contained pellets and eating them, assessed the performance of a given animal in each trial. The learning was evaluated using the percentage of correct responses in all the trials.

The learning and memory tests were made at 25- and 30-days postlesion. After the injection of the Amyloid-beta (25–35) and the



Epicatechin treatment, each rat underwent 10 trials in 1 day, without previous habituation. At the beginning of each trial the animal was placed on the central platform and was allowed to move freely in the maze. Then the rat was allowed to choose only 3 arms in each trial. During each trial the animal was allowed to make three test choices, and then the animal was removed from the maze for a 50-min intertrial interval. The performance of each animal was assessed during each trial by the percentage of correct responses in the same way as during the training tests.

## 2.7. Histological techniques

Immunostaining against GFAP was assessed as a reliable marker of reactive astrogliosis. Coronal brain sections (5  $\mu$ m) close (30  $\mu$ m) to the lesion site and mounted on silane-coated slides were rehydrated in decreasing concentrations of ethanol in water and subsequently transferred into a solution of 2% albumin and 0.2% Triton for 15 min. The slides were first rinsed in 0.1 M phosphate-saline buffer (PBS) (pH 7.4) for 5 min per step, and then incubated with the GFAP polyclonal antibody (1:100) in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 150 min. Thereafter, the slides were incubated with secondary-RTC anti-rabbit antibody (1:100) and rinsed in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 5 min per step. The slides were then mounted with Vectashield plus DAPI. Image acquisition and processing were made with a Leica (Leica Microsystems Wetzlar, Germany) microscope fitted with a Leica DC 300F digital-imaging system using Leica Image Manager 1000 acquisition software. Fluorescent photomicrographs were obtained.

The number of immunoreactive cells to GFAP per field was determined in three fields per rat, and graphically expressed as an average per group  $\pm$  S.E.

## 2.8. Statistical analysis

All data were expressed as mean  $\pm$  S.E. and analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. For all cases, values of  $P < 0.05$  were considered as statistically significant. For the immunostaining data, semiquantitative analyses were made.

## 3. Results

### 3.1. Formation of lipid peroxidation and reactive oxygen species

Data obtained from lipid peroxidation measurements are presented in Fig. 1. Epicatechin alone ( $0.86 \pm 0.032$  and  $0.78 \pm 0.06$  URF/mg protein at 2 and 24 h) had no effect on the basal lipid peroxidation obtained from the sham group ( $0.85 \pm 0.075$  and  $0.69 \pm 0.075$  URF/mg protein at 2 and 24 h). In turn, Amyloid-beta 25-35 produced a significant increase of lipid peroxidation when compared with the sham group ( $2.05 \pm 0.23$  and  $1.25 \pm 0.05$  URF/mg protein at 2 and 24 h), representing increases of 141% and 80% at both times tested. In contrast, pretreatment of Amyloid-beta 25-35-rats with lesions with Epicatechin caused significant decreases in the lipid peroxidation values generated by Amyloid-beta 25-35 alone, even below the basal levels ( $0.68 \pm 0.11$  and  $0.82 \pm 0.063$  URF/mg protein at 2 and 24 h). These differences represented a decrease of 166% and 65%, compared to the Amyloid-beta group.

The amounts of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein formed in hippocampal tissues as an index of reactive oxygen species formation are shown in Fig. 1. The baseline of reactive oxygen species levels (sham) were  $0.39 \pm 0.02$  and  $0.51 \pm 0.01$  nmol DCF/mg protein/min at 2 and 24 h. Epicatechin alone produced no effect on reactive oxygen species formation when compared with sham ( $0.40 \pm 0.06$  and  $0.55 \pm 0.05$  nmol DCF/mg protein/min at 2 and 24 h), whereas Amyloid-beta 25-35 showed a stimulatory action on reactive oxygen species formation when compared with sham ( $0.67 \pm 0.06$  and  $0.92 \pm 0.07$  at 2 and 24 h); representing increases of 70% and 80%. The pretreatment of Amyloid-

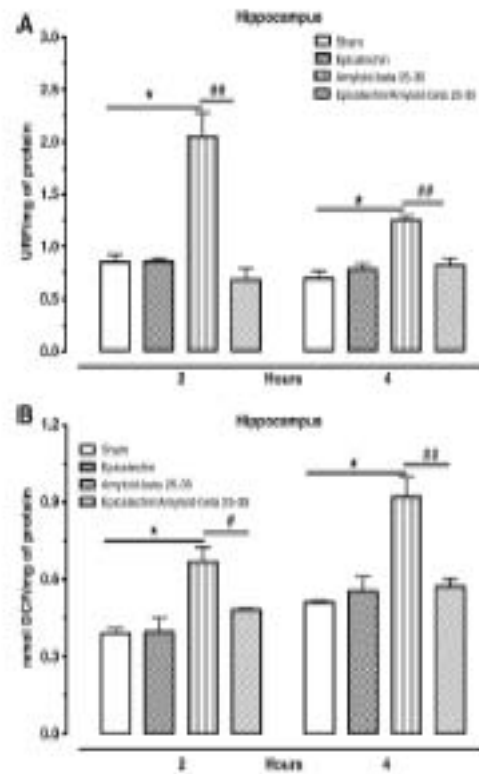


Fig. 1. A) Effect of Epicatechin on the Amyloid-beta 25-35-caused lipid peroxidation and B) formation of reactive oxygen species in the rat hippocampus at 2 and 4 h. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

beta 25-35-treated animals with Epicatechin significantly decreased the oxidant action of the toxin alone, producing levels of reactive oxygen species formation of  $0.52 \pm 0.03$  and  $0.57 \pm 0.03$  at 2 and 24 h, representing decreases of 20% and 61% compared to Amyloid-beta 25-35 alone.

### 3.2. Radial-arm-maze task

For the results of the spatial learning test, the first 10 trials (Olton, 1977) and Amyloid-beta 25-35 showed a tendency to slow this response. The next 10 trials represented consolidation, and Amyloid-beta 25-35 produced a significant decrease of this response. Pretreatment with Epicatechin in Amyloid-beta 25-35-treated rats caused increases in both acquisition and consolidation responses (Fig. 2A and C). The average differences were a 32% decrease for Amyloid-beta 25-35 alone compared to sham and a 43% increase for Epicatechin + Amyloid-beta 25-35 compared with Amyloid-beta 25-35 alone (Fig. 2A and C). For the memory test, we found a significant 36% decrease of this response from the Amyloid-beta 25-35 group when compared with sham, whereas the pretreatment with Epicatechin increased this marker by 42% compared with Amyloid-beta 25-35 alone (Fig. 2B and D). This finding indicates that Amyloid-beta 25-35 causes decreased responses on consolidation and memory tasks, whereas Epicatechin is able to exert a protective action on acquisition, consolidation, and information recovery.

### 3.3. Glial-fibrillar acidic protein (GFAP) immunohistochemistry

To show astrogliosis as part of the toxic action of Amyloid-beta 25-35, GFAP immunoreactivity was assessed in the same rat groups immediately after the memory tests were made. In the Amyloid-beta 25-35-treated group, GFAP immunoreactivity showed an increased reactivity when compared to sham and Epicatechin attenuated this

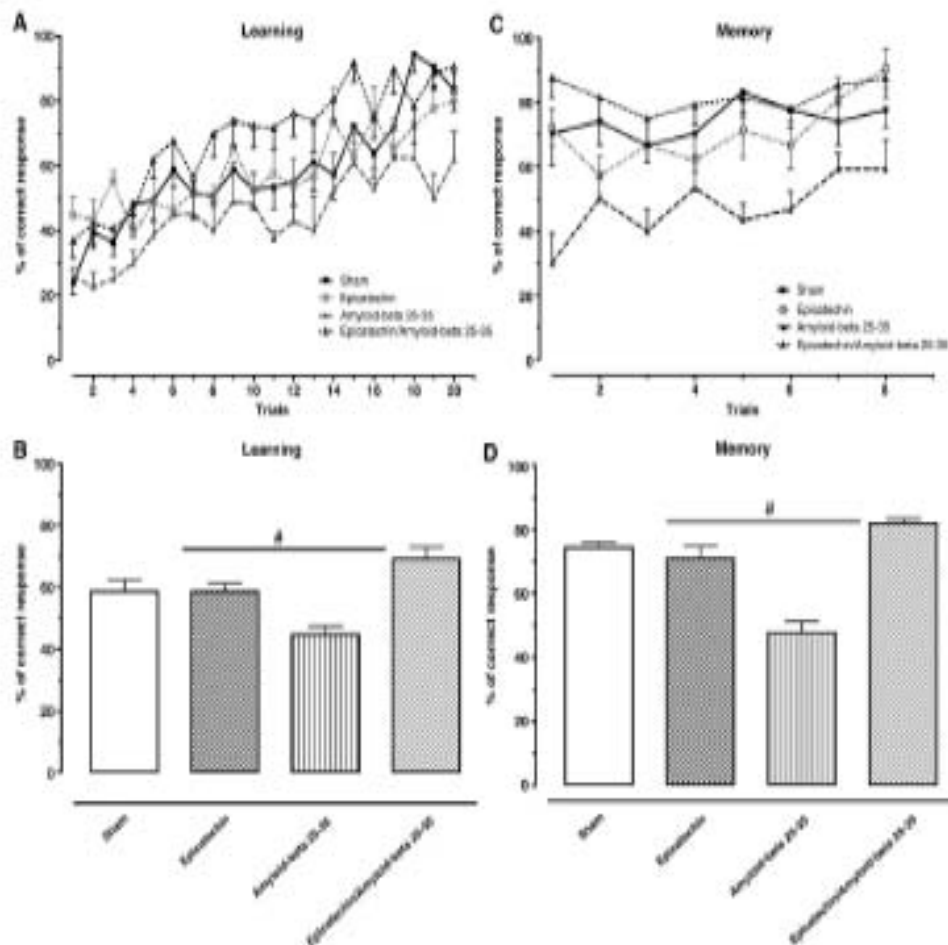


Fig. 2. Effects of Epicatechin on the Amyloid-beta 25-35-caused changes in learning and memory tasks in rats. A) Course of spatial learning in Epicatechin and/or Amyloid-beta 25-35-treated animals. B) Effect of Epicatechin on Amyloid-beta 25-35-caused affected learning. C) Course of spatial memory in Epicatechin and/or Amyloid-beta 25-35-treated animals. D) Summarized effect of Epicatechin on Amyloid-beta 25-35-caused affected memory. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

Amyloid-beta 25-35-caused reactivity (Fig. 3A–D). Quantitative data of GFAP-immunopositive cells in the CA1 region were for sham ( $33 \pm 3$  or  $fs/mm^2$ ), Epicatechin ( $41.17 \pm 4.33$  cells/ $mm^2$ ), Amyloid-beta 25-35 treated rats ( $80.75 \pm 2.75$  cells/ $mm^2$ ) and Epicatechin + Amyloid-beta 25-35 treated rats ( $37.50 \pm 3.44$  cells/ $mm^2$ ). We found a 190% increase in GFAP immunoreactive cells from Amyloid-beta 25-35-treated animals when compared with sham, and a corresponding 153% decrease of reactivity in the Epicatechin-pre-treated rats as compared with Amyloid-beta 25-35 alone.

#### 4. Discussion

The use of molecules with antioxidant ability for experimental studies has largely helped to understand part of the mechanisms linked to the selective damage caused by different neurotoxins, in particular the use of flavonoids in several models of neurotoxicity, such as those produced by 6-hydroxydopamine, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (Levites et al., 2003; Pan et al., 2003), and Amyloid-beta peptides in neuronal cultures (Choi et al., 2001; Bastianetto and Quirion, 2002). It has been proposed that these molecules are able to exert neuroprotective actions through their antioxidant activity. In this study, we used the Epicatechin as a tool to understand the pro-oxidant nature of Amyloid-beta 25-35. Epicatechin has been suggested to be one of the most effective antioxidants among several others (Ishige et al., 2001). This antioxidant activity is derived from its high value of Trolox-equivalent

antioxidant capacity (TEAC), even higher than that of vitamin E (Luximon-Ramma et al., 2005; Ishige et al., 2001; Cao et al., 1997). Our results demonstrate that Amyloid-beta 25-35 increases reactive oxygen species formation of hippocampus in early stages, as well as cognitive deficits. We also found hippocampal reactive astrogliosis in late stages. Also, our data confirm the neuroprotective effect of Epicatechin against Amyloid-beta 25-35 oxidative damage.

Amyloid-beta 25-35 is known to be the toxic functional domain of the Amyloid-beta 1-42, where methionine, at position 35, seems to be responsible for the redox site conformation (Butterfield and Kansik, 2001). It mediates neuronal damage in several ways, such as the increase of intracellular calcium, oxidative stress, apoptosis, necrosis, glial activation, and further tissue damage. All these events converge in a common pattern that may be responsible for the cognitive deficit (Mattson, 2002; Butterfield et al., 2002; Stepanichev et al., 2004). We found that Amyloid-beta 25-35 increased reactive oxygen species formation, and consequently lipid peroxidation, accompanied by loss of spatial learning and memory and increased reactive gliosis. We previously demonstrated similar changes caused by A $\beta$ 25-35 and how it is blocked by garlic extract (S-allylcysteine) (Pérez-Severiano et al., 2004) and  $\alpha$ -arabonin in rats (Jimón et al., 2009b).

Epicatechin is a flavonoid synthesized by plants, mostly found in green and black tea extract. It has been suggested that Epicatechin and its metabolite 3-O-methyl Epicatechin inhibit cell death caused by hydrogen peroxide (Spencer et al., 2001). Epicatechin has also been



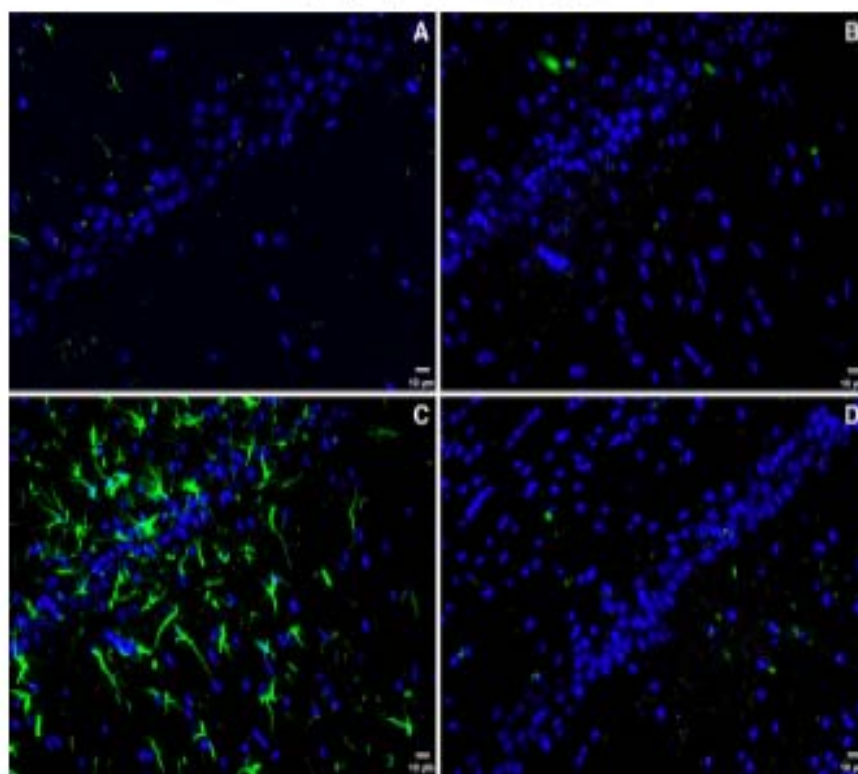


Fig. 3. Immunohistochemistry against GFP (green color) in the CA1 of the Epicatechin and Amyloid-beta 25-35 rat hippocampus. A) Sham; B) Epicatechin; C) Amyloid-beta 25-35 alone; and D) Epicatechin plus Amyloid-beta 25-35. Images correspond to the pyramidal layer and close to the lesion site. Nuclei were counterstained with DAPI (blue color). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

involved in radical scavenging activity and superoxide dismutase activity (Kotiyak et al., 2004). Moreover, it has been demonstrated that the bioavailability of (–)-Epicatechin is greater than that of (+) catechin in rats (Saba et al., 2001). Flavonoids are able to transverse the blood-brain barrier after oral ingestion (Mohsen et al., 2004; Youdim et al., 2004; Ishige et al., 2001). It is possible that A $\beta$ 25-35 neurotoxicity might be blocked by an antioxidant mechanism, but also by inhibition of Amyloid-beta oligomers and/or fibril formation (Bartlanetto et al., 2005). Similarly, it is possible that Epicatechin produced neuroprotection in our Amyloid-beta 25-35 model. Furthermore, treatment of PC12 cells with green tea extract (10–50  $\mu$ g/ml) attenuated, in a dose-dependent manner, the Amyloid-beta 25-35 (50  $\mu$ M) caused cell death, intracellular reactive oxygen species levels, and 8-oxodG formation, in addition to p53, Bax, and caspase-3 expression, whereas it up-regulated Bcl-2 (Lee et al., 2005). Furthermore, green tea extract prevented the Amyloid-beta 25-35-caused activation of the NF- $\kappa$ B, ERK, and p38 MAP kinase pathways. Different mechanisms could be involved in the action against Amyloid-beta, such as regulation of several key intracellular pathways and the inhibition of Amyloid-beta formation, implicating more than merely its reported free-radical-scavenging activity (Longpré et al., 2006). Additional possible actions have been found that prevent Amyloid-beta 25-35-caused neuronal-cell damage by interfering with an increase in intracellular [Ca $^{2+}$ ] and the consequent inhibition of glutamate release, reactive oxygen species generation, and caspase-3 activation (Ban et al., 2005a). Protective effects against Amyloid-beta-caused neurotoxicity and regulated secretory processing of nonamyloidogenic APP, via a PKC pathway, have also been demonstrated (Levin et al., 2003; Rezai-Zadeh et al., 2005).

Animals receiving catechins have improved reference and working memory-related learning abilities, lower plasma concentrations of

lipid peroxides, and lower hippocampal reactive oxygen species formation (Haque et al., 2006). Improvement in spatial cognitive learning has been suggested to be caused by the antioxidant activity of green tea catechins (Haque et al., 2006).

In our work, we have clarified that Amyloid-beta 25-35 is able to produce damage via oxidative stress, is possibly responsible of reactive astroglia and loss of learning and memory skills, and we have demonstrated the protective efficacy of Epicatechin. However, it is known that flavonoids act through signaling cascades (Williams et al., 2004). We demonstrated that Epicatechin may attenuate deleterious effects of the Amyloid-beta 25-35 neurotoxic peptide. Our results open a new opportunity to search for new treatments against the Alzheimer's disease pathology (Selkoe, 2000), although more studies are needed to understand the precise mechanisms of action of these biomolecules and their potential use as treatments against neurodegeneration.

#### Acknowledgments

This work was supported in part by CONACYT (61205), INNN (15/05), UNAM PAPIIT IN214809 and IN212008 given to J.G. and the Laboratory of Neuropharmacology-BUMP, and grant (UNAM-08) given to D.L. and Programa Universitario de Epidemiología, Genética y Proteómica (SDE/PTID.051), Facultad de Medicina UNAM. Thanks to Dr. Ellis Glazier for editing this English-language text. Thanks to Programa en Ciencias Biológicas, UNAM.

#### References

- Al, S.J., David, S.J., Newport, G.D., 1998. Age-related susceptibility to MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology* 19, 29–34.

- Baba, S., Oikube, H., Natsune, M., Mito, Y., Takizawa, T., Terao, J., 2001. In vivo comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats. *J. Nutr.* 131, 2885–2891.
- Bae, J.Y., Cho, S.O., Koh, S.B., Song, K.S., Baek, K., Seong, Y.H., 2006a. Protection of amyloid beta protein (25–35)-induced neurotoxicity by methanol extract of *Sida acuta* rhizome in cultured rat cortical neurons. *J. Ethnopharmacol.* 106, 220–227.
- Bae, J.Y., Jeon, S.Y., Bae, K., Song, K.S., Seong, Y.H., 2006b. Catechin and epicatechin from *Sida acuta* rhizome protect cultured rat cortical neurons against amyloid beta protein (25–35)-induced neurotoxicity through inhibition of cytosolic calcium elevations. *Life Sci.* 79, 2254–2259.
- Bamberg, K.J., Mathers, C.L., Bath, A.J., 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 205–214.
- Barilanteo, S., Quirion, R., 2002. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol. Aging* 23, 891–897.
- Barilanteo, S., Wu, Z.C., Papadopoulos, V., Quirion, R., 2006. Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin/gallocatechin against beta-amyloid-induced toxicity. *Eur. J. Neurosci.* 23, 55–68.
- Barilanteo, S., Kraneck, S., Quirion, R., 2008. Polyphenols as potential inhibitors of amyloid aggregation and toxicity: possible significance to Alzheimer's disease. *Mol. Rev. Med. Chem.* 8, 439–465.
- Bauerfeld, D.A., Karnak, J., 2001. Methionine residue 35 is critical for the oxidative stress and neurotoxic properties of Alzheimer's amyloid beta-peptide 1–42. *Peptides* 22, D99–D109.
- Bauerfeld, D.A., Carrozzini, A., Lauderbach, C.M., Drake, J., 2002. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol. Aging* 23, 655–664.
- Chen, C., Sofic, E., Price, R., 1987. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 749–760.
- Choi, Y.T., Jung, C.H., Lee, S.R., Bae, J.H., Baik, W.K., Suh, M.H., Park, J., Baik, C.W., Suh, S.L., 2008. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life Sci.* 79, 603–614.
- Croce, A., Pellegrini, S., Tajirazuoli, D., 2003. Synergistic protection of PC12 cells from beta-amyloid toxicity by norepinephrine and catechin. *Brain Res. Bull.* 62, 29–38.
- Da Silva, E.L., Prada, M., Terao, J., 1996. Enhancement of antioxidant ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1209–1216.
- Delbecq, S., Privat, A., Maurice, T., 1997. In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptide (25–35)-induced amnesia in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 319, 1–4.
- Drouot, B., Pripot-Raymond, M., Charbat, J., Pfler, T., 2000. Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 705–715.
- Haque, A.M., Hashimoto, M., Kanakura, M., Tanabe, Y., Hara, Y., Shido, O., 2006. Long-term administration of green tea catechin improves spatial cognition learning ability in rats. *J. Nutr. Dev.* 1043–1047.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems in the road to therapeutics. *Science* 298, 962–964.
- Huo, H.J., Lee, C.V., 2005. Epicatechin and catechin in cocoa inhibit amyloid beta protein induced apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1446–1448.
- Iqbal, K., Roy, M., Khanlou, S., Soliman, H., Ramiya, T., Ichihara, M., Nafarati, L., Blennow, K., Andreason, N., Vannucchi, E., Grundke-Iqbal, I., 2005. Subgroups of Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid molecular markers. *Ann. Neurol.* 58, 248–257.
- Ishige, K., Schubert, D., Sagara, Y., 2004. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 433–446.
- Kostyak, V.A., Petropoulos, A.I., Seligova, E.N., Kostyak, T.V., Natarov, I.B., 2004. Experimental evidence that flavonoid metal complex may act as mimics of superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 428, 204–208.
- Lee, S.Y., Lee, J.W., Lee, H., Ko, H.S., Yoo, Y.R., Oh, K.W., Ha, T.Y., Hong, J.T., 2005. Inhibitory effect of green tea extract on beta-amyloid-induced PC12 cell death by inhibition of the activation of NF-kappaB and ERK/p38 MAP kinase pathway through antioxidant mechanisms. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 140, 45–54.
- Leiras, Y., Anit, T., Mandel, S., Youdim, M.B., 2003. Neuroprotection and neurorescue against A-beta toxicity and PQC-dependent release of neurotrophic adult protein precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J. Neurosci.* 23, 92–99.
- Urota, U., Ogar, A., Minamide, T., Chazotte, G., Epineva, B., Zanone, E., Guayana, J., 2006a. Amyloid-beta(25–35) impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rat. *Neurosci. Res.* 63, 129–137.
- Urota, U., Minamide, T., Ogar, A., Chazotte, G., Epineva, B., Zanone, E., Guayana, J., 2006b. Neuroprotective effect of alpha-asarone on spatial memory and nitric oxide levels in rats injected with amyloid-beta(25–35). *Neurosci. Lett.* 403, 91–93.
- Longoni, F., Carneiro, R., Chelton, Y., Banerjee, C., 2006. Protection by EGCG against beta-amyloid-induced neurotoxicity: involvement of NF-kappaB, ERK, and MAPK pathways and inhibition of amyloid fibril formation. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 1761–1764.
- Luzon-Ramirez, A., Bahamon, T., Crost, A., Zambky, V., Garcia, K., Gomez, D., Anacona, G., 2005. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Maianthum Radix. *Food Res. Int.* 38, 357–367.
- Mandil, S., Youdim, M.B., 2004. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 104–117.
- Mandil, S., Weislich, G., Anit, T., Youdim, M.B., 2004. G11 signaling pathway in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* 88, 1555–1569.
- Marambaud, P., Zhao, H., Davies, P., 2005. Reversible protease cleavage of Alzheimer's disease amyloid-beta peptide. *J. Biol. Chem.* 280, 37377–37382.
- Mattson, M.P., 2002. Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22, 5239–5250.
- Maurice, T., Lockhart, B.R., Privat, A., 1996. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptide involves cholinergic dysfunction. *Brain Res.* 706, 81–89.
- McGeer, R.L., McGeer, E.G., 2002. Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22, 5239–5250.
- Moham, M.A., Marik, J., Kibele, G., Bior-Danis, C., Mhone, K., Gheon, G., Debrun, E., Saal, S.K., 2004. The differential tissue distribution of the flavonone naringenin following gastric intubation. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1329–1340.
- Morita, H., Nanamura, A., Nakamura, M., Takada, A., Shink, J.C., Aloy, G., Smith, M.A., Perry, G., 2008. Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* 44, E92–E95.
- Olson, G.S., 1977. Spatial memory. *Sci. Am.* 236, 82–84, 89–94, 96–98.
- Oyggos, J.M., Garriga, J.F., Lopez, S., Leinonen, L., Commenge, D., Salonen, R., Raut, S., Brossier, M.B., 1997. Wine consumption and dementia: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev. Neurol. (Paris)* 153, 185–192.
- Rao, T., Fu, J., Zhou, X., Jankovic, J., Lu, W., 2003. Effects of green tea polyphenol on dopamine uptake and on MPP(+)-induced dopamine neuron injury. *J. Biol. Chem.* 278, 1073–1083.
- Rathar, M.S., Hemnani, T., 2004. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J. Clin. Neurosci.* 11, 466–467.
- Ratnes, G., Watson, C., 1997. Hippocampal function. In: Ratnes, G., Watson, C. (Eds.), *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, pp. 30–46.
- Ribeiro-Silva, F., Sahuquillo, S.R., Rodriguez, P.M., Casas, M.E., Garsara, J., Llanos, D., Maldonado, D.R., Medina, C.O., Rodriguez, C.J., Santamaría, A., 2004. S-allylcysteine prevents amyloid beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and accelerates learning deficits. *Eur. J. Pharmacol.* 489, 197–202.
- Rice, C.J., Walenczyk-Waserman, A.J., Komonik, J., Gibbs, D.J., Glabe, C.G., Conway, C.W., 1995. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta25–35 region to aggregation and neurotoxicity. *Neurochem.* 64, 253–265.
- Rizk, M.K., Terao, J., 1998. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes (rat plasma). *J. Nutr.* 128, 1172–1178.
- Rohit, A., Herzig, M.C., Miel, C., Ipari, S., Tolay, M., 2004. Perisomatic granules (non-plaque dystrophic dendrites) of hippocampal CA1 neurons in Alzheimer's disease and Pick's disease: a lesion distinct from granulovacuolar degeneration. *Acta Neuropathol.* 102, 626–648.
- Rosa-Jadit, K., Shytle, D., Sun, H., Mori, T., Hsu, H., Jaramillo, D., Ehrhart, J., Townsend, K., Zeng, J., Morgan, D., Hardy, J., Town, T., Tan, J., 2005. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. *J. Neurosci.* 25, 807–814.
- Sato, T.E., Pinar, M., Vargas, M., Barbato, L., Maccioni, R.B., 2004. Amyroic nitric oxide triggers tau hyperphosphorylation in hippocampal neurons. *In Vitro* 20, 275–280.
- Selkoe, D.J., 2000. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 924, 17–25.
- Spencer, J.R., Schroeter, H., Crosswell, A.J., Kibele, G., Williams, R.J., Bior-Danis, C., 2004. Contrasting influences of glutathione and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1139–1146.
- Soparkchev, M.V., Zhdanova, I.M., Zambenko, U., Mishra, Y.V., Lazareva, N.A., Gashina, M.V., Gulgayeva, N.V., 2004. Amyloid-beta(25–35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Psychol. Behav.* 30, 647–655.
- Stony, E., Kinnella, G.J., Slavin, M.J., 2001. The neurophysiological diagnosis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 3, 261–285.
- Taniguchi, Y., Ishiguro, K., Harigaya, Y., Matsubara, E., Henda, M., Park, J.M., Yasuda, K., Kawasabayashi, T., Okamoto, K., Shoji, M., 2004. Abeta amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP(Swe) mice. *Neurosci. Lett.* 299, 169–172.
- Vajda, E.J., 2002. Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J. Clin. Neurosci.* 9, 4–8.
- Williams, R.J., Spencer, J.R., Bior-Danis, C., 2004. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radic. Biol. Med.* 36, 838–849.
- Wlazniak, H.M., Wegiel, J., Kondzi, L., 1996. Some neuropathological aspects of Alzheimer's disease and its relevance to other disciplines. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 22, 3–11.
- Wys-Coray, T., Mucke, L., 2002. Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword. *Neuron* 35, 49–63.
- Yankner, B.A., 1999. Amyloid and Alzheimer's disease: cause or effect? *Neurobiol. Aging* 20, 470–471.
- Youdim, K.A., Shukit-Hale, B., Joseph, J.A., 2004. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1603–1609.
- Zheng, H., Xu, H., D'Elia, S.N., Gross, R., Hardy, K., Gayner, J., LaFrancis, J., Simpkins, J., Ruffolo, L.M., Petancika, S., Wang, B., Duff, K., 2002. Modulation of Abeta(1–42) peptide by estrogen in mouse models. *J. Neurochem.* 80, 194–198.

## XV. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aksenov M, Aksenova M, Butterfield D, Geddes J, Markesbery W. (2001). Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease, *Neurosci.* 103:373–383.
2. Aksenova M, Aksenov M, Payne R, Trojanowski J, Schmidt M, Carney J, Butterfield D, Markesbery W, (1999). Oxidation of cytosolic proteins and expression of creatine kinase BB in frontal lobe in different neurodegenerative disorders. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 10:158–165.
3. Alberca R, Montes-Latorre E, Gil-Néciga E, Mir-Rivera P, Lozano-San Martín P. (2002). Enfermedad de Alzheimer y mujer. *Rev Neurol.* 35: 571-579.
4. Alkama T, Nitta A, Mizoguchi H, Itoh A, Nabeshima T. (2007). A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A<sub>β</sub> 25–35. *Beh. Brain Res.* 180:139-145
5. Allen S. (2007). Alzheimer's disease: a hundred years of investigation. *Molecular and cellular neurobiology: Neurobiology of Alzheimer's disease*, 3th. Edition. Edited by: Dawbarn D and Allen S. Oxford University. Chapter 1: 1-36.
6. Alonso A. (1997). Importancia de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Colombia.* 7:14-15.
7. Arias C, Montiel T, Quiroz-Báez R, Massieu L. (2002). Beta-Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 176:163-74.
8. Ayasolla K, Khan M, Singh AK and Singh I. (2004). Inflammatory mediator and h-amyloid (25–35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E. *Free Rad. Biol. and Med.* 37:325-338.
9. Baba S, Osakabe N, Natsume M, Muto Y, Takizawa T, Terao J. (2001). In vivo comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats. *J Nutr.* 131:2885-91.
10. Ban J, Cho S, Koh S, Song K, Bae K, Seong Y. (2006a). Protection of amyloid β- protein (25–35)-induced neurotoxicity by methanol extract of *Smilacis chinae* rhizome in cultured rat cortical neurons. *J. Ethnopharm.* 106:230–237
11. Ban J, Jeon S, Bae K, Song K, Hee Y. (2006b) Catechin and epicatechin from *Smilacis chinae* rhizome protect cultured rat cortical neurons against amyloid β protein (25–35)-induced neurotoxicity through inhibition of cytosolic calcium elevation. *L. Sci.* 79: 2251–2259
12. Bass D, Parce J, Dechatelet L, Szejda P, Seeds M, Thomas M. (1983). Flow cytometric studies of oxidative Blanchard product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 130, 1910.
13. Bastianetto S, Ramassamy C, Doré S, Christen Y, Poirier J, Quirion R. (2000). The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *Eur J Neurosci.* 12:1882-1890.
14. Bastianetto S, Quirion R. (2002). The ginkgo biloba extract (EGB671) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoids constituents and protein kinase C. *J. Neurochem* 74:2268-2277.
15. Bastianetto S, Yao Z, Papadopoulos V, Quirion R. (2006) Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against b-amyloid-induced toxicity. *Eu. J. Neurosc.* Vol. 23, pp. 55–64.

16. Behl C, Davis J, Lesley R, Schubert D. (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77:817–827.
17. Bertram L, Tanzi RE. (2008). Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci.* 9:768-78.
18. Blanchard BJ, Konopka G, Russell M, Ingram VM. (1997). Mechanism and prevention of neurotoxicity caused by beta-amyloid peptides: relation to Alzheimer's disease. *Brain Res.* 776:40-50.
19. Brion JP, Anderton BH, Authelet M, Dayanandan R, Leroy K, Lovestone S, Octave JN, Pradier L, Touchet N, Tremp G (2001). Neurofibrillary tangles and tau phosphorylation. *Biochem Soc Symp.* 67:81-88.
20. Bush AL, Masters CL, Tanzi RE. (2003). Cooper, beta-amyloide, and alzneimer's disease: tapping a sensitive connection. *Proc. Natl. acad. Sci.* 100:11193-11194.
21. Butterfield D, Yatin S, Link C. (1999). In vitro and in vivo protein oxidation induced by Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1–42), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893:265–268.
22. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C and Castegna A (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid  $\beta$ -peptide. *TRENDS in Molecular Medicine* 7(12):548-554.
23. Butterfield A, Kanski J. (2001). Methionine residue 35 is critical for the oxidative stress and neurotoxic properties of Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide 1-42. *Peptides.* 23:1299-1309.
24. Butterfield D, Castegna A, Lauderback C and Drake J (2002) Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiology of Aging* 23 655–664.
25. Butterfield DA, Boyd-Kimball D. (2005). The critical role of methionine 35 in Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1703:149-156.
26. Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273:27765-27767.
27. Cappai R, Needham E, Ciccotosto G. (2007). The Function of the Amyloid Precursor Protein Family: Abeta Peptide and Alzheimer's Disease Celebrating a Century of Research. Edited by: Barrow C and Small D. Springer-Verlag London, Chapter 3:37-51.
28. Chan YC, Hosoda K, Tsai, Yamamoto S, Wang MF. (2006). Favorable effects of tea on reducing the cognitive deficits and brain morphological in senescence-accelerated mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 52:266-273
29. Chen S, Wright J, Barnes C. (1996). The neurochemical and behavioral effects of  $\beta$ -amiloyd peptides (25-35). *Brain. Res.* 720:54-60.
30. Chong Z Z, Li F and Maiese K (2005) Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology* 75 207–246.
31. Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH (2005) Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8:79-84.
32. Commenges D, Scotet V, Renaund S, Jacmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, Dartigues J. (2000). Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur. J. epidemiol.* 16:357-363.

33. Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, y Rowan MJ. (1997). Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments. *NeuroReport*, 8: 3213-3217.
34. Curtain CC, Ali F, Volitakis I, Cherny RA, Norton RS, Beyreuther K, Barrow CJ, Masters CL, Bush AI, Barnham KJ. (2001). Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *J Biol Chem*. 276:20466-20473.
35. Curtain CC, Ali FE, Smith DG, Bush AI, Masters CL, Barnham KJ. (2003) Metal ions, pH, and cholesterol regulate the interactions of Alzheimer's disease amyloid-beta peptide with membrane lipid *J Biol Chem*. 278:2977-2982.
36. Da Silva E, Piskula M, Terao J. (1998). Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. *Free. Radic. Biol. Med.* 8:1209-1216.
37. Delobette S, Privat A, Maurice T. (1997). In vitro aggregation facilitates b-amyloid peptide-25–35-induced amnesia in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 319, 1–4.
38. Dickson DW. (1997). The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropath. Exp Neurol.* 56:321-339.
39. Dickson DW, Crystal HA, Bevona C, HonerW, Vincent I, Davies P. (1995). Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiol. Aging* 16:285–98
40. Eddleston M, Mucke L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease. *Neurosci.* 54:15-36.
41. Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, Herbst M, Masino L, Lurz R, Engemann S, Pastore Annalisa and Wanker EE. (2008) EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat. Stru. & Mol. Biol.* 15:558-566
42. Esiri M. (2007). The neuropathology of Alzheimer's disease. Molecular and cellular neurobiology: Neurobiology of Alzheimer's disease, 3th. Edition. Edited by: Dawbarn D and Allen S. Oxfor University. Chapter 2: 37-58.
43. Evin G, Weidemann A. (2001). Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A $\beta$  amyloid peptides. *Peptides.* 23:1285-1297. Frautschy S, Baird A and Cole G. (1991) Effects of injected Alzheimer  $\beta$ -amyloid cores in rat brain. *Proc Nat Acad Sci.*88:8362-836
44. Frautschy S, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido T, Hsiao K, Cole G. (1998). Microglial response to amyloid plaques in APP<sup>sw</sup> transgenic mice. *Am J Pathol.*152:307–317.
45. Freir DB, Holscher C, Herron CE. (2001). Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo. *J Neurophysiol.* 85:708-713
46. Games D, Adams D, Allesandrini R, Bardour R, Bert helette P, Blackwell C, Cart T; Clemens J, Donaldson T, Gillespie E, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg, Little S, Masaliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Pom M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale S, Wadsworth S, Wolozin, B, Zhao J. (1995). Alzheimer-like neuropathology in transgenic mice overexpressing 717<sup>v</sup>~ F 13-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.
47. Ghiso J, frangione B. (2000). Amyloidosis and Alzheimer's disease. *Advanced drug delivery reviews.* 54:1539-51.

48. Glenner G, Won C. (1984) Alzheimer's disease: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:1131-1135.
49. Goedert M. (1993). Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 16:460-465.
50. Gordon M, Holcomb L, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Boyett K, Connor K, Melachrinou J, O'Callaghan J, Morgan D. (2002). Time course of the development of Alzheimer-like pathology in the doubly transgenic PS1 \_ APP mouse. *Exp Neurol* 173:183–195.
51. Gordon K, Dawbarn D. (2007). Current pharmacological approaches to treating Alzheimer's disease. *Molecular and cellular neurobiology: Neurobiology of Alzheimer's disease*, 3th. Edition. Edited by: Dawbarn D and Allen S. Oxford University. Chapter 16: 359-390.
52. Gotz J, Schild A, Hoerndli F, Pennanen L. (2004) Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models. *Int J Dev Neurosci.* 22:453-465.
53. Grundman M. (2000). Vitamin E and Alzheimer's disease: the basis of additional clinical trials. *Am. J. clin. Nutr.* 71:630S-636S
54. Halliwell B, Gutterer J. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Univ. Press, Oxford.
55. Haque A, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Hara Y, Shido O. (2006). Long-Term Administration of Green Tea Catechins Improves Spatial Cognition Learning Ability in Rats. *J. Nutr.* 136:1043–1047.
56. Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Hara Y, Shido O. (2008). Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by A $\beta$ 1–40 in rats. *J. Nutr. Biochem.* 19:619-626
57. Hardy J, Higgins G. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Sci.* 256:184-185.
58. Hardy J y Selkoe D. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
59. Harper J, Wong S, Lieber C, Lansbury P. (1999). Assembly of A beta amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. *Biochem.* 38(28):8972-8980.
60. Hebert LE, Scherr PA, McCann JJ, Beckett LA, Evans DA. (2001). Is the risk of developing AD greater for women than for men? *Am J Epidemiol.* 153: 132-136.
61. Hensley k, Carney JK, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA y Butterfield DA. (1994). A model for  $\beta$ -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: Relevance to Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:3270-3274.
62. Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita S, Wu J, Carney J. (1995). Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation, *J. Neurochem.* 65:2146–2156.
63. Hensley K, Maitt M, Yu Z, Sang H, Markesbery W, Floyd R, (1998). Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation, *J. Neurosci.* 18:8126–8132.
64. Holscher C, Gengler S, Gault VA, Harriott P, Mallot HA. (2007). Soluble beta-amyloid[25-35] reversibly impairs hippocampal synaptic plasticity and spatial learning. *Eur J Pharmacol.* 561:85-90.



65. Holtzman, D. M. (2001). Role of ApoE/Abeta interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *J. Mol. Neurosci.* 17: 147–155
66. Hsiao K, Borchelt R, Olson K, Johannsdottir R, Kitt C, Yunis W, Xu S, Eckman C, Younkin S, Price D, Ladecola C, Clark H, Carlson G. (1995). Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron* 15:1203–1208.
67. Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ. (1998). Amyloid beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res.* 785:195.
68. Huang X, Cuajungco MP, Atwood CS, Hartshorn MA, Tyndall JD, Hanson GR, Stokes KC, Leopold M, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Saunders AJ, Lim J, Moir RD, Glabe C, Bowden EF, Masters CL, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI. (1999). Cu(II) potentiation of Alzheimer's amyloid beta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J Biol Chem.* 274(52):37111-6.
69. Iqbal K, Grandhe-Iqbal, Smith A, George L, Tung Y, Zaidi T. (1989). Identification and localization of a tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Proc. Nat. Aca. Sci.* 86:5646-5650.
70. Iqbal K, Alonso AC, Gong CX, Khatoon S, Pei JJ, Wang JZ, (1998). Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. *J Neural Transm Suppl.* 53: 169-180.
71. Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, Hyman BT. (1997). Ab deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss, in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J. Neurosci.* 17:7053-7059.
72. Ishige K, Schubert D, Sagara Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Rad. Biol. Med.* 30:433-446.
73. Janus C, D'Amelio S, Amitay O, Chishti MA, Strome R, Fraser P, Carlson GA, Roder JC, St George-Hyslop P, Westaway D. (2000). Spatial learning in transgenic mice expressing human presenilin-1. (PS1) transgenes. *Neurobiol. Aging* 21:541-549.
74. Jin HH AND Yong CL. (2005). Epicatechin and Catechin in Cocoa Inhibit Amyloid  $\beta$  Protein Induced Apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 53:1445-1448.
75. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325:733-736.
76. Kim SJ, Jeong HJ, Lee KM, Myung NY, An NH, Yang WM, Park SK, Lee HJ, Hong SH, Kim HM, Um JY. (2007) Epigallocatechin-3-gallate suppresses NF- $\kappa$ B activation and phosphorylation of p38 MAPK and JNK in human astrocytoma U373MG cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1-10
77. Klunk WE, Pettegrew JW, Abraham DJ (1989). Quantitative evaluation of Congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J Histochem and Cytochem* 37:1273-1281.
78. Kolsch H, Rao ML. (2002). Neuroprotective effects of estradiol-17 $\beta$ : implications for psychiatric disorders. *Arch Women Ment Health.* 5: 105-110.
79. Kondo K, Kurihara M, Miyata Naoki, Suzuki Takashi, and Toyoda M. (1999). Mechanistic Studies of Catechins as Antioxidants against Radical Oxidation *Arch. Biochem. Biophys.* 362:79–86.

80. Kowall N, Beal M, Busciglio J, Duffy L, Yankner B. (1991). An in vivo model for the neurodegenerative effects of  $\beta$ -amyloid and protection by substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7247-7251.
81. Kraus B, Wolff H, Heilmann J, Elstner EF. (2007). Influence of *Hypericum perforatum* extract and its single compounds on amyloid- $\beta$  mediated toxicity in microglial cells. *Life Sci.* 81:884-894
82. Lambert JC, Coyle N, Lendon C. (2004). The allelic modulation of apolipoprotein E expression by oestrogen: potential relevance for Alzheimer's disease. *J Med Genet.* 41: 104-112.
83. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F.. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci.* 96: 3922-3927.
84. Launer LJ, Andersen K, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Amaducci LA, Brayne C, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A. (1999). Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. *European Studies of Dementia. Neurology.* 52: 78-84.
85. Lee VM. (1995). Disruption of the cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol.* 5:663-668.
86. Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, Frosch MP, Selkoe DJ (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40:1087-1093.
87. Lemere CA, Blustzjan JK, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido TC, Selkoe DJ. (1996). Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and ApoE in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol. Dis.* 3:16-32.
88. Lewis J, Dickson D, Lin W, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E. (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Sci.* 293:1487-1491.
89. Limón ID, Díaz A, Mendieta L, Chamorro G, Espinosa B, Zenteno E, Guevara J. (2009). Amyloid-beta (25-35) impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats. *Neurosci Res.* 63:129-137.
90. Ling FA, Hui DZ, Ji SM. (2007). Protective effect of recombinant human somatotropin on amyloid beta-peptide induced learning and memory deficits in mice. *Growth Horm IGF Res.* 17:336-341.
91. Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci.* 97:1456-1460.
92. López-Pausa S. Definición y epidemiología de la enfermedad de Alzheimer. En: *Enfermedad de Alzheimer y otras demencias.* 2ª. Edi. Editores: Alberca R López-Pausa S. Editorial medica Panamericana. 11:147-156
93. Lorenzo A y Yankner B. (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 91:12243-12247.



94. Lovell M, Xie C, Markesbery W. (1998). Decreased glutathione transferase activity in brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease, *Neurology* 51:1562–1566.
95. Lovell M, Xie C, Gabbita S, Markesbery W. (2000). Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain, *Free Radic. Biol. Med.* 28:418–427.
96. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. (1951). Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.
97. Lyras L, Cairns N, Jenner A, Jenner P, Halliwell B. (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 68:2061–2069.
98. Mandel S, Youdim MB. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* 37:304–317
99. Mann D. (1985). The neuropathology of alzheimer's disease: a review with pathogenetic, aetiological and therapeutic considerations. *Mech. Ageing and Develop.* 31: 213-255
100. Marcus D, Thomas C, Rodriguez C, Siemberkoff K, Tsay J, Strafaci J, Freedman M. (1998). Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 150:40-44.
101. Markesbery W, Lovell M. (1998) Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 19:33–36.
102. Martínez A, Lahiri DK, Giacobini E, Greig NH. (2009) Advances in Alzheimer therapy: understanding pharmacological approaches to the disease. *Curr Alzheimer Res.* 6:83-85.
103. Masters C, Simm G, Weinman N, Multhaup G, Mc Donald B, Beyreuther K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Nat. acad. Sci.* 82:4245-4249.
104. Mattson MP. (2003). Gene-diet interaction in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann. Intern. Mol.* 139:441-444.
105. Mattson MP. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430:631–639.
106. Mattson MP, Chan SL, Duan W. (2002). Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiol Rev.* 82:637-672.
107. Mattson M, Chan S. (2003). Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.* 34: 385–397.
108. Mattson M, Cheng B, Davis D, Bryan K, Lieberburg I, Rydel R. (1992).  $\beta$ -Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12: 376-389.
109. Mattson MP, Barger SW, Cheng S, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, and Rydel RE. (1993).  $\beta$ -Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal  $Ca^{2+}$  homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16: 409–414,
110. Maurer K, Volk S, Gerbaldo H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet.* 349:1546-1549.
111. Maurice P, Lochat A, Privat. (1996). Amnesia induced in mice by centrally administered  $\beta$ -Amyloid peptide involves cholinergic dysfunction, *Brain Res.* 319:1- 4.

112. Mayeux R. (2003). Epidemiology of neurodegeneration. *Ann. Rev. Neurosci.* 26:81-104.
113. McDonald MP, Dahl EE, Overmier JB, Mantyh P, Cleary J. (1994). Effects of an Exogenous fl-Amyloid Peptide on Retention for Spatial Learning. *Behav and Neu. Biol.* 62:60--67
114. Mecocci P, MacGarvey U, Beal M. (1994). Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 36:747-751.
115. Montiel T, Ricardo Quiroz-Baez R, Massieu L, Arias C. (2006). Role of oxidative stress on  $\beta$ -amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: Protection by antioxidants. *Exp. Neurol.* 200:496-508.
116. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. (2000). A beta-peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature.* 408:982-985.
117. Morris R. (1984). Developments of water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 47-56.
118. Nalbantoglu J, Tirado-Santiago G, Lahsaini A, Poirier J, Goncalves O, Verge G, (1997). Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature*, 387, 500–505.
119. Nitta A, Itoh A, Hasegawa T, Nabeshima T. (1994).  $\beta$ -Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci. Lett.* 170:63–66.
120. Norenberg MD. (2005). The reactive astrocyte. En: Aschner M, editor. *The role of glia in neurotoxicity.* Boca Raton, FL:CRC press. 75-92.
121. Nunan J, Small DH. (2000). Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* 483:6-10.
122. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron.* 39:409-421.
123. Olariu A, Tran M, Yamada K, Mizuno M, Hefco V, Nabeshima T. (2001). Memory deficits and increased emotionality induced by  $\beta$ -amyloid (25-35) are correlated with the reduced acetylcholine release and altered phorbol dibutyrate binding in the hippocampus. *J. Neural. Transm.* 108:1065-1069
124. Olariu A, Yamada K, Mamiya T, Hefco V, Nabeshima T. (2002). Memory impairment induced by chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid (1–40) involves downregulation of protein kinase C. *Brain Research* 957: 278-286
125. Olton D, Collison C y Werz M. (1977) Spatial memory and radial arm maze performance of rats. *Lear. Motiv.* 8: 289-314.
126. Pamplona R, Dalfo E, Ayala V, Bellmunt M, Prat J, Ferrer I, Portero-Otin M. (2005). Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycoxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J. Biol. Chem.* 280:21522–21530.
127. Patterson D, Gardiner K, Kao FT, Tanzi R, Watkins P, Gusella JF. (1988). Mapping of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein and its relationship to the Down syndrome region of chromosome 21. *Proc Natl Acad Sci.* 85:8266-8270.

128. Pavia J, Alberch J, Álvarez I, Toledano A, De Ceballos ML. (2000). Repeated intracerebroventricular administration of  $\beta$ -amyloid 25-35 to rats decreases muscarinic receptors in cerebral cortex. *Neurosc. Lett.* 278:69-72
129. Paxinos G, Watson C. (1996). Hippocampal fissure. The rat brain in stereotaxic coordinates. Eds: Paxinos G y Watson C. Academic Press.
130. Pekny M, Nilsson M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* 50:427-434
131. Perez-Severiano F, Salvatierra S, Rodríguez P, Cuevas M, Guevara J, Limon D, Maldonado D, Medina C, Pedraza C, Santamaría A. (2004). S-allylcysteine prevents amyloid- $\beta$  peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *Eu. J. Pharm.* 489(3):197-202
132. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. (2000) *J. Nat. Prod.* 63:1035-42.
133. Pike C, Walencewicz A, Glabe C, Cotman C. (1991). Aggregation-related toxicity of synthetic  $\beta$ -amyloid protein in hippocampal cultures. *Brain Res.* 563:311-14
134. Pike C, Burdick D, Walencewicz A, Glabe C, Cotman C. (1993). Neurodegeneration induced by  $\beta$ -amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci.* 13:1676-1687.
135. Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. (1995). Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem.* 64:253-265.
136. Pike C, Ramezan-Arab N, Cotman C. (1997). Beta-amyloid neurotoxicity in vitro: evidence of oxidative stress but not protection by antioxidants. *Journal of Neurochemistry* 69:1601-1611.
137. Praticò D and Delanty N (2000). Oxidative Injury in Diseases of the Central Nervous System: Focus on Alzheimer's Disease *The Amer J Med* 109 577-585.
138. Prediger RD, Franco JL, Pandolfo P, Medeiros R, Duarte FS, Di Giunta G, Figueiredo CP, Farina M, Calixto JB, Takahashi RN, Dafre AL. (2007). Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. *Behav Brain Res.* 177:205-213.
139. Quinn J, Bussiere J, Hammond R, Montine T, Henson E, Jones R, Stackman R. (2007). Chronic dietary alpha-lipoic acid reduces deficits in hippocampal memory of aged Tg2576 mice. *Neurobiol. Aging.* 28:213-225.
140. Reinhard C, Hébert SS, De Strooper B. (2005). The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J.* 24:3996-4006.
141. Roher A, Chaney M, Kuo Y, et al. (1996). Morphology and toxicity of A $\beta$ (1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem,* 271:20631-20635.
142. Royall J, Ischiropoulos H. (1993). Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 302:348-355.
143. Rush DK, Aschmies S, Merriman MC. (1992). Intracerebral beta-amyloid(25-35) produces tissue damage: is it neurotoxic? *Neurobiol Aging.* 13:591-594.

144. Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Virgata G, Barcellona ML, Vanella A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol. Toxicol.* 16:91-98.
145. Sano M, Rosen W, Stern Y, Rosen J, Mayeux R. (1995). Simple reaction time as a measure of global attention in Alzheimer's disease. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 1:56-61.
146. Sayre L, Zelasko D, Harris P, Perry G, Salomon R, Smith M. (1997). 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 68:2092-2097.
147. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, et al. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-77
148. Schmand B, Smit J, Lindeboom J, Smits C, Hooijer C, Jonker C, Deelman B, (1997). Low education is a genuine risk factor for accelerated memory decline and dementia. *J. Clin. Epidemiol.* 50:1025-1033.
149. Schroeter H, Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ. (2001). Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem J.* 358:547-557.
150. Selkoe D. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature reviews.* 399:A24-A31.
151. Selkoe D (2000) The origins of Alzheimer disease: a is for amyloid. *JAMA* 283:1615-1617.
152. Selkoe D. (2001). Alzheimer disease: genes, proteins and therapy. *Physiol. Rev.* 81:741-766.
153. Shea T, Ekenci F, Ortiz D, Dawn-Linsley M, Wilson T, Nicolosi R. (2002). Efficacy of vitamin E, phosphatidyl choline, and pyruvate on buffering neuronal degeneration and oxidative stress in cultured cortical neurons and in central nervous tissue of apolipoprotein E-deficient mice. *Free. Radic. Biol. Med.* 33:276-282.
154. Shen Y, Zhang Guihong, Liu L, and Xu S. (2007). Suppressive Effects of Melatonin on Amyloid-b-induced Glial Activation in Rat Hippocampus. *Arch. Med. Res.* 38:284-290
155. Sherrington R, Rogaev E, Liang Y, Rogaeva E, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin J, Bruni A, Montesi M, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky R, Wasco W, Da Silva H, Haines J, Pericak-Vance M, Tanzi R, Roses A, Fraser P, Pommens J, George-Hyslop P. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375:754-760.
156. Sies H, Cadenas E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 311:617-631.
157. Sik SK, Yeon JL, Keum YC, Sook SS, Sun JK, Jin SJ, Nam YH, Ho KS and Hee BH. (2005). Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15:3588-3591
158. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 1999; 402:537-540.
159. Sipos E, Kurunczi A, Kasza A, Horváth J, Felszeghy K, Laroche S, Toldi J, Párducz A, Penke B, Penke Z. (2007). Beta-amyloid pathology in the

- entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 147:28-36.
160. Smith M, Harris P, Sayre L, Beckman J, Perry G. (1997). Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci*. 17:2653–2657.
  161. Soler F, Soler C, Casany T, Soria C. (1997). Tratamiento actual y nuevas perspectivas terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer. *Farm Hosp*. 21:195-207.
  162. Spencer JP, Schroeter H, Kuhnle G, Srai SK, Tyrrell RM, Hahn U, Rice-Evans C. (2001). Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochem J*. 354:493-500.
  163. Stepanichev M, Onufriev V, Mitrokhina O, Moiseeva Yu, Lazareva A., Victorov I, Gulyaeva N. (2000). Neurochemical, behavioral, and neuromorphological effects of central administration of beta-amyloid peptide (25–35) in rat. *Neurochem*. 17: 278–293.
  164. Stepanichev M, Moiseeva Y, Gulyaeva N. (2002). Injection models of Alzheimer's disease. Oxidative stress in the mechanisms of AF64A and ( $\beta$ -amyloid peptide toxicity in rodents). *Neurochem*. 19:165-175.
  165. Stepanichev M, Moiseeva Y, Lazareva N, Onufriev M, Gulyaeva N. (2003). Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25-35) peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats. *Brain. Res. Bull*. 61:197-205.
  166. Stepanichev M, Zdobnova I, Zarubenko I, Moiseeva Y, Lazareva N, Onufriev M, Gulyaeva N. (2004). Amyloid-beta(25–35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol. Behav*. 80, 647–655.
  167. Sung S, Yao Y, Urdu K, Yang H, Lee V, Trojanowski J, Praticò D. (2003). Early Vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces A $\beta$  levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*.
  168. Tabner BJ, Turnbull S, El-Agnaf OM, Allsop D. (2002). Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A(beta) and alpha-synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*. 32:1076-1083.
  169. Terranova JP, Kan JP, Storme JJ, Perreaut P, Le Fur G, Soubrié P. (1996). Administration of amyloid beta-peptides in the rat medial septum causes memory deficits: reversal by SR 57746A, a non-peptide neurotrophic compound. *Neurosci Lett*. 213:79-82.
  170. Torreilles F, Tabcheh S, Guérin M, Torreilles J. (1999). Neurodegenerative disorders: The role of peroxynitrite, *Brain Res. Rev*. 30: 153-
  171. Terry R, Masliah E, Salmon D, Butters N, DeTeresa R, Hil R, Hansen L and Katzman R. (1991). Physical basis of cognitive alteration in Alzheimer disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment, *Ann Neurol* 30. 572–580.
  172. Tohda C, Matsumoto N, Zou K, Meselhy MR and Komatsu K. (2004) Ab(25–35)-Induced Memory Impairment, Axonal Atrophy, and Synaptic Loss are Ameliorated by M1, A Metabolite of Protopanaxadiol-Type Saponins. *Neuropsychopharm*. 29:860-868
  173. Tran M, Yamada K, Olariu A, Mizuno M, Hai R, Nabeshima T. (2001). Amyloid  $\beta$ -peptide induces nitric oxide production in rat hippocampus:

- association with cholinergic dysfunction and amelioration by inducible nitric oxide synthase inhibitors. *FASEB*. 15: 1407-1409.
174. Turner P, O'Connor K, Tate W, Abrahamb W. (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* 70:1-3
  175. Walsh D, Klyubin I, Fadeeva J, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 416:535-539.
  176. Walsh D, Selkoe D. (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44, 181-193.
  177. Wilcok C, Esiri M (1982). Plaques, tangles and dementia. A quantitative study. *J. Neurol. Sci.* 56:343-356.
  178. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* 36:838-849.
  179. Williams T, Lynn B, Markesbery W, Lovell M. (2006) Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 27:1094-1099.
  180. Whitson J, Selkoe D, Cotman C. (1989). Amyloid  $\beta$  protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science* 243: 1488-1490.
  181. Wong PC, Cai H, Borchelt DR, and Price DL. (2002). Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* 5:633-639.
  182. Yamaguchi Y, Kawashima S. (2001). Effects of amyloid- $\beta$ (25-35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 412:265-272.
  183. Yankner B, Duffy L, Kishner D. (1990). Neurotropic and neurotoxic effects of amyloid  $\beta$  protein: Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279-282.
  184. Yates S, Burgess L y Kocsis-Angle J. (2000). Amyloid- $\beta$  and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J. Neurochem.* 74: 101-1025.
  185. Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. (1990). Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene.* 87:257-63.
  186. Yatin SM, Varadarajan S, Link CD, Butterfield DA. (1999) .In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide (1-42). *Neurobiol. Aging* 20:325-330
  187. Yenkovyan K, Safaryan K, Navasardyan G, Mkrtchyan L, Aghajanov M. (2009). Effects of beta-amyloid on behavioral and amino acids spectrum in rats' brain and their modulation by embryonic proteins. *Neurochem. Internat.* 54:292-298
  188. Youdim K, Shukitt-Hale B, Joseph J. (2004). Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radic. Biol. Med.* 37:1683-1693.
  189. Zandi P, Anthony J, Khachaturian A, Stone S, Gustafson D, Tschanz J, Norton M, Welsh-Bohmer K, Breitner J. (2004). Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study, *Arch. Neurol.* 61:-88.

190. Zannis V, Just P, Breslow J. (1981). Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am. J. Hum. Gene.* 33:11–24