

VNIVERSITAT E VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA



**Estudio del estrés oxidativo hepático
asociado a la enfermedad de Alzheimer.
Efecto del tratamiento con bexaroteno
y/o genisteína.**

Escrita y presentada por:

Vicent Bonet Costa

Dirigida por:

Profesor D. José Viña Ribes

Profesora Dña. Consuelo Borrás Blasco

Profesor D. Juan Gambini Buchón

Valencia, 2013

Facultat de Medicina i Odontologia
Departament de Fisiologia

Prof. **D. José Viña Ribes**, catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Prof. **Doña. Consuelo Borrás Blasco**, profesora titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Prof. **D. Juan Gambini Buchón**, profesor ayudante doctor del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que **Don Vicent Bonet Costa**, licenciado en Biología por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada:

Estudio del estrés oxidativo hepático asociado a la enfermedad de Alzheimer. Efecto del tratamiento con bexaroteno y/o genisteína.

para la obtención del título de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, a de de 2013

Don José Viña Ribes Doña Consuelo Borrás Blasco Don Juan Gambini Buchón

AGRAÏMENTS

Hi ha molta gent a la que donar les gràcies. Ha passat molta gent per la meua vida, i cada persona que, en major o menor mesura ha col·laborat en el meu *carpe diem* té dret a estar ací, però no fa falta cansar els ulls del lector explicant perquè. Cada ú de vosaltres sap perquè li done les gràcies.

Crec que els que més se les mereixen són els meus pares Vicent i Tere.

A Pepe, Xelo i Juan. A Ana i Mari Carmen. Al meu minigrup, Marya, Kheira, Marta, Raúl, Mar i Cris. A tota la gent del grup, Rebeca, Gloria, Helios, Thomas, Esther, Bea, Fabián, Vladi, Tanja, Elisa, Elena, Andrea i Javier. A gent que a passat per ací com Annalisa, Sara, Richard, Consuelo, Ernesto, Enrique, Nuno i Mika.

Als que ens trobem pels pasillos Jose Luis, Sergio, Sonia, Edu, Marta i Santi. A les secres, Mari, Eva i Elena. A la gent del animalari, Ana, Pili i Anita. Als diversos col·laboradors, dins de la Universitat de València a Dani Monleón, Jose Manuel García Verdugo i Patri García, de la Universidad de Murcia a Juan Antonio Madrid i Bea Baño, del Institut de Investigacions Biomèdiques de Barcelona a Coral Sanfeliu.

A la meua novia Pilar, als meus germans Ferran, Juanle, Pablo, Àngels, Marta i Teresa. A la meua neboda Carlota. A ma uela Teresa. A mon tio Juanle, a les meues ties Loli, Roge, Mari, Inma i Sole, junt als “consortes” Toni, Pipo i Emilio, als meus cosins/es Meri, Àngela, Emilio i Roge, Sara i Jose, i Nuria. A les meues cunyaes Maria José i Mar. A ma tia Lolita, als meus cosins/tios Dolores, Paco, Vicen i Rosa, també als “consortes” Vicent i Dolores, als meus nebotets Arnau, Aina, Joan, Javier i Nico. I clar, als que ja no estan, mon uelo Fernando i els meus uelos Juan i Rogelia, i mon tio Francisco. I al meu gos Jazz que tampoc està.

Als meus amics Fran, Noel, Alfon, Ritxi, Jordi, Johnny, i també Javiero. A les respectives Núria, Mónica, Ana, Fina, Raquel i Àfrica. A les meues bioques Amparo i Maje. A Jaume, Vera, Adrià i Mónica. A tota la gent del poble, Iván i Pau, Llúcia, Ali Laicon, Pauet i Imma, Isa i Vicent, Roc, Ali, Javi Alvarito, Tore i Guillem. A més gent encara, a Clara i a Leti.

De la facultat, a Salva, David, Hilària, Francesc, Aida, Carmen Rosa, Minerva i Laura. De la facultat i del cole a Silvia.

M'he deixat a gent que també va ser important, però tot no pot ser en esta vida. Ja ens vorem en una altra.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	17
1.1	ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	19
1.1.1	Historia	19
1.1.2	Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer	20
1.1.2.1	Teorías sobre la Enfermedad de Alzheimer.....	20
1.1.2.2	Sintomatología.....	22
1.1.2.3	Fases.....	23
1.1.2.4	Epidemiología	25
1.1.2.5	Tratamiento	28
1.1.3	Mecanismos moleculares implicados en la enfermedad de Alzheimer	28
1.1.3.1	El péptido beta-amiloide	28
1.1.3.2	La proteína tau.....	30
1.1.3.3	Receptor lipoproteico de baja densidad asociado a proteína 1.....	32
1.1.3.4	Receptor de productos de glicosilación avanzada	35
1.1.4	La apolipoproteína E en la enfermedad de Alzheimer	36
1.1.5	Repercusiones sistémicas en la enfermedad de Alzheimer	38
1.1.5.1	Diabetes.....	38
1.1.5.2	Enfermedades vasculares	40
1.1.5.3	Cáncer.....	41
1.1.6	Modelos animales para la enfermedad de Alzheimer.....	42
1.2	RADICALES LIBRES.....	44
1.2.1	Radicales libres	44
1.2.1.1	Clases de Radicales libres	45
1.2.1.1.1	Anión superóxido (O_2^-).....	45
1.2.1.1.2	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).....	46
1.2.1.1.3	Radical hidroxilo ($OH\cdot$).....	46
1.2.1.1.4	Radical peroxilo ($ROO\cdot$).....	47
1.2.1.1.5	Oxígeno singlete ($\cdot O_2$).....	47
1.2.1.1.6	Óxido nítrico ($NO\cdot$)	47
1.2.1.1.7	Dióxido de nitrógeno (NO_2)	47
1.2.1.1.8	Radicales de átomos derivados de carbono ($R\cdot$).....	48
1.2.1.1.9	Radicales de átomos derivados de azufre ($RS\cdot$)	48
1.2.2	Génesis de especies reactivas del oxígeno.....	48
1.2.2.1	Fuentes exógenas	48
1.2.2.2	Fuentes endógenas	49

1.2.2.2.1	La cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	49
1.2.2.2.2	Reacción de Fenton-Haber-Weiss	49
1.2.2.2.3	Los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico.....	50
1.2.2.2.4	Microsomos o peroxisomas.....	50
1.2.2.2.5	Membrana plasmática	50
1.2.3	Antioxidantes fisiológicos.....	50
1.2.3.1	Antioxidantes enzimáticos	52
1.2.3.1.1	Superóxido dismutasa	52
1.2.3.1.2	Glutación peroxidasa.....	52
1.2.3.1.3	Catalasa.....	53
1.2.3.2	Antioxidantes no enzimáticos.....	53
1.2.3.2.1	El glutati6n	53
1.2.3.2.2	Papel antioxidante del glutati6n: ciclo redox	54
1.3	ESTRÉS OXIDATIVO	54
1.3.1	Concepto de estr6s oxidativo	54
1.3.2	Estr6s oxidativo y daño a biomol6culas.....	55
1.3.2.1	Daño oxidativo a lípidos	55
1.3.2.2	Daño oxidativo a prote6nas	56
1.3.2.3	Daño oxidativo al DNA	56
1.3.2.4	Daño oxidativo a glúcidos	57
1.3.3	Indicadores de estr6s oxidativo	57
1.4	TEORÍA MITOCONDRIAL DE LOS RADICALES LIBRES	58
1.4.1	La mitocondria: estructura y funci6n	59
1.4.2	Producci6n de radicales libres en los estados mitocondriales	62
1.4.3	Otras acciones de las mitocondrias	64
1.5	ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y ESTRÉS OXIDATIVO	64
1.5.1	Daño a biomol6culas.....	65
1.5.2	Relaci6n del β -amiloide con el estr6s oxidativo asociado a la enfermedad de Alzheimer.....	67
1.5.3	Relaci6n de p38 con el estr6s oxidativo asociado a la enfermedad de Alzheimer	68
1.6	POSIBLES TRATAMIENTOS PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: BEXAROTENO Y FITOESTRÓGENOS	68
1.6.1	Bexaroteno y enfermedad de Alzheimer.....	68
1.6.2	Fitoestr6genos y enfermedad de Alzheimer.....	69
1.6.3	Epidemiolog6a	70

1.6.4	Mecanismo de acción.....	71
1.6.5	Fitoestrógenos como antioxidantes	71
1.6.6	Relación con la enfermedad de Alzheimer	72
1.7	ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y CONSUMO DE GLUCOSA CEREBRAL	73
1.7.1	Tomografía por emisión de positrones.....	73
1.7.2	Relación con la Enfermedad de Alzheimer.....	74
2	OBJETIVOS	77
3	METODOLOGÍA.....	81
3.1	MATERIAL	83
3.1.1	Animales de experimentación	83
3.1.2	Aparatos	84
3.1.3	Reactivos.....	85
3.2	MÉTODOS	86
3.2.1	Técnicas quirúrgicas.....	86
3.2.1.1	Sacrificio de los animales.....	86
3.2.1.2	Extracción y conservación de muestras	86
3.2.1.3	Ovariectomía.....	86
3.2.2	Aislamiento de mitocondrias hepáticas.....	87
3.2.2.1	Fundamento.....	87
3.2.2.2	Reactivos	88
3.2.2.3	Procedimiento.....	88
3.2.3	Determinación de la tasa de producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno.....	89
3.2.3.1	Fundamento.....	89
3.2.3.2	Reactivos	89
3.2.3.3	Preparación de los patrones.....	90
3.2.3.4	Procedimiento.....	91
3.2.3.5	Cálculos.....	91
3.2.4	Determinación de proteínas	92
3.2.4.1	Fundamento.....	92
3.2.4.2	Reactivos	93
3.2.4.3	Procedimiento.....	93
3.2.4.4	Cálculos.....	94
3.2.5	<i>Western Blotting</i>	94
3.2.5.1	Fundamento.....	94

3.2.5.2	Condiciones del gel y transferencia.....	94
3.2.5.3	Marcaje y revelado.....	95
3.2.5.4	Cálculos.....	95
3.2.6	<i>Western blotting</i> de proteínas carboniladas.....	95
3.2.6.1	Fundamento.....	95
3.2.6.2	Reactivos.....	96
3.2.6.3	Procedimiento.....	96
3.2.7	Cromatografía líquida de alta resolución. Determinación de malondialdehído.....	96
3.2.7.1	Fundamento.....	96
3.2.7.2	Recogida de muestras.....	97
3.2.7.3	Reactivos.....	97
3.2.7.4	Preparación de los patrones.....	97
3.2.7.5	Procedimiento de derivatización.....	98
3.2.7.6	Preparación de las fases móviles para HPLC.....	98
3.2.7.7	Condiciones cromatográficas.....	99
3.2.7.8	Método cromatográfico.....	99
3.2.7.9	Cálculos.....	100
3.2.8	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.....	100
3.2.8.1	Fundamento.....	100
3.2.8.2	Reactivos.....	100
3.2.8.3	Preparación de los patrones.....	100
3.2.8.4	Procedimiento.....	101
3.2.8.5	Cálculos.....	101
3.2.9	Estudio del consumo de glucosa <i>in vivo</i> mediante tomografía por emisión de positrones.....	101
3.2.9.1	Fundamento.....	101
3.2.9.2	Reactivos.....	103
3.2.9.3	Procedimiento.....	103
3.2.9.4	Cálculos.....	105
3.2.10	Determinación de transaminasas en sangre.....	105
3.2.10.1	Fundamento.....	105
3.2.10.2	Procedimiento.....	106
3.2.11	Microscopía.....	106
3.2.11.1	Fundamento.....	106
3.2.11.2	Procedimiento.....	106
3.2.12	Diseño experimental de la caracterización del estrés oxidativo en hígado.....	107
3.2.13	Diseño experimental de la caracterización de la vía del cerebro al hígado del beta-amiloide.....	108
3.2.14	Diseño experimental del tratamiento con genisteína y bexaroteno.....	109

3.2.15	Diseño experimental del consumo de glucosa por tomografía de emisión de positrones.....	110
3.2.16	Análisis estadístico	111

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 113

4.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO..... 115

4.2 ESTRÉS OXIDATIVO EN HÍGADO..... 117

4.2.1	Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas.....	117
4.2.1.1	Tasa de producción de H ₂ O ₂ en mitocondrias hepáticas de ratones de 3-5 meses	118
4.2.1.2	Tasa de producción de H ₂ O ₂ en mitocondrias hepáticas de ratones de 10-13 meses.....	119
4.2.1.3	Tasa de producción de H ₂ O ₂ en mitocondrias hepáticas de ratones de 20-26 meses.....	120
4.2.1.4	Tasa de producción de H ₂ O ₂ en mitocondrias hepáticas en ratones macho de distintas edades.....	121
4.2.1.5	Tasa de producción de H ₂ O ₂ en mitocondrias hepáticas en ratones hembra de distintas edades.....	122
4.2.1.6	Discusión de la tasa de producción de H ₂ O ₂ en mitocondrias hepáticas.....	123
4.2.2	Proteínas carboniladas en hígado.....	124
4.2.2.1	Proteínas carboniladas en hígado de ratones de 3-5 meses.....	125
4.2.2.2	Proteínas carboniladas en hígado de ratones de 10-13 meses.....	126
4.2.2.3	Proteínas carboniladas en hígado de ratones de 20-26 meses.....	127
4.2.2.4	Proteínas carboniladas en hígado de ratones macho a distintas edades	128
4.2.2.5	Proteínas carboniladas en hígado de ratones hembra a distintas edades	129
4.2.2.6	Discusión de proteínas carboniladas en hígado.....	130
4.2.3	Malondialdehído en hígado.....	131
4.2.3.1	MDA en hígado de ratones de 3-5 meses	131
4.2.3.2	MDA en hígado de ratones de 10-13 meses.....	132
4.2.3.3	MDA en hígado de ratones de 20-26 meses.....	133
4.2.3.4	MDA en hígado de ratones macho a distintas edades.....	134
4.2.3.5	MDA en hígado de ratones hembra a distintas edades	135
4.2.3.6	Discusión de malondialdehído en hígado	136
4.2.4	Discusión de los resultados de estrés oxidativo en hígado	137

4.2.4.1	Hipótesis varias.....	137
4.2.4.2	Valoración global del estrés oxidativo en hígado	138
4.3	CONSUMO DE GLUCOSA CEREBRAL	140
4.3.1	Tomografía por emisión de positrones en cerebro	141
4.3.1.1	PET en cerebro de ratones de 3-5 meses.....	141
4.3.1.2	PET en cerebro de ratones de 10-13 meses.....	142
4.3.1.3	PET en cerebro de ratones de 20-26 meses.....	143
4.3.1.4	PET en cerebro de ratones de macho a distintas edades	144
4.3.1.5	PET en cerebro de ratones de hembra a distintas edades.....	145
4.3.2	Discusión de los resultados del consumo de glucosa cerebral	146
4.3.2.1	Tomografía por emisión de positrones en cerebro total.....	146
4.3.2.2	Hipótesis varias.....	146
4.4	DEL CEREBRO AL HÍGADO	148
4.4.1	Niveles de LRP1	148
4.4.1.1	Resultados de los niveles de LRP1 en cerebro.....	149
4.4.1.2	Resultados de los niveles de LRP1 en hígado.....	150
4.4.1.3	Discusión de los niveles de LRP1.....	151
4.4.2	Niveles de RAGE en cerebro	153
4.4.2.1	Resultados de los niveles de RAGE en cerebro.....	153
4.4.2.2	Discusión de los niveles de RAGE.....	154
4.4.3	Concentración de β -amiloide 40 en sangre.....	155
4.4.3.1	Resultados de los niveles de β -amiloide 40 en sangre	155
4.4.3.2	Discusión de la concentración de β -amiloide 40 en sangre	156
4.4.4	Discusión de los resultados de la vía del cerebro al hígado.....	156
4.4.4.1	Hipótesis varias.....	156
4.4.4.2	Valoración global de la vía del cerebro al hígado	157
4.5	EFFECTOS AGUDOS DEL TRATAMIENTO CON BEXAROTENO Y GENISTEÍNA	159
4.5.1	β -amiloide en cerebro	159
4.5.1.1	Niveles de β -amiloide 40 en cerebro	160
4.5.1.2	Niveles de β -amiloide 42 en cerebro	161
4.5.1.3	Discusión de β -amiloide en cerebro.....	162
4.5.2	Niveles de β -amiloide 40 en sangre	163
4.5.2.1	Resultados de β -amiloide 40 en sangre.....	163
4.5.2.2	Discusión de los niveles de β -amiloide 40 en sangre.....	164
4.5.3	Placas de β -amiloide en cerebro.....	165
4.5.3.1	Número de placas.....	166
4.5.3.2	Índice del área de placas	167

4.5.3.3	Tamaño de las placas	168
4.5.3.4	Discusión de las placas de beta-amiloide.....	169
4.5.4	Mecanismo de acción del aclaramiento cerebral.....	171
4.5.4.1	Niveles de PPAR γ en cerebro	171
4.5.4.2	Niveles de apolipoproteína E en cerebro	172
4.5.4.3	Discusión del mecanismo de acción del aclaramiento cerebral.....	173
4.5.5	Transaminasas en sangre	175
4.5.5.1	Gamma-glutamil transpeptidasa	175
4.5.5.2	Glutamato-oxalacetato transaminasa.....	176
4.5.5.3	Glutamato-piruvato transaminasa.....	177
4.5.5.4	Discusión de transaminasas en sangre	178
4.5.6	Valoración global de los efectos agudos del tratamiento con bexaroteno y genisteína.....	178
4.6	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	180
5	CONCLUSIONES.....	181
5.1	CONCLUSIÓN PRINCIPAL	183
5.2	CONCLUSIONES ESPECÍFICAS	183
6	BIBLIOGRAFÍA.....	185

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Hipótesis de la cascada amiloidea. Tomado de (Cummings, J.L. 2004).	22
Figura 1.2 Incidencia de la EA según la edad. Tomado de (Bermejo-Pareja, F. 2008)	26
Figura 1.3 Estudios sobre la EA a nivel mundial. Tomado de (Ferri, C.P. 2005)	27
Figura 1.4 Perspectiva de la prevalencia de la EA en el futuro. Tomado de (Ferri, C.P. 2005).	27
Figura 1.5 Escisión de la APP.....	29
Figura 1.6 Formación del β -amiloide.....	30
Figura 1.7 Placas de β -amiloide.....	30
Figura 1.8 Ovillo neurofibrilar (NFT).....	31
Figura 1.9 Formación de los ovillos neurofibrilares.....	32
Figura 1.10 Estructura del transportador LRP1. Tomado de (Lillis, A.P. 2008).....	33
Figura 1.11 Formación del β A mediada por LRP1. Tomado de (Lillis, A.P. 2008)..	34
Figura 1.12 Eliminación del β A a través de la barrera hematoencefálica y su transporte sistémico. Tomado de (Zlokovic, B.V. 2010).....	35
Figura 1.13 Función del transportador RAGE en la barrera hematoencefálica. Tomado de (Han, S.H. 2011).	36
Figura 1.14 Mecanismos relacionados entre la diabetes tipo 2 y la EA. Tomado de (Correia, S.C. 2012).	40
Figura 1.15 El ciclo celular en la EA. Tomado de (Raina, A.K. 2000)	42
Figura 1.16 Placa de β A en el cerebro de ratón transgénico APPswe/PS1dE9.	43
Figura 1.17 Ciclo redox del glutatión	54
Figura 1.18 Mecanismo de peroxidación lipídica	56
Figura 1.19 Estructura de la mitocondria.....	59
Figura 1.20 Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.	61

Figura 1.21 Control respiratorio mitocondrial.....	63
Figura 1.22 Grupos carbonilo (flechas: ovillo neurofibrilar; cabeza de flecha: citoplasma; cabeza de flecha pequeña: núcleo) en hipocampo de pacientes con EA. Tomado de (Smith, M.A. 1996).....	65
Figura 1.23 Daño oxidativo a lípidos en cerebro de pacientes con EA. A: paciente de EA; B: paciente control. Tomado de (Sayre, L.M. 1997).....	66
Figura 1.24 AGEs en la EA. A: N-carboximetil-lisina en la EA; B: hexitol-lisina en la EA; C: paciente control. Tomado de (Castellani, R.J. 2001).	66
Figura 1.25 Daño oxidativo a ácidos nucleicos en hipocampo de pacientes con EA. C: paciente de EA; D: paciente control. Tomado de (Nunomura, A. 1999).	67
Figura 1.26 Similitud estructural entre el β -estradiol y la genisteína.	69
Figura 1.27 Metabolismo de la FDG y glucosa.....	74
Figura 1.28 Reducciones metabólicas progresivas en el hipocampo.....	75
Figura 3.1 Ovariectomía.	87
Figura 3.2 Mecanismo de detección de peróxido de hidrógeno.....	89
Figura 3.3 Programación de la duración (minutos) de las Fases A y B, durante un cromatograma del análisis de MDA.....	99
Figura 3.4 Molécula de ^{18}F -FDG y esquema de su consumo en la célula.....	102
Figura 3.5 Esquema de detección de coincidencias por el equipo Albira PET.....	102
Figura 3.6 Posición del animal en la camilla.....	104
Figura 4.1 Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de ratones de 3-5 meses.	118
Figura 4.2 Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de ratones de 10-13 meses.....	119
Figura 4.3 Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de ratones de 20-26 meses.....	120
Figura 4.4 Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de machos.	121

Figura 4.5 Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de hembras.....	122
Figura 4.6 Carbonilación proteica en hígado de ratones de 3-5 meses.....	125
Figura 4.7 Carbonilación proteica en hígado de ratones de 10-13 meses.....	126
Figura 4.8 Carbonilación proteica en hígado de ratones de 20-26 meses.....	127
Figura 4.9 Carbonilación proteica en hígado de machos.....	128
Figura 4.10 Carbonilación proteica en hígado de hembras.....	129
Figura 4.11 Niveles de MDA en hígado de ratones de 3-5 meses.....	131
Figura 4.12 Niveles de MDA en hígado de ratones de 10-13 meses.....	132
Figura 4.13 Niveles de MDA en hígado de ratones de 20-26 meses.....	133
Figura 4.14 Niveles de MDA en hígado de machos.....	134
Figura 4.15 Niveles de MDA en hígado de hembras.....	135
Figura 4.16 Captación de glucosa en cerebro de ratones de 3-5 meses.....	141
Figura 4.17 Captación de glucosa en cerebro de ratones de 10-13 meses.....	142
Figura 4.18 Captación de glucosa en cerebro de ratones de 20-26 meses.....	143
Figura 4.19 Captación de glucosa en cerebro de machos.....	144
Figura 4.20 Consumo de glucosa cerebral en hembras.....	145
Figura 4.21 Niveles de LRP1 en cerebro.....	149
Figura 4.22 Niveles de LRP1 en hígado.....	150
Figura 4.23 Niveles de RAGE en cerebro.....	153
Figura 4.24 Concentración de β A en plasma.....	155
Figura 4.25 Hipótesis de los receptores en el estrés oxidativo hepático.....	157
Figura 4.26 Niveles β A 40 en cerebro.....	160
Figura 4.27 Niveles β A 42 en cerebro.....	161

Figura 4.28 Niveles de β A 40 en sangre.....	163
Figura 4.29 Placas de β A en cerebro en los distintos grupos de tratamientos.	165
Figura 4.30 Número de placas de β A en cerebro.	166
Figura 4.31 Índice del área de las placas de β A en cerebro.....	167
Figura 4.32 Tamaño de las placas de β A en cerebro.	168
Figura 4.33 Niveles de PPAR γ en cerebro.....	171
Figura 4.34 Niveles de apoE en cerebro.	172
Figura 4.35 Niveles de GOT en sangre.....	176
Figura 4.36 Niveles de GPT en sangre.	177

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Distintas escalas de evaluación del estado de la EA. Tomado de (Alberca, R. 2005).....	24
Tabla 1.2 Incidencia de la EA en hombres y mujeres. Tomado de (Viña, J. 2010)..	25
Tabla 1.3 Vida media de radicales libres	45
Tabla 1.4 Tipos de SOD y localización celular mayoritaria.....	52
Tabla 1.5 Clasificación y origen de los principales fitoestrógenos.....	70
Tabla 3.1 Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón del nivel de peróxidos.....	90
Tabla 3.2 Progresión del tratamiento. Gen-genisteína; Bex-bexaroteno.....	110

ABREVIATURAS

ADAS-cog: Alzheimer's Disease Assessment Scale.

ADP: Adenosín difosfato.

ANT: *adenine nucleotide translocator*.

apoE: Apoliproteína E.

APP: Proteína precursora del beta-amiloide.

ATP: Adenosín trifosfato.

β A: Beta-amiloide.

BACE: β -Amyloid precursor protein cleavage enzyme.

Bex: Bexaroteno.

BGO: óxido de germanato de bismuto.

BPDS: Baptholphenanthroline disulfonate.

BSA: Seroalbúmina bovina.

CTEM: Componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

CT: Tomografía computerizada.

DCL: Deterioro cognitivo leve.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EA: Enfermedad de Alzheimer.

ECAT II: Emission computed axial tomography.

EDTA: Ácido etilendiamino-N,N,N',N'-tetraacético.

EGTA: Etileno glicol-bis (aminoetil éter)- N,N,N',N'- ácido tetraacético.

FAST: Functional assessment staging.

FDG: 2-[¹⁸F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa.

FWHM: *full width at half maximum*

GC-MS: Cromatografía de gases - Espectrometría de masas.

Gen: genisteína.

GGT: gamma-glutamil transpeptidasa

GOT: glutamato-oxalacetato transaminasa

GPx: Glutación peroxidasa.

GPT: glutamato-piruvato transaminasa.

GSH: Glutación reducido.

GSSG: Glutación oxidado.

HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

HEPES: N-(2-hidroexietil) pipoeracina-N'-(2-ácido etanosulfónico).

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

HTMPs: Estrategia de perfiles de alto rendimiento molecular.

ID: Dosis inyectada.

LBM: Masa libre de grasa (del inglés *Lean Body Mass*).

LC-MS: Cromatografía de líquidos - Espectrometría de masas.

LDA: Análisis discriminativo lineal.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

LRP1: Receptor lipoproteico de baja densidad asociado a proteína 1

MAPK: Proteín kinasas activadas por mitógenos.

MBq: Megabequerelios.

mCi: MiliCurios.

MDA: Malondialdehído.

MMSE: Mini-Mental State Examination.

MLEM: *Maximum-likelihood expectation maximization algorithm*.

Cu-Zn SOD: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc.

Mn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso.

MOPS: Tampón del ácido propanosulfónico (del inglés *3-(N-morpholino propanesulfonic acid buffer)*).

MRGlc: Tasa metabólica de glucosa.

NADH: Nicotiamida adenín dinucleótido.

NADPH: Nicotiamida adenín dinucleótido fosfato.

NEM: N-etilmaleimida.

NFT: ovillos neurofibrilares.

NPI: Neuropsychiatric Inventory.

Oxo8dG: 8-hidroxi-2' desoxi guanosina.

p38 MAPK: Proteín kinasa activada por mitógenos.

PBS: Fosfato tampón salino.

PCA: Ácido perclórico (del inglés *Perchloric Acid*).

PET: Tomografía por emisión de positrones.

PLS: Cuadrados parciales.

PLS-DA: Análisis discriminativo por mínimos cuadrados parciales.

PPAR γ : Receptor activado de proliferación de los peroxisomas γ .

PS: Presenilina.

RAGE: Receptor de productos de glicosilación avanzada.

RDS: *Radiopharmaceutical Delivery System*.

RM: Resonancia magnética.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNS: Especies reactivas del nitrógeno.

ROI: Región de interés.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

RS•: Radicales de átomos derivados de azufre.

RXR: Receptor X del retinoide.

SBM: Mapeo estadístico cerebral.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

SOD: Superóxido dismutasa.

SPECT: Tomografía Computerizada por Emisión de Fotones Individuales.

SUV: Standard uptake value.

TAC: Tomografía axial computerizada.

TBA: ácido 2-tiobarbitúrico.

TBARS: Especies reactivas del tiobarbitúrico.

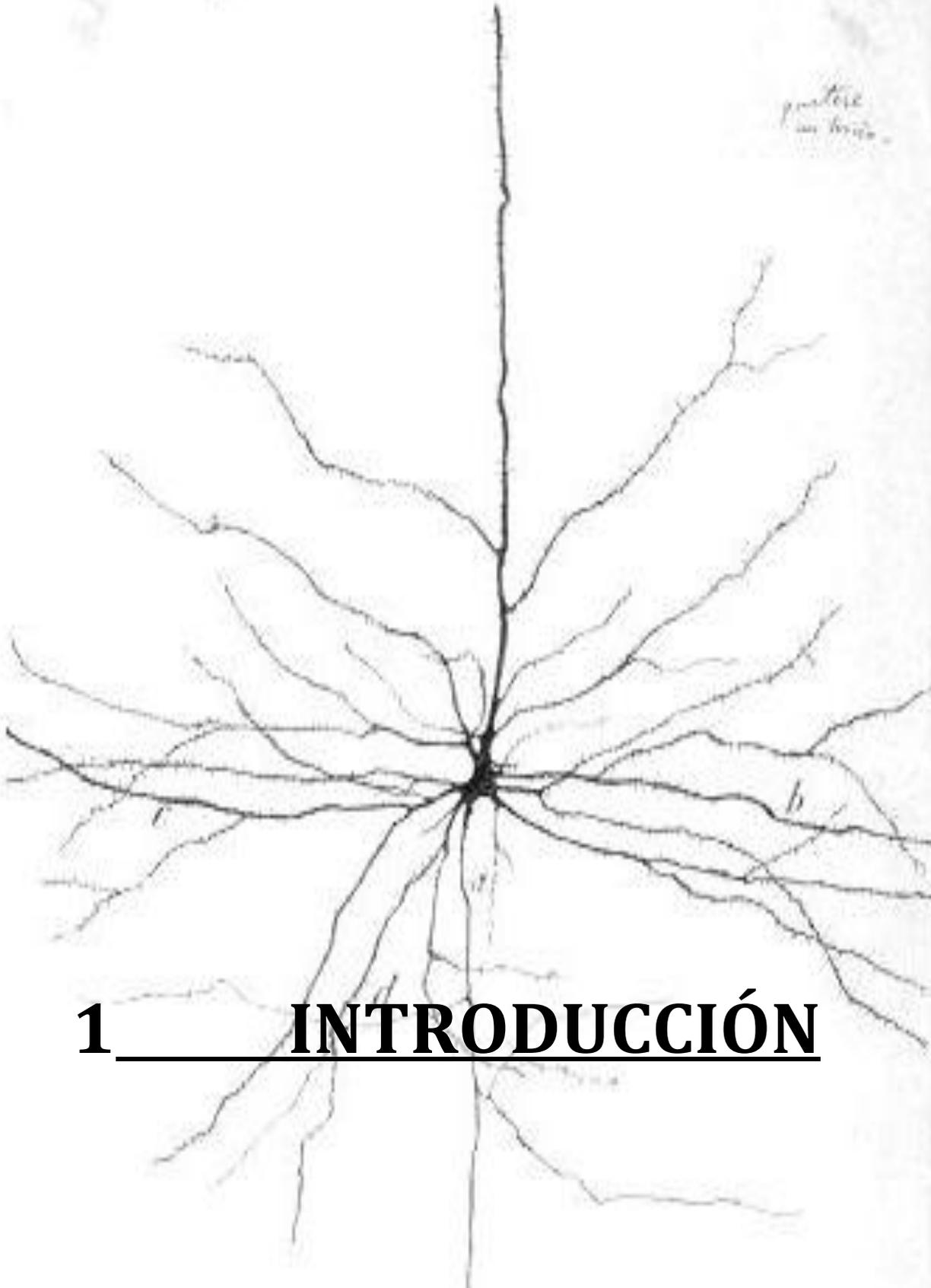
TGF-a: Factor de crecimiento transformante.

TRIS: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol.

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

VOI: Volumen de interés.

*quiere
un libro*



1 **INTRODUCCIÓN**

1.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1.1 Historia

Alois Alzheimer descubrió esta enfermedad a principios del siglo XX (Alzheimer, A. 1907), a causa de una paciente que ingresó en el hospital para enfermos mentales de Frankfurt, centro en el que trabajaba, a la que llamó Auguste D., y que en aquel momento era una entidad completamente desconocida. Describió la sintomatología asociada, a partir de entrevistas en las que la paciente respondía sin ningún sentido a las preguntas formuladas, por la observación directa de su comportamiento, y por la información suministrada por la familia. A la muerte de la paciente con el estudio histopatológico del cerebro, Alzheimer



describió las características lesiones cerebrales neuropatológicas que provoca la enfermedad, placas amiloideas y ovillos neurofibrilares, y patología asociada, como aterosclerosis en las arterias cerebrales. Los investigadores Perusini y Bonfiglio colaboraron en el análisis de estas muestras, y llegaron a las mismas conclusiones que Alois Alzheimer, se trataba de una enfermedad desconocida hasta la fecha. Presentó su hallazgo en 1906, en un congreso sobre psiquiatría en Tübingen, Alemania, con el título *“Una enfermedad grave característica de la corteza cerebral”*. En 1907 publicó su estudio. En honor a su descubridor se llamó enfermedad de Alzheimer (EA), nombre usado por primera vez por Emil Kraepelin en 1910, en una reedición de su obra *“Tratado de Psiquiatría”* (Lage, J.M. 2006).

Hasta mediados del siglo XX se describieron pocos casos de EA, debido a que la esperanza de vida en aquellos años era de una edad relativamente joven (Fernandez-Ballesteros, R. 1999), y la EA es una enfermedad asociada a edades avanzadas, sobre los 60 años, era normal no llegar a desarrollar la enfermedad. Con el aumento de la esperanza de vida, y del desarrollo de las técnicas experimentales, se vio como se incrementaba el número de casos. Gracias a los avances en microscopía la descripción de la EA se fue haciendo más precisa (Kidd, M. 1963; Terry, R.D. 1963), hasta que en la década de los 70 Robert Katzman le descubrió al mundo la importancia de esta enfermedad (Katzman, R. 1976).

1.1.2 Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer

La EA es una enfermedad exclusiva del ser humano (Bufill, E. 2006) y neurodegenerativa, que provoca la pérdida progresiva de las funciones cognitivas, siendo la causa más común de demencia en edades avanzadas (Brookmeyer, R. 1998; Bermejo-Pareja, F. 2008).

La EA tiene 2 formas principales de presentarse:

- La primera se llama de tipo familiar, y se debe a causas genéticas. Se desarrolla a una edad temprana, aproximadamente a los 40 años. Los genes implicados son 3, el gen de la proteína precursora del beta-amiloide (APP, del inglés *amyloid precursor protein*), y los genes S182 y STM-2 que codifican para las presenilinas 1 y 2 (PS1, PS2). Estos casos suponen el 10% del total de los casos de EA (Hardy, J.A. 1989; Schellenberg, G.D. 1992; Rogaev, E.I. 1995). En los siguientes apartados explicaremos con mayor detalle estos genes.
- La otra forma se origina de manera espontánea, por causas no del todo conocidas. Entre ellas se puede destacar los factores de riesgo cardiovascular (Altman, R. 2010), la diabetes de tipo 2 (Kroner, Z. 2009), y la posesión del alelo $\epsilon 4$ para la apolipoproteína E (Polvikoski, T. 1995). En esta forma se reconocen el 90% restante de los casos de EA.

Hay algunos factores sociales que se asocian a la enfermedad, como ambientes incultos, una dieta inadecuada, o un menor desarrollo intelectual. Estos factores implican un mayor riesgo de padecer EA (Andersen, K. 1999; Matson, S.C. 2000) ya que el ejercicio de la mente es una forma de prevención que permitirá que el cerebro funcione mejor si se padece la enfermedad. En cualquier caso, la calidad de vida de la persona enferma de EA y de las que la rodean disminuye de forma considerable con el curso de la enfermedad.

1.1.2.1 Teorías sobre la Enfermedad de Alzheimer.

Aunque no se sabe con exactitud la etiología, distintas teorías se barajan actualmente como causa de la EA:

- La disminución de los niveles del neurotransmisor acetilcolina es una de ellas. Se ha sugerido que los bajos niveles del neurotransmisor son los responsables de la pérdida de las funciones cognitivas (Bartus, R.T. 1982). La acetilcolina está en continua formación y degradación, por lo que si se impide su degradación se revertiría el efecto.
- Una de las teorías que se barajan es la del péptido β -amiloide (βA) (Glennner, G.G. 1984; Masters, C.L. 1985). La aparición de este péptido está

relacionada con alelos mutantes en determinados genes que se asocian a la EA de tipo familiar. Uno de los genes es el de la proteína precursora del β A (APP) en el cromosoma 21 (Kang, J. 1987). La mutación hace que se sobreexpresen la proteína. Otros son los genes S182 y STM-2 en los cromosomas 14 y 1, respectivamente, y que codifican para las presenilinas 1 y 2 (PS1, PS2) (Cruts, M. 1995; Hutton, M. 1996). Estos genes codifican para las enzimas encargadas de la formación del β A a partir de la APP (Jankowsky, J.L. 2004). Se ha sugerido que el β A es el eje principal de la EA (Hardy, J.A. 1992), que a partir de esta molécula se desencadenan todos los procesos asociados a la EA, lo que se ha llamado la cascada amiloidea (figura 1.1). Esta hipótesis se basa en que el péptido es la causa de procesos como la degeneración neuronal, estrés oxidativo, formación de placas amiloides en el cerebro, inflamación e hiperfosforilación de la proteína tau. Todos estos procesos son los que llevarán a los déficits cognitivos (Cummings, J.L. 2004).

- Otra teoría es la de la proteína tau (Grundke-Iqbal, I. 1986), que está implicada en el mantenimiento de la estructura de los microtúbulos de la célula, y es funcional si está fosforilada. Si se hiperfosforila deja de actuar como debería, y forma unas estructuras llamadas ovillos neurofibrilares (*neurofibrillary tangles*, NFT) dentro de la célula, que pierde su estructura y muere (Lace, G.L. 2007).

Estas 2 últimas teorías se explicarán más detalladamente en el apartado 1.1.3.

No hay una teoría que se considere más aceptada que otra, ni se sabe si son independientes entre sí, o si existe un elemento que sea capaz de unificarlas.

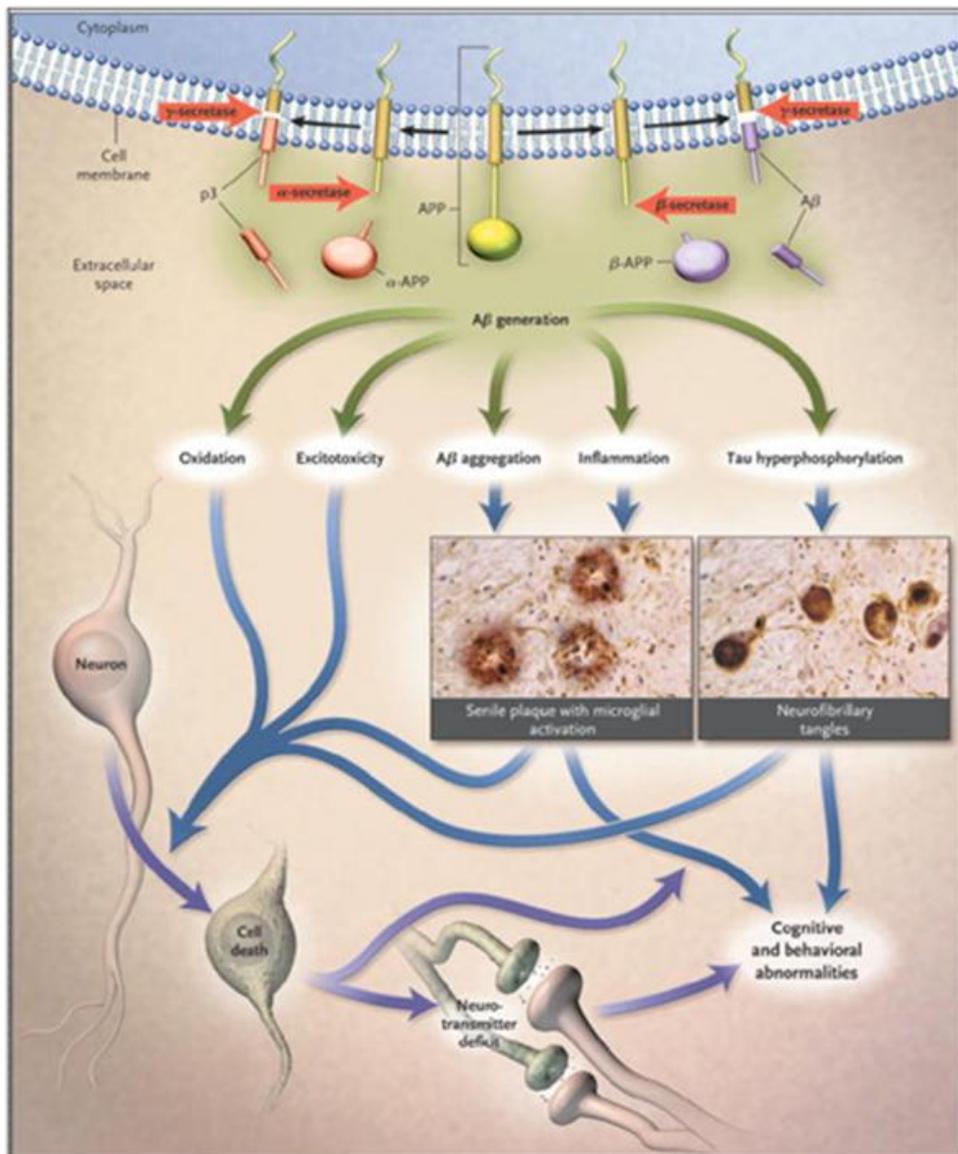


Figura 1.1 Hipótesis de la cascada amiloidea. Tomado de (Cummings, J.L. 2004).

1.1.2.2 Sintomatología

La EA se caracteriza por un proceso neurodegenerativo que causa pérdida progresiva de las funciones mentales superiores, destacando la memoria, fundamentalmente la memoria reciente. La conducta en los pacientes cambia de forma notable, desarrollan trastornos del humor como depresión, ansiedad y trastornos psicóticos. Pueden llegar a exhibir actitudes agresivas, paranoias, alucinaciones, o pérdida de la orientación espacio-temporal. También pérdida de las capacidades lingüísticas, tanto orales como escritas (Becker, J.T. 2002; Alberca,

R. 2005; Craig, D. 2005). El paciente progresa a un estado de aislamiento con el medio e incapaz de controlar sus funciones fisiológicas más simples.

Finalmente llegan a la muerte por causas relacionadas con el hecho de estar enfermo, no directamente con la EA. Principalmente se debe a accidentes cardiovasculares, o por problemas derivados de la inanición, como infecciones por llagas.

1.1.2.3 Fases

Se distingue entre 3 fases de evolución de la EA, clasificadas según su grado de demencia: leve, moderada y severa. Entendemos por demencia el nivel de afectación de las funciones cognitivas y conductuales del enfermo. Cada fase no tiene una duración determinada, varía según los pacientes y el tipo de EA que tengan. Sí que se observa una meseta en los estados inicial y final, y un deterioro más rápido en las fases leve y moderada.

Las escalas que se usan para determinar el nivel de demencia se basan en la evaluación de actividades de la vida diaria y acciones sencillas. Entre estas está escribir, leer, reconocer objetos, recordar una serie de palabras, la capacidad de vestirse, etc. (Galasko, D. 2005). La puntuación de cada escala es completamente arbitraria, según los autores hayan decidido hacer la valoración. Hay varias escalas para medir este nivel de demencia, entre las más importantes podemos destacar las siguientes:

- Para medir la afectación de las capacidades cognitivas tenemos la escala MMSE, *Mini-Mental State Examination* (Folstein, M.F. 1975).
- “Escala de evaluación de la EA” (*Alzheimer’s Disease Assessment Scale ADAS-cog*) (Rosen, W.G. 1984).
- “Evaluación funcional del estadio” (*Functional assessment staging, FAST*) (Sclan, S.G. 1992).
- Para evaluar las alteraciones del comportamiento la *Neuropsychiatric Inventory*, (NPI) (Cummings, J.L. 1994).

En la tabla 1.1 tenemos una clasificación de distintas escalas que se usan para evaluar las distintas facetas relacionadas con el estado de pacientes con EA.

Introducción

Tabla IV. Tests, escalas y cuestionarios utilizados en los ensayos clínicos para la enfermedad de Alzheimer grave.

Objetivo	Test o escala	Descripción
Valoración global del cambio	CIBIC-plus [13] ^a	Basada en una entrevista al paciente y al cuidador. Puntúa de 1 (gran mejoría) a 7 (gran empeoramiento)
Cognición	MMSE [1]	Escala cognitiva breve que puntúa de 30 (máximo) a 0 (mínimo); punto de corte habitual: 24
	ADAS-cog [2]	Escala cognitiva con 11 ítems que puntúa de 0 a 70 (máxima afectación); punto de corte habitual: 14
	SIB [15]	Escala con 51 ítems adaptada para la fase tardía de la EA, puntúa de 0 a 100 (máxima afectación)
Alteración conductual	NPI [16]	Escala con 12 ítems que puntúa la intensidad y la frecuencia del trastorno (0-144) y la repercusión sobre el cuidador (0-60)
Capacidad funcional	ADCS-ADLsev [14] ^a	Escala con 19 preguntas para valorar la capacidad del paciente para las AVD. La mejor puntuación posible es 54
Estadiado	FAST [8]	Evalúa la capacidad funcional en siete estadios, desde 1 (normal) a 7 (máxima afectación)
	GDS [9]	Evalúa el estado cognitivo y funcional del enfermo. Tiene siete estadios, de 1 (normal) a 7 (máxima afectación)
Repercusión socioeconómica	RUD [17]	Basada en el cuidador, determina el tiempo que dedica al enfermo y la repercusión médica, económica y social

^a Instrumentos primarios de evaluación en los ensayos clínicos; el resto son secundarios.

Tabla 1.1 Distintas escalas de evaluación del estado de la EA. Tomado de (Alberca, R. 2005)

En la primera fase el paciente tiene lo que se llama deterioro cognitivo leve (DCL). Los trastornos son mínimos, sin que el paciente pierda su propia autonomía. Se reduce a pérdidas de memoria leves, como olvidar citas, actos realizados recientemente, reducción de la expresión en el lenguaje, aunque no sea capaz de realizar tareas complejas, como pagar facturas en el banco. Se corresponde con valores para las escalas de 18-24 puntos para la MMSE, estadio 4 en la FAST, y puntuación de 15-30 en la ADAS-cog (Alberca, R. 2005).

La fase moderada se traduce en una acentuación del descenso de las capacidades descritas para la fase leve. En este punto la persona enferma ya no se puede valer completamente por sí misma, necesita ayuda para realizar tareas cotidianas. Los valores para esta fase están entre 12-18 puntos para la MMSE, estadio 5 para la FAST y de 30-50 para la ADAS-cog (Alberca, R. 2005).

La demencia más grave es la última fase. El paciente es completamente dependiente para todas las actividades, incluso las más básicas, como comer o beber. Pierde el control de los esfínteres, llega a perder el habla, ya no reconoce a nadie, y se mantiene inmóvil. La pérdida de masa muscular hace que tenga que estar en cama, por lo que acaban apareciendo problemas derivados de esta situación, como las llagas. Los valores que alcanza en las escalas son de menos de 12 para la MMSE, estadío 6-7 para la FAST, y más de 50 puntos para la ADAS-cog (Alberca, R. 2005).

1.1.2.4 Epidemiología

La EA es la causa más común de demencia en edades avanzadas, y que aumenta de forma proporcionalmente directa con la edad (Brookmeyer, R. 1998; Bermejo-Pareja, F. 2008). La esperanza de vida es de una media de 4 años para los hombres y de 6 años para las mujeres desde el momento del diagnóstico de la EA (Larson, E.B. 2004). Aproximadamente, el 70 % de los casos de demencia senil se debe a la EA (Larson, E.B. 2004; Bermejo-Pareja, F. 2008) En la figura 1.2 vemos que hay una relación directa entre el envejecimiento y la EA. Además también se observa que la incidencia es mayor en mujeres que en hombres. El mismo hecho se puede comprobar en la tabla 1.2 donde se observa claramente una mayor incidencia en mujeres que en hombres, hecho que no es atribuible solo a la mayor longevidad de las mujeres (Andersen, K. 1999; Vina, J. 2010).

Incidence of Alzheimer's disease in different age groups and genders. Figures are % of the population in the European community suffering Alzheimer's disease in each age-group

Age groups	Men	Women
60-64	0.2	0.9
65-69	1.8	1.4
70-74	3.2	3.8
75-79	7.0	7.6
80-84	14.5	16.4
85-89	20.9	28.5
90-94	29.2	44.4
> 95	32.4	48.8

Tabla 1.2 Incidencia de la EA en hombres y mujeres. Tomado de (Viña, J. 2010)

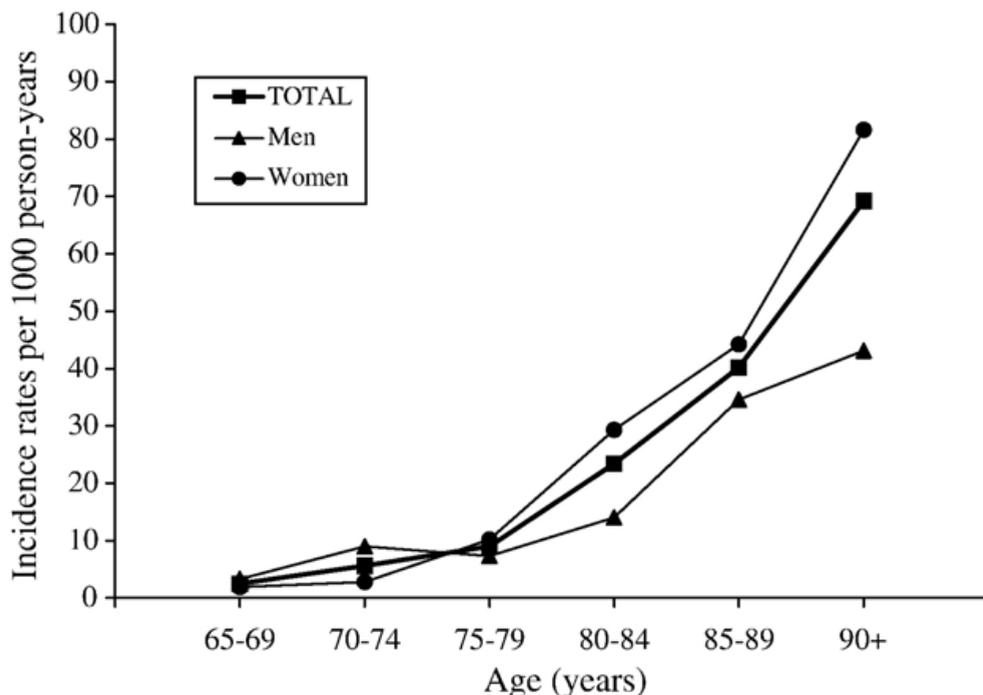


Figura 1.2 Incidencia de la EA según la edad. Tomado de (Bermejo-Pareja, F. 2008)

Se estima que en el total de la población mundial hay 35 millones de personas afectadas (Querfurth, H.W. 2010), con la aparición de unos 4.6 millones nuevos de casos al año. Se espera que la incidencia aumente con los años, debido al aumento de la longevidad de la población. Al ser una enfermedad relacionada con el envejecimiento los países más desarrollados tienen una mayor prevalencia, aproximadamente del 60% de los casos en el mundo (Ferri, C.P. 2005). No obstante, como vemos en la figura 1.3, esta evaluación a nivel mundial tiene realmente un sesgo importante, ya que en la mayoría de los países del mundo no hay estudios, y no se conocen datos fiables.

La expectativa de futuro es que la EA continúe aumentando su prevalencia en los años venideros llegando a más de 140 millones de casos en 2050, representado en la figura 1.4 (Ferri, C.P. 2005; Pahnke, J. 2009). Se espera que el mayor incremento se dé en los países subdesarrollados actualmente. No por tener una mayor tasa de EA, si no porque se desconoce la prevalencia en estos países. Al tener la mayor parte de la población mundial, se supone que se descubrirán más casos de EA en el momento en que los avances en medicina lo permitan.

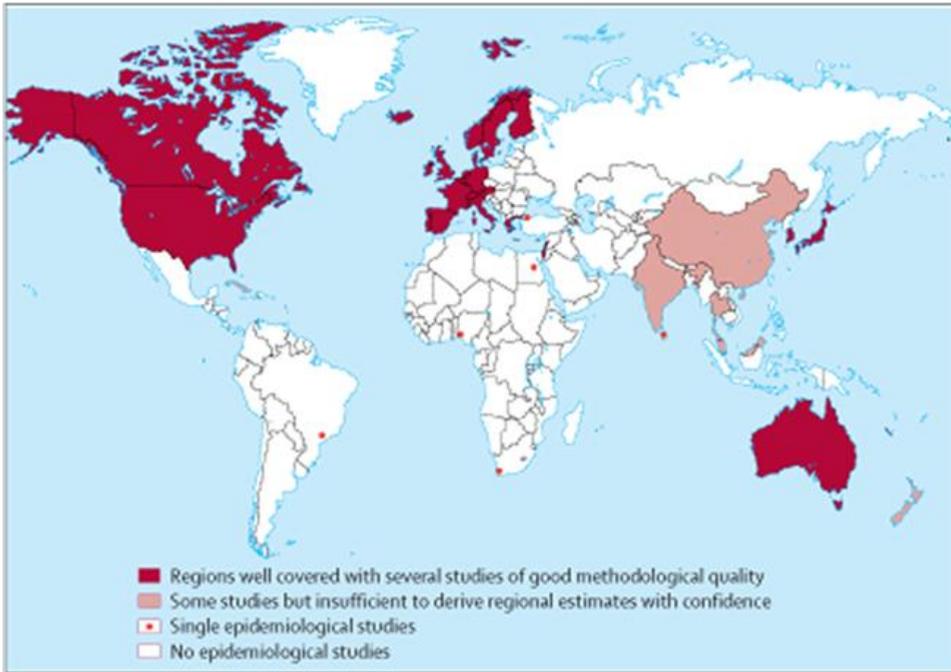


Figura 1.3 Estudios sobre la EA a nivel mundial. Tomado de (Ferri, C.P. 2005)

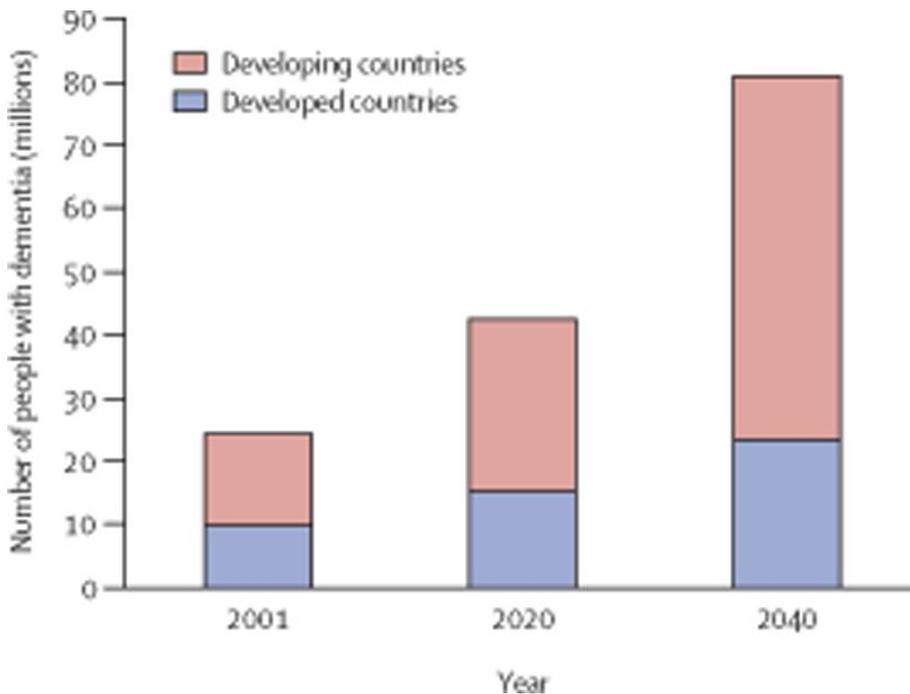


Figura 1.4 Perspectiva de la prevalencia de la EA en el futuro. Tomado de (Ferri, C.P. 2005).

1.1.2.5 Tratamiento

No existe un tratamiento que sea realmente efectivo, pero hay distintas estrategias en las que se trabaja para tratar de aliviar los síntomas, o detener el progreso de la EA.

Hay inhibidores de la colinesterasa, enzima que degrada la acetilcolina, que se usan como terapia para la EA. Uno de ellos es la tacrina, que no es completamente efectivo, y además tiene efectos hepatotóxicos (Watkins, P.B. 1994), por lo que no se usa. Hay otros 3 fármacos, el donezepil, rivastigmina y galantamina, que con un efecto similar producen una ligera mejoría, pero no detienen la progresión de la EA. (Cummings, J.L. 2004; Shen, Z.X. 2004).

Se probó una vacuna contra el β A, que aparentemente funcionaba en ratones transgénicos para la APP (Schenk, D. 1999), pero al probarla en humanos se vio que provocaba encefalitis (Orgogozo, J.M. 2003), por lo que no es viable su administración.

La administración de antioxidantes como la vitamina E, se ha demostrado que no es efectiva, (Sano, M. 1997) y que incluso puede ser perjudicial (Lloret, A. 2009).

Todo esto conlleva un elevado coste sanitario. Los tratamientos farmacológicos, los gastos que genera mantener a pacientes totalmente dependientes, en cuanto a personal cualificado para atenderlos, mantenimiento en residencias etc. El coste llega a unos 2.000.000 millones de dólares en los Estados Unidos (Alzheimer's Association, A. 2012).

1.1.3 Mecanismos moleculares implicados en la enfermedad de Alzheimer

1.1.3.1 El péptido beta-amiloide

El β A es un péptido que puede tener de 39 a 42 aminoácidos, siendo las formas más corrientes las de 40 y 42 aminoácidos. La forma de 42 aminoácidos es la que se acumula mayoritariamente formando placas en el cerebro (Burdick, D. 1992; Jarrett, J.T. 1993; Iwatsubo, T. 1994). La de 40 aminoácidos es más soluble, por lo que pasará a los vasos sanguíneos (Prelli, F. 1988). Como vemos en la figura 1.6 se forma a partir de la escisión de un fragmento de la APP (Kang, J. 1987). Hay mutaciones que hacen que tenga una sobreexpresión, las conocidas como mutaciones "suecas", en concreto los alelos KM594/595NL (Yan, R. 1999).

Su función fisiológica es desconocida, pero se cree que participa en la formación de las sinapsis durante la diferenciación neuronal (Turner, P.R. 2003; Priller, C. 2006).

La formación del péptido (figuras 1.5 y 1.6) se puede dar de 2 maneras distintas. Una de forma no patológica gracias a una α -secretasa, que escinde la APP en 2 fragmentos no tóxicos. La β -Amyloid precursor protein Cleavage Enzyme (BACE), y las PS1 y PS2, γ -secretasas, cortan el fragmento de la APP que se convertirá en β A. Esto no quiere decir que las 2 enzimas se excluyan entre sí. Su actividad dependerá de las mutaciones genéticas relacionadas con la EA (Hardy, J.A. 1989) que se expresen en cada individuo, y de factores externos que veremos más adelante (Guglielmo, M. 2012).

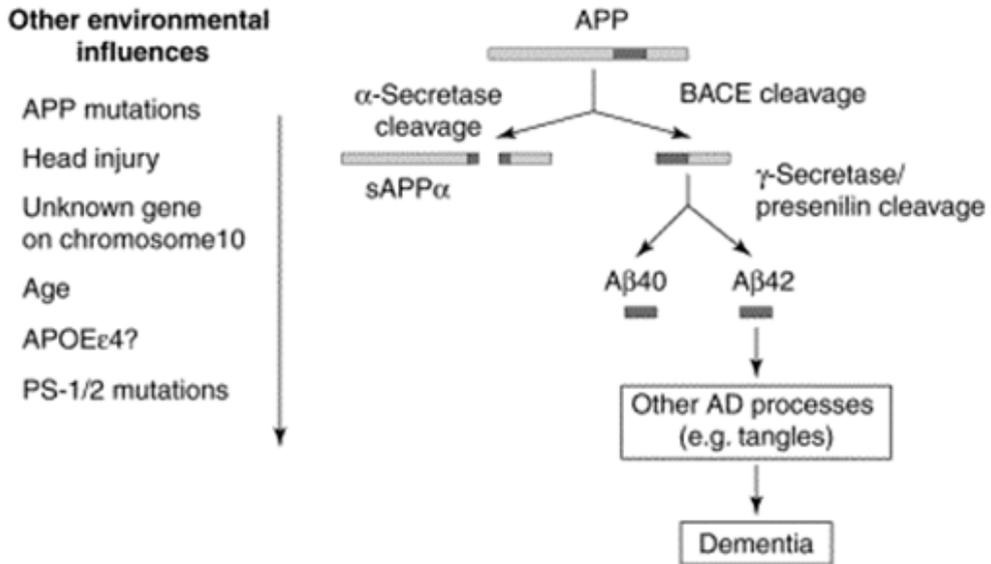


Figura 1.5 Escisión de la APP.

La α -secretasa corta un fragmento del dominio extracelular de la APP, en los residuos 613-614 del extremo amino-terminal extracelular, se forma un fragmento de la APP, el sAPP α que es soluble, y el fragmento p3, que no es tóxico (Kang, J. 1987; Turner, P.R. 2003).

Si el corte de la APP se da por la BACE, el corte se hace en los residuos 596-597 del extremo amino-terminal extracelular, que determinará que el corte por la γ -secretasa en el extremo C-terminal transmembrana genere el β A. Dependiendo de por donde se dé el corte tendrá un número distinto de aminoácidos, y se formará el β A de 42 o de 40 aminoácidos (Prelli, F. 1988).

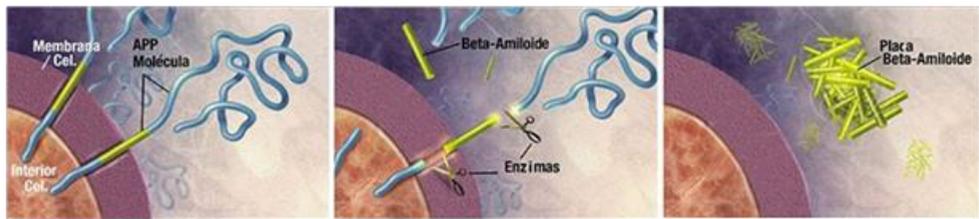


Figura 1.6 Formación del β -amiloide.

El β A se agrega formando placas en el cerebro (figura 1.7), con la consiguiente pérdida de funcionalidad de las zonas afectadas, estableciéndose una correlación inversamente proporcional entre el volumen ocupado por las placas y el índice en la escala MMSE (Cummings, B.J. 1995), lo que significa que a mayor volumen de depósitos amiloideos mayor demencia.

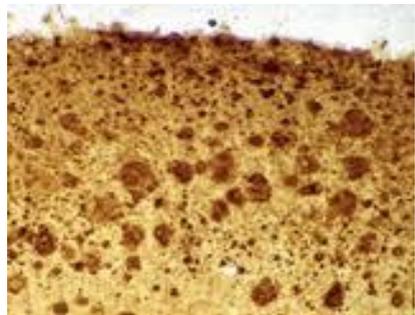
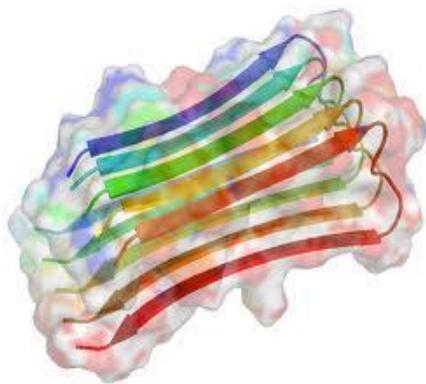


Figura 1.7 Placas de β -amiloide.

En la barrera hematoencefálica tenemos el transportador LRP1. Éste media la salida del cerebro del péptido (Pflanzner, T. 2011), y así lo encontramos en la sangre (Skovronsky, D.M. 2001). Evidentemente, esto hace que tenga una influencia muy importante sobre el sistema vascular. Se ha comprobado que el endotelio tiene efectos sobre la síntesis del β A, una inhibición de la óxido nítrico sintasa endotelial aumenta los niveles de APP y BACE (Austin, S.A. 2010). También provoca alteraciones sobre el flujo sanguíneo cerebral, el β A 40 en concreto reduce el flujo sanguíneo (Niwa, K. 2000). Una influencia muy grande se puede ver en una enfermedad vascular como la angiopatía amiloidea cerebral, en la que se acumulan proteínas amiloideas en las arterias cerebrales (Ellis, R.J. 1996).

1.1.3.2 La proteína tau

Tau es una proteína citoplasmática asociada a microtúbulo, encargada del mantenimiento de su estructura. La conformación funcional implica que tau esté fosforilada, si se hiperfosforila pierde la funcionalidad y se agrupa formando NFT

(figura 1.8). Si esto ocurre el citoesqueleto se desmorona y la célula muere (Chun, W. 2007). Este proceso se da en muchas más enfermedades neurodegenerativas, como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Pick o la degeneración corticobasal (Lee, V.M. 1999).

Los NFT están formados en su mayoría por la proteína tau (Grundke-Iqbal, I. 1986), también por elementos intracelulares y partes de los mismos microtúbulos (Grundke-Iqbal, I. 1979).

La causa de este comportamiento anormal de la proteína no está clara, hay un par de hipótesis que intentan explicarlo.

Se ha sugerido que el βA es el responsable de la formación de los ovillos (figura 1.8), a través de la inducción de una vía de activación de caspasas, que conducirán a su formación (Rissman, R.A. 2004). Se ha atribuido la hiperfosforilación de tau en esta vía de actuación a la acción de kinasas, como la familia de las MAP-kinasas o la GSK3 β (Takashima, A. 1993; Ekinci, F.J. 1999).

Otra de las hipótesis de la hiperfosforilación de tau es que la misma proteína hiperfosforilada secuestra la proteína tau en su estado activo y otras proteínas asociadas a microtúbulos, MAP1 y MAP2, lo que destruye los microtúbulos. La anomalía en la fosforilación de tau se atribuye a una fosfatasa, la “protein phosphatase-2A” (PP2A). En la EA esta enzima tiene unos niveles inferiores a los fisiológicos (Iqbal, K. 2009), debido a la sobreexpresión de inhibidores de la PP2A, en concreto los inhibidores I₁^{PP2A} y I₂^{PP2A} (Li, M. 1995).

En la figura 1.8 apreciamos un ovillo completamente formado.



Figura 1.8 Ovillo neurofibrilar (NFT).

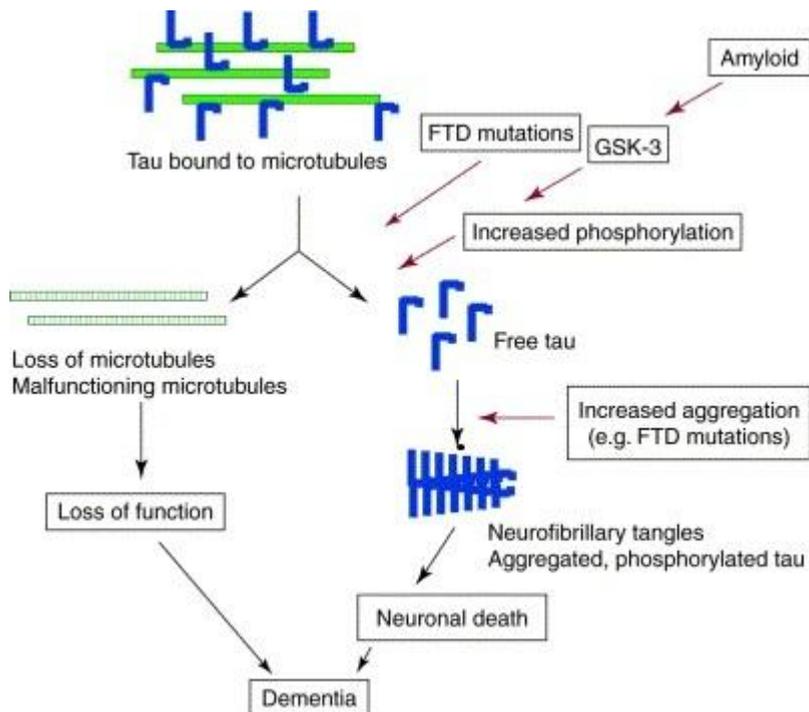


Figura 1.9 Formación de los ovillos neurofibrilares.

1.1.3.3 Receptor lipoproteico de baja densidad asociado a proteína 1

El receptor lipoproteico de baja densidad asociado a proteína 1 (LRP1), es un receptor implicado en el transporte de una cantidad muy grande de sustancias, entre las que se incluyen el β A y apoE (Trommsdorff, M. 1998). Esto y la situación en determinados tejidos como el cerebro, en la barrera hematoencefálica y en el hígado, hace que tenga una importancia muy grande para la presente investigación (Lillis, A.P. 2008).

En la figura 1.10 vemos la estructura del receptor. Está compuesto de un dominio extra celular rico en cisteína (Daly, N.L. 1995), una parte transmembrana y una citoplasmática, que se encargará de las interacciones con las moléculas para el tráfico celular o señalizaciones intracelulares (Gotthardt, M. 2000; May, P. 2002).

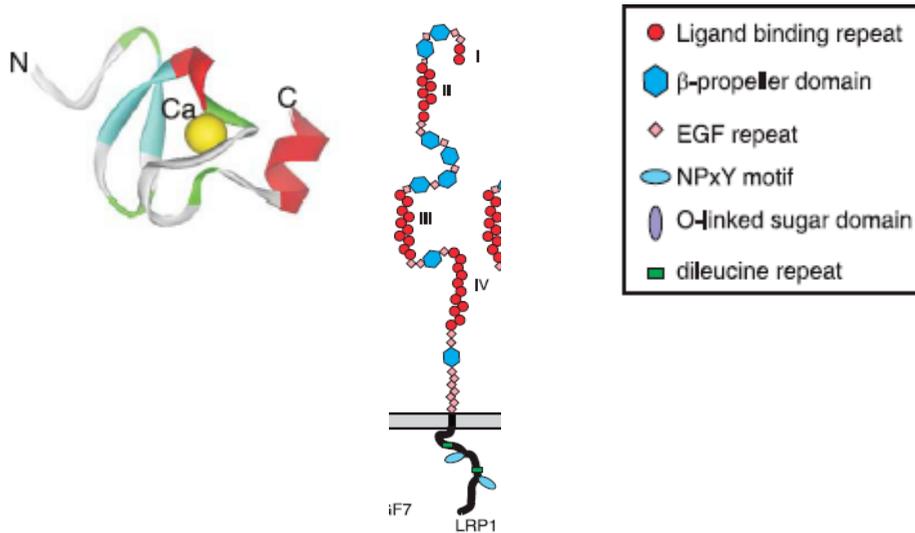


Figura 1.10 Estructura del transportador LRP1. Tomado de (Lillis, A.P. 2008).

El LRP1 interviene en la formación del β A formando un endosoma que atrapa la APP (Kounnas, M.Z. 1995) (figura 1.11). El receptor y la APP se unen por la parte citoplasmática por la mediación de la proteína Fe65 (Kinoshita, A. 2001). Así se crea el endosoma en el que se encuentran las enzimas encargadas de la escisión de la APP (figura 1.5). Como resultado se formará β A (Ulery, P.G. 2000; Pietrzik, C.U. 2002), que se liberará al exterior al reciclarse el endosoma, proceso en el que también el LRP1 vuelve a la membrana plasmática. El complejo que forman la proteína Fe65 y el resto de lo que era la APP se desprende de la vesícula e induce una represión en la expresión del receptor. El β A que se forma por este proceso es soluble, por lo que no alterará la formación de placas, pero sí que afectará a los procesos patológicos propios de la EA, como el estrés oxidativo (Zerbinatti, C.V. 2004).

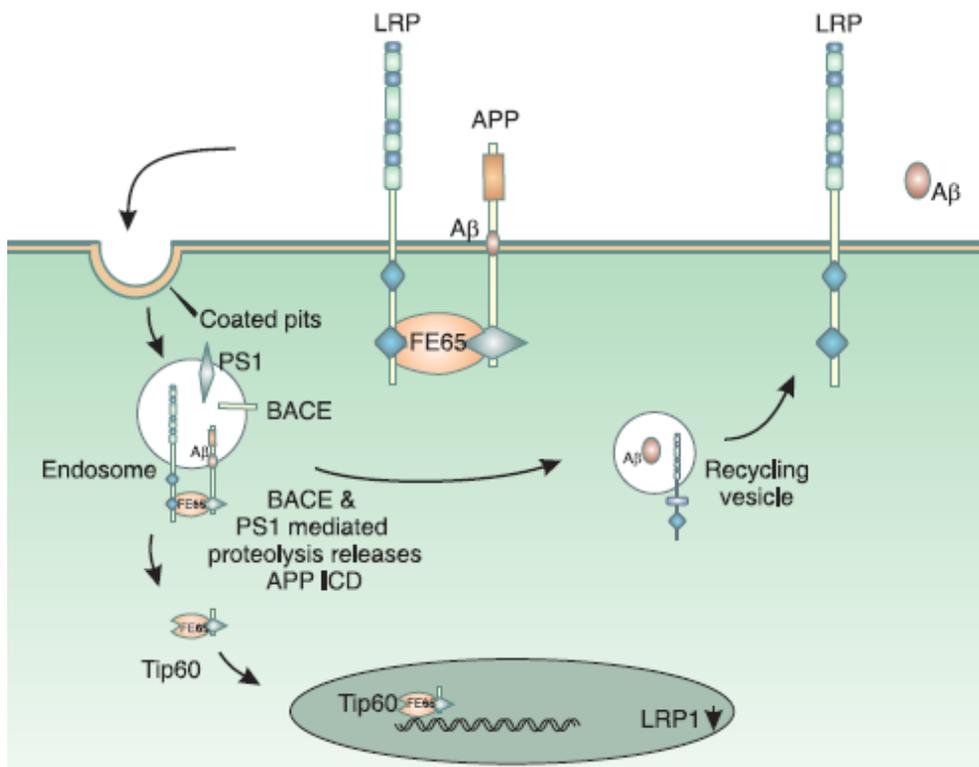


Figura 1.11 Formación del β A mediada por LRP1. Tomado de (Lillis, A.P. 2008)

La eliminación del péptido β A a través de la barrera hematoencefálica desde el cerebro hacia la sangre está mediada por este transportador (Shibata, M. 2000; Deane, R. 2004). Al transportar el β A un fragmento soluble del LRP1 se desprende de la membrana y se une al β A, que ayudará a su transporte sistémico (figura 1.12) (Zlokovic, B.V. 2010). Esta circulación sistémica acaba en el hígado, donde también media la entrada del β A (Tamaki, C. 2006). Una vez en este punto se degrada (Ghisso, J. 2004), con la consiguiente eliminación del organismo.

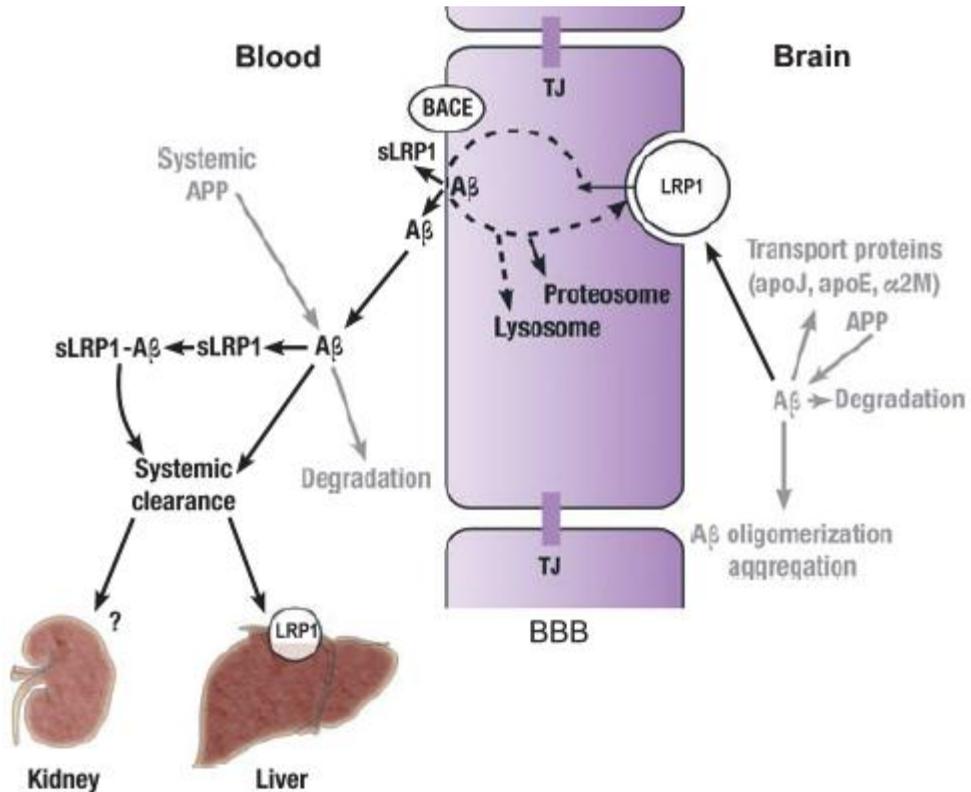


Figura 1.12 Eliminación del β A a través de la barrera hematoencefálica y su transporte sistémico. Tomado de (Zlokovic, B.V. 2010).

1.1.3.4 Receptor de productos de glicosilación avanzada

Pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, el receptor de productos de glicosilación avanzada (RAGE) es un transportador multiligando. Entre los ligandos que transporta se encuentran productos de glicosilación avanzada (AGEs). Su estructura comprende 3 regiones extracelulares, un dominio de tipo "V" y 2 de tipo "C", una parte transmembrana, y una cola citoplasmática de 43 aminoácidos (Bierhaus, A. 2005).

Los AGEs son proteínas y lípidos que han sido modificados como resultado de reacciones de glicosilación. Estas modificaciones hacen que las biomoléculas tengan propiedades distintas de las originales. Este cambio hace que contribuyan a la formación de los depósitos amiloides (Vitek, M.P. 1994).

En la figura 1.13 vemos un resumen de las acciones en las que se ve envuelto el RAGE al interactuar con el β A. Se ha visto que el complejo formado por el receptor y los AGEs induce la sobreexpresión de la BACE (ver punto 1.1.3.1) incrementando de esta forma la producción del β A (Guglielmotto, M. 2012).

Introducción

El RAGE es capaz de introducir el β A desde la sangre al cerebro. En este proceso se provoca estrés oxidativo (Deane, R. 2003). También induce el aumento de astrocitos, que se encargarán de la respuesta inmunológica frente al β A (Giri, R. 2000).

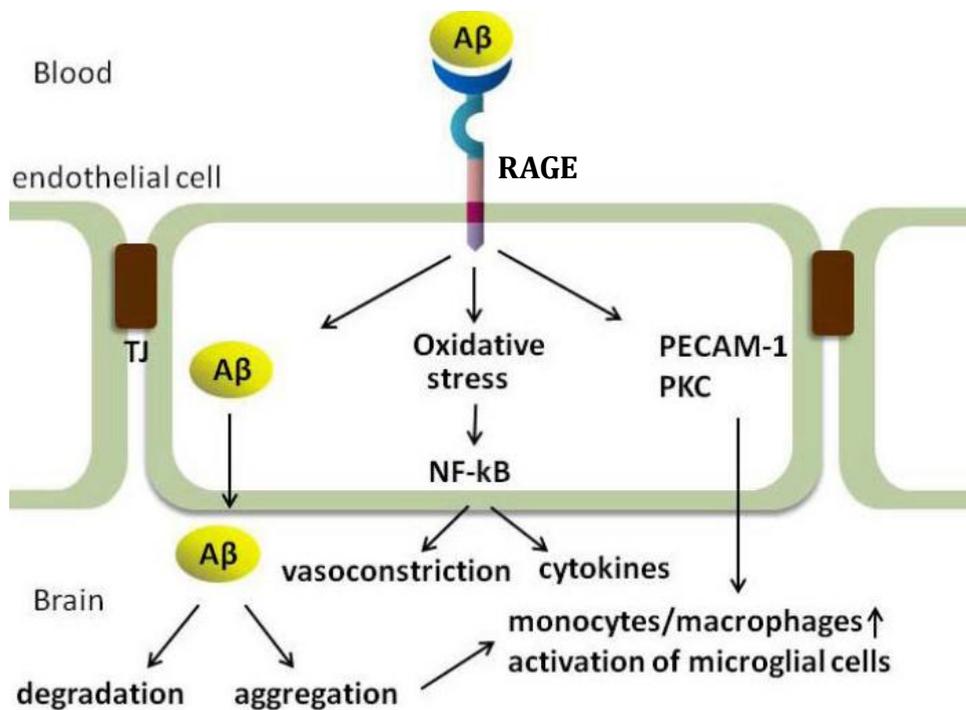


Figura 1.13 Función del transportador RAGE en la barrera hematoencefálica. Tomado de (Han, S.H. 2011).

1.1.4 La apolipoproteína E en la enfermedad de Alzheimer

La apolipoproteína E (apoE) es un polipéptido de 299 aminoácidos. Se asocia a lipoproteínas en la sangre y actúa como transportadora de lípidos, entre los que se encuentra el colesterol (Mahley, R.W. 1988). Este hecho que hace que esté estrechamente relacionada con enfermedades vasculares (ver apartado [1.1.5.2](#)).

El ser humano presenta un polimorfismo para la apoE con tres alelos distintos, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. La diferencia entre los alelos está en los residuos 112 y 158 de los aminoácidos. El alelo $\epsilon 2$ tiene cisteína en los 2 sitios, $\epsilon 3$ arginina y cisteína respectivamente, y $\epsilon 4$ arginina en ambos sitios (Weisgraber, K.H. 1981). La prevalencia de los alelos en la mayoría de las poblaciones en el mundo es del 70-80% para $\epsilon 3$, del 10-15% para $\epsilon 4$ y del 5-10% para $\epsilon 2$ (Roses, A.D. 1996).

La síntesis de apoE en el cuerpo humano se da principalmente en el hígado, seguido por el cerebro (Elshourbagy, N.A. 1985). Dentro del sistema nervioso central, los astrocitos son las células que producirán mayoritariamente la apoE (Brown, M.S. 1986), seguido por la microglía. También las neuronas son capaces de sintetizar apoE en el caso de que se haya producido un daño cerebral (Xu, Q. 2000; Xu, Q. 2006). Ya que la degradación del β A está mediada principalmente por apoE (Jiang, Q. 2008), el hecho de que se sintetice mayoritariamente en el hígado hará que este órgano adquiera una importancia capital en la patología de la EA.

A nivel del sistema nervioso, la degeneración neuronal conlleva la liberación de lípidos provenientes de las membranas celulares y la mielina. Los astrocitos reaccionan sintetizando y liberando ApoE (Brown, M.S. 1986) que capta estos lípidos y los recicla para la neurogénesis (Ignatius, M.J. 1986; Poirier, J. 1993). La importancia del correcto funcionamiento se ha demostrado en ratones *knock-out* para apoE, en los que existe una pérdida de sinapsis y alteraciones en las dendritas (Masliah, E. 1995).

La posesión del alelo ϵ 4 de la apoE es, tras la edad avanzada, el factor de riesgo más importante para la EA senil, como se puede comprobar en estudios epidemiológicos (Corder, E.H. 1993; Polvikoski, T. 1995). Los heterocigotos ϵ 4 tienen un riesgo 4 veces mayor, y los homocigotos ϵ 4 hasta 10 veces mayor de desarrollar EA que una persona sin alelos ϵ 4 (Mayeux, R. 1998). Se ha visto que en pacientes portadores de dicho alelo hay un mayor número de las lesiones cerebrales características de la EA, placas de β A y ovillos neurofibrilares (Tiraboschi, P. 2004).

El por qué del comportamiento del alelo ϵ 4 en la EA no está completamente esclarecido. ApoE tiene un claro papel protector del sistema nervioso. El β A que segregan las células al medio se degrada por la mediación de apoE de varias maneras: en una de ellas facilita la degradación proteolítica del β A a través de la enzima degradadora de insulina, de forma extracelular. En otra vía de degradación promueve la captación y degradación por la microglía del β A del medio extracelular (Jiang, Q. 2008).

En otra de las vías de eliminación del β A en las que interviene apoE, facilita el aclaramiento desde el cerebro a la sangre también por la mediación del receptor LRP1 (LaFerla, F.M. 2012).

No solo interviene en la degradación, sino que también tiene un papel antioxidante que protege frente a la apoptosis neuronal (Hayashi, H. 2009). Este papel protector lo ejerce a través del receptor LRP1 (ver apartado [1.1.3.3](#)), que desencadenará una cascada de señalización intracelular en la que interviene GSK-3 β , enzima relacionada con la diabetes y la EA (ver apartado [1.1.5.1](#)).

Otra de las posibles relaciones entre apo ϵ 4 y la EA se establece en la producción de acetilcolina. Una de las hipótesis que se barajan como causa de la EA es la de que está causada por los bajos niveles de este neurotransmisor (Bartus, R.T. 1982). Se ha visto que en pacientes con EA portadores del alelo ϵ 4 tienen menor producción de acetilcolina (Soininen, H. 1995; Beffert, U. 1998).

Las diferencias entre los alelos ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4 de la apoE parece que son determinantes en el comportamiento de dicha proteína. La hipótesis más viable que se maneja es que el alelo ϵ 4 por sí solo no es causa de la EA. El hecho que induciría la enfermedad sería que no es capaz de ejercer el papel protector que se le atribuye en la protección del sistema nervioso. Al no poder frenar el estrés oxidativo, la degradación del β A o la apoptosis neuronal, entre otras acciones, se desarrollaría la EA como consecuencia de todos estos procesos lesivos (Maezawa, I. 2004).

1.1.5 Repercusiones sistémicas en la enfermedad de Alzheimer

No se puede perder de vista el comportamiento somático en cualquier tipo de enfermedad. La perturbación de la homeostasis en una zona determinada puede repercutir en el resto del cuerpo. Las enfermedades relacionadas con el sistema nervioso pueden tener una importancia fundamental en el buen funcionamiento sistémico.

Una posible relación con la EA, se establece al determinar que hay β A en el plasma (Prelli, F. 1988), y si circula por todo el cuerpo podría afectar a los órganos. Hasta hoy en día no se ha demostrado que tenga una relación con el estado de los órganos del resto del cuerpo.

Uno de los órganos que puede tener una estrecha relación con la EA es el hígado. El hígado tiene, entre otras, la función de servir como un agente detoxificante de la sangre. Será muy importante para eliminar restos nocivos que se encuentren en el sistema vascular sanguíneo, como el β A (Ghiso, J. 2004).

El transporte del β A del cerebro hacia la sangre, y de la sangre hacia el cerebro se debe a los transportadores LRP1 y RAGE respectivamente (ver apartados [1.1.3.3](#) y [1.1.3.4](#)).

1.1.5.1 Diabetes

La diabetes es un desorden metabólico caracterizado por la hiperglucemia crónica. Esta enfermedad se presenta de 2 formas. Una de ellas es la diabetes de tipo 1, caracterizada por la destrucción autoinmune de las células pancreáticas

encargadas de segregar insulina. La otra forma es la de tipo 2, en que el paciente sí que produce insulina, pero es resistente a su acción.

La diabetes de tipo 2 tiene una estrecha relación con la EA. Las personas que la desarrollan tienen el doble de riesgo de desarrollar EA que una persona sana para esta patología (Kroner, Z. 2009). El motivo de esta relación no está completamente esclarecido. La insulina y el receptor de la insulina (IR) en las células son uno de los reguladores de plasticidad neuronal, con lo que la pérdida de su funcionalidad con la diabetes tipo 2 sería uno de los factores que iniciarían la EA (Zhao, W.Q. 2001; Chiu, S.L. 2008). También se ha visto que la enzima degradadora de la insulina (IDE) es capaz de degradar β A (Farris, W. 2003; Jiang, Q. 2008). Al haber más niveles de insulina, por la incapacidad del receptor de captarla, ésta competiría con el β A como sustrato para la IDE, resultando en una menor degradación. Por otra parte, la enzima glucógeno sintasa kinasa 3α y 3β (GSK-3) también tiene un papel en la relación entre la diabetes y la EA. Al no ser funcionales los IRs, en la vía de señalización interna que se muestra en la figura 1.13 no se inactivaría GSK-3 (Cardoso, S. 2009). Al estar la enzima activa, por mecanismos desconocidos actualmente, provocaría el aumento de los depósitos de β A (Phiel, C.J. 2003) y de la hiperfosforilación de tau (Noble, W. 2005).

Soportando la hipótesis de que la desregulación de la insulina es una de las causas de la EA, el grupo de Catarina Oliveira (Correia, S.C. 2012) ha observado las siguientes evidencias:

- Reducción de los niveles de insulina y del IR en la EA (Frolich, L. 1998; Steen, E. 2005).
- El progreso de la EA según la escala de Braak (Braak, H. 1993) está relacionado con la reducción progresiva de los niveles de mRNA de la insulina, IGF-1, IGF-2 y sus receptores (Rivera, E.J. 2005).
- Pacientes con EA muestran niveles altos de insulina en plasma y niveles bajos en el fluido cerebroespinal, y niveles altos de β A (Watson, G.S. 2004), lo que sugiere que el descenso en el aclaramiento de la insulina provoca el ascenso en los niveles de β A en el plasma (Li, L. 2007).
- La administración de insulina y glucosa incrementa la memoria en pacientes con EA (Manning, C.A. 1993).

La hiperglucemia crónica que sufren los pacientes significa que también habrá altos niveles de AGEs. Como hemos comentado en el punto 1.1.4.2, el complejo formado por el receptor y los AGEs induce la sobreexpresión de la BACE, de esta forma habría mayor formación de β A (Guglielmotto, M. 2012), y por tanto un mayor riesgo de desarrollar EA.

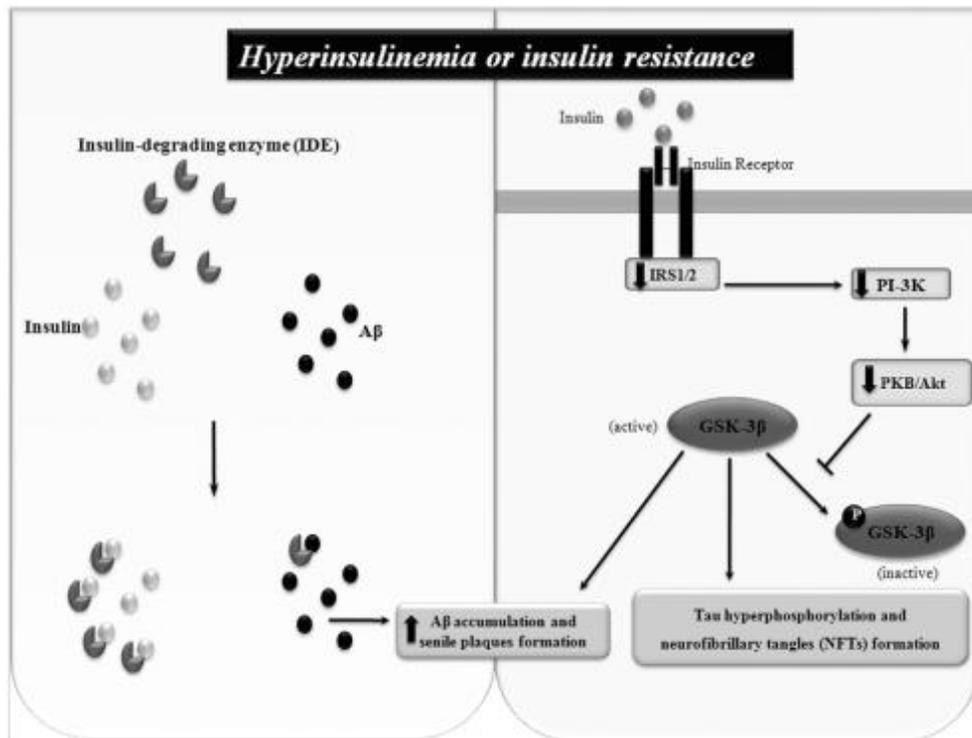


Figura 1.14 Mecanismos relacionados entre la diabetes tipo 2 y la EA. Tomado de (Correia, S.C. 2012).

1.1.5.2 Enfermedades vasculares

Una de las enfermedades que suele ir de la mano de la EA es la angiopatía amiloide cerebral (CAA), hasta en más del 80% de los casos de EA se detecta esta patología (Ellis, R.J. 1996). Se caracteriza por la deposición de proteínas amiloideas en las paredes de las arterias cerebrales. Esta deposición puede causar hemorragias intracerebrales, con una sintomatología muy variada que dificulta su diagnóstico, desde simples dolores de cabeza a crisis epilépticas, dependiendo de la magnitud del accidente vascular. Hay una clara relación directa entre la EA y la CAA, tiene una incidencia mucho mayor en pacientes con EA respecto a individuos sanos, incluso más que en pacientes que han desarrollado algún otro tipo de demencia (Attems, J. 2007). Los depósitos que se forman provocan anomalías en los vasos que alteran el flujo sanguíneo y crean problemas cerebrales (Stopa, E.G. 2008; Thal, D.R. 2009).

En relación al flujo sanguíneo cerebral, se ha visto que el βA 40 reduce el flujo, no así el βA 42. El flujo cerebral sanguíneo disminuye por la acción indirecta del βA 40, al actuar este sobre la generación de radicales libres, y actuando éstos sobre vasodilatadores que actúan a nivel del endotelio (Niwa, K. 2000).

Las diferencias entre los residuos de aminoácidos que existen en cada uno de los alelos de apoE (ver apartado 1.1.4) son las que provocan que apoE4 tenga una mayor preferencia por las lipoproteínas plasmáticas. Al tener una mayor afinidad por estas, incrementan sus niveles en sangre (Davignon, J. 1988). Debido a esto, es causante de enfermedades coronarias, como el infarto de miocardio agudo (Tiret, L. 1994; Wilson, P.W. 1996) y aterosclerosis (Davignon, J. 1988; Ilveskoski, E. 1999), derivado del hecho de tener un elevado nivel de lípidos en sangre.

1.1.5.3 Cáncer

El cáncer es una enfermedad en la que las células de un determinado tejido u órgano se dividen sin control. Este descontrol hace que las células pierdan su función original, y hará que el órgano en cuestión deje de ser funcional.

La EA y el cáncer son 2 enfermedades que no se suelen presentar de forma conjunta. Es decir, si se tiene una alta probabilidad de contraer cáncer menor riesgo de padecer EA, y si se padece EA hay un menor riesgo de contraer cáncer (Roe, C.M. 2005). Los mecanismos que la relacionan con la EA no se conocen demasiado bien, pero es evidente que debe existir un factor común.

Una de las características del cáncer es la alta actividad y niveles de la telomerasa. Esta enzima hace que los telómeros se regeneren continuamente y que la célula no entre en apoptosis, el ciclo celular se repite continuamente. Si se descontrola las células nunca llegan a morir y se inmortalizan, se vuelven cancerosas. Hay evidencia de que la expresión de la telomerasa está disminuida en cerebros con EA, y también la longitud de los telómeros (Franco, S. 2006; Rolyan, H. 2011), lo que es una situación muy alejada de la que tenemos en el cáncer.

El ciclo celular también se ve alterado en las neuronas en la EA (figura 1.15). En estas células se dan cambios con la enfermedad, como el incremento del número de mitocondrias, la fosforilación de tau, y la activación de ciclinas. Esta “maquinaria” que implicaría una mayor división celular, se ve compensada por la expresión de quinasas inhibitorias, como p16 y p21. Al final, como consecuencia del hipermetabolismo producido por el aumento de mitocondrias, la célula produce un exceso de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, y aumenta la hiperfosforilación de tau. Todo esto lleva a un daño celular que acabará provocando la apoptosis celular (Raina, A.K. 2000).

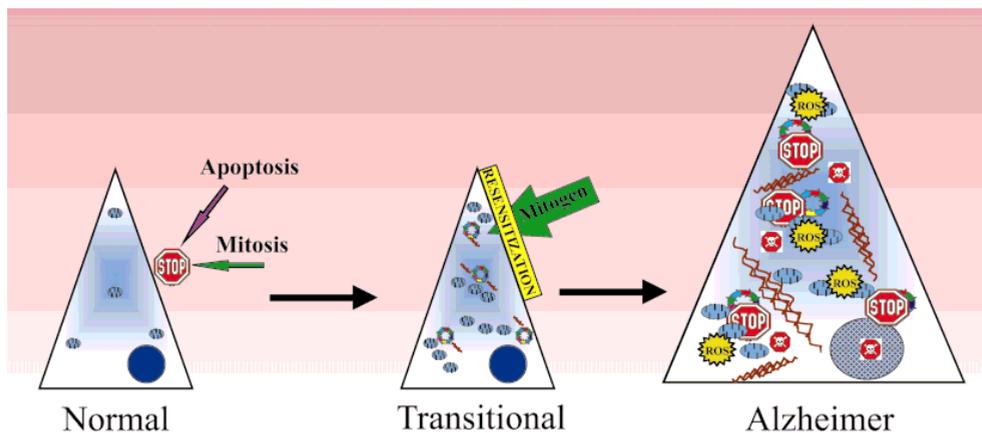


Figura 1.15 El ciclo celular en la EA. Tomado de (Raina, A.K. 2000)

1.1.6 Modelos animales para la enfermedad de Alzheimer

La dificultad de estudiar la EA se basa principalmente en que es una enfermedad exclusivamente humana (Bufill, E. 2006), y por obvias razones éticas se necesitan modelos animales, modelos en los que no podemos asegurar que se desarrolle la EA humana. Las maneras de trabajar con humanos se remiten a trastornos de la conducta (Galasko, D. 2005), o a trabajar *post-mortem*, con órganos de gente que haya consentido en donarlos a la ciencia (Nunomura, A. 1999).

La facilidad de trabajar con un modelo animal es elevada, y permite ver efectos a largo plazo, ya que se puede trabajar durante toda la vida del animal, que en humanos sería inviable, por el tiempo que se tardaría en realizar el estudio, ya que estamos hablando de una enfermedad asociada al envejecimiento.

Los primeros modelos animales para la EA se deben a Henry Wisniewski, que trabajando con conejos en un experimento sin relación con la EA, en el que les administraba aluminio, vio que desarrollaban NFT, aunque más tarde se comprobó que no eran como los que se desarrollan en la EA. También intentó trabajar con perros y monos, pero no obtuvo resultados satisfactorios para conseguir un modelo que se acercara a la EA (Wisniewski, T. 2001).

El modelo animal más usado es el ratón, por las facilidades que ofrece de cría y de manipulación genética. Al no ser muy longevo, experimentalmente se puede ver el efecto de un tratamiento o enfermedad sobre el animal durante toda la vida.

Para la EA hay varios modelos que intentan reproducir los efectos en el ratón. Uno de ellos consiste en que el animal desarrolle las placas de βA típicas de la enfermedad. Se consigue insertando en el genoma los alelos de los genes que codifican para el carácter en cuestión. En uno de los modelos se han hecho ratones

transgénicos para la APP, con mutaciones en los alelos que hacen que haya sobreexpresión de esta proteína. Por tanto mayor facilidad para la aparición de las placas de β A. Si se insertan 2 transgenes, un ratón doble transgénico, el que codifica para la APP, y para la PS1, la aparición de las placas se da a edades más tempranas que en el ratón con un solo transgen (Jankowsky, J.L. 2004). Concuerta con lo que ocurre en humanos, ya que la EA de aparición temprana está relacionada con las presenilinas. Nuestro grupo de investigación, en colaboración con el laboratorio del doctor García Verdugo de la Universitat de València, ha comprobado que estos animales desarrollan placas de β A alrededor de los 6 meses de edad (figura 1.16).

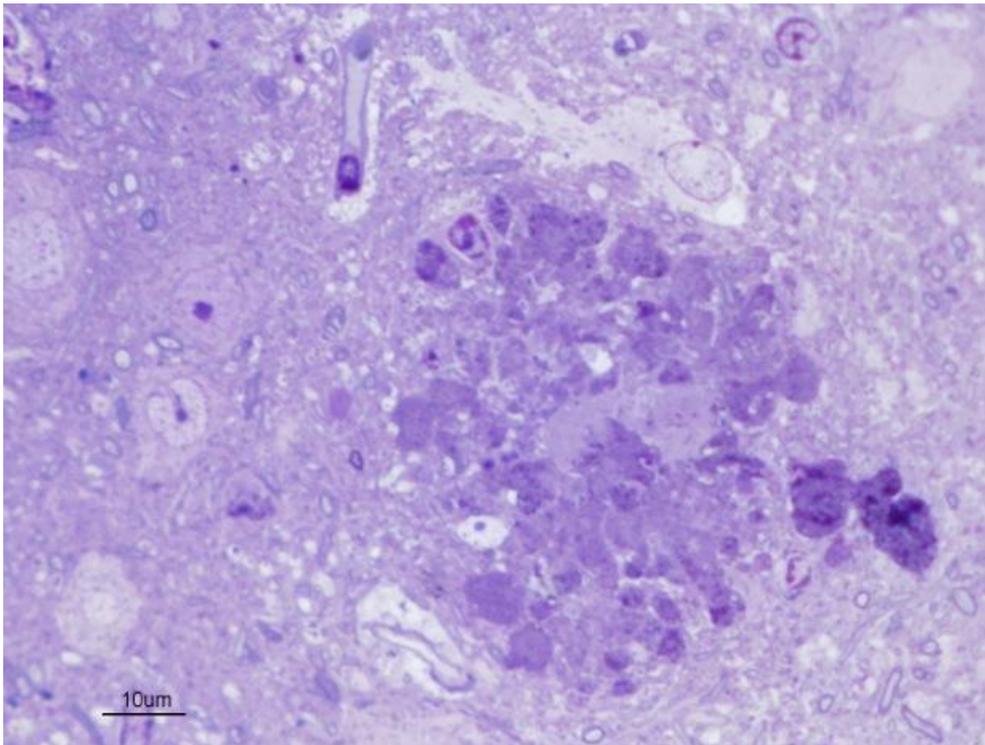


Figura 1.16 Placa de β A en el cerebro de ratón transgénico APPswe/PS1dE9.

Este ratón, de acuerdo con la teoría de la cascada amiloidea (Hardy, J.A. 1992), debería desarrollar NFTs, pero no lo hace, aunque sí que se detecta hiperfosforilación de tau (Gotz, J. 2007). Esto se debe seguramente a que la estructura de la proteína tau es distinta en ratones que en humanos. Para tener un ratón con NFTs, se debe insertar un transgen más, el gen que codifica para tau, MAPT. De esta manera tenemos el ratón triple transgénico para la EA, con alelos mutantes para los genes APP, PS1 y MAPT. En estos ratones, la patología amiloidea precede a la de tau (Oddo, S. 2003), un punto que favorecería la hipótesis de la cascada amiloidea.

1.2 RADICALES LIBRES

La teoría de los radicales libres en el envejecimiento enunciada por Harman en 1956 propone que los radicales libres derivados del oxígeno son los responsables del daño oxidativo que se produce con la edad a nivel celular y tisular (Harman, D. 1956). Los sistemas antioxidantes no son capaces de hacer frente a todas las especies reactivas de oxígeno que se generan continuamente a lo largo de la vida de la célula, lo que acaba provocando un daño oxidativo en ella, y por extensión sobre los tejidos.

Existen muchas pruebas experimentales a favor de esta teoría. Los animales viejos presentan mayores índices de oxidación que los jóvenes y se acumulan proteínas oxidadas, formas oxidadas del DNA y de lípidos (Stadtman, E.R. 1992; Sohal, R.S. 1993; Hamilton, M.L. 2001; Bokov, A. 2004). En principio, esto podría atribuirse a una tasa mayor de radicales libres generados por los organismos viejos.

También, a favor de esta teoría son los descubrimientos de numerosos estudios realizados en diversos organismos, que sugieren que la reducción del estrés oxidativo o el aumento de la resistencia al mismo, están relacionados con la prolongación de la vida (Harman, D. 1978; Miquel, J. 1979; Harrington, L.A. 1988; Phillips, J.P. 1989; Orr, W.C. 1994; Parkes, T.L. 1998; Finkel, T. 2000; Melov, S. 2000; Ruan, H. 2002; Ishii, N. 2004; Huang, T.T. 2006; Zou, S. 2007; Kim, J. 2008; Quick, K.L. 2008; Dai, D.F. 2009; Shibamura, A. 2009).

A pesar de que la teoría de radicales libres está dentro de las más estudiadas y aceptadas de todas las hipótesis del mecanismo de envejecimiento, varios estudios han generado ambigüedad y controversia de la misma (Muller, F.L. 2007; Perez, V.I. 2009a; Perez, V.I. 2009b; Lapointe, J. 2010; Salmon, A.B. 2010). Por ejemplo, la gran mayoría de los estudios en ratones no muestran ningún cambio en la vida útil después del incremento o reducción de la actividad de enzima antioxidante (Huang, T.T. 2000; Perez, V.I. 2009b). Tampoco ha sido demostrado que prolongue la vida en ensayos clínicos en humanos, a los que se les administraba sustancias antioxidantes (Howes, R.M. 2006; Bjelakovic, G. 2007)

Para entender la Teoría de los Radicales Libres en el Envejecimiento pasamos, a continuación, a definir algunos conceptos y términos básicos.

1.2.1 Radicales libres

Radical libre es aquella especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia, esto hace que estas especies presenten una gran reactividad. Se caracterizan por su gran poder oxidante y porque su vida

media es normalmente muy corta. La tabla 1.3 muestra ejemplos de la vida media de algunos radicales libres.

RADICAL	SUSTRATO	CONCENTRACIÓN	VIDA MEDIA (a 37°C)
HO·	LH	1 M	10 ⁻⁹ s
RO·	LH	100 mM	10 ⁻⁶ s
ROO·	LH	1 mM	7 s
L·	O ₂	20 μM	10 ⁻⁸ s
Q·		-	Días

Tabla 1.3 Vida media de radicales libres

Estas especies químicas son abundantes en los sistemas vivos. Es más, algunos autores como Denham Harman en su estudio sobre el origen y evolución de la vida (Harman, D. 2001) proponen a los radicales libres como una de las causas del origen de la vida en nuestro planeta. Así pues, por una parte da origen a la vida y por otra, por su capacidad de formar distintos radicales libres es capaz de dañar estructuras esenciales para el desarrollo de ésta, tales como DNA, proteínas, carbohidratos y lípidos (Sies, H. 1983). Además los radicales libres intervienen en procesos fisiopatológicos como la diabetes y algunos tipos de cáncer (Takada, A. 1982). También intervienen en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Pacifi, R.E. 1991) y el ejercicio físico agotador (Davies, K.J. 1982; Sastre, J. 1992). En la naturaleza los radicales libres son mayoritariamente compuestos derivados del oxígeno y se denominan especies reactivas del oxígeno (ROS). La base química por la cual el oxígeno se comporta de tal forma viene detallada en el siguiente apartado.

1.2.1.1 Clases de Radicales libres

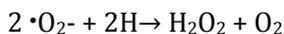
Existen muchas clases de radicales libres, tanto especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) como las especies reactivas del nitrógeno (RNS). Algunos de los radicales libres más importantes son:

1.2.1.1.1 Anión superóxido (O₂⁻)

Estado de reducción del oxígeno de un electrón, formado en reacciones catalizadas enzimáticamente, como producto en las reacciones de las deshidrogenasas flavoproteínicas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc. (Korycka-Dahl, M. 1980), en las oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p450, etc.), también en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína (Vina, J. 1983). Asimismo en la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris, A. 1972), siendo potencialmente tóxico, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos. Se ha estimado que una célula del cuerpo humano produce alrededor de unas 10¹⁰ moléculas de anión superóxido por día (Ames, B.N. 1993). Sin embargo

Introducción

el 99% de las moléculas que se producen se dismutan hacia peróxido de hidrógeno (Cheeseman, K.H. 1993).



1.2.1.1.2 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

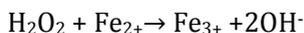
El peróxido de hidrógeno no es un radical libre como tal, pues no posee electrones desapareados en su capa de valencia. Es la forma menos activa de las especies reactivas del oxígeno. Su importancia recae en el hecho de que atraviesa fácilmente las membranas biológicas, con lo que puede dar lugar a reacciones de oxidación en puntos de la célula más alejados de su lugar de producción.

Se puede originar a partir de diversas fuentes:

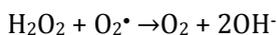
- Por reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones (Sawyer, D.T. 1988).
- $O_2 + 2 e^- + 2 H \rightarrow H_2O_2$
- Por dismutación del $\cdot O_2^-$ (Cheeseman, K.H. 1993; Frei, B. 1994).
- Como producto de algunas enzimas (glucosa oxidasa, uricasa, etc.) (Fridovich, I. 1986).
- Por reacciones químicas de autooxidación (Korycka-Dahl, M. 1980).

1.2.1.1.3 Radical hidroxilo (OH \cdot)

Estado de reducción de tres electrones de la molécula de oxígeno. Es la especie más reactiva con una vida media estimada de alrededor de 10^{-9} s (Liochev, S.I. 1994). Puede generarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X, rayos γ) que puede provocar rotura homolítica del agua corporal. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el agua oxigenada en 2 moléculas de radical hidroxilo. Otro proceso todavía más importante en la formación del radical hidroxilo es la llamada reacción de Fenton (Fenton, H.J.H. 1894).



También a partir de agua oxigenada y del radical superóxido puede formarse el radical hidroxilo, por la reacción de Haber-Weiss (Haber, F.W., J. 1934).



Esta reacción es catalizada por metales como el hierro o el cobre.

1.2.1.1.4 Radical peroxilo (ROO•)

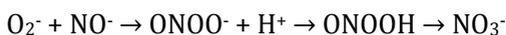
Formado a partir de hidroperóxidos orgánicos por pérdida de hidrógeno. Tiene una vida media relativamente larga, del orden de segundos (ver tabla 1.3).

1.2.1.1.5 Oxígeno singlete ($\cdot\text{O}_2$)

Es una forma excitada del oxígeno molecular. No es un radical libre como tal. Se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno. Su vida media es alrededor de 10^{-6} segundos, dependiendo de la naturaleza de la matriz circundante. Puede interactuar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas. Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas o en la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, lipooxigenasa y prostanglandinsintetasa, entre otras (Kanofsky, J.R. 1993).

1.2.1.1.6 Óxido nítrico (NO•)

El óxido nítrico es un gas lipofílico e hidrosoluble, cuya vida media es relativamente larga (3-5 s). Ha cobrado gran relevancia en los últimos años por la importante función fisiológica que desempeña, además de ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre. Su formación tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido nítrico sintasa cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina, dando como subproducto NO• en numerosos tipos celulares (Moncada, S. 1991). Además lo producen los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria. El óxido nítrico genera anión peroxinitrito (ONOO⁻) al reaccionar con el anión superóxido (Gryglewski, R.J. 1986; Miles, A.M. 1996), tal como se muestra en la siguiente reacción:



Interviene en numerosos procesos fisiológicos, actuando como regulador del flujo sanguíneo local, inhibidor de la agregación plaquetaria, neurotransmisor, etc. siendo el cerebro el órgano con mayor actividad óxido nítrico sintasa (Czapski, G. 1995).

1.2.1.1.7 Dióxido de nitrógeno (NO₂)

El dióxido de nitrógeno es un radical libre contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del NO• atmosférico. Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica (Postlethwait, E.M. 1995).

1.2.1.1.8 Radicales de átomos derivados de carbono (R•)

Los radicales centrados en un átomo de carbono (R•) surgen del ataque de un radical oxidante sobre una molécula biológica. En el primer paso se arranca un átomo de hidrógeno (H⁺) de un grupo metileno situado entre dos enlaces dobles. Este tipo de radicales es muy inestable y reacciona rápidamente con el oxígeno, dando lugar a un radical peróxido (ROO•). A su vez, estos radicales pueden participar en otras reacciones y generar otras especies radicales (Frei, B. 1994).

1.2.1.1.9 Radicales de átomos derivados de azufre (RS•)

Los átomos de azufre también pueden ser el centro de un radical libre (RS•) formado, por ejemplo, a partir de la cisteína. Ésta se autooxida con facilidad dando lugar a la formación de radicales tiolo e hidroxilo (Estrela, J.M. 1983; Sparrow, C.P. 1993).

1.2.2 Génesis de especies reactivas del oxígeno

Todos los radicales libres descritos anteriormente corresponden a especies cuya formación es endógena, pero el organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas como la dieta (en la que son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante), el ozono, el humo del tabaco, la polución ambiental, etc. (Ames, B.N. 1983). Las especies reactivas del oxígeno pueden tener un origen endógeno o exógeno (Freeman, B.A. 1982; Frei, B. 1994). Algunas de ellas surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas de oxígeno se generan *in vivo* con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen O₂⁻ y H₂O₂ (Halliwell, B. 1991).

1.2.2.1 Fuentes exógenas

Las fuentes exógenas más importantes en la generación de especies activadas de oxígeno son:

- Muchos agentes antineoplásicos tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos (Doroshov, J.H., P. 1982) que dependen de grupos quinoideos o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.
- La irradiación de los organismos debido a las radiaciones electromagnéticas (rayos X y g) o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas a y b) (Bielsky, B.H.G., J.M. 1977).

• Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Mason, R.P. 1982).

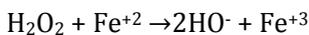
1.2.2.2 Fuentes endógenas

1.2.2.2.1 La cadena de transporte electrónico mitocondrial

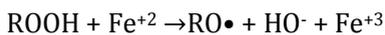
La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en interior de la célula. Está compuesta por una serie de proteínas con capacidad redox que reducen al oxígeno molecular hasta la formación de una molécula de agua. Esta reacción está acoplada a la fosforilación oxidativa, en la cual se produce energía en forma de ATP.

1.2.2.2.2 Reacción de Fenton-Haber-Weiss

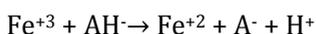
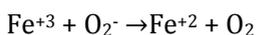
Consiste en la reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso (Fe^{+2}) y, en menor medida, el cuproso (Cu^+) y otros iones. El agua oxigenada (H_2O_2) es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Fenton (Fenton, H.J.H. 1894) descubrió que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezclas de peróxido de hidrógeno y Fe^{+2} (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss los que posteriormente comprobaron cómo el Fe^{+2} reduce al H_2O_2 , que a su vez se descompone en radical hidroxilo e ión hidroxilo (Haber, F.W., J. 1934).



Y en general,



Aunque esta reacción puede tener lugar con varios metales, el hierro parece ser el más importante en sistemas biológicos. El Fe^{+2} se oxida a Fe^{+3} con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica (Halliwell, B. 1986). Pero el ion férrico puede ser reducido por el ascorbato (Sawyer, D.T. 1988) y por el radical superóxido (Frei, B. 1994), con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo:



1.2.2.2.3 Los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico

Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P450 y b5, que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila, J. 1981) y xenobióticos. Bajo la denominación de citocromos P450 se engloba un número muy elevado de proteínas con grupos hemo, ampliamente distribuidos entre los seres vivos. Son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberadas en la célula (Dolphin, D. 1988; Forster, R.E. 1993).

1.2.2.2.4 Microsomas o peroxisomas

Los microsomas o peroxisomas son una fuente importante de peróxido de hidrógeno. Poseen una concentración elevada de oxidasas, como la D-aminoácido oxidasa y la acil-CoA oxidasa, enzimas utilizadas en la degradación de ácidos grasos y aminoácidos, que producen peróxido de hidrógeno como producto de la reacción que catalizan (Boveris, A. 1972). La catalasa peroxisomal metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno formado en ellos (Freeman, B.A. 1982; Krinsky, N. 1994). Por otro lado, el citocromo P450 tiene un papel importante en los microsomas que detoxifican xenobiótico (Philpot, R.M. 1991).

1.2.2.2.5 Membrana plasmática

La enzima NAD(P)H-oxidasa presente en la membrana plasmática de las células fagocíticas, es una importante fuente biológica de producción de radicales libres, debido a la activación de los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos que consumen gran cantidad de oxígeno, el cual será transformado en radical superóxido. Estos radicales libres de oxígeno pueden dañar a la propia célula que los origina y a células próximas a los fagocitos estimulados. También se ha visto que la NADH oxidasa es una importante fuente de radicales libres en células musculares lisas arteriales y endotelio (Jones, S.A. 1994). Cabe destacar el papel de las enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, en la producción de radicales libres fruto del metabolismo de su producto, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (White, R.P. 1990).

1.2.3 Antioxidantes fisiológicos

Ya que los seres vivos han evolucionado en presencia de sustancias oxidantes, la evolución ha ido dotando a estos organismos de sistemas capaces de hacer frente a este tipo de sustancias tan reactivas. Halliwell en 1995 definió como

antioxidante a “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Sies, H. 1993; Halliwell, B. 1995).

Pueden actuar de las siguientes formas:

- Previene la formación de ROS
- Interceptando el ataque de ROS
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS y, por último
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

Bajo el punto de vista de la fisiología celular, los podemos dividir en antioxidantes primarios, secundarios y terciarios.

Los *antioxidantes primarios* previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Estos antioxidantes actúan por conversión de los radicales libres existentes en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación desde otras moléculas. Dentro de este grupo se incluye a la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina) que limitan la disponibilidad de hierro necesario para la formación del radical OH⁻ (Halliwell, B.G., J.M.C. 1989).

Los *antioxidantes secundarios* son protectores no enzimáticos o captadores de radicales libres que intervienen cuando hay superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Se incluye el glutatión, la vitamina E, vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (Halliwell, B. 1990).

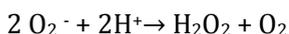
Los *antioxidantes terciarios* reparan biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos se encuentran los sistemas proteolíticos intracelulares, que actúan degradando proteínas dañadas oxidativamente, evitando de este modo su acumulación (Davies, K.J. 1987b; Pacifici, R.E. 1991). También podemos destacar las enzimas reparadoras de DNA, la metionina sulfóxido reductasa y la fosfolipasa A2 que corta los fosfolípidos oxidados de la membrana (Sevanian, A. 1985).

Otra forma de clasificar a los antioxidantes, muy utilizada en la literatura, es desde un punto de vista bioquímico. Así, podríamos clasificarlos en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

1.2.3.1 Antioxidantes enzimáticos

1.2.3.1.1 Superóxido dismutasa

Bajo este nombre se incluye a una familia de metaloproteínas ampliamente distribuida en la naturaleza, presente en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno, e incluso en algunas bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas (Hassan, H.M. 1977). Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 (McCord, J.M. 1969). La superóxido dismutasa (SOD) transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa (McCord, J.M. 1974). Cabe destacar que el radical superóxido es inestable en medio acuoso y dismuta espontáneamente formando H_2O_2 . Sin embargo, la velocidad de dismutación espontánea no enzimática es relativamente baja (a pH fisiológico, está alrededor $2 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$). La catálisis de la reacción de dismutación llevada a cabo por la enzima superóxido dismutasa incrementa esta velocidad del orden de 10.000 veces. Hay descritas cuatro formas diferentes de superóxido dismutasas (Fridovich, I. 1974) según el grupo prostético metálico ligado al enzima (tabla 1.4).



ENZIMA	GRUPO PROSTÉTICO	LOCALIZACIÓN CELULAR
Cu,Zn-SOD	Cu, Zn	Citosol y núcleo
Mn-SOD	Mn	Matriz mitocondrial y citosol
Mn-SOD	Mn	Bacterias
Fe-SOD	Fe	Bacterias

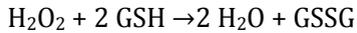
Tabla 1.4 Tipos de SOD y localización celular mayoritaria

1.2.3.1.2 Glutatión peroxidasa

La glutatión peroxidasa (GPx) es también un antioxidante primario. Convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos de lípidos en moléculas inofensivas (Chance, B. 1979).

Hay dos tipos de glutatión peroxidasa, y ambas requieren glutatión reducido como dador de equivalentes reductores: *Glutatión peroxidasa selenio dependiente*: es una proteína tetramérica, con cuatro átomos de selenio, que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos (Ketterer, B. 1986), además de intervenir en otros procesos como eliminación de xenobióticos (Sohn, O.S. 1999).

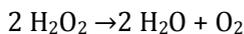
Su centro activo contiene una cisteína en la que el azufre ha sido sustituido por selenio (Forstrom, J.W. 1978). Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta (Ketterer, B. 1986).



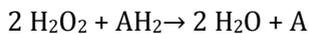
Glutación peroxidasa no selenio dependiente: sólo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos. La mayor parte de la actividad glutación peroxidasa se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, B. 1986).

1.2.3.1.3 Catalasa

La catalasa participa en la eliminación de peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance, B. 1979).



También es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidación en presencia de H_2O_2 , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (Chance, B. 1979).



La catalasa se halla principalmente en los peroxisomas (Tolbert, N.E. 1981), si bien en años recientes se ha descrito cierta actividad catalasa también en mitocondrias y citosol (Rodríguez, A.M. 2000).

1.2.3.2 Antioxidantes no enzimáticos

1.2.3.2.1 El glutatión

Es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos. Fue descubierto por Hopkins en 1921 (Hopkins, F.G. 1921) y está constituido por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina. Su estructura le confiere ciertas características que hacen que el glutatión tenga una funcionalidad amplia e importante en la célula. Se puede encontrar en 2 formas según su estado de óxido-reducción: como GSH o glutatión reducido, o como GSSG o glutatión oxidado que está compuesto por 2 moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas.

El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas (Viña, J. 1990), una de ellas es la de proteger a la célula contra los radicales libres, los

peróxidos y otros compuestos tóxicos, así como proteger frente al efecto nocivo de las radiaciones.

1.2.3.2.2 Papel antioxidante del glutatión: ciclo redox

El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin intervención enzimática alguna y detoxificarlos, o bien puede reducir los peróxidos formados por medio de la glutatión peroxidasa. Cuando se da una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio del enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (figura 1.17). Tanto la glutatión peroxidasa como la glutatión reductasa se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria.

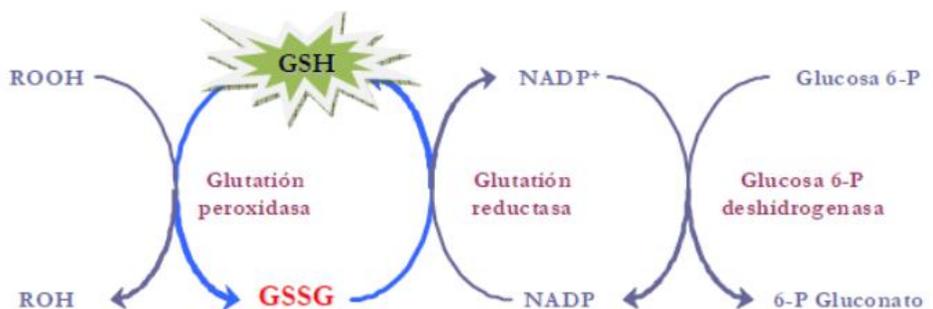


Figura 1.17 Ciclo redox del glutatión

1.3 ESTRÉS OXIDATIVO

1.3.1 Concepto de estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, H. 1985).

A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas especies activadas de oxígeno, también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes (Halliwell, B. 1996).

La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso normal e inevitable (Slater, T.F. 1984), ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. Estas especies tan reactivas, no causan daño oxidativo en condiciones normales debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes.

Cuando se produce un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, el resultado es un daño oxidativo, que puede afectar a diversas moléculas, y que puede reflejarse en sus funciones fisiológicas. Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez.

1.3.2 Estrés oxidativo y daño a biomoléculas

1.3.2.1 Daño oxidativo a lípidos

De los principales tipos de biomoléculas, los lípidos, y sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles de ser atacados por radicales libres (Cheeseman, K.H. 1993) siendo el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), el peróxido ($\text{ROO}\cdot$), el alcoxilo ($\text{RO}\cdot$) y el alquílico ($\text{R}\cdot$) los principales generadores de daño oxidativo a lípidos.

El proceso de ataque oxidativo a lípidos (figura 1.18), denominado peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Halliwell, B. 1994; Krinsky, N. 1994). Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble. Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados, con lo que se propaga la reacción en cadena de los radicales (Halliwell, B. 1994).

De esta manera, un sólo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos, principalmente malondialdehído (MDA), e isoprostanos, 4-hidroxinonal, e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Freeman, B.A. 1982; Cheeseman, K.H. 1993). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares con lo que causan mutaciones en el DNA, y producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Krinsky, N. 1994). La peroxidación lipídica se considera un factor muy importante en el envejecimiento de células aerobias, (Lippman, R.D. 1985), ya que el daño oxidativo a los lípidos de la membrana constituye, muy probablemente, un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas, y por tanto afectará a su funcionalidad (Shigenaga, M.K. 1994). El MDA es un marcador muy fiable del perfil de peroxidación lipídica.

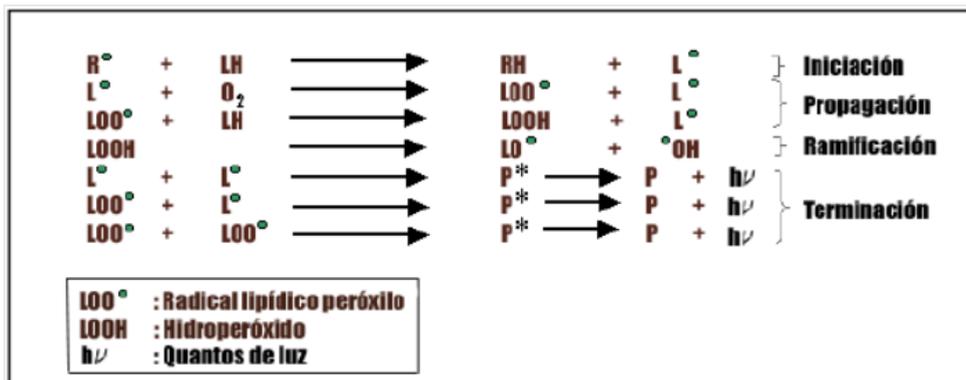


Figura 1.18 Mecanismo de peroxidación lipídica.

1.3.2.2 Daño oxidativo a proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (Stadtman, E.R. 1992). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren (Davies, K.J. 1987a). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica.

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas. Otros aminoácidos como histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo (Stadtman, E.R. 1992). El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Dean, R.T. 1993).

1.3.2.3 Daño oxidativo al DNA

El DNA también es susceptible de daño oxidativo en todos sus componentes. El oxígeno es capaz de atacar tanto a las bases como al azúcar.

Podemos encontrar más de veinte subproductos tras un ataque oxidativo al DNA. Entre ellos, la oxidación de la 2-desoxiguanosina a 8-hidroxi 2-desoxiguanosina es una de las lesiones más frecuentes, y reviste gran importancia por su alto efecto mutagénico, ya que durante la replicación producirá transversiones de purinas (Kasai, H. 1984).

El daño oxidativo asociado a proteínas y DNA no debe ser considerado de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadoras puede aumentar la acumulación de daño oxidativo en el DNA, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del DNA dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un DNA dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (Breen, A.P. 1995). Por ello, las lesiones oxidativas al DNA parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la edad avanzada.

El DNA mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el nuclear (Richter, C. 1988), ya que presenta ciertos rasgos que le hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: carece de histonas que puedan recibir el ataque en lugar del DNA (Johns, D.R. 1995); el sistema de reparación es menos efectivo (Suter, M. 1999) y, por último, se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, uno de los sistemas principales de producción de especies reactivas del oxígeno (Giulivi, C. 1993). Otro factor distintivo del DNA mitocondrial es que no posee intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta usualmente a una zona de DNA codificante (Ames, B.N. 1993) y su repercusión suele ser, por tanto, más importante.

1.3.2.4 Daño oxidativo a glúcidos

Los glúcidos reaccionan con facilidad con el radical hidroxilo. Los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares (Albertini, R. 1996).

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres dando lugar a procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido hialurónico cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. Se ha observado que la superóxido dismutasa es capaz de proteger frente a la despolimerización del ácido hialurónico, en el líquido sinovial (McCord, J.M. 1974). Los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa de forma similar (Greenwald, R.A. 1980).

1.3.3 Indicadores de estrés oxidativo

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que nos permitan medirlo. Entre los indicadores propuestos, uno de los más relevantes es

el cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) característico de estrés oxidativo, de modo que un aumento en la concentración de glutatión oxidado produce una alteración del estado redox celular (Sies, H. 1986).

Además, como indicadores de daño oxidativo a lípidos, el malondialdehído y el hidroxinonenal son los más empleados, aunque también se pueden considerar los niveles de pentano y de etano. La 8- hidroxí-2'-desoxiguanosina es un indicador de daño oxidativo al DNA, los grupos carbonilo y la 2-oxohistidina se utilizan como marcadores de daño en oxidativo en proteínas (Hageman, J.J. 1992).

1.4 TEORÍA MITOCONDRIAL DE LOS RADICALES LIBRES

Miquel y colaboradores proponen en 1980 la Teoría Mitocondrial del Envejecimiento Celular (Miquel, J. 1980). Esta teoría sugiere que la senescencia es un producto derivado del ataque de los radicales de oxígeno al genoma mitocondrial en células postmitóticas fijadas. Las mitocondrias de las células postmitóticas consumen O₂ a velocidades altas, liberando entonces radicales de oxígeno que exceden la capacidad de las defensas antioxidantes celulares (Miquel, J. 1980).

La Teoría Mitocondrial del Envejecimiento se ha probado recientemente en varios laboratorios, y existe en la bibliografía una gran cantidad de evidencias experimentales que la apoyan. Diversos autores han comprobado que las mitocondrias de animales viejos producen más radicales libres que las de los jóvenes (Sohal, R.S. 1991; Sastre, J. 1998). Además, existe una relación inversa entre la producción mitocondrial de peróxidos y la longevidad de los mamíferos (Sohal, R.S. 1990; Barja, G. 1994). Estos resultados apoyan la idea de que la generación de prooxidantes es un factor crítico en la velocidad del envejecimiento (Sohal, R.S. 1991). Así mismo, se ha demostrado que el daño oxidativo al DNA mitocondrial, proteínas y lípidos sobrevienen a lo largo del envejecimiento (Richter, C. 1988; Shigenaga, M.K. 1994), y que la generación de peróxidos por la mitocondria aumenta con la edad.

El papel de las mitocondrias viejas en el envejecimiento celular se ha demostrado microinyectando mitocondrias aisladas a partir de fibroblastos de ratas viejas, donde se veía que las células inducidas degeneraban (Corbisier, P. 1990).

La generación continua de ROS por la mitocondria a lo largo de la vida celular, produce un estrés oxidativo mitocondrial "crónico" relacionado con la edad, que juega un papel clave en el envejecimiento. Más aún, la mitocondria de especies que viven periodos de tiempos más cortos produce relativamente cantidades más elevadas de ROS que aquella procedente de especies que viven más (Sohal, R.S. 1990; Barja, G. 1994). De este modo, la velocidad de producción de ROS aparece

como determinante en el potencial de vida máxima (Perez-Campo, R. 1998). El papel de la mitocondria en el envejecimiento celular también se ha relacionado con las pérdidas funcionales mitocondriales a lo largo del proceso de envejecimiento (Miquel, J. 1980; Shigenaga, M.K. 1994). Así, la actividad respiratoria de mitocondrias aisladas decrece con la edad en hígado, músculo esquelético y cerebro. Recientemente, en nuestro laboratorio demostramos que el potencial de membrana mitocondrial decrecía con la edad y que aumentaba el tamaño mitocondrial en el envejecimiento (Sastre, J. 1996). También se ha publicado que existe una disminución de los transcritos mitocondriales relacionados con la edad en algunos tejidos de rata y en *Drosophila* (Calleja, M. 1993). Debemos tener en consideración la expresión del 16S rRNA mitocondrial, la cual se ve disminuida en los procesos de estrés oxidativo (Crawford, D.R. 1997).

Además, la expresión de este gen mitocondrial disminuye con la edad, y esta disminución se correlaciona con la curva de supervivencia en *Drosophila* (Calleja, M. 1993). Así pues, la expresión del 16S rRNA puede ser considerada como un marcador de envejecimiento celular.

1.4.1 La mitocondria: estructura y función

Las mitocondrias son orgánulos celulares de forma ovalada, con una longitud de unas 2 μm y un diámetro de 0,5 μm , el tamaño aproximado de una bacteria. Estudios de microscopía electrónica revelan la existencia de dos membranas, una externa y una interna muy extensa y con numerosos pliegues, llamados crestas. Por lo tanto existen dos compartimentos: (1) el espacio intermembranal, situado entre la membrana externa e interna y (2) la matriz que está rodeado de la membrana interna (figura 1.19).

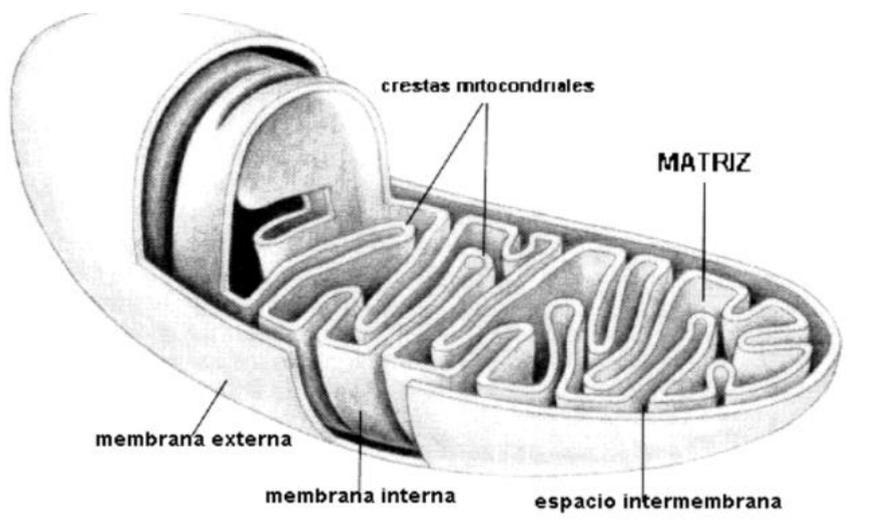


Figura 1.19 Estructura de la mitocondria.

Introducción

En la matriz se localizan varias copias del genoma circular mitocondrial, los ribosomas y numerosos complejos enzimáticos necesarios tanto para las funciones energéticas, como para la expresión y la replicación de genes. En concreto el genoma mitocondrial humano contiene 16.569 pares de bases (pb) y codifica 13 proteínas de la cadena respiratoria así como los RNAs ribosómicos grande y pequeño y suficientes tRNAs como para traducir todos los codones. Sin embargo las mitocondrias también contienen muchas proteínas codificadas por el DNA nuclear.

En el espacio intermembranal se localizan las enzimas que median el tránsito de sustancias entre la matriz mitocondrial y el citosol, y alguno de estos complejos presenta actividad quinasa.

Del mismo modo, sus membranas ofrecen también diferencias significativas. La membrana interna se caracteriza morfológicamente por presentar unas invaginaciones denominadas 'crestas', con multitud de complejos enzimáticos (los componentes de la cadena transportadora de electrones -CTE-, la ATP sintasa) y proteínas que regulan el paso de metabolitos, como el traslocador de nucleótidos de adenina (ANT, del inglés *adenine nucleotide translocator*). La membrana mitocondrial interna resulta especialmente impermeable a iones gracias a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina, característica esencial que le permite soportar un gradiente electroquímico necesario para el desempeño de la función energética. Por el contrario, la membrana externa carece de crestas mitocondriales y, en condiciones fisiológicas, es permeable al paso de iones y de metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6.000 Da debido a la presencia de la proteína porina, conocida en la actualidad como canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, del inglés *voltage dependent anion channel*).

A pesar de la existencia de estos compartimentos, que a primera vista parecen estancos, la estructura mitocondrial permite el paso regulado de proteínas mediante procesos controlados por unos complejos proteicos transmembranales TIM (del inglés, *translocase of the inner membrane*) en la membrana interna y TOM (del inglés, *translocase of the outer membrane*) en la externa- que son capaces de discriminar entre aquellas proteínas que deben dirigirse a la matriz y las que lo harán hasta el espacio intermembranal; en este proceso intervienen algunos miembros de la familia de las chaperonas que se inducen por calor (HSP, del inglés *heat shock proteins*), como la HSP 70 y la HSP 60 (Hood, D.A. 2003).

Existen zonas de contacto entre las membranas mitocondriales, las denominadas 'zonas densas', cuyos componentes proteicos son capaces de interactuar y dar lugar a la formación de un canal, el PPTM (poro de permeabilidad transitoria mitocondrial), del que también forman parte proteínas del citoplasma y de la matriz mitocondrial.

Entre las funciones que se realizan en la mitocondria cabe destacar, según la relación con el tema, la fosforilación oxidativa. La cual tiene lugar en la cadena de transporte electrónico, que es llevada a cabo por un complejo enzimático en el que se genera poder reductor, en forma de NADH y FADH₂, que se utiliza en la cadena respiratoria. Acoplado al transporte de los electrones por diferentes niveles redox, y gracias a la energía liberada, tiene lugar la salida de tres protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranal, lo que origina un gradiente electroquímico entre los dos compartimentos; ello se traduce en una diferencia de pH de una unidad y en una diferencia de potencial eléctrico de 140 mV, lo que supone un incremento de energía libre (ΔG) de aproximadamente -5 Kcal. Esta energía la utiliza la ATP sintasa (complejo V), localizada en la membrana interna, para fosforilar moléculas de ADP, dando lugar a ATP, a la vez que los protones vuelven a la matriz a favor de gradiente. El funcionamiento correcto de este complejo enzimático es esencial para la vida de la célula, de forma que cualquier alteración en las enzimas que lo componen se puede traducir en enfermedades degenerativas.

Son muchos los inhibidores que se conocen de los distintos componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTEM), los cuales se utilizan en estudios sobre su funcionamiento.

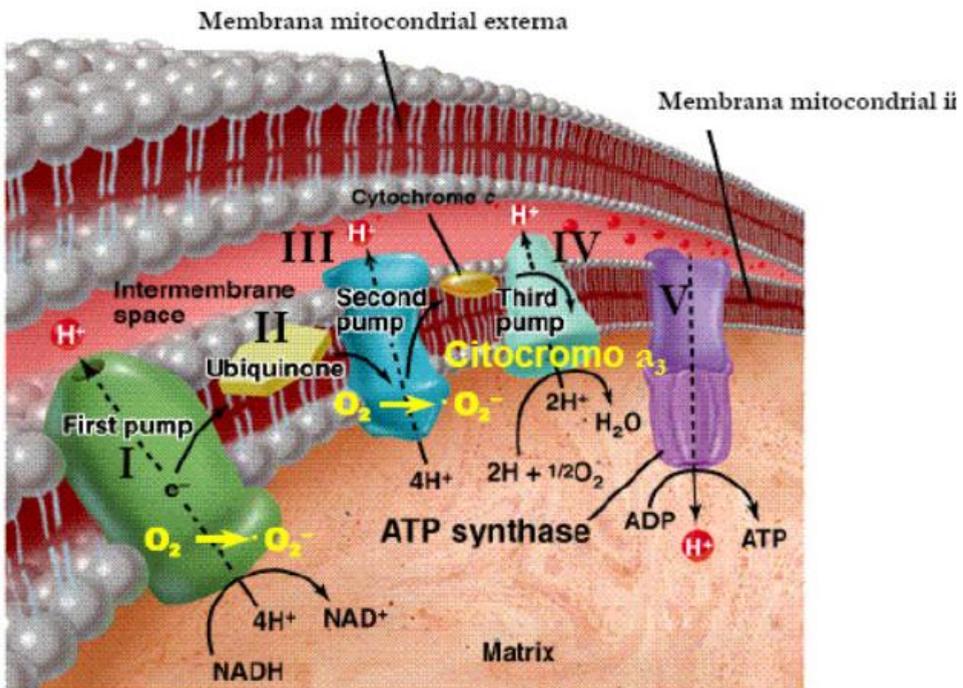


Figura 1.20 Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

1.4.2 Producción de radicales libres en los estados mitocondriales

Se calcula que entre el 2 y el 3 % de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial en estado 4 (cuando todo el ADP está en forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno (Cadenas, E. 1977; Frei, B. 1994). Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital antienlazante.

El citocromo a₃ del complejo IV de la cadena respiratoria es capaz de mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al O₂ y con ello la formación de H₂O (Benzi, G. 1995). Por tanto, la citocromo c oxidasa perteneciente al complejo IV de la cadena respiratoria no produce este radical. Además, exhibe cierta actividad superóxido dismutasa. Sin embargo, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al O₂, pero por el contrario no son capaces de retener el ión superóxido formado (Benzi, G. 1995).

Así pues, se produce •O₂, que puede dismutar a su vez generando peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres (Boveris, A. 1972). La producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno fue inicialmente descrita por Jensen en 1966 (Jensen, P.K. 1966). Estudios posteriores demostraron que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procedía de la dismutación del radical superóxido (Boveris, A. 1972).

Se ha estimado que se producen del orden de 10¹⁰ moléculas de •O₂- por célula y por día (Ames, B.N. 1993). Los procesos de formación de anión superóxido son una serie de reacciones no enzimáticas cuya velocidad aumenta linealmente con la concentración de oxígeno presente en el medio. Utilizando mitocondrias aisladas se puede determinar experimentalmente el consumo de oxígeno por la mitocondria, fenómeno denominado Control Respiratorio (ver figura 1.21). En ausencia de sustrato o de ADP, el consumo de oxígeno causado por la oxidación de sustratos endógenos es bajo. Este estado respiratorio se define como estado 1. Añadiendo un sustrato oxidable, como glutamato o malato, este consumo aumenta levemente (estado 2).

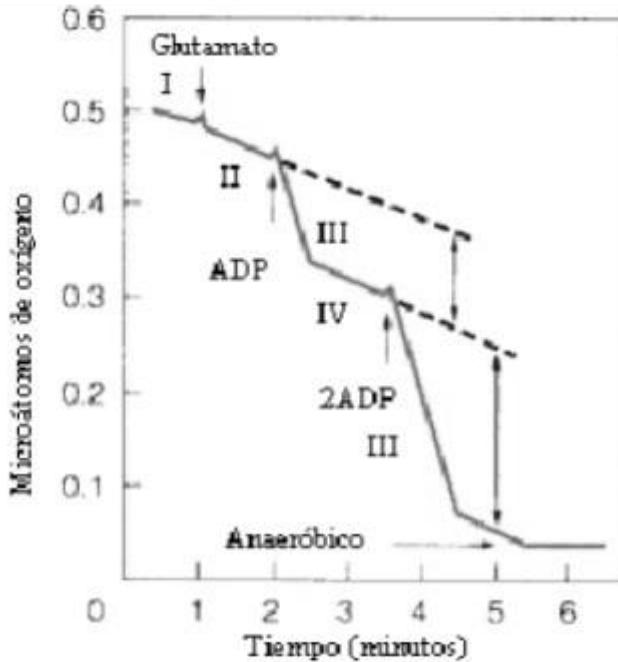
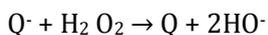


Figura 1.21 Control respiratorio mitocondrial.

El estado 3 de la cadena de respiración mitocondrial se define como el consumo de oxígeno en presencia de sustrato y ADP, es decir, cuando tiene lugar transporte de electrones y síntesis de ATP. El estado 4 se alcanza cuando el ADP ha sido consumido, y el gradiente electroquímico generado por la cadena de transporte electrónico no puede ser empleado en sintetizar ATP. El mantenimiento del Control Respiratorio depende de la integridad de la membrana mitocondrial, si ésta recibe algún daño, se desacopla el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Las mitocondrias que consumen la misma cantidad de oxígeno en estado 3 que en estado 4 están desacopladas (Rickwood, R. 1987a).

La producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno aumenta cuando el aporte de sustratos a la cadena de transporte electrónico mitocondrial excede la demanda energética, es decir, en condiciones cercanas al estado 4, en las cuales el cociente ATP/ADP es elevado. En estas condiciones, aumentan la presión parcial de O_2 y el grado de reducción de los transportadores redox de los complejos I, II, y III, con el consiguiente incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno. Así pues, el estado reducido de los elementos redox de los complejos I y III también contribuyen al aumento de la velocidad de generación de $\bullet O_2^-$ (Skulachev, V.P. 1996). Puesto que se postula que las mitocondrias se encuentran en un estadio intermedio entre el estado 3 y el estado 4 (Brand, M.D. 1987), la generación de especies reactivas de oxígeno por los complejos I y III puede ser de gran importancia en el envejecimiento mitocondrial.

Experiencias *in vitro* demuestran que formas solubles de la semiquinona son capaces de producir $O_2\cdot$ por autooxidación en medios oxigenados, por lo que se propuso que la ubisemiquinona mitocondrial era una de las fuentes de ion superóxido (Cadenas, E. 1977). Sin embargo, consideraciones termodinámicas descartan un papel directo de la dismutación de la ubisemiquinona en la producción de este radical *in vivo*, porque el ciclo redox de la ubiquinona tiene lugar enteramente en la fase apolar de la membrana, y en tales condiciones la autooxidación de las quinonas se ve desfavorecida (Benzi, G. 1995). La ubisemiquinona, en cambio, podría estar implicada en la formación de $HO\cdot$ a partir de H_2O_2 . Puesto que el peróxido de hidrógeno puede atravesar fácilmente las membranas biológicas puede entrar en contacto con la ubisemiquinona y producirse la reacción siguiente (Boveris, A. 1972):



1.4.3 Otras acciones de las mitocondrias

Se sabe que la mitocondria desempeña un papel importante en la regulación de la supervivencia celular y la apoptosis (Nilsen, J. 2006) modulando la homeostasia del calcio intracelular, por ejemplo, además de ser la central metabólica para la vía de los ácidos grasos, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la urea, biosíntesis de aminoácidos, purinas, esteroides, etc. Por lo tanto el contenido mitocondrial y la actividad de la cadena respiratoria es susceptible de ser regulada en función de las condiciones celulares. De modo que deberían responder a los distintos cambios fisiológicos producidos tanto por hormonas, como por factores de crecimiento, cambios en la actividad fisiológica, etc.

1.5 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y ESTRÉS OXIDATIVO

La EA no tiene una etiología perfectamente definida. Una de las hipótesis es la que la relaciona con el estrés oxidativo. A través de las moléculas relacionadas con la EA, como el βA y los NFT se generaría estrés oxidativo, que sería el agente que realmente estaría provocando la EA (Perry, G. 1998). La acumulación progresiva del daño oxidativo a lo largo de los años podría explicar que la progresión de la EA vaya asociada al envejecimiento.

Todas las biomoléculas que forman los seres vivos son susceptibles de ser atacadas por los radicales libres. Se ha comprobado el daño en proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y glúcidos (Stadtman, E.R. 1993; Levine, R.L. 1994). La oxidación en sitios como el núcleo hace que el DNA sea más susceptible de recibir un daño, con las consecuencias que conlleva. Si se daña el DNA puede haber una pérdida de funcionalidad en la célula, cambios que repercutirán también en las células formadas a partir de la dañada. También es importante el daño al DNA

mitocondrial, ya que la mitocondria como principal productora de radicales libres es fundamental para entender el estrés oxidativo.

1.5.1 Daño a biomoléculas

Las proteínas son una de las principales biomoléculas diana de los radicales libres. Los grupos carbonilo que se detectan en pacientes con EA son una confirmación del daño oxidativo que reciben. La detección en hipocampo de pacientes con EA (figura 1.22) reveló que la oxidación proteica que sufren está ligada a los ovillos neurofibrilares, citoplasma, y núcleo de las neuronas y de células de la glía (Smith, M.A. 1996).

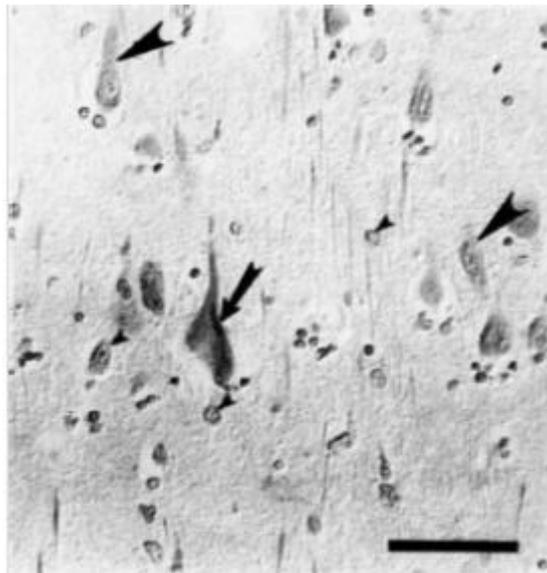


Figura 1.22 Grupos carbonilo (flechas: ovillo neurofibrilar; cabeza de flecha: citoplasma; cabeza de flecha pequeña: núcleo) en hipocampo de pacientes con EA. Tomado de (Smith, M.A. 1996).

El daño oxidativo a lípidos se ha observado también en el cerebro de pacientes con EA. A través de la medida del hidroxinonal se ha observado una clara relación entre este daño y los ovillos neurofibrilares (figura 1.23) (Sayre, L.M. 1997).

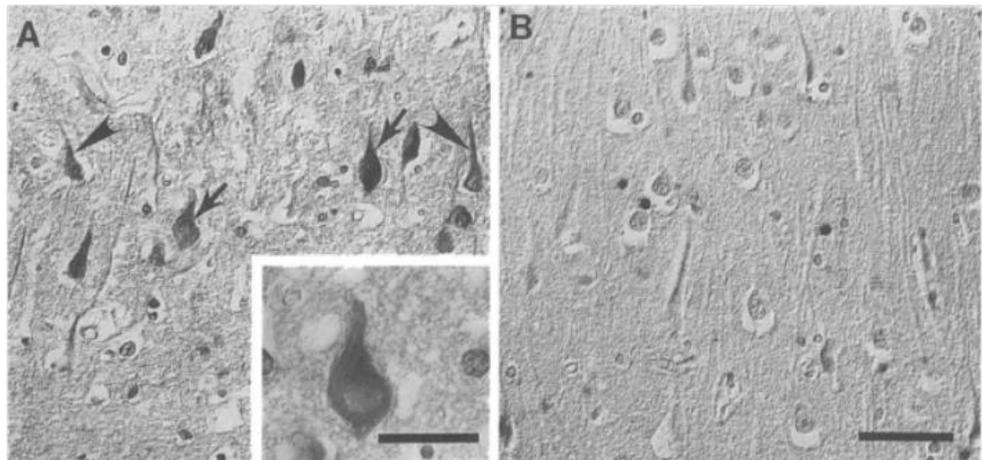


Figura 1.23 Daño oxidativo a lípidos en cerebro de pacientes con EA. A: paciente de EA; B: paciente control. Tomado de (Sayre, L.M. 1997).

El daño oxidativo a proteínas y lípidos puede ser debido también a la formación de los AGEs, que está mediada por reacciones de oxidación. El principal AGE que se acumula *in vivo* es el N-carboximetil-lisina, y se detecta en la EA al igual que su precursor el hexitol-lisina. Lo podemos ver asociado a los ovillos neurofibrilares (figura 1.24). Su formación se debe tanto a reacciones de glicosilación como a reacciones de lipoperoxidación (Castellani, R.J. 2001).

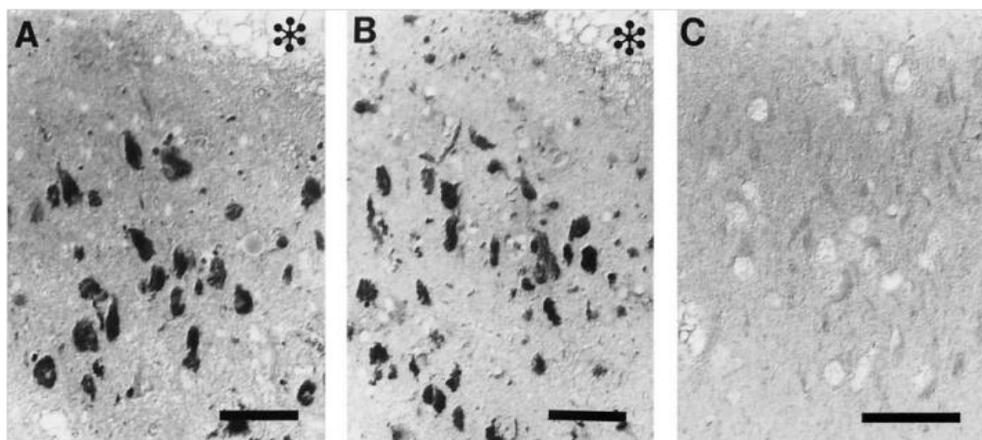


Figura 1.24 AGEs en la EA. A: N-carboximetil-lisina en la EA; B: hexitol-lisina en la EA; C: paciente control. Tomado de (Castellani, R.J. 2001).

El daño oxidativo a ácidos nucleicos también parece estar relacionado con lo que hemos comentado. La 8-hidroxidesoxiguanosina (8HdG) y 8-hidroxiguanosina (8HG) son marcadores de daño al DNA y RNA respectivamente. Su detección en tejido cerebral ha permitido comprobar que existen niveles más elevados en casos

de EA que en casos sin ninguna patología neurodegenerativa asociada (figura 1.25). También más daño al RNA que al DNA, ya que el RNA está localizado en el citoplasma, lo que es compatible con que la principal fuente de estrés oxidativo en la EA es la mitocondria (Nunomura, A. 1999).

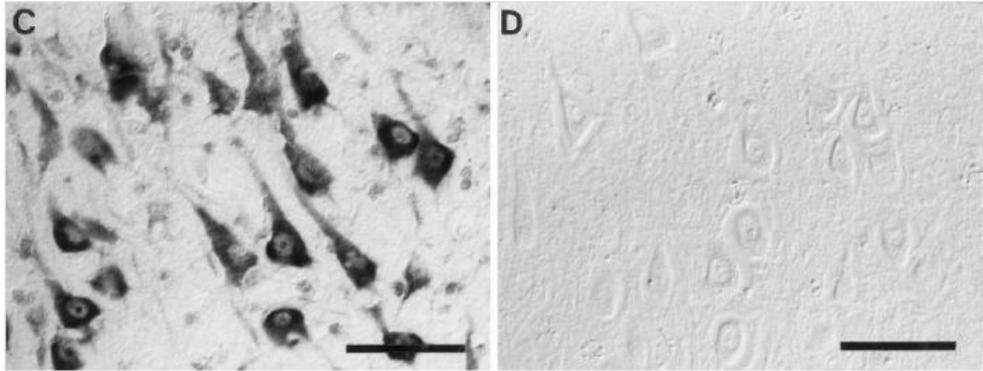


Figura 1.25 Daño oxidativo a ácidos nucleicos en hipocampo de pacientes con EA. C: paciente de EA; D: paciente control. Tomado de (Nunomura, A. 1999).

No obstante, se ha visto que con la formación de las placas los niveles de 8HG disminuyen, sugiriendo un posible efecto antioxidante (Odetti, P. 1998). La hipótesis para tratar de explicarlo es que se agruparía el β A extracelularmente, liberando así a las células del estrés oxidativo que provoca el péptido, y evitando las complicaciones intracelulares asociadas al estrés oxidativo que provoca.

1.5.2 Relación del β -amiloide con el estrés oxidativo asociado a la enfermedad de Alzheimer

El β A es neurotóxico. La toxicidad se da de forma intracelular, de manera que las placas de β A por sí mismas no parecen ser las causantes del estrés oxidativo observado, ya que son extracelulares. Es el β A intracelular el que tiene un efecto directo sobre las mitocondrias, tal y como se ha sugerido en multitud de trabajos (Lustbader, J.W. 2004; Reddy, P.H. 2005; Chen, J.X. 2010; Viña, J. 2010). Actúa bloqueando la cadena de transporte de electrones, inhibiendo el complejo IV, con el consiguiente aumento del radical O_2^- (Morais Cardoso, S. 2002). Al entrar en acción la SOD para detoxificarlo también producirá a su vez un aumento en la tasa de producción de peróxido de hidrógeno, que asimismo es una fuente de radicales libres (Lloret, A. 2008). Estos radicales, a su vez aumentarán el daño oxidativo a los distintos componentes celulares, hasta el punto en que la célula dejará de ser funcional, y sufrirá un proceso apoptótico.

La presencia de grupos hemo está relacionada con la cadena de transporte electrónico. La inhibición de estos grupos por parte del β A sería el motivo por el

cual la cadena de transporte electrónico deja de funcionar correctamente (Atamna, H. 2004).

El β A provoca una serie de acciones que van a llevar a una situación de estrés oxidativo. Se comprueba al ver que aumenta la oxidación y nitratación de proteínas mitocondriales, y promueve la liberación de citocromo C, otro marcador de estrés oxidativo (Lloret, A. 2008).

1.5.3 Relación de p38 con el estrés oxidativo asociado a la enfermedad de Alzheimer

Las MAP quinasas son enzimas encargadas de la fosforilación que permitirá mantener la estructura de los microtúbulos de la célula. Por tanto su funcionamiento estará implicado en la fosforilación de tau. Tiene una importancia mayor la quinasa p38 (Reynolds, C.H. 1997; Cuenda, A. 2007), considerada un marcador de estrés oxidativo (Dolado, I. 2007), porque se activa en respuesta a situaciones de estrés oxidativo como una medida antioxidante. Los niveles altos de p38 indican que hay fosforilación de tau, lo que es una posible explicación para la formación de NFT mediada por el estrés oxidativo.

El β A también está relacionado con p38. Como hemos comentado antes, el β A induce a las mitocondrias a la producción de radicales libres (Morais Cardoso, S. 2002), y también lleva asociada la expresión de p38 de forma dependiente de la concentración del péptido. También se relaciona a la inversa, la inhibición de la expresión de p38 disminuye la toxicidad del β A (Zhu, X. 2005). La inhibición de la ruta de las MAP quinasas previene la muerte celular provocada por el β A (Valles, S.L. 2008).

Todo esto nos sugiere que la MAP quinasa p38 juega un papel fundamental en la regulación de los efectos del β A asociados al estrés oxidativo.

1.6 POSIBLES TRATAMIENTOS PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: BEXAROTENO Y FITOESTRÓGENOS

1.6.1 Bexaroteno y enfermedad de Alzheimer

Este medicamento se usa principalmente en el tratamiento del linfoma cutáneo de células T (Vademécum 2003). Poco se ha investigado relativo a la EA. La relación se desprende a partir de un artículo de reciente publicación (Cramer, P.E. 2012), en el que se demuestra que el tratamiento con bexaroteno es beneficioso para aliviar la patología amiloidea en modelos animales para la EA.

La importancia que se le puede atribuir se debe a que es un agonista del receptor retinoide X (RXR), el cual funciona formando un dímero con el receptor activado de proliferación de los peroxisomas γ (PPAR γ), que hace que se sobreexpresen la apolipoproteína E. Esta sobreexpresión induce la degradación del β A (Jiang, Q. 2008), y con ello induce una mejora de la cognición (Cramer, P.E. 2012).

1.6.2 Fitoestrógenos y enfermedad de Alzheimer

Los fitoestrógenos se han definido como cualquier sustancia vegetal o metabolito que induce respuestas biológicas en vertebrados y pueden imitar o modular la acción de los estrógenos endógenos, por lo general mediante la unión a receptores de estrógeno (Shemesh, M. 1972; Verdeal, K. 1980; Madej, A. 2002). Este hecho puede ser debido, como se puede apreciar en la figura 1.26, a la gran similitud en sus estructuras químicas (Fowler, M.E. 1983). Tienen la particularidad de que una dieta rica en fitoestrógenos o un tratamiento farmacológico no tienen efecto feminizante en la población masculina (Messina, M. 2010).

Los fitoestrógenos son compuestos fenólicos, y en los alimentos se pueden dividir en dos grupos. Por un lado, los flavonoides que se subdividen en isoflavonas, coumestanos y flavonoides prenilados. En segundo lugar, los no flavonoides, que comprenden los lignanos (tabla 1.5) (Sunita, P. 2011). El grupo más estudiado son las isoflavonas, principalmente, las derivadas de la soja como son: genisteína y daidzeína (Fukutake, M. 1996; Bingham, S.A. 1998). Aunque otras legumbres como los garbanzos y guisantes verdes también contienen isoflavonas, los niveles están por lo menos 2 órdenes de magnitud por debajo de los que se encuentran en la soja (Liggins, J. 2000).

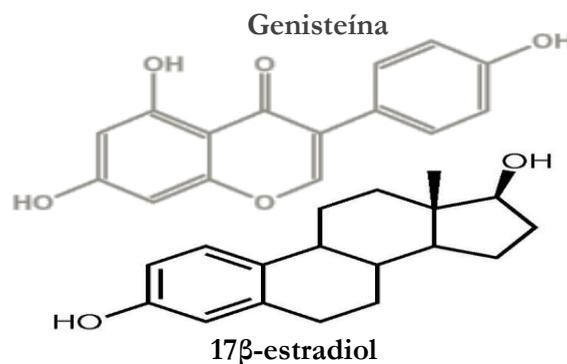


Figura 1.26 Similitud estructural entre el β -estradiol y la genisteína.

Grupo	Compuestos	Alimentos
Lignanós	Enterodiol Enterolactona	Granos enteros Cereales Lentejas
Isoflavonas	Genistéina Daidzéina Equol	Granos de soja Harina de soja Tofú
Cumestanos	4'-cumestrol Metoxycumestrol	Alfalfa Coles

Tabla 1.5 Clasificación y origen de los principales fitoestrógenos.

Las isoflavonas son sin duda las que mayor interés despiertan del grupo de los fitoestrógenos. Casi todos los datos conocidos sobre los fitoestrógenos provienen del estudio de las isoflavonas, especialmente de la genistéina y la daidzéina, que son sus representantes más importantes.

1.6.3 Epidemiología

Existen varios estudios epidemiológicos y experimentales que demuestran que el alto contenido de soja en la dieta está asociado a una menor incidencia de ciertas patologías, como son la enfermedad cardiovascular, algunos cánceres hormonodependientes, como el de mama, endometrio, próstata y colon, la sintomatología climatérica, la osteoporosis, y las alteraciones del ciclo menstrual (Adlercreutz, H. 1984; Setchell, K.D. 1984; Cassidy, A. 1994; Messina, M.J. 1994; Adlercreutz, C.H. 1995; Barnes, S. 1998; Lissin, L.W. 2000; Adlercreutz, H. 2002; Ma, D.F. 2008).

Estos estudios han comparado la dieta occidental con la dieta oriental, especialmente la de Japón y otros países asiáticos, encontrando que el consumo de isoflavonas es significativamente mayor en estos países (Adlercreutz, H. 1990). Los asiáticos consumen de 20 a 80 mg de genistéina por día en la dieta habitual, por el contrario, el promedio de americanos ingiere sólo de 1 a 3 mg por día (Barnes, S. 1995). Al determinar la concentración de lignanos e isoflavonas en plasma y orina, se ha encontrado relación entre las bajas concentraciones de estos compuestos y la mayor incidencia y prevalencia de las enfermedades anteriormente citadas (Adlercreutz, H. 1993; Adlercreutz, H. 1997; Shoff, S.M.

1998). Esto se ve reforzado aún más cuando descubren que inmigrantes japoneses en los Estados Unidos, que cambian sus hábitos dietéticos y al cabo del tiempo igualan su riesgo con respecto a la población general (Yamamoto, S. 2003).

Todo esto indica un claro efecto beneficioso de la dieta rica en fitoestrógenos en la salud.

1.6.4 Mecanismo de acción

Debido a su similar estructura química al 17β -estradiol, tienen la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos (Setchell, K.D. 2001) siendo mayor su afinidad por el ER- β que por el ER- α (Kuiper, G.G. 1998). En este punto pueden actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos (Bingham, S.A. 1998). Además, los fitoestrógenos pueden ejercer sus efectos por una vía no hormonal. Así pues, los mecanismos de acción de estos compuestos se pueden dividir en dos, dependiendo de si son hormono-dependientes (mediados por receptor estrogénico) o no hormonales (independientes de receptor estrogénico) (Magee, P.J. 2004).

De estos posibles mecanismos de acción de los fitoestrógenos, tenemos por una parte que su actividad estrogénica se cree que es responsable de la mayoría de sus efectos beneficiosos sobre los procesos hormono-dependientes. Procesos como la reducción de la pérdida de la masa ósea asociada a la osteoporosis, la mejoría de los síntomas menopáusicos y la reducción de los niveles de LDL en plasma (Kuiper, G.G. 1997; Tikkanen, M.J. 1998). Por otro lado, también se han descrito algunos de sus efectos no relacionados con los receptores estrogénicos. Estos efectos incluyen su actividad antiproliferativa, inhibición de la tirosin kinasa C, ADN topoisomerasa II, actividad antioxidante, inhibición de la angiogénesis y la inhibición de la prostaglandin sintasa (Akiyama, T. 1987; Degen, G.H. 1990; Fotsis, T. 1993; Markovits, J. 1995; Wei, H. 1995; Arora, A. 1998).

1.6.5 Fitoestrógenos como antioxidantes

A los fitoestrógenos se les han atribuido funciones antioxidantes ya que se ha visto que las isoflavonas de soja son capaces de reducir el estrés oxidativo y mejorar parámetros relacionados con el envejecimiento (Mahn, K. 2005; Borras, C. 2006; Azadbakht, L. 2007; Hsieh, H.M. 2009).

Se ha demostrado que el consumo de soja en animales, o el tratamiento con genisteína en células, tiene la capacidad de frenar la producción de radicales libres, además de sobreexpresar genes antioxidantes, como los que codifican para las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y reductasa

Introducción

(Wiseman, H. 2000; Sierens, J. 2001; Adlercreutz, H. 2002; Mahn, K. 2005; Vina, J. 2005; Borrás, C. 2006).

Por tanto, pueden constituir una alternativa interesante a las terapias hormonales sustitutivas, debido a los grandes efectos beneficiosos que se le atribuyen y muy pocos efectos perjudiciales (Vina, J. 2011).

1.6.6 Relación con la enfermedad de Alzheimer

Hay pocos estudios que relacionen la EA con los fitoestrógenos en humanos. Se ha hipotetizado que la dieta puede ser un factor muy importante (Berrino, F. 2002), pero no está demostrado que sea así. Se cree que los fitoestrógenos administrados a través de la dieta, como la soja y el vino, pueden mejorar las capacidades cognitivas, pero no está demostrado en humanos (Lee, Y.B. 2005; Karvaj, M. 2007). En relación a pacientes con EA no está claro la relación entre las 2 cosas ni si reduce el riesgo de padecer dicha enfermedad.

La cantidad de factores (alimentación, tabaco, nivel sociocultural...) a los que está expuesta una persona con riesgo de padecer EA hacen que sea muy difícil concretar el papel de la dieta.

La capacidad antioxidante de los fitoestrógenos les confiere la facultad de proteger frente al estrés oxidativo que se asocia a la EA. En diversas hipótesis se ha sugerido que la causa de la EA es el estrés oxidativo (Smith, M.A. 1996; Perry, G. 1998; Viña, J. 2007), de manera que la prevención de este daño frenaría la progresión de la EA.

En modelos animales sí que se ha demostrado que la dieta rica en isoflavonas puede ser beneficiosa, revirtiendo los déficits cognitivos y aumentando la capacidad antioxidante (Hsieh, H.M. 2009; Bansal, N. 2010). No está claro si son las isoflavonas en general o si es en concreto alguna de ellas. Hay evidencia a favor de las isoflavonas en general en experimentos *in vitro* (Pan, M. 2012), donde se ve que tanto la daidzeína como la genisteína tienen efectos neuroprotectores y ayudan a la proliferación neuronal. Como se ha visto en (Westmark, C.J. 2013) la daidzeína puede ser perjudicial, no así la genisteína, aumentando los trastornos del comportamiento. La genisteína protege frente a la toxicidad inducida por el βA (Luo, S. 2012), y experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, indican que la genisteína podría prevenir la aparición de la EA al prevenir la formación de radicales libres por la mitocondria y protegerla de la toxicidad del βA (Vina, J. 2007; Valles, S.L. 2008). Experimentos *in vivo* en modelos animales indican que la administración de genisteína mejora la cognición y ayuda a eliminar el βA del cerebro, eliminando este péptido del sistema nervioso se reduce el estrés

oxidativo y ayudará a reducir el daño neuronal (Bagheri, M. 2011; Bagheri, M. 2012).

1.7 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y CONSUMO DE GLUCOSA CEREBRAL

1.7.1 Tomografía por emisión de positrones.

La Tomografía por Emisión de Positrones (PET) es una técnica de medicina nuclear con características claramente diferenciadas respecto a otros métodos de diagnóstico por la imagen. La información que proporciona la PET es de tipo molecular, constituyendo un perfecto complemento de otras técnicas de imagen, tanto funcionales (SPECT, *Single Photon Emission Computed Tomography*) como morfoanatómicas (RMN, TAC, RX convencional, etc.). Al poder incorporar trazadores a cualquier sustrato biológico permite estudiar y cuantificar regionalmente fenómenos biológicos, fisiológicos, bioquímicos y farmacológicos, de forma inocua en la práctica clínica habitual.

Sus principales indicaciones tienen su ámbito dentro de la oncología (Chen, W.P. 2005), la neurología (Kepe, V. 2006) y la cardiología (Goodman, M.M. 1981), aunque se está incrementando su uso en investigación y desarrollo de nuevos fármacos, genética, etc. (Gambhir, S.S. 1998).

En la fisiopatología de todas las enfermedades, las alteraciones metabólicas son más precoces que los cambios anatómicos, por lo que disciplinas como la biología molecular y los métodos de imagen metabólica (entre los que se incluye la PET), deben indicar la presencia de determinadas enfermedades con más precocidad que las técnicas de estudio anatómicas, como la tomografía axial computerizada (TAC) o la resonancia magnética (RM).

La PET utiliza moléculas marcadas con isótopos radioactivos, administradas a pacientes *in vivo* para su posterior detección externa, representando en imágenes la distribución corporal de dichas moléculas. Este mismo principio es aplicado, igualmente, en equipos diseñados específicamente para animales de investigación.

La molécula más comúnmente utilizada es la flúor-2- deoxi-D-glucosa (FDG) marcada con F18. La FDG es un análogo de la glucosa. Tanto la glucosa como la FDG atraviesan la barrera hematoencefálica y entran fácilmente en las células empleando los transportadores de glucosa. Tras su entrada, ambos compuestos inician la vía glicolítica siendo la FDG fosforilada a FDG-6-fosfato por la hexoquinasa. La presencia del átomo de flúor, sustituyendo al grupo OH en el carbono 2 de la molécula de glucosa, impide su isomerización a fructosa- 6-fosfato, por lo que la FDG no participa ni en la glucólisis ni en la síntesis de

glucógeno. Queda atrapada en el interior de la célula tras ese primer paso de la glucólisis y la retención de FDG-6-fosfato es proporcional al consumo tisular de glucosa. Se muestra el fundamento metabólico para el uso de la FDG en la figura 1.27.

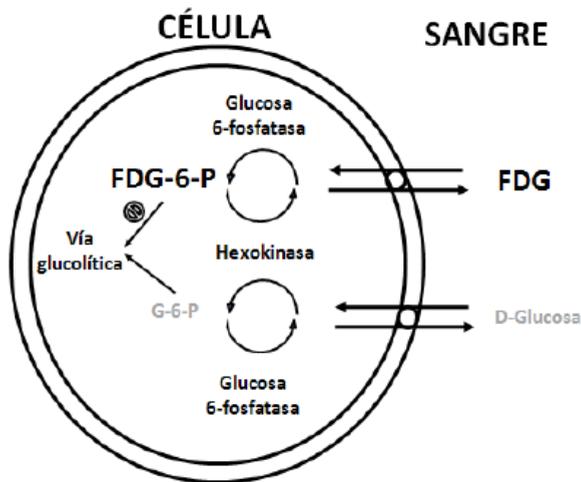


Figura 1.27 Metabolismo de la FDG y glucosa.

1.7.2 Relación con la Enfermedad de Alzheimer

En el diagnóstico de la EA se requiere demostrar la existencia de deterioro cognitivo crónico y progresivo en pacientes adultos o ancianos, sin otras causas subyacentes que puedan explicar este fenómeno. Sin embargo, utilizando este criterio clínico es difícil diferenciar entre enfermedad de Alzheimer y otras causas de deterioro, como el deterioro cognitivo leve (DCL) en etapas tempranas de la enfermedad. Por eso, las imágenes funcionales de cerebro obtenidas en técnicas como la PET son tan útiles para establecer el diagnóstico diferencial (Newberg, A. 2002).

En los primeros estudios con PET en pacientes con enfermedad de Alzheimer, se observó que éstos presentaban una disminución global del metabolismo de la glucosa del orden de 20 a 30% con relación a los controles de edad equivalente (Newberg, A. 2002). En otros estudios se observó además del hipometabolismo global, un mayor compromiso bilateral de la región temporo-parietal (Bonte, F.J. 1990).

El volumen del hipocampo con resonancia magnética y el metabolismo de la glucosa de la región entorrinal con PET-FDG son dos excelentes marcadores para diferenciar entre ancianos sanos y con DCL. Sin embargo, para diferenciar entre

pacientes con DCL y EA es mejor la región neocortical temporal (De Santi, S. 2001).

En la siguiente figura podemos ver las reducciones metabólicas progresivas en el hipocampo (flechas rojas) y en la corteza temporal (flechas blancas). Se pasa de un estado *normal* a un estado de EA pasando por un estado intermedio considerado como deterioro cognitivo leve (DCL).

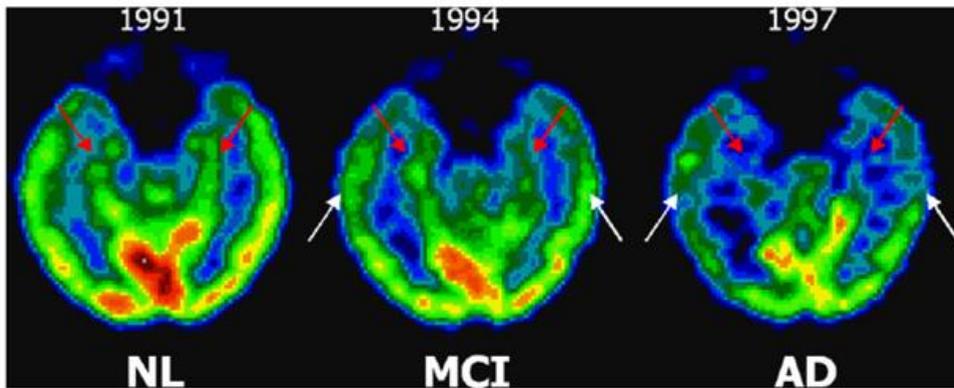


Figura 1.28 Reducciones metabólicas progresivas en el hipocampo.

Esto es lo que se denomina el patrón típico de la enfermedad de Alzheimer y puede ser especialmente pronunciado en pacientes menores de 65 años. El patrón crítico descrito es altamente predictivo de esta enfermedad, sin embargo, no es exclusivo: puede verse en enfermedad de Parkinson, hematoma subdural parietal bilateral, infarto parietal bilateral y radioterapia parietal bilateral (Mazziotta, J.C. 1992).

Así, recientemente se están usando diferentes moléculas buscando más especificidad para este deterioro cognitivo y no solamente FDG. Se han sintetizado ya moléculas que no son marcadores del consumo de glucosa cerebral, si no que se trata de marcadores de la acumulación de β A. Una de estas moléculas es un derivado de la tioflavina-T (PIB), y otra molécula es 2-(1-{6-[2- 18 F fluoroetil](metil)amino]-2-naftil}etiliden)malonitrilo (18 F FDDNP), que además de unirse a β A también se une a la proteína tau, facilitando así la obtención de un diagnóstico diferencial.

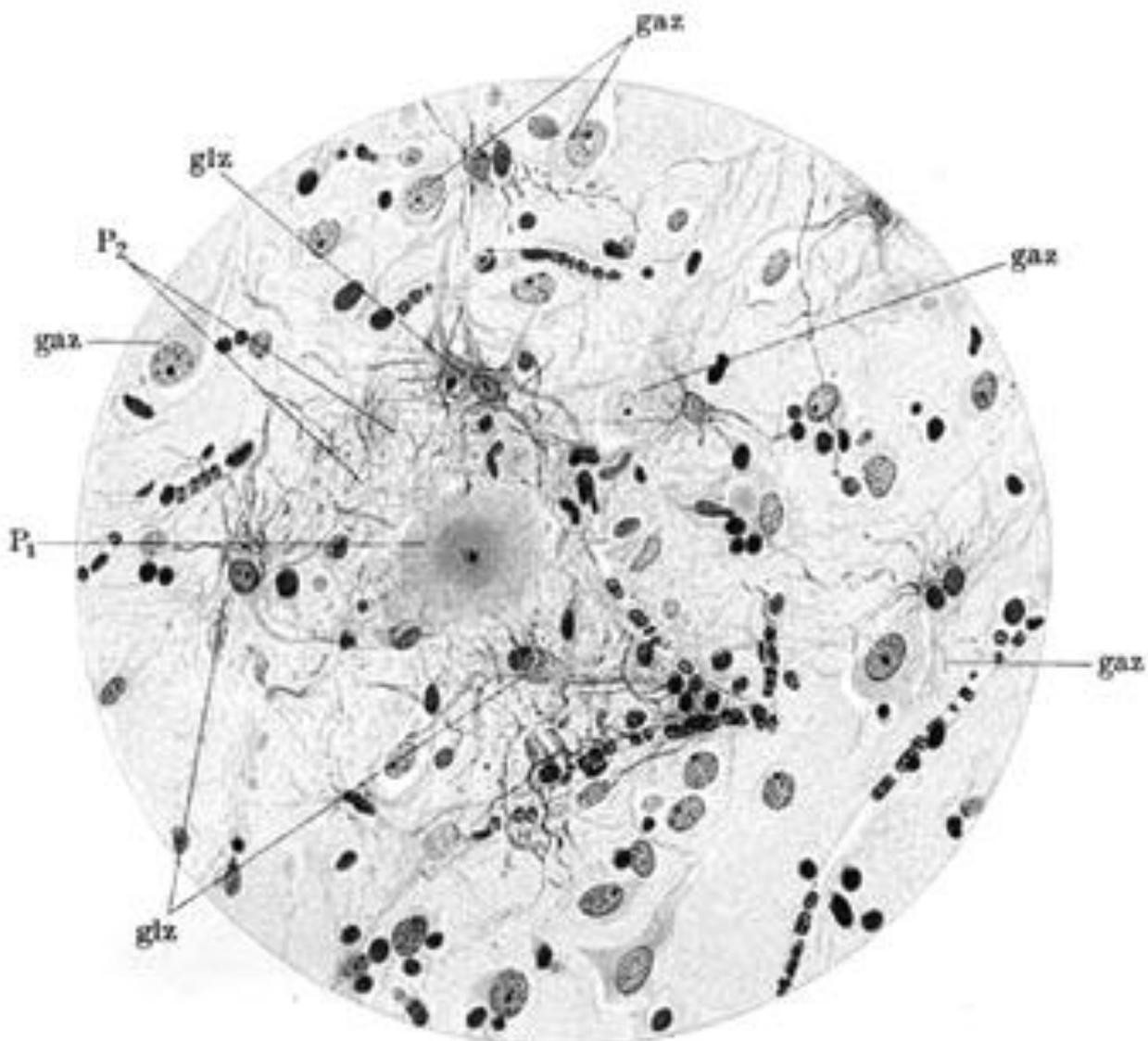


Fig. 1.

2 **OBJETIVOS**

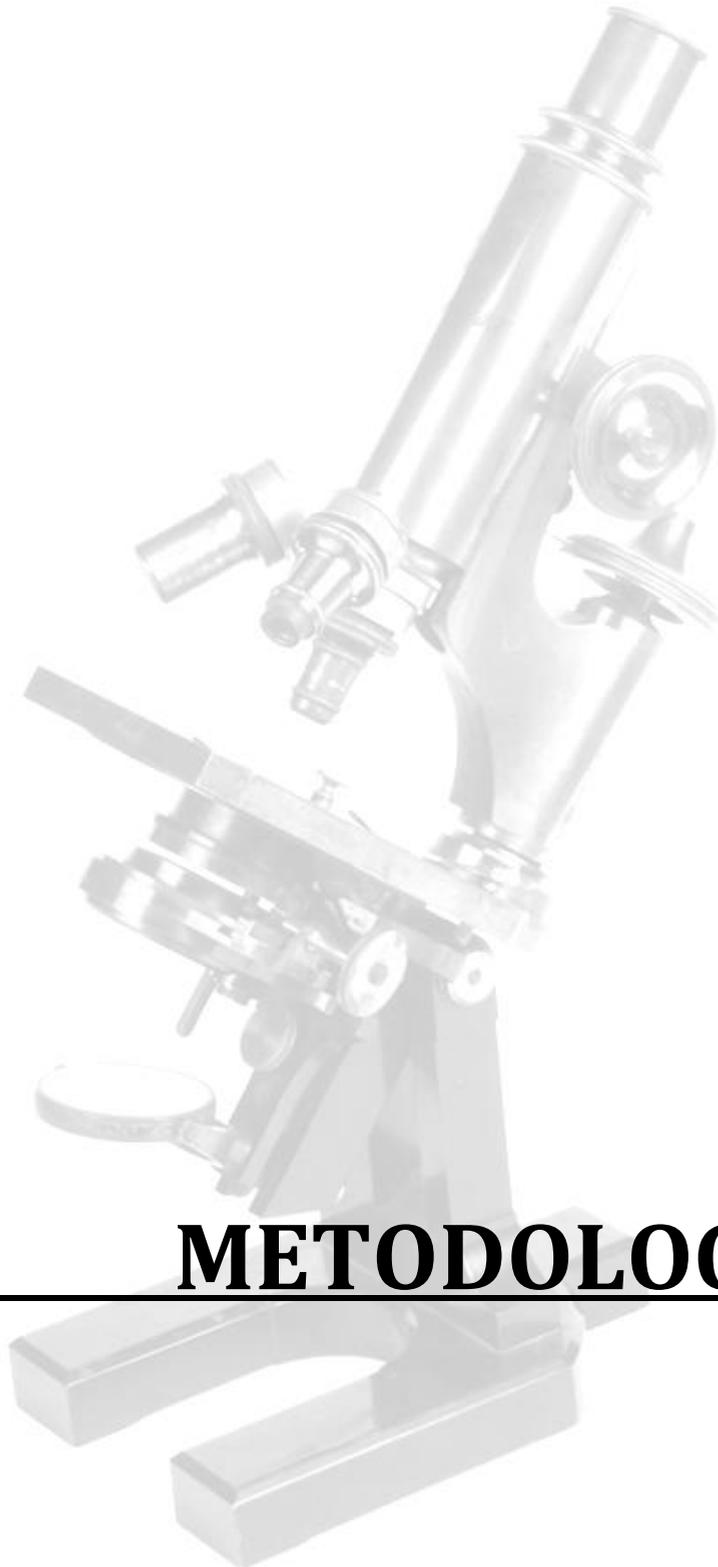
El objetivo principal de la presente tesis es estudiar el estrés oxidativo hepático y los efectos del tratamiento con bexaroteno y/o genisteína asociados a la enfermedad de Alzheimer en un modelo animal.

Tenemos una serie de objetivos concretos que nos ayudarán a la consecución del objetivo principal:

1. Estudio del estrés oxidativo hepático en el ratón APPswe/PS1dE9 en comparación con ratones *wild type* en distintas edades y en ambos sexos, medido como:
 - Determinación de la producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno.
 - Determinación de los niveles de carbonilación proteica.
 - Determinación de los niveles de malondialdehído.
2. Caracterización del consumo cerebral de glucosa en el ratón APPswe/PS1dE9 en comparación con ratones *wild type* en distintas edades y en ambos sexos.
3. Determinación de la vía que comunica el sistema nervioso y el hígado en ratones APPswe/PS1dE9 en comparación con ratones *wild type*, machos y en distintas edades, medida como:
 - Determinación de niveles del transportador LRP1 en hígado y cerebro.
 - Determinación de niveles del transportador RAGE en cerebro.
 - Medida de la concentración en sangre de beta-amiloide 40.
4. Determinación de los efectos agudos del tratamiento con bexaroteno y/o genisteína sobre la concentración de beta-amiloide 40 y 42 en cerebro de ratones hembra APPswe/PS1dE9 ovariectomizadas.
5. Determinación de los efectos agudos del tratamiento con bexaroteno y/o genisteína sobre las placas amiloideas en cerebro de ratones hembra APPswe/PS1dE9 ovariectomizadas, medidos como:
 - Número de placas amiloideas.
 - Área de las placas amiloideas.
 - Tamaño de las placas amiloideas.
6. Determinación de los efectos agudos del tratamiento con bexaroteno y/o genisteína sobre la concentración de beta-amiloide 40 en sangre de ratones hembra APPswe/PS1dE9 ovariectomizadas.
7. Determinación de los efectos agudos del tratamiento con bexaroteno y/o genisteína sobre el mecanismo de eliminación del beta-amiloide en cerebro de ratones hembra APPswe/PS1dE9 ovariectomizadas, medido como:
 - Niveles del factor de transcripción PPAR γ .

Objetivos

- Niveles de la apolipoproteína E.
- 8. Determinación de los efectos agudos del tratamiento con bexaroteno y/o genisteína sobre los niveles de transaminasas en sangre de ratones hembra APPswe/PS1dE9 ovariectomizadas, medidas como:
 - Niveles de gamma-glutamyl transpeptidasa.
 - Niveles de glutamato-oxalacetato transaminasa.
 - Niveles de glutamato-piruvato transaminasa.



3 METODOLOGÍA

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animales de experimentación

Los animales que utilizamos son los ratones doble transgénicos APP^{swe}/PS1^{dE9} para la EA (Jankowsky, J.L. 2004) cuya cepa de origen es C57BL/6J. Los animales fueron comprados a los laboratorios Jackson (Estados Unidos), (<http://jaxmice.jax.org/strain/004462.html>) y criados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universitat de València.

Este animal tiene insertados 2 transgenes. Uno es un híbrido entre ratón y humano para la APP (Mo/HuAPP695^{swe}), y que engloba las mutaciones humanas “suecas” K595N/M596L. El otro es un alelo mutante para la PS1 humana (PS1-dE9) que es una delección para el exón 9. Ambos están vehiculados para que se expresen en el sistema nervioso central.

Las dos mutaciones están asociadas al desarrollo de la EA de forma temprana en humanos. La mutación Mo/HuAPP695^{swe} hace que se sobreexpresa la proteína APP, lo que facilita el camino para la β -secretasa codificada por la PS1-dE9, encargada de cortarla y formar el β A (ver apartado 1.1.3.1 de la introducción). Los 2 genes se expresan de manera conjunta, ya que se insertan juntos en hemizigosis en los cromosomas autosómicos del ratón, y se regulan por el mismo promotor en el ratón, de forma que se comportan como si se tratara de un solo *locus*.

El fenotipo que desarrollan les hace padecer una serie de particularidades relacionadas con la enfermedad de Alzheimer en humanos:

- Depósitos de β A, que se pueden observar en el hipocampo a partir de los 6 meses de edad.
- Placas de β A en todo el cerebro a partir de los 9 meses. Ocasionalmente pueden encontrarse depósitos en el cerebro a los 6 meses.
- El ratio del péptido β A de 40:42 aminoácidos es de 1:2 en el sistema nervioso central.

La colonia se mantiene cruzando ratones *wild type* con ratones transgénicos, de forma que la descendencia sea siempre hemizigota para los 2 genes. Se estabulan machos y hembras por separado, excepto en los casos en que deban estar en cruce para mantenimiento de la colonia. Viven con un ciclo circadiano de 12 horas de luz 8:00-20:00 y 12 de oscuridad 20:00-08:00. Los ratones dispusieron de agua y comida *ad libitum*.

El diseño de los experimentos fue presentado y aprobado por el comité de ética de la Universitat de València, con el código A134807222326.

3.1.2 Aparatos

- Balanzas:
 - Balanza de precisión Sartorius, modelo 6110 balance, sensibilidad ± 0.0001 g.
 - Balanza de precisión Sartorius, modelo Aculab, sensibilidad ± 0.0001 g.
 - Balanza Gram precision, modelo AHZ, sensibilidad $\pm 0,01$ g.
- Centrífugas:
 - Centrífuga Hettich, rutina 35 R para eppendorfs.
 - Centrífuga Thermo scientific, Sorvall legend XTR.
 - Centrífuga Sigma, 1-14.
- Espectrofotómetro:
 - Espectrofotómetro Cecil, CE3021, 3000 series.
 - Espectrofotómetro de placas Molecular Devices, spectramax plus 384.
- Sistema de purificación de agua:
 - Marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-R.
 - Marca Elga, purelab flex.
- pHmetro:
 - Marca Crison, pHmeter, GLP21.
- Fluorímetro:
 - Marca Perkin Elmer, modelo LS 50B.
- Homogeneizador:
 - Marca IKA-WERK, modelo Janke y Kunkel RW 20 DZH.
- Cubetas de electroforesis:
 - Cubeta de la casa BIO-RAD.
- Fuentes de alimentación de electroforesis:
 - Marca BIO-RAD, modelo PowerPac Basic.
- Dispositivo fotográfico:
 - Sistema fotográfico marca Polaroid, modelo MP 4+.
 - Image quant LAS 4000, GE-Healthcare Bio-Sciences.
- Equipo de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):
 - Cromatógrafo DIONEX modelo Ultimate 3000, compuesto por los siguientes elementos:
 - Bomba.
 - Autoinyector.
 - Detector UV.
 - Detector de fluorescencia RF 2000.
 - Controlador del equipo: software Chromoleon.
 - Columna DIONEX Acclaim Polar advantage. C16 $5\mu\text{m}$ 120 A, 4.6×150 mm.

- Campana de gases:
 - Marca Crumair, 1100-G A.
 - Marca Burdinola, OR-ST 1200.
- Baño seco:
 - Marca Stuart, Block heater, SBH 130 D.
- Agitador magnético:
 - Marca Stuart, Hotplate stirrer, SB 162-3.
- Sonicator:
 - Marca MSE.
- Baño caliente:
 - Marca Clifton, modelo shaking bath, con agitación regulable.
- Congeladores:
 - -80°C marca Revco, modelo ultima II.
 - -80°C marca Platinum 500.
 - -20°C marca Liebherr, modelo Comfort Nofrost.
 - 2-4°C Nevera Lynx.

3.1.3 Reactivos

- Determinación de proteínas:
 - Se empleó el “Protein ASSAY Kit” de Sigma-Aldrich Química, que contiene el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin.
- Proteínas carboniladas:
 - Kit OxyBlot protein oxidation detection kit de Millipore.
- ELISA:
 - Kits “Human A β 40 ELISA” (ref. KHB3481) y “Human A β 42 ELISA” (ref. KHB3441) de invitrogen.
- Enzimas:
 - Peroxidasa de rábano, Roche 10108090001.
 - 18F-Fluorodesoxiglucosa (18F-FDG).
- Anestesia:
 - Isoflorano.
- Analgesia:
 - Buprenorfina y meloxicam.
- Bexaroteno.
- Genisteína, Sigma ref: G 6649.
- El resto de reactivos se obtuvieron de los laboratorios: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania), Molecular Probes, Panreac, Merck Biochemica (Alemania).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Técnicas quirúrgicas

3.2.1.1 Sacrificio de los animales

Los animales se sacrificaron entre las 9:00 y 10:00 horas de la mañana del día correspondiente. El sacrificio se realizó por dislocación cervical del animal, sin utilizar ninguna sustancia anestésica y/o tranquilizante.

3.2.1.2 Extracción y conservación de muestras

Una vez sacrificado el animal, se procedió inmediatamente a la recogida de la mayor cantidad posible de sangre en un tubo con anticoagulante, heparina o EDTA, según que parámetro se vaya a medir, heparina para medir GSH y GSSG, y EDTA para medir MDA. En el caso de la recogida de suero no se utilizó ningún tipo de anticoagulante.

El volumen de sangre recogido se centrifugó a 1500g durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener el plasma o suero. Seguidamente, éste se congeló en alícuotas a -80°C para posteriores determinaciones.

A continuación, se procedió a la apertura del cráneo, para la extracción del cerebro, distinguiendo entre hipocampo y el resto del cerebro, y cerebelo. A continuación apertura de la cavidad abdominal para extraer el resto de órganos de interés de los animales, como el hígado, bazo, corazón, pulmones, riñones, la aorta y el músculo gastrocnemio. Para aislar mitocondrias se usó tejido fresco, ya que la congelación hace que se destruyan las estructuras biológicas y no serían funcionales. El resto de los órganos fueron congelados inmediatamente mediante la técnica del *freeze-clamping* en nitrógeno líquido a -189°C para su posterior conservación a -80°C .

3.2.1.3 Ovariectomía

La ovariectomía se realizó de la siguiente forma (figura 3.1): se administró buprenorfina (0.2 mg/kg) como analgésico intraoperatorio. Se anestesió el animal con isoflurano al 5%, y al 2% para mantenerla durante la operación. Se inmovilizó sobre el dorso y se practicó una incisión de 1 cm en el cuadrante inferior del abdomen. Se tomó el ovario y se separó con una ligadura junto con unos 0.5 cm del cuerno uterino correspondiente y se extrajo de la cavidad peritoneal. La incisión se suturó y se procedió de igual forma por el otro lado. A las 24 horas se les administró meloxicam (2 mg/kg) como analgésico.

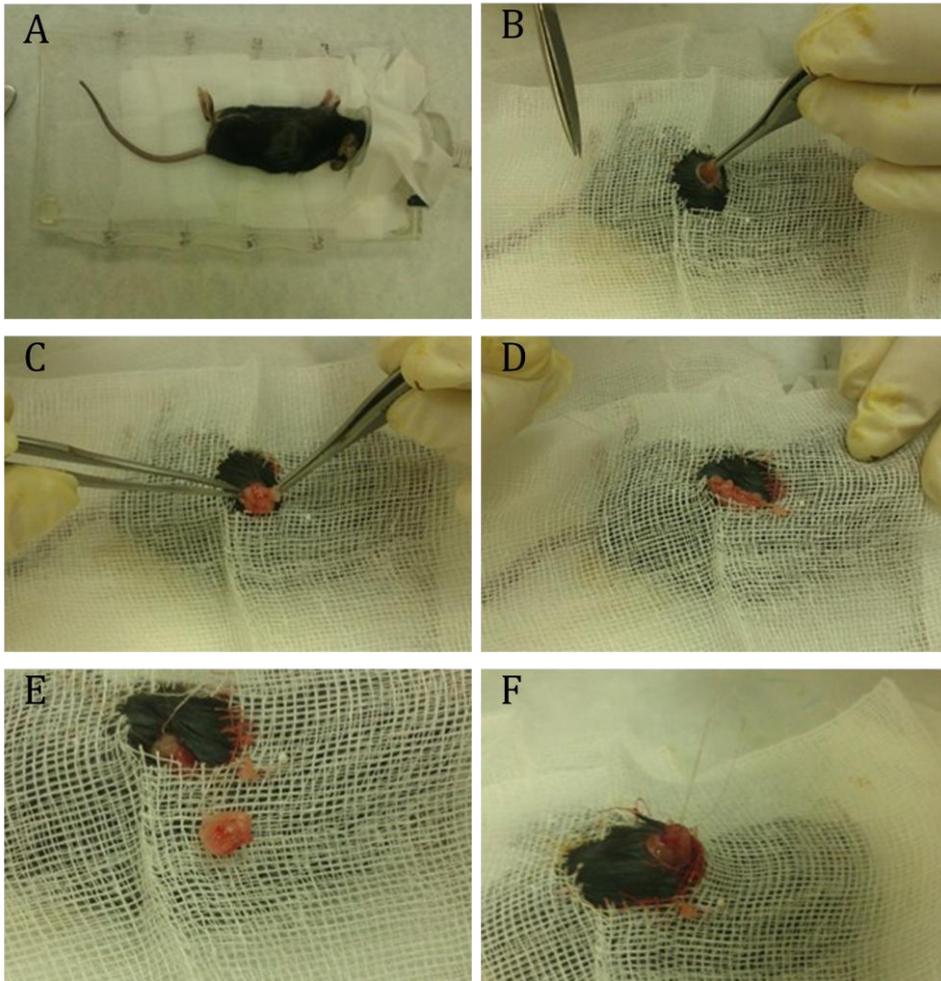


Figura 3.1 Ovariectomía.

A: anestesia del animal. B: incisión en el abdomen. C: extracción del ovario. D: ligamiento de la arteria ovárica. E: ovario extraído. F: sutura de la incisión.

3.2.2 Aislamiento de mitocondrias hepáticas

3.2.2.1 Fundamento

Basándose en el diferente peso y densidad de los componentes celulares, y utilizando la fuerza de la gravedad de la centrífuga, y la densidad de los tampones, es posible por sucesivas centrifugaciones a distintas fuerzas aislar las mitocondrias a partir del homogenado de un tejido.

3.2.2.2 Reactivos

- Solución de lavado: NaCl 0.9%
- Tampón de aislamiento de mitocondrias: Sacarosa 0.3M, EGTA 1mM, MOPS 5mM, BSA 15 μ M, KH_2PO_4 5mM. El pH del tampón se ajusta añadiendo KOH al 20% (p/v) hasta alcanzar pH=7.4.

3.2.2.3 Procedimiento

Una vez extraído el hígado, se introduce en un cuenco de cerámica para lavarlo en presencia de NaCl 0.9% (el último lavado debe realizarse con tampón de aislamiento). Se elimina el exceso de agua y seguidamente se pesa. Una vez pesado se trocea y se introduce en el homogeneizador de vidrio, donde se añade tampón de aislamiento a razón de 2 mL/g de tejido. Tras homogeneización a 980 rpm de velocidad, para disgregar el tejido y romper las células, obtenemos un homogenado del tejido, que introducimos en uno o varios tubos de centrífuga según el volumen obtenido. (NOTA: todo este proceso se debe realizar a 4°C). Seguidamente procedemos al aislamiento mitocondrial propiamente dicho, que está basado en el método publicado por Rickwood y colaboradores (Rickwood, R. 1987b). Este método consiste en una centrifugación diferencial que comprende dos partes principales: en una primera parte se centrifuga el homogenado a 1000 g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos de tejido. A continuación se recoge el sobrenadante, y el precipitado se resuspende en 3 mL de tampón de aislamiento y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones para obtener un óptimo rendimiento del proceso. Se juntan los dos sobrenadantes obtenidos y se centrifuga de nuevo para eliminar posibles contaminaciones con restos celulares. Una vez recogido el sobrenadante, que contiene las mitocondrias, pasamos a la segunda parte del aislamiento, que comprende tres centrifugaciones a 10000g durante 10 minutos a 4°C. Esta alta velocidad de centrifugación conlleva la sedimentación de las mitocondrias, obteniendo por tanto un sedimento rico en mitocondrias que lavamos en sucesivas centrifugaciones. Tras la tercera centrifugación, las mitocondrias obtenidas se resuspenden en tampón de aislamiento o en tampón para la determinación de peróxidos, a razón de 2 μ L/mg de mitocondrias o 20 μ L/mg de mitocondrias respectivamente. De este modo obtenemos una suspensión mitocondrial diluida en función de la determinación a realizar.

En este caso se tomaron las siguientes alícuotas (en tubos eppendorf):

- 50 μ L para medir proteínas. Congelar a -20°C.
- 250 μ L para medir la producción de peróxido de hidrógeno (en el mismo día).
- El resto se congela a -80°C.

3.2.3 Determinación de la tasa de producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno

3.2.3.1 Fundamento

Utilizamos un método modificado a partir del desarrollado por Barja (Barja, G. 1999). Esta técnica se fundamenta en la medida de la fluorescencia emitida (a 420 nm) por el dímero formado entre el peróxido de hidrógeno producido por las mitocondrias en estado 4 y el ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metilfenilacético), al ser excitado por un haz de luz de una longitud de onda de 312 nm. La catálisis de la reacción de dimerización la lleva a cabo la enzima peroxidasa a medida que se va formando el peróxido de hidrógeno.

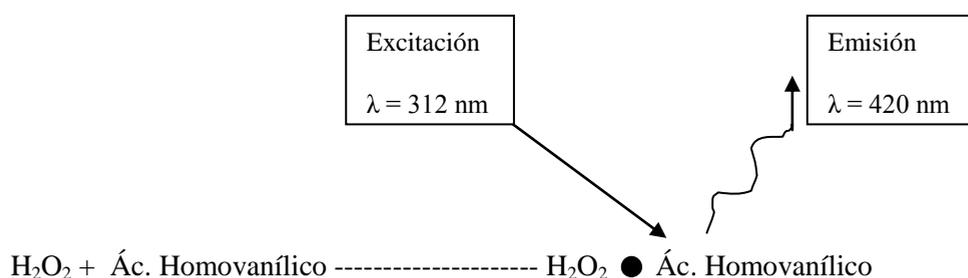


Figura 3.2 Mecanismo de detección de peróxido de hidrógeno.

Las mitocondrias, una vez aisladas del tejido correspondiente, se incuban con sustratos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial como el succinato 10 mM, que es sustrato del complejo II. Se realizan determinaciones por duplicado de la cantidad de dímero H_2O_2 -ácido homovanílico a los 5, 10, 15 y 20 minutos.

3.2.3.2 Reactivos

- Tampón para la determinación de peróxido de hidrógeno: EGTA 0.1 mM, KH_2PO_4 5 mM, MgCl_2 3 mM, KCl 145 mM, HEPES 30 mM, enrasar con agua. El pH se ajusta con KOH al 20% hasta 7.4.
- Solución Glicina-EDTA: Glicina 2 mM, EDTA 50 mM, NaOH 2.2 mM, enrasar con agua. El pH se ajusta con KOH al 20% hasta ≥ 11 .
- Succinato potásico 10 mM (concentración final en el tubo): Neutralizar ácido succínico con KOH 20% hasta alcanzar $\text{pH}=7.4$. Enrasar con tampón para la determinación de H_2O_2 .
- Ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metilfenilacético) 0.1 mM (concentración final en el tubo) disuelto en tampón para la determinación de H_2O_2 .
- Peroxidasa de rábano 6 U/mL.

3.2.3.3 Preparación de los patrones

La fluorescencia emitida por los sobrenadantes se valora frente a una recta patrón construida con concentraciones conocidas de peróxido de hidrógeno en presencia de ácido homovanílico y peroxidasa. La recta patrón se realiza añadiendo a una misma cantidad de ácido homovanílico y peroxidasa, distintas cantidades de peróxido de hidrógeno, como se indica en la tabla siguiente:

Peroxidasa (μL)	Ac. Homovanílico (μL)	Tampón peróxido (μL)	H ₂ O ₂ (nmol/mL)
5	20	1975	0
5	20	1970	1
5	20	1965	1,5
5	20	1960	2

Tabla 3.1 Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón del nivel de peróxidos.

Para realizar la determinación fluorimétrica, se añaden a los tubos los reactivos que indica la tabla 3.1, y a continuación se añaden 1000 μL de tampón glicina-EDTA a cada uno de los tubos y a partir de ese momento se procede igual que con las muestras.

Los patrones de H₂O₂ se realizan a partir de una solución comercial de peróxido de hidrógeno al 33,3%. Primero se realiza una dilución 1/10³ del peróxido de hidrógeno comercial en el mismo tampón que utilizamos para las muestras, y, a partir de ésta se obtiene una dilución 1/10⁵ de la comercial (también en este tampón). Esta será la solución que se utilizará para realizar los patrones de H₂O₂.

Para calcular con exactitud la concentración de la solución comercial de peróxido de hidrógeno debe medirse la absorbancia de la dilución 1/10³ a una longitud de onda de 230 nm (A₂₃₀) y, utilizando el coeficiente de extinción molar (ε) del H₂O₂ a esa longitud de onda (72,4 mM⁻¹ x cm⁻¹) y, mediante la siguiente ecuación, puede conocerse la concentración de H₂O₂ en cada tubo de la recta patrón:

$$\frac{A_{230} \times \mu\text{L H}_2\text{O}_2 \times 10^4}{\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} \times 1000 \mu\text{L}} = \text{nmoles H}_2\text{O}_2/\text{mL}$$

3.2.3.4 Procedimiento

Una vez aisladas las mitocondrias, el sedimento se resuspende en tampón para la determinación de peróxido de hidrógeno a razón de 20 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de precipitado.

Por otro lado, realizamos la mezcla de reactivos que nos servirá para medir la producción de peróxido de hidrógeno. Dicha mezcla contiene las siguientes cantidades de reactivo por cada determinación: 5 μL de peroxidasa de rábano 6 U/mL, 20 μL de ácido homovanílico 1 mM, 20 μL de succinato 0,1 M pH 7,4 y hasta 1.5 mL del tampón para la determinación de H_2O_2 previamente burbujeado con aire durante 5 minutos. Dicha mezcla se utilizará para medir la producción de peróxido de hidrógeno en la cadena de transporte electrónico mitocondrial aportando como donante de sustancias reductoras el succinato (complejo II).

A continuación se preparan tubos de polipropileno aptos para centrifugar. Necesitaremos dos tubos por cada tiempo de incubación a realizar (5, 10, 15, 20 minutos). Se añade a cada tubo 1.5 mL de la mezcla de reacción.

Preincubamos a 37°C durante 5 minutos en agitación la suspensión mitocondrial y los tubos con la mezcla de reacción. Transcurrido ese período de tiempo, añadimos 500 μL de suspensión mitocondrial respetando los tiempos de incubación a realizar. (Separamos una pequeña cantidad de suspensión mitocondrial para determinar el contenido proteico de la muestra).

Detenemos la reacción de dimerización aumentando el pH por medio de la adición de 1 mL de tampón Glicina-EDTA pH=12.7. A medida que paramos la reacción, guardamos los tubos en hielo, y seguidamente centrifugamos a 15000 g durante 15 minutos a 4°C.

Recogemos los sobrenadantes, que contienen el dímero H_2O_2 -homovanílico, y medimos con un fluorímetro la fluorescencia que emite a 420 nm de longitud de onda tras excitación con un haz de luz de 312 nm. El precipitado celular se disuelve en NaOH 1N, para determinar la cantidad de proteínas de las células, que nos servirá para normalizar el resultado.

3.2.3.5 Cálculos

Para calcular los resultados de nuestras muestras se interpolará la fluorescencia obtenida en cada una de ellas con la recta patrón construida previamente. Este resultado se corregirá por la concentración de proteínas en cada una de las muestras y por tiempo según la fórmula:

$$\text{Tasa de producción de } \text{H}_2\text{O}_2 = \frac{\text{nmoles } \text{H}_2\text{O}_2/\text{mL}}{\text{mg prote ína/mL}} \times \frac{1}{\text{min}}$$

3.2.4 Determinación de proteínas

3.2.4.1 Fundamento

La absorción de luz por parte de una sustancia es una propiedad característica de cada sustancia, que puede ser utilizada para su identificación y cuantificación. Todas las sustancias absorben luz en alguna región del espectro electromagnético (VIS, UV, IR, etc.).

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en: la propiedad de las proteínas para absorber luz en el UV, la formación de derivados químicos, o la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes.

Lambert y Beer demostraron que la absorbancia (A) de una sustancia es directamente proporcional a la concentración (c) de la sustancia absorbente, la longitud del paso de luz (l) (espesor de la solución) y una constante denominada coeficiente de extinción o coeficiente de absorción (ϵ), que es característico para cada sustancia a una longitud de onda (λ) determinada.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Todo método espectrofotométrico se basa en la comparación de la absorbancia de una sustancia de concentración desconocida con la de una solución de la misma sustancia cuya concentración se conoce y a la cual se denomina solución patrón o estándar. La absorbancia de una solución es la resultante de la absorbancia del soluto cuya concentración se desea conocer y la de otros componentes del sistema (solventes, reactivos) que absorben también a esa longitud de onda. Estos compuestos se denominan interferencias. Se debe descartar la absorbancia de las interferencias, para ello es necesario hacer siempre una muestra que contenga todos los componentes del sistema menos aquel que se desea medir. Esta muestra se llama blanco y la absorbancia de éste debe restarse a las muestras problema y a los patrones, o bien, con el blanco se calibra el instrumento a absorbancia igual a 0, o sea 100% de transmisión.

Se obtiene la curva de calibrado midiendo la absorbancia de una serie de soluciones de concentraciones conocidas de una misma sustancia tratadas con un mismo método y medidas a igual longitud de onda en el mismo instrumento. Para medir la concentración de una sustancia se elige por lo general, la región de máxima absorción del espectro, denominada longitud de onda analítica.

El resultado se expresa en una gráfica de la absorbancia (A) en función de la concentración (c). Si el sistema sigue la ley de Lambert-Beer se obtiene una línea recta que pasa cerca del origen. Es posible determinar gráficamente la

concentración de una muestra desconocida dibujando la absorbancia frente a concentraciones conocidas de un patrón interno, normalmente BSA. Se escoge la parte lineal y se calcula la recta de regresión lineal que mejor se ajusta y de ésta se interpolan los datos de absorción de nuestras muestras.

El método de Lowry consta de dos etapas:

1. Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.
2. La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

3.2.4.2 Reactivos

- Reactivo Lowry:
 - Añadir 40 mL de agua a la botella de reactivo *Lowry reagent powder*.
 - Mezclar hasta disolver por completo.
 - Guardar a temperatura ambiente.
- Reactivo Folin-Ciocalteu:
 - 88 mL de agua + 18 mL de la solución *Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent* en una botella opaca.
 - Guardar a temperatura ambiente.

3.2.4.3 Procedimiento

1. En un eppendorf pipetear 490 μL de agua bidestilada y 10 μL de la muestra.
2. Añadir 500 μL del reactivo de Lowry e incubar 20 minutos en oscuridad.
3. Añadir 250 μL del reactivo de Folin Ciocalteu e incubar 30 minutos en oscuridad.
4. Medir la absorbancia a 660 nm.

3.2.4.4 Cálculos

Los resultados se calcularán interpolando la absorbancia de las muestras en una recta patrón construida a partir de concentraciones conocidas de proteína.

3.2.5 Western blotting

3.2.5.1 Fundamento

La electroforesis es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en gel de poliacrilamida, se utiliza mayoritariamente para la separación de proteínas. Concretamente se utilizó el SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) en condiciones desnaturizantes. Para la realización de esta técnica es imprescindible que las proteínas se encuentren completamente desnaturizadas. Para ello, utilizamos dos agentes desnaturizantes, el dodecilsulfato sódico (SDS) como detergente y el β -mercaptoetanol como agente reductor, que provoca la rotura de los puentes disulfuro. De este modo obtenemos proteínas en su estructura primaria.

En presencia de una concentración de SDS superior a 8 mM, las proteínas unen 1.4 g de SDS por gramo de proteínas, lo que equivale a la unión de una molécula de SDS por cada 2 aminoácidos. Las cargas propias de las proteínas quedan así enmascaradas o anuladas. Como cada molécula de SDS proporciona una carga negativa (del grupo SO_4^-), los complejos proteína/SDS están cargados negativamente de forma uniforme, de forma que la separación depende de la carga y masa molecular de las distintas proteínas.

3.2.5.2 Condiciones del gel y transferencia

Para detectar las distintas proteínas de ensayo se cargaron 20 μ g de proteínas celulares totales en geles con el 10% de acrilamida (29:1 acrilamida:bisacrilamida) con un 0,1% de SDS, sobre los que se aplicó un campo eléctrico de voltaje constante de 100 voltios durante el tiempo necesario para que se distribuyeran por el gel, en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3).

Una vez finalizado el desplazamiento electroforético, el gel se transfirió (Blotting) a una membrana de PVDF (Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas, por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA). El proceso se mantuvo de forma que pasaran 170 miliamperios por cada membrana de la que se hace transferencia, en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

3.2.5.3 Marcaje y revelado

- Tras la transferencia las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de leche desnatada en polvo o en 5% BSA, 0,1% Tween-20 en 1x TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6). (TBS-T).
- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 10 mL de TBS-T.
- Las membranas se incuban durante toda la noche a 4°C en agitación en tampón de anticuerpo (5% BSA, 0,1 % Tween-20 en 1x TBS) y con las correspondientes diluciones de anticuerpo primario.
- Se realizan 3 lavados de 10 minutos con 10 mL de TBS-T.
- Las membranas son incubadas 60 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. El anticuerpo se disuelve en tampón de bloqueo a la concentración especificada por la casa.
- Se realizan 3 lavados de 10 minutos con 10 mL de TBS-T.
- La membrana se incuba 1 minuto con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se revela con un detector quimioluminiscente, mediante el programa "Image quant LAS 4000" (GE-Healthcare Bio-Sciences).

3.2.5.4 Cálculos

Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato digital ".tif" para poder realizar la densitometría utilizando el programa "image j".

Los valores de las proteínas estudiadas se expresaron en relación a los valores obtenidos de la α -tubulina en las mismas muestras. Esta proteína forma parte de los microtúbulos de las células eucariotas, sin que haya cambios importantes en los distintos organismos (Little, M. 1988; Doolittle, R.F. 1992). Ya que es una proteína que no se ve alterada, es una buena referencia para controlar que se haya cargado la misma cantidad de proteína de cada una de nuestras muestras al realizar el experimento.

3.2.6 *Western blotting* de proteínas carboniladas

3.2.6.1 Fundamento

El estrés oxidativo modifica la actividad de las proteínas, que tendrán cambios en su función, y las hace más susceptibles a la degradación. Los radicales libres derivados del O₂ afectan a las proteínas modificando algunos aminoácidos, formando puentes disulfuro en cisteína, o introduciendo grupos carbonilo (aldehídos y cetonas). Estos grupos carbonilo se pueden detectar por *western blot*. Al derivatizar las muestras con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) se marcan los grupos, y queda como 2,4-dinitrofenilhidrazona, para el cual hay anticuerpos.

3.2.6.2 Reactivos

Se ha usado el kit comercial OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit, de la casa Millipore, ref s750.

3.2.6.3 Procedimiento

Excepto por la derivatización de las muestras, se procede de la misma manera que en el apartado 3.2.5. La derivatización se hace de la siguiente manera:

1. Los fragmentos de tejido se homogeneizaron en 10 μ L de tampón por mg de tejido, en una solución amortiguadora de lisis (tampón fosfato 50 mM, 1 mM EDTA, pH 7,4). Las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min a 4 ° C. El sobrenadante fue recogido y congelado a -20 ° C hasta su análisis.
2. Añadir 5 μ L de muestra a un eppendorf, o el volumen necesario para tener 20 μ g de proteína. Si el volumen es inferior ajustar a 5 μ L con el tampón de homogenado.
3. Añadir 5 μ L de SDS. En el caso de que el volumen de la muestra exceda los 5 μ L, se corrige añadiendo menor volumen de SDS a mayor concentración.
4. Añadir 10 μ L de DNPH a cada muestra. También se prepararán muestras como controles negativos, a los que se añade solución de derivatización control.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
6. Añadir 7,5 μ L de la solución de neutralización. Si no se había añadido un agente reductor a la muestra durante el homogenado, añadir 1-1.5 μ L de 2-mercaptoetanol.

En este punto se carga el gel de poliacrilamida y se sigue con el procedimiento de un *western blotting* normal, como se indica en el punto 3.2.5.

3.2.7 Cromatografía líquida de alta resolución. Determinación de malondialdehído

3.2.7.1 Fundamento

El malondialdehído (MDA) es uno de los productos generados durante el proceso de la oxidación de los lípidos en las membranas biológicas, capaz de provocar una alteración estructural en las mismas que desemboca en una pérdida de fluidez y, por tanto, un aumento de su rigidez y, por ello, es un índice ampliamente utilizado para conocer el nivel de oxidación lipídica de las membranas celulares.

Se ha seguido el método descrito por Wong y colaboradores (Wong, S.H. 1987). Este método se basa en la hidrólisis de los lipoperóxidos presentes en la muestra y

posterior formación de un aducto entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el malondialdehído liberado (TBA-MDA2). Esta reacción produce un cromógeno rosado con un máximo de absorción entre 532-535nm. Puesto que el ácido 2-tiobarbitúrico reacciona con distintos grupos carbonilos presentes en la muestra, además, de con el malondialdehído, se realiza una separación por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa del aducto ácido 2-tiobarbitúrico-malondialdehído del resto de las sustancias reaccionantes presentes en las muestras.

3.2.7.2 Recogida de muestras

- Muestras de sangre: Se recogen en tubos con EDTA como agente quelante del Ca^{+2} . Hay que tener la precaución de no poner en hielo los tubos para evitar la hemólisis de los glóbulos rojos. Centrifugar a 1500g 15 min. para obtener el plasma.
- Muestras de tejidos y células: Cada 100 mg de tejido (o como mínimo 3×10^5 células) debe suspenderse en 1 mL de Kpi 0.1 M, EDTA 1 mM, pH=7.0. No hay que centrifugar esta solución.
- Muestras de mitocondrias: se toman alícuotas del extracto.

3.2.7.3 Reactivos

- Tampón acetato sódico anhidro 2M, pH 3,5, con TBA 0.2%. Para preparar 1L se toman 119 mL de ácido acético glacial (pureza 98%) y se le añaden a unos 600 mL de agua "mili-Q". Se ajusta el pH hasta 3,5 con NaOH 10 M. A continuación se añade a la solución 2 g de ácido tiobarbitúrico y se mantienen en agitación, a 50-60°C, hasta la total disolución del TBA. Se comprobará que el pH se mantiene y, si no es así, se volverá a ajustar. Finalmente se afora el volumen a 1litro y se guarda protegido de la luz a 4°C.
- Tampón KH_2PO_4 50 mM, pH 6,8 : Para 500 mL se pesan 3,4 g de KH_2PO_4 y se añaden a unos 400 mL de agua; se ajusta el pH con KOH (1 M) hasta 6,8 y se afora con agua hasta el volumen final. Se guardará a 4°C.
- Tampón KH_2PO_4 50 mM, pH 3,5: Para 500 mL se pesan 3,4 g de KH_2PO_4 y se añaden a unos 400 mL de agua; se ajusta el pH con HCl (1 M) hasta 3,5 y se afora con agua hasta el volumen final. Se guardará también a 4°C.

3.2.7.4 Preparación de los patrones

Dado que la identificación y cuantificación del MDA de las muestras analizadas se llevará a cabo gracias a una curva patrón, previamente al ensayo habrá que proceder a prepararla:

Metodología

Partimos de una solución comercial de MDA-bis (Merck) que está a una concentración de 12,2 M. Para obtener una solución inicial 10 mM, diluimos 410 μ L de MDA 12,2 M en 500 mL de agua.

Si diluimos la solución anterior $\frac{1}{2}$, tenemos entonces una solución 5 mM, a partir de la cual conseguimos los siguientes puntos para nuestra recta patrón:

- 50 nmol/mL
- 25 nmol/mL
- 12,5 nmol/mL
- 5 nmol/mL
- 2,5 nmol/mL
- 1,25 nmol/mL
- 0,625 nmol/mL
- Blanco: agua mili-Q

3.2.7.5 Procedimiento de derivatización

Todas las muestras las prepararemos en tubos tipo “ependorf”.

1. A 500 μ L del tampón inicial (con TBA) se le añaden 20 μ L de muestra (plasma, homogenado de tejido o suspensión de células) y de la misma forma se trata a cada uno de los patrones. Hay que destacar que las muestras de cultivos celulares deben de resuspenderse previamente en 25 μ L de Kpi 50 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,4.
2. Las preparaciones se incuban durante 60 minutos a una temperatura de 95°C. Es en este paso donde se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos y la consiguiente liberación de moléculas de malondialdehído que se conjugan con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA).
3. Añadir 500 μ L del tampón de KH_2PO_4 a pH 6,8 a cada muestra. Agitar. Este paso es crítico ya que el aducto MDA-TBA₂ es inestable en el rango de pH neutro-básico, por lo que debe hacerse con rapidez.
4. Centrifugar durante 5 min. a 13000 rpm, temperatura de 4°C.
5. A 200 μ L del sobrenadante añadirle 200 μ L del tampón KH_2PO_4 50 mM, pH 3,5 y agitar.
6. Tomar 200 μ L y colocarlos en un vial para realizar el análisis por HPLC.

3.2.7.6 Preparación de las fases móviles para HPLC

Este es un método “isocrático” y necesitaremos 2 fases diferentes: la “fase de lavado” y la “fase de elución”:

- Fase de lavado (Fase B): está constituida por una mezcla de acetonitrilo/agua al 70%, ambos de máxima pureza y el agua del tipo “mili-Q”.
- Fase de elución (Fase A): La sal que contiene esta fase es KH_2PO_4 50mM, pH 6,8. La relación es de 83/17 (KH_2PO_4 50mM, pH 6,8 / acetonitrilo).

El modo de preparación es el siguiente:

1. Pesar 13,6g de KH_2PO_4 y disolverlos en unos 1800 mL de “agua mili-Q”
2. Ajustar el pH de esta disolución con KOH 1M.
3. Enrasar hasta 2000 mL.
4. Añadir 410 mL de acetonitrilo. Esta solución debe homogeneizarse bien.
5. La solución debe filtrarse, mediante bomba de vacío y filtro de 0,22 micras.

Antes de pasar por el HPLC, ambas fases deben desgasificarse por baño de ultrasonidos durante 20 minutos.

3.2.7.7 Condiciones cromatográficas

- Flujo de las fases: 1.0 mL/min
- Detección en HPLC: se utiliza el detector UV visible a $\lambda=532$ nm.
- Columna DIONEX Acclaim Polar advantage. C16 5 μm 120 A, 4.6x150mm

3.2.7.8 Método cromatográfico

Al ser un método isocrático, sólo necesitamos programar el tiempo que va a estar pasando cada una de las fases líquidas correspondientes. Un cromatograma conlleva unos 30 minutos y la secuencia de las fases móviles a través del HPLC es la siguiente:

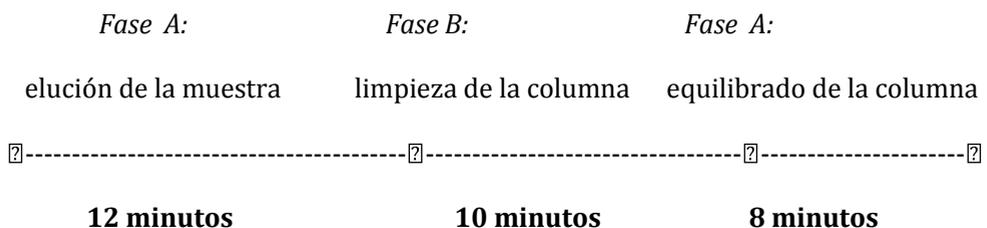


Figura 3.3 Programación de la duración (minutos) de las Fases A y B, durante un cromatograma del análisis de MDA.

Una programación de muestras supone el repetir cada secuenciación anterior tantas veces como muestras y patrones se deseen analizar.

3.2.7.9 Cálculos

El área del pico bajo la curva correspondiente al aducto TBA-MDA2 se valora frente a la recta patrón construida con patrones de MDA. Los resultados obtenidos se expresarán por mg de proteína total o por mL de plasma.

3.2.8 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

3.2.8.1 Fundamento

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es una técnica de inmunoensayo que permite detectar moléculas con gran precisión. El antígeno de nuestra molécula se detecta mediante un anticuerpo inmovilizado, al que después se unirán anticuerpos primario y secundario. Este último va ligado a una enzima capaz de generar un cambio de color. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno de la molécula que estamos buscando en la muestra. En este caso se ha medido la concentración de β A40 y de β A42.

3.2.8.2 Reactivos

Se ha usado el kit comercial de la casa invitrogen “Human A β 40 ELISA” (ref. KHB3481) y “Human A β 42 ELISA” (ref. KHB3441).

3.2.8.3 Preparación de los patrones

Dado que la identificación y cuantificación del β A de las muestras analizadas se llevará a cabo gracias a una curva patrón, previamente al experimento habrá que proceder a prepararla:

1. Partimos del β A que hay en el kit, se resuspende en 55 mM *sodium bicarbonate buffer (NaHCO₃, ultrapure grade)*, pH 9.0, para tener una concentración de 100ng/mL.
2. Haciendo diluciones seriadas con el diluyente proporcionado en el kit conseguimos los siguientes puntos para la recta patrón:
 - 250 pg/mL
 - 125 pg/mL
 - 62,5 pg/mL
 - 31,25 pg/mL
 - 15,62 pg/mL
 - 7,81 pg/mL
 - Blanco a partir del diluyente empleado en la preparación de los patrones.

3.2.8.4 Procedimiento

Las muestras y patrones deben cargarse por duplicado. Reservar 2 pocillos para el blanco del cromógeno.

1. Añadir 50 μL de cada punto de la recta patrón y de cada una de las muestras en los pocillos.
2. Añadir 50 μL de Hu A β Detection Antibody del kit a cada pocillo excepto en el blanco del cromógeno.
3. Cubrir la placa e incubar durante 3 horas a temperatura ambiente en movimiento.
4. Eliminar el líquido de los pocillos y lavar 4 veces.
5. Añadir 100 μL del anticuerpo Anti-Rabbit a cada pocillo excepto en el blanco del cromógeno.
6. Cubrir la placa e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Eliminar el líquido de los pocillos y lavar 4 veces.
8. Añadir 100 μL de Stabilized Chromogen a cada pocillo.
9. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
10. Añadir 100 μL de Stop Solution a cada pocillo.
11. Leer la placa a $\lambda=450\text{nm}$.

3.2.8.5 Cálculos

Los resultados se calcularán interpolando la absorbancia de las muestras en una recta patrón construida a partir de concentraciones conocidas de la molécula que estamos midiendo, en este caso βA40 o βA42 .

3.2.9 Estudio del consumo de glucosa *in vivo* mediante tomografía por emisión de positrones

3.2.9.1 Fundamento

El estudio del metabolismo glucídico a nivel fisiológico y/o fisiopatológico mediante tomografía por emisión de positrones (PET)- ^{18}F -FDG proporciona importante información acerca del estado de salud de los órganos estudiados, además de ser una buena herramienta para detectar la aparición o avance de un proceso tumoral.

La ^{18}F -FDG es un análogo de la glucosa, con la salvedad de que el isótopo radiactivo ^{18}F sustituye, tras un procedimiento de marcación y síntesis de la molécula ^{18}F -FDG, el grupo OH del carbono 2 de la molécula de glucosa. De este modo, la base teórica para su utilización es que compite con la molécula por entrar en las células para ser consumida y generar ATP, en el proceso de la

Metodología

glucolisis. Sin embargo, y por esa modificación en el carbono 2, una vez que entra en la célula y se fosforila a glucosa-6-fosfato, no puede seguir la reacción y pasar a fructosa-6-fosfato. De este modo, queda atrapada en la célula donde se había iniciado su consumo (figura 3.4).

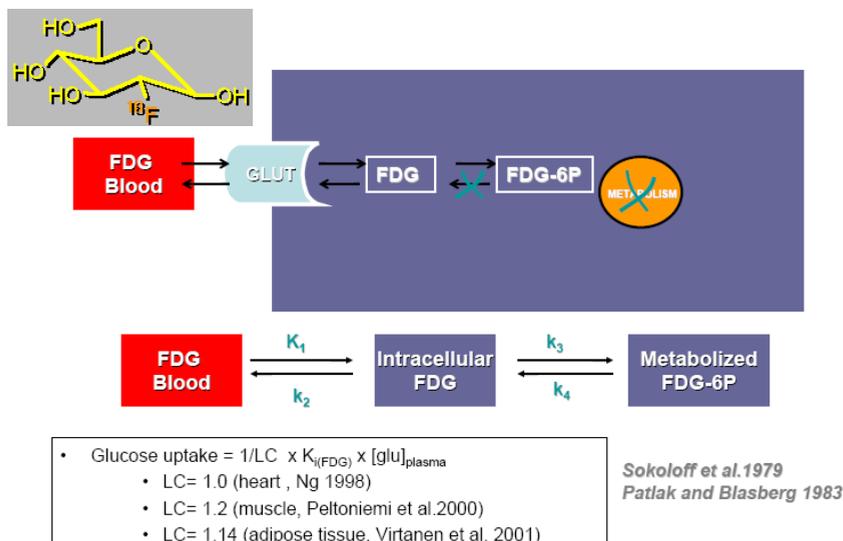


Figura 3.4 Molécula de ^{18}F -FDG y esquema de su consumo en la célula.

Al ser el ^{18}F un isótopo emisor de positrones (antimateria de los electrones), habrá una emisión más alta allí donde se haya acumulado más esta molécula, es decir, en aquellas regiones donde el consumo de glucosa sea más elevado. Los positrones al encontrarse con los electrones se aniquilarán y emitirán dos fotones de alta energía ($\pm 511 \text{ KeV}$) a $\pm 180^\circ$ que serán detectados por los módulos de la cámara PET (figura 3.5). Estos fotones pasan un filtro temporal y energético para ser aceptados como “verdaderos”, es decir, provienen del mismo punto de origen.

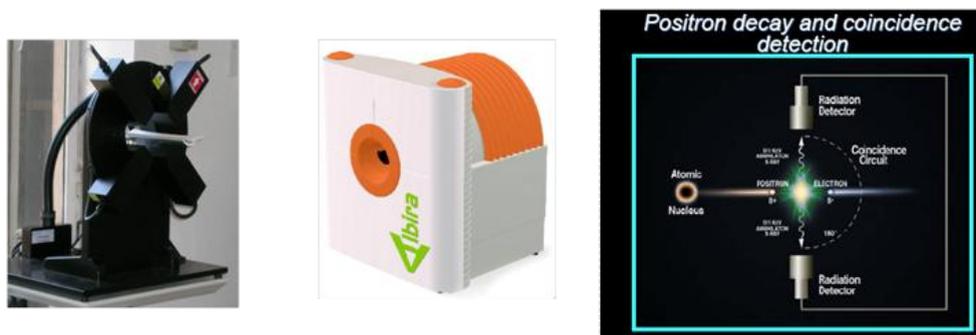


Figura 3.5 Esquema de detección de coincidencias por el equipo Albira PET.

Esta “ventana temporal” se establece en 2-3 nanosegundos, por lo que un fotón que incide en el cristal detector se asocia a otro fotón detectado en el lado opuesto en ese mismo espacio de tiempo. Es necesario además que ambos lleguen dentro del rango de energías del equipo (400-600 KeV), lo cual depende a su vez de la sensibilidad (0,7 %). Esta señal luminosa se amplifica a través de unos fotomultiplicadores insertados en cada uno de los módulos de la cámara PET, con lo que al final se transforma en una señal eléctrica proporcional a la intensidad con la que llegaron los fotones y proporcionando información acerca de su punto de origen, o sea, dónde fue consumida la ^{18}F -FDG.

Para discriminar la captación de las diferentes regiones de interés, un aspecto también importante es la resolución espacial. Ella nos permitirá diferenciar zonas con distintos valores de captación pero muy próximos. En el equipo Albira PET es de 1.5 mm (FWHM = 1.6 mm, con una reconstrucción MLEM y una ventana de coincidencias de 3 ns).

Por ello, y teniendo en cuenta que es una técnica no invasiva, se ha optado por analizar el consumo de glucosa fisiológico a nivel cerebral de los grupos experimentales aquí estudiados. Varios estudios previos se han realizado para intentar estandarizar los métodos y protocolos para animales de investigación (Green, L.A. 1998; Huang, S.C. 2004; Shimoji, K. 2004; Laforest, R. 2005; Fueger, B.J. 2006; Kim, J. 2006; Schiffer, W.K. 2007). Considerando las características del equipo PET Albira y la bibliografía existente se determinó el consumo cerebral de glucosa en los grupos estudiados como se expone en el apartado de procedimiento.

3.2.9.2 Reactivos

- Fluodos, 1110 MBq/mL, solución inyectable (^{18}F -Fluorodesoxiglucosa).
- Isoflorano.
- Oxígeno comprimido medicinal $\geq 99,5\%$.
- Solución salina fisiológica.

3.2.9.3 Procedimiento

En primer lugar, se mantiene a los animales 8 horas en ayuno (agua *ad libitum*) antes de realizar el estudio PET- ^{18}F -FDG. Tras pesar al animal y comprobar su temperatura rectal y niveles de glucemia, se introduce en una cámara de anestesia durante un mínimo de 5 minutos con oxígeno e isoflurano al 1-2% a un flujo constante de 1.5 L/min. A continuación, se inyecta 200-300 μcurios de ^{18}F -FDG vía intravenosa y rápidamente se coloca en la camilla de la cámara PET en la posición establecida previamente para escanear el cerebro.

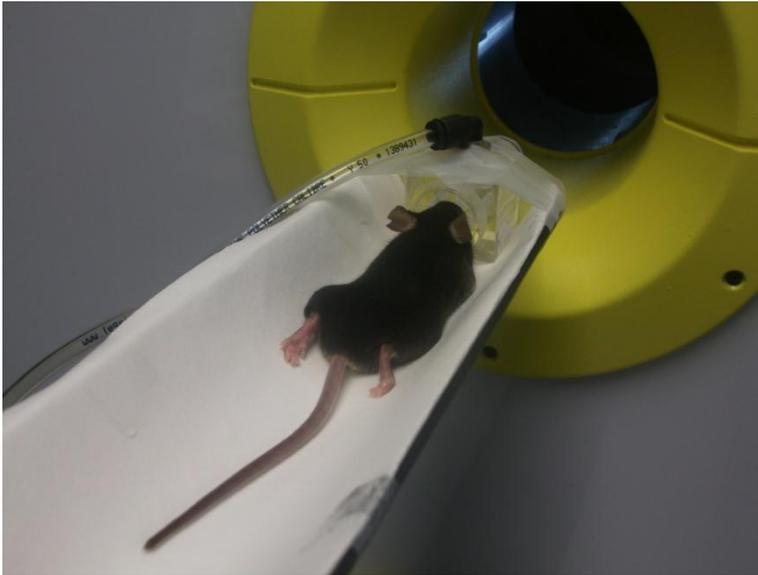


Figura 3.6 Posición del animal en la camilla.

Se realiza un protocolo dinámico de adquisición por secuencias de 1 minuto hasta completar un periodo de distribución del radiotrazador por todo el cuerpo de 30 minutos.

Seguidamente, el escáner inicia automáticamente otra adquisición de cuerpo completo por secuencias temporales (o *frames*) de 10 minutos (*field of view*, FOV) y de 40mm sobre el eje longitudinal hasta completar el animal en tres tomas. La medida de la primera zona (donde está el cerebro) será la analizada para cuantificar posteriormente el consumo cerebral de glucosa de cada animal estudiado.

Una vez terminada la adquisición de PET, se recoloca la camilla en la posición adecuada para iniciar el estudio anatómico/estructural mediante CT.

Para ello, se establece una adquisición de cuerpo completo estructurado en secuencias espaciales (en este caso de 75 mm de FOV) y medida de calidad “estándar”, es decir, 180 proyecciones (de 2º) para formar el giro completo del anillo del CT sobre el animal.

La suma de estos paquetes de datos (30x1 minutos) genera un nuevo archivo de datos que es reconstruido por el *software* que proporciona la casa comercial del aparato, mediante un algoritmo Ossem Cross, en el cual se hacen 3 correcciones, una por decaimiento (puesto que la 18F-FDG tiene una vida media 109.8 minutos) otra por dispersión de los positrones, y otra corrección por coincidencias aleatorias.

Tras reconstruir el archivo de datos se genera un archivo de imagen “img.hdr” el cual se utiliza para cuantificar las regiones de interés (ROI) y volúmenes de interés (VOI). En nuestro estudio se ha analizado el cerebro de cada ratón. El VOI construido para cada cerebro es analizado mediante el programa “PMOD 2.95”.

Una vez terminado el estudio, se mantuvo 12 horas (para asegurar que toda la radiación había decaído) a cada animal en su jaula con comida y agua *ad libitum*, antes de devolver las jaulas con el resto de su grupo.

3.2.9.4 Cálculos

La actividad cuantificada en cada uno de los VOIs analizados es la suma de todos los eventos captados por cada uno de ellos en ese periodo de tiempo (30 minutos) expresada en miliCurios (mCi) por unidad de volumen (cm³). Esta captación de ¹⁸F-FDG (*standard uptake value*, SUV) es corregida por la dosis inyectada (ID) y el peso del animal (g), mediante la siguiente fórmula:

$$SUV = \frac{\text{actividad captada en el volumen de interés (mCi/cm}^3) \times \text{peso (g)}}{ID \text{ (mCi)}}$$

$$SUV = \frac{VOI \times \text{Peso}}{ID} = \frac{(\text{mCi/cm}^3) \times \text{g}}{\text{mCi}}$$

3.2.10 Determinación de transaminasas en sangre

3.2.10.1 Fundamento

Las transaminasas son enzimas encargadas de reacciones de transaminación. Forman principalmente aminoácidos no esenciales, y en el mismo proceso también dan lugar a otros metabolitos como piruvato u oxalacetato, fundamentales en el metabolismo. Su localización es principalmente hepática. Si las encontramos en sangre será porque el hígado está sufriendo un proceso traumático, que conducirá a la muerte de los hepatocitos liberándolas así a la sangre (Lehninger, A.L. 1993; Mathews, C.K. 2000).

Las principales transaminasas son gamma glutamil transpeptidasa (GGT) glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato-piruvato transaminasa (GPT). Se han medido en suero por un laboratorio especializado en análisis clínicos.

3.2.10.2 Procedimiento

Las muestras para medir los niveles de transaminasas se enviaron a un laboratorio especializado en este tipo de análisis. El laboratorio en cuestión es el laboratorio de “Analítica Clínica Veterinaria”, www.acvlab.es.

3.2.11 Microscopía

3.2.11.1 Fundamento

La aparición de la patología amiloidea es una de las características de la EA. El β A se agrega formando placas en el cerebro, con la consiguiente pérdida de funcionalidad de las zonas afectadas, estableciéndose una correlación inversamente proporcional entre el volumen ocupado por las placas y el índice en la escala MMSE (Cummings, B.J. 1995), lo que significa que a mayor volumen de depósitos amiloides mayor demencia. Las placas de β A se pueden apreciar por microscopía tiñéndolas de la manera adecuada.

3.2.11.2 Procedimiento

Al extraer el cerebro sumergir y mantener en solución fijadora durante 24 horas a 4°C.

❖ **Inclusión del cerebro en araldita.**

1. Lavar en PB 0'1M (5X5').
2. Fijación y contraste (1h 30'): osmio 2% en PB 0'1M (2ml osmio/2ml PB 0'2M) en oscuridad y agitación.

*Preparar la araldita.

3. Lavar con H₂O (3X5')

*No sobrepasar los 15' porque el Osmio precipita.

4. Deshidratar: Alcohol 30° (5')
Alcohol 50° (5')
Alcohol 70° (10')

* Los lavados en alcohol hay que hacerlos rápidamente para que no se rehidraten las muestras.

5. Lavar en acetato de uranilo 2% En alcohol de 70° (2h 30') en nevera (se disuelve con ultrasonidos)

6. Deshidratar: Alcohol 70° (2X5')
 Alcohol 96° (5'+10')
 Alcohol 100° (2X7')
 Alcohol 100° seco (10')
7. Lavar en óxido de propileno (2X10')

*Se evapora muy rápido, perfora el plástico.

Transferir con un pincel a la araldita en unos moldes de papel de aluminio. Las muestras se quedan en agitación toda la noche.

❖ **Corte de los bloques de araldita con un micrótopo.**

1. Montar sobre un portaobjetos.

❖ **Tinción con azul de toluidina.**

1. Teñir con azul de toluidina durante 5 minutos.
2. Dejar secar.

❖ **Observación al microscopio.**

3.2.12 Diseño experimental de la caracterización del estrés oxidativo en hígado

La caracterización del estrés oxidativo en el hígado asociado a la enfermedad de Alzheimer es uno de los objetivos de la presente tesis. Los animales empleados en este experimento no recibieron ningún tipo de tratamiento ni se realizó ninguna manipulación hasta el momento de su sacrificio.

Para determinar el estrés oxidativo en hígado hemos medido:

- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas por fluorimetría (ver apartado 3.2.3).
- Niveles de carbonilación proteica por *western blotting* (ver apartado 3.2.6).
- Niveles de malondialdehído por HPLC (ver apartado 3.2.7).

Para ver diferencias en el estrés oxidativo debidas al sexo y al tipo genético estos experimentos los realizamos en ratones:

- Machos y hembras.
- WT y TG

Para ver la evolución del estrés oxidativo asociado a la enfermedad a lo largo de la vida del animal contamos con 3 grupos de diferentes edades:

Metodología

- 3-5 meses
- 10-13 meses
- 20-26 meses.

El número de animales con el que contamos es de:

- N= 67
- n=4-12 por grupo

3.2.13 Diseño experimental de la caracterización de la vía del cerebro al hígado del beta-amiloide

La caracterización de la vía que sigue el β A desde el cerebro al hígado es otro de los objetivos de la presente tesis. Los animales empleados en este experimento no recibieron ningún tipo de tratamiento ni se realizó ninguna manipulación hasta el momento de su sacrificio.

Para determinar la vía del cerebro al hígado del β A hemos medido:

- Niveles del transportador LRP1 en cerebro e hígado por *western blotting* (ver apartado 3.2.5).
- Niveles del transportador RAGE en cerebro *western blotting* (ver apartado 3.2.5).
- Concentración de β A en sangre por ELISA (ver apartado 3.2.8).

Para ver diferencias debidas al tipo genético en el tránsito del β A asociado a la EA estos experimentos los realizamos en ratones machos:

- WT y TG

Para ver si el tránsito del β A asociado a la EA es el mismo a lo largo de la vida del animal a lo largo de la vida del animal contamos con 3 grupos de diferentes edades:

- 3-5 meses
- 10-13 meses
- 20-26 meses

El número de animales con el que contamos es de:

- N= 30
- n=2-6 por grupo

3.2.14 Diseño experimental del tratamiento con genisteína y bexaroteno

Lo realizamos en ratones hembra TG ovariectomizadas. Se hace la ovariectomía (ver apartado 3.2.1) para simular una menopausia, y reproducir las condiciones en que una mujer desarrolla la EA. El hecho de elegir hembras es porque la EA se desarrolla con mayor frecuencia en mujeres (Baum, L.W. 2005; Viña, J. 2010). Son hembras de $8 \pm 0,6$ meses, que ya presentan la patología amiloidea (Jankowsky, J.L. 2004), por tanto podemos ver cambios debidos al tratamiento.

Para determinar el efecto conjunto del bexaroteno y la genisteína sobre la cantidad de βA en el cerebro en la enfermedad de Alzheimer nos basamos en:

1. Medición por ELISA de la cantidad de βA (ver apartado 3.2.8).
2. Medición de las placas de βA a través de la microscopía de un corte histológico (ver apartado 3.2.11).

Trabajamos con los siguientes grupos:

1. Control.
2. Genisteína.
3. Bexaroteno.
4. Bexaroteno + genisteína.

Los animales son hembras transgénicas APP^{swe}/PS1^{dE9} de $8 \pm 0,6$ meses:

- N= 16 hembras.
- n=3-4 por grupo.

A estos grupos se les administró por vía oral las siguientes dosis:

- Bexaroteno: 100 mg/kg/día.
- Genisteína: 0,022mg/kg/día.
- Bexaroteno + genisteína a las mismas concentraciones indicadas anteriormente.

En la tabla 3.2 podemos ver la progresión del tratamiento que siguieron los ratones durante la duración del experimento:

Día	1		2	3	4	5		
Tratamiento	Ovariectomía		Gen	Gen	Gen	Gen	Bex	Gen+Bex
Grupo	1,2,3,4		2,4	2,4	2,4	2	3	4
Día	6			7			8	
Tratamiento	Gen	Bex	Gen+Bex	Gen	Bex	Gen+Bex	Sacrificio	
Grupo	2	3	4	2	3	4	1,2,3,4	

Tabla 3.2 Progresión del tratamiento. Gen-genisteína; Bex-bexaroteno.

3.2.15 Diseño experimental del consumo de glucosa por tomografía de emisión de positrones

Se ha medido también la captación de glucosa en cerebro. Ya que el modelo animal lleva 2 transgenes vehiculados al sistema nervioso central, es importante ver cómo se comporta este órgano, y más teniendo en cuenta que estamos tratando con una enfermedad neurológica. Los animales empleados en este experimento no recibieron ningún tipo de tratamiento ni se realizó ninguna manipulación hasta el momento de la prueba de tomografía por emisión de positrones.

Para determinar el consumo de glucosa hemos medido:

- Captación de glucosa por tomografía de emisión de positrones.

Para ver diferencias en el consumo de glucosa debidas al sexo y al tipo genético estos experimentos los realizamos en ratones:

- Machos y hembras.
- WT y TG.

Para ver la evolución del consumo de glucosa asociado a la enfermedad a lo largo de la vida del animal, contamos con 3 grupos de diferentes edades:

- 3-5 meses.
- 10-13 meses.
- 20-26 meses.

Los animales son transgénicos APP^{swe}/PS1^{dE9} y *wild type*:

- N= 62.
- n=4-7 por grupo.

3.2.16 Análisis estadístico

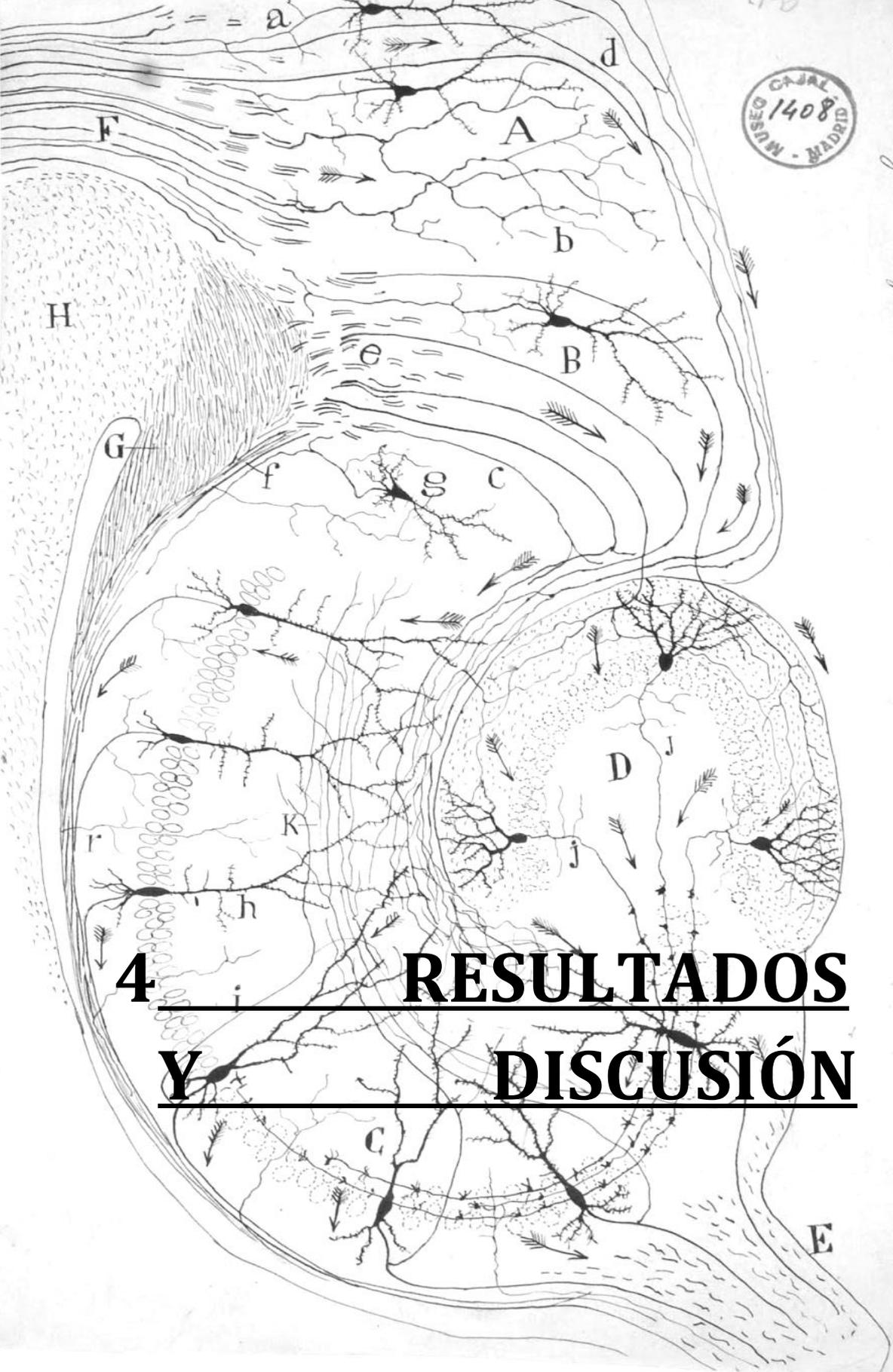
Para el análisis estadístico se ha usado el programa IBM SPSS statistics 19. Se ha tomado un intervalo de confianza al 95% ($p= 0.05$) para aceptar que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos.

Se ha usado la prueba T para comparar 2 medias.

Se usó el test estadístico ANOVA en el caso de que se comparen más de 2 medias con un factor de variación. Si la n de los grupos a comparar no es igual en todos ellos se ha usado la comparación de Scheffé. En el caso de que la n de los grupos a comparar sea igual en todos ellos dependerá de la prueba de homogeneidad de las varianzas. Si no es significativa se ha usado la comparación de Tukey, si es significativa se ha usado el método de Games-Howell.



*quiere algo mas
de un 40.*



4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que provoca la pérdida gradual de las funciones cognitivas (Becker, J.T. 2002; Craig, D. 2005), y que está ligada al envejecimiento y al estrés oxidativo, como se ha demostrado en varios estudios (Smith, M.A. 1996; Nunomura, A. 1999; Castellani, R.J. 2001). La gran mayoría de los estudios en humanos se han centrado en el sistema nervioso, a través de donantes de órganos en humanos *post mortem*, o de forma indirecta, a través del estudio del fluido cerebrospinal, que refleja lo que ocurre en el sistema nervioso (Fagan, A.M. 2011; Handoko, M. 2013). También hay una cantidad muy grande de estudios referidos a las capacidades cognitivas, basados en test de comportamiento, y que tratan de catalogar las fases cognitivas de los pacientes o de los modelos animales (Andersen, K. 1999; Becker, J.T. 2002; Craig, D. 2005; Harrison, F.E. 2009). Otros estudios se refieren a la administración de tratamientos farmacológicos (Cummings, J.L. 2004; Shen, Z.X. 2004), o de sustancias antioxidantes (Sano, M. 1997; Lloret, A. 2009). Todo lo relacionado con el sistema nervioso puede tener consecuencias que afectarán en diversa medida al resto del cuerpo. Una posible relación se establece al determinar que hay β A en el plasma (Prelli, F. 1988; Slemmon, J.R. 2007; Takechi, R. 2009). Esta circulación sistémica podría afectar a los órganos, pero no se ha demostrado una relación con el estado del resto del cuerpo.

Por evidentes razones éticas no es posible realizar ciertos estudios en humanos, como el análisis de órganos, por lo que se emplean modelos animales. El modelo elegido por nuestro grupo de investigación es el ratón doble transgénico para la EA (ver apartado [3.1.1](#) de metodología), porque es un modelo que desarrolla particularidades de la patología asociada a la EA en humanos, como es el depósito y posterior aparición de las placas de β A en el ratón (Jankowsky, J.L. 2004) (ver Figura [1.16](#)).

En la 1ª parte de este trabajo hemos analizado el hígado. ¿Por qué hemos hecho esta elección, si la EA es una enfermedad neurodegenerativa? No se puede perder de vista el comportamiento somático en cualquier tipo de enfermedad. Una perturbación de la homeostasis en una zona determinada, y más tratándose del sistema nervioso, puede repercutir en diversas patologías asociadas por el resto del cuerpo, entre ellas el hígado. El hígado tiene, entre otras, la función de servir como un agente detoxificante de la sangre, por lo que será muy importante para eliminar restos nocivos que se encuentren en el sistema vascular sanguíneo, como el péptido amiloideo característico de esta patología neurológica. Por esto, a la hora de un hipotético tratamiento para la EA, es de vital importancia conocer el estado del hígado.

Resultados y discusión

La medida del estrés oxidativo hepático es una de las maneras de evaluar la toxicidad debida a la EA. A más daño oxidativo, en peor estado estarán las biomoléculas y por tanto perderán la funcionalidad biológica para la que están diseñadas. Si pierden su función, evidentemente derivará en problemas de salud para el organismo en cuestión, tanto en ratones como en humanos.

Cómo explicar que la EA, que es una enfermedad asociada al sistema nervioso, pueda influir en el hígado. Para ello es necesario determinar el camino que sigue el péptido amiloideo desde el sistema nervioso central al hígado. Los transportadores LRP1 y RAGE son fundamentales en este proceso. LRP1 se encarga del aclaramiento cerebral del β A, lo saca hacia la sangre (Shibata, M. 2000; Deane, R. 2004), y es capaz de introducirlo en el hígado (Tamaki, C. 2006). El RAGE a nivel cerebral tiene el papel contrario, es decir, lo transporta desde la sangre hacia el cerebro (Deane, R. 2003). Por ello determinamos los niveles de los transportadores para ver su papel en el estado del hígado.

El estudio del mecanismo de aclaramiento cerebral del β A nos llevó a interesarnos por elementos que sean capaces de contribuir a este proceso. Al disminuir la patología amiloidea asociada a la EA, se espera contribuir a la mejora de los síntomas de la enfermedad.

Uno de los puntos importantes fue el artículo de Cramer et al., en que consiguen aliviar la patología amiloidea asociada en un modelo murino para la EA, con un tratamiento con bexaroteno (Cramer, P.E. 2012). Este medicamento es un agonista del receptor retinoide X (RXR), el cual funciona formando un dímero con el receptor activado de proliferación de los peroxisomas γ (PPAR γ), que hace que se sobreexpresen la apolipoproteína E, la cual es responsable de la degradación del β A (Jiang, Q. 2008).

Nuestro grupo publicó hace unos años que la genistéina incrementa los niveles de PPAR γ (Valles, S.L. 2010). Por tanto, si aumentamos la disponibilidad del factor de transcripción se debería potenciar el efecto del medicamento.

Los resultados obtenidos de todos estos experimentos son los que mostramos en los siguientes apartados.

4.2 ESTRÉS OXIDATIVO EN HÍGADO

Analizamos parámetros de estrés oxidativo en hígado. Para ello determinamos como fuente de estrés oxidativo la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas. Como medidas de daño oxidativo determinamos la oxidación de proteínas, medida como la carbonilación de las proteínas, y niveles de lipoperoxidación, mediante la determinación del malondialdehído (MDA).

Iniciamos la investigación determinando el estado del hígado a través de la medida del estrés oxidativo. Si en el hígado vemos cambios entre los animales WT y TG se deberán al hecho de ser transgénicos o no, porque las condiciones de vida son exactamente iguales para ambos tipos genéticos. Para este experimento contamos con animales machos y hembras. Nuestro grupo de investigación ha comprobado que existen diferencias en el estrés oxidativo entre sexos, debido principalmente al papel de los estrógenos (Borras, C. 2003; Viña, J. 2003; Viña, J. 2005a; Viña, J. 2005b; Viña, J. 2010), por lo que es importante valorar este factor.

También contamos con 3 grupos de diferentes edades, de esta manera podemos ver la evolución de la patología a lo largo de la vida del animal. El diseño experimental de esta parte lo encontramos en el apartado [3.2.12](#) de metodología.

4.2.1 Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas

Se ha medido la producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias porque son la principal fuente de radicales libres en la célula (Miquel, J. 1980), y la relación de la EA con el estrés oxidativo está ligada claramente a la mitocondria a través de la inducción de la formación de radicales libres por el β A (Lustbader, J.W. 2004; Lloret, A. 2008). Las figuras 4.1-4.5 muestran los resultados de la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas. Esta producción es importante porque el peróxido de hidrógeno puede ser por sí solo un oxidante, y porque da lugar al radical hidroxilo (ver apartado [1.2](#) de la introducción). Este parámetro se ha medido por fluorimetría (ver apartado [3.2.3](#) de metodología) (Barja, G. 1998).

4.2.1.1 Tasa de producción de H₂O₂ en mitocondrias hepáticas de ratones de 3-5 meses

En la figura 4.1 vemos los resultados de la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas para la edad de 3-5 meses machos y hembras, observamos que:

- Entre el ratón TG y el WT no hay diferencias significativas.
- Entre machos y hembras no hay diferencias significativas.

Lo que nos permite deducir que no se puede establecer una relación entre este parámetro y el tipo genético a la edad de 3-5 meses, ni en el sexo a esta edad. A pesar de que la estadística no sea significativa, sí que hay una clara tendencia del ratón TG a una mayor tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas.

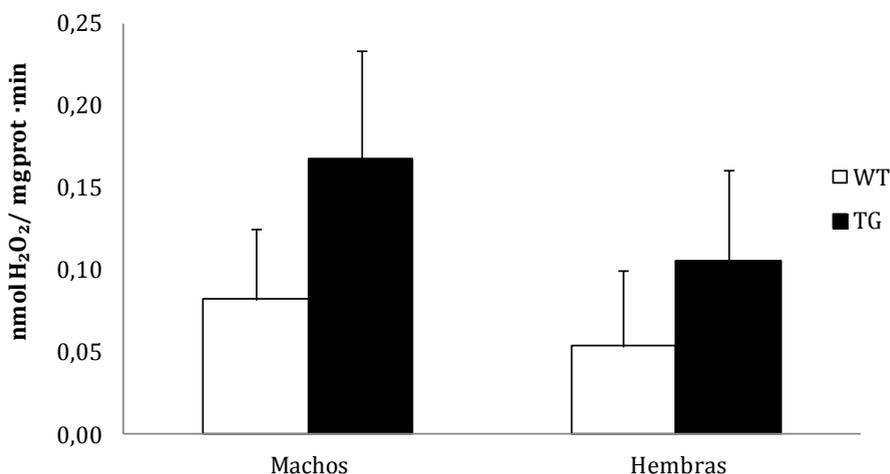


Figura 4.1 Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de ratones de 3-5 meses.

Los valores están expresados como la media ± desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-5 ratones.

4.2.1.2 Tasa de producción de H_2O_2 en mitocondrias hepáticas de ratones de 10-13 meses

En la figura 4.2 vemos los resultados de la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas para la edad de 10-13 meses, machos y hembras, observamos que:

- Entre el ratón TG y el WT no hay diferencias significativas.
- Entre machos y hembras no hay diferencias significativas.

Lo que nos permite deducir que no se puede establecer una relación entre este parámetro y el tipo genético a la edad de 10-13 meses, ni en el sexo a esta edad.

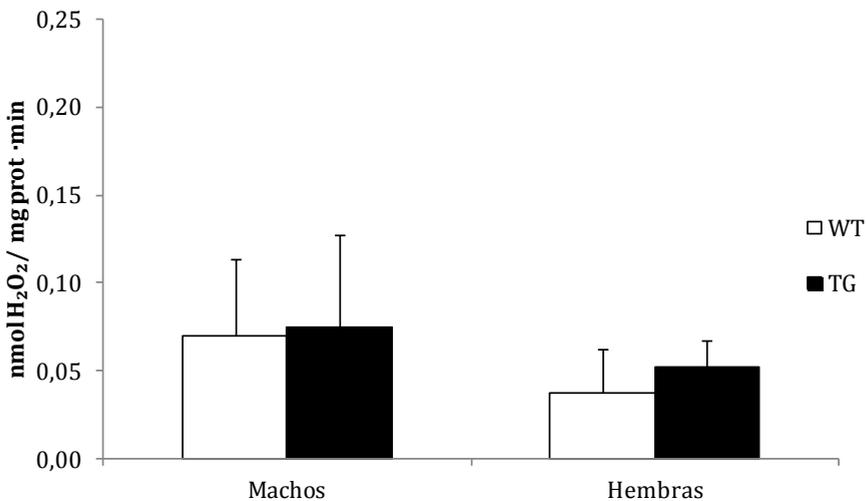


Figura 4.2 Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de ratones de 10-13 meses.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron de 6-12 ratones.

4.2.1.3 Tasa de producción de H₂O₂ en mitocondrias hepáticas de ratones de 20-26 meses

En la figura 4.3 vemos los resultados de la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas para la edad de 20-26 meses, machos y hembras, observamos que:

- Entre el ratón TG y el WT no hay diferencias significativas.
- Entre machos y hembras no hay diferencias significativas.

Lo que nos permite deducir que no se puede establecer una relación entre este parámetro y el tipo genético a la edad de 20-26 meses, ni en el sexo a esta edad. A pesar de que no hay una diferencia estadísticamente significativa el ratón WT tiene una tendencia a una mayor tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas.

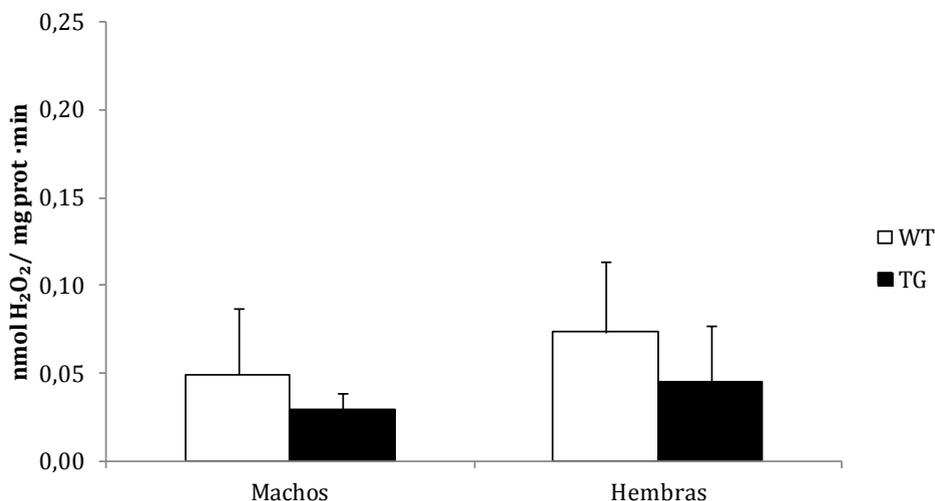


Figura 4.3 Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de ratones de 20-26 meses.

Los valores están expresados como la media ± desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 5 ratones.

4.2.1.4 Tasa de producción de H₂O₂ en mitocondrias hepáticas en ratones macho de distintas edades

En la figura 4.4 vemos la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas en los ratones machos WT y TG con la edad, observamos que:

- En los ratones TG hay diferencias significativas. Los ratones de 3-5 meses tienen mayor tasa de producción de peróxido de hidrógeno en las mitocondrias hepáticas, respecto a los grupos de 10-13 meses y 20-26 meses de edad.
- En ratones WT no hay diferencias significativas entre las distintas edades.

Esto nos permite deducir que el ratón TG macho tiene una menor producción de radicales libres con la edad en mitocondrias hepáticas.

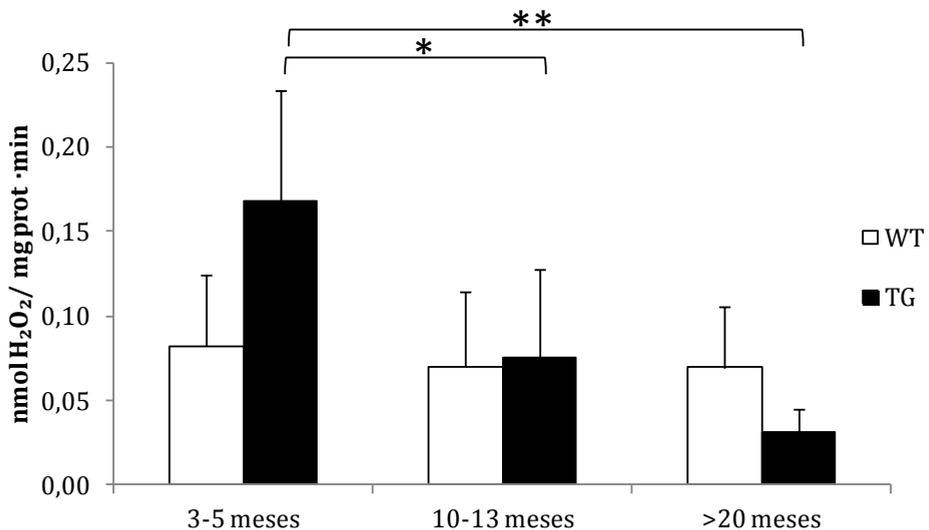


Figura 4.4 Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de machos.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-7 ratones.

4.2.1.5 Tasa de producción de H₂O₂ en mitocondrias hepáticas en ratones hembra de distintas edades

En la figura 4.5 vemos la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas en las hembras WT y TG con la edad, observamos que:

- En los ratones TG hay diferencias significativas. Los ratones de 3-5 meses tienen mayor tasa de producción de peróxido de hidrógeno en las mitocondrias hepáticas, respecto a los grupos de 10-13 meses y 20-26 meses de edad.
- En ratones WT no hay diferencias significativas entre las distintas edades.

Esto nos permite deducir que en el ratón TG hembra tiene una menor producción de radicales libres con la edad en mitocondrias hepáticas.

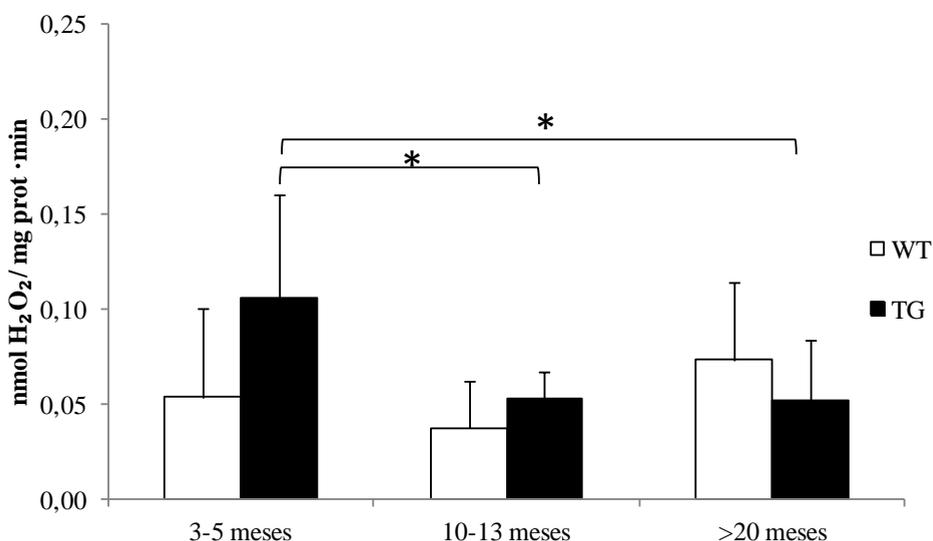


Figura 4.5 Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de hembras.

Los valores están expresados como la media ± desviación estándar. Valores estadísticamente significativos *= $p < 0,05$. En cada grupo experimental se utilizaron de 5-12 ratones.

4.2.1.6 Discusión de la tasa de producción de H₂O₂ en mitocondrias hepáticas

En la comparación entre TG y WT no observamos diferencias significativas en ninguno de los grupos del estudio debidas al sexo o al tipo genético. No obstante al comparar las edades de los ratones sí que apreciamos diferencias (figuras 4.4 y 4.5).

La diferencia más llamativa es la reducción de tasa de producción de H₂O₂ en mitocondrias hepáticas en las diferentes edades del ratón TG. Este resultado es completamente contrario a las observaciones previas de nuestro grupo, en que el envejecimiento afectaba al hígado aumentando esta fuente de radicales libres (Sastre, J. 1996). También contradice la teoría de los radicales libres en el envejecimiento de Harman (Harman, D. 1956).

En los animales WT tampoco observamos un aumento de la producción de H₂O₂, hecho que deberíamos esperar si los resultados se ajustaran a la teoría de Harman (Harman, D. 1956) o a los resultados previos (Sastre, J. 1996). No obstante no existe un descenso como en los ratones TG, la tasa de producción de H₂O₂ se mantiene en números similares en las 3 edades estudiadas.

Así pues tenemos un inesperado resultado que requiere seguir adelante con la investigación para tratar de esclarecer los motivos del mismo.

4.2.2 Proteínas carboniladas en hígado

Las proteínas son fundamentales en las funciones fisiológicas de los seres vivos. Son las que realmente van a ejercer un papel clave en el metabolismo, como las reacciones enzimáticas (Oliver, C.N. 1987), controlando el intercambio de ciertas sustancias a través de la membrana, o regulando la expresión génica (Pognonec, P. 1992) etc. Cambios en la conformación estructural como los que se pueden dar por la oxidación hacen que la proteína pierda la capacidad de realizar su función (Dean, R.T. 1993). Al medir la oxidación de las proteínas, tenemos un indicador muy fiable del estado del órgano, de la capacidad que tendrá para funcionar con normalidad. Una forma de oxidación son los grupos carbonilo, que indican que en el C en que se encuentren ha habido un proceso oxidativo. Los aminoácidos más susceptibles de carbonilación son lisina, arginina, prolina o treonina (Stadtman, E.R. 1993).

Estos grupos carbonilo se detectan mediante *western blotting* (ver apartado 3.2.6 de metodología). En las figuras 4.6-4.10 tenemos los resultados de la carbonilación proteica.

4.2.2.1 Proteínas carboniladas en hígado de ratones de 3-5 meses

En la figura 4.6 vemos la carbonilación proteica en hígado en ratones de 3-5 meses machos y hembras, observamos que:

- Entre los ratones machos hay diferencias significativas. Hay mayor nivel de carbonilación proteica en el ratón TG que en el WT.
- En hembras no hay diferencias entre WT y TG.
- En los ratones WT hay diferencias significativas. Hay mayor nivel de carbonilación proteica en hembras que en machos.

De esto podemos deducir que el ratón macho TG tiene un mayor daño oxidativo a proteínas en hígado que el WT.

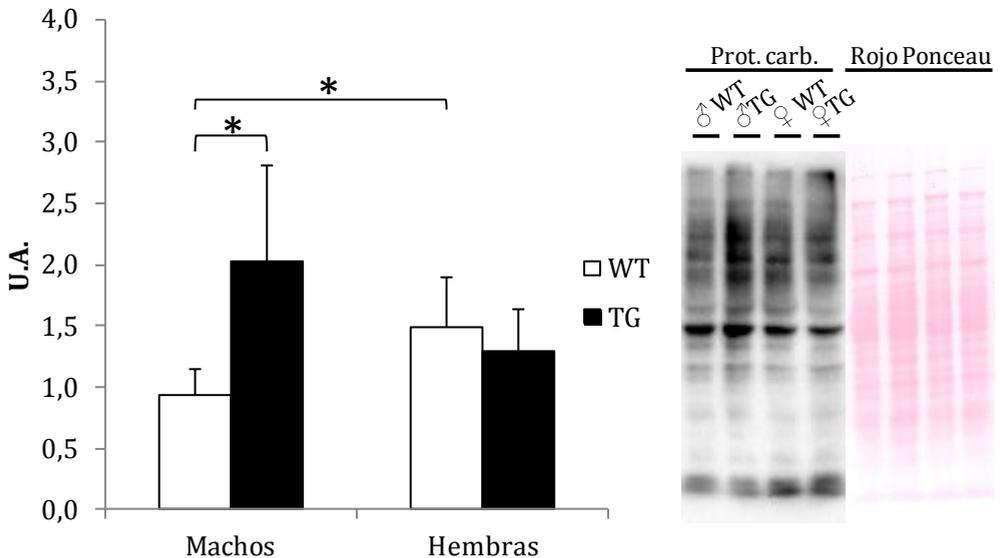


Figura 4.6 Carbonilación proteica en hígado de ratones de 3-5 meses.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $*=p<0,05$. En cada grupo experimental se utilizaron 5 ratones. Se ha utilizado el rojo ponceau como control de carga.

4.2.2.2 Proteínas carboniladas en hígado de ratones de 10-13 meses

En la figura 4.7 vemos la carbonilación proteica en hígado en ratones de 10-13 meses machos y hembras, observamos que:

- Entre el ratón TG y el WT no hay diferencias significativas.
- Entre machos y hembras no hay diferencias significativas.

Lo que nos permite deducir que no se puede establecer una relación entre este parámetro y el tipo genético a la edad de 10-13 meses, ni en el sexo a esta edad.

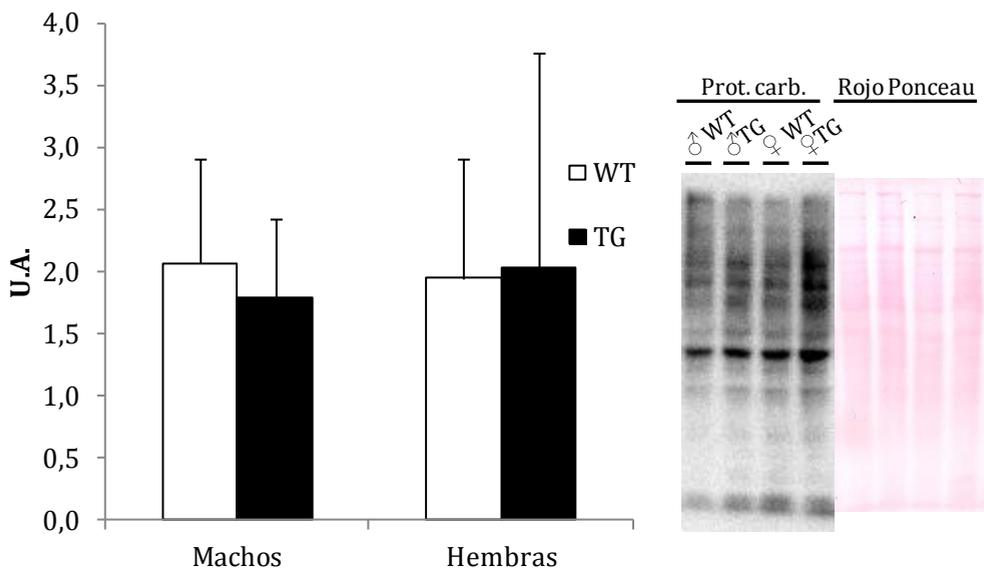


Figura 4.7 Carbonilación proteica en hígado de ratones de 10-13 meses.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 5 ratones. Se ha utilizado el rojo ponceau como control de carga.

4.2.2.3 Proteínas carboniladas en hígado de ratones de 20-26 meses

En la figura 4.8 vemos la carbonilación proteica en hígado en ratones de 20-26 meses machos y hembras, observamos que:

- Entre el ratón TG y el WT no hay diferencias significativas.
- Entre sexos hay diferencias significativas. Los machos de ambos tipos genéticos tienen mayor nivel de carbonilación proteica que las hembras.

De esto deducimos que los machos tienen mayor oxidación proteica que las hembras en el hígado a esta edad.

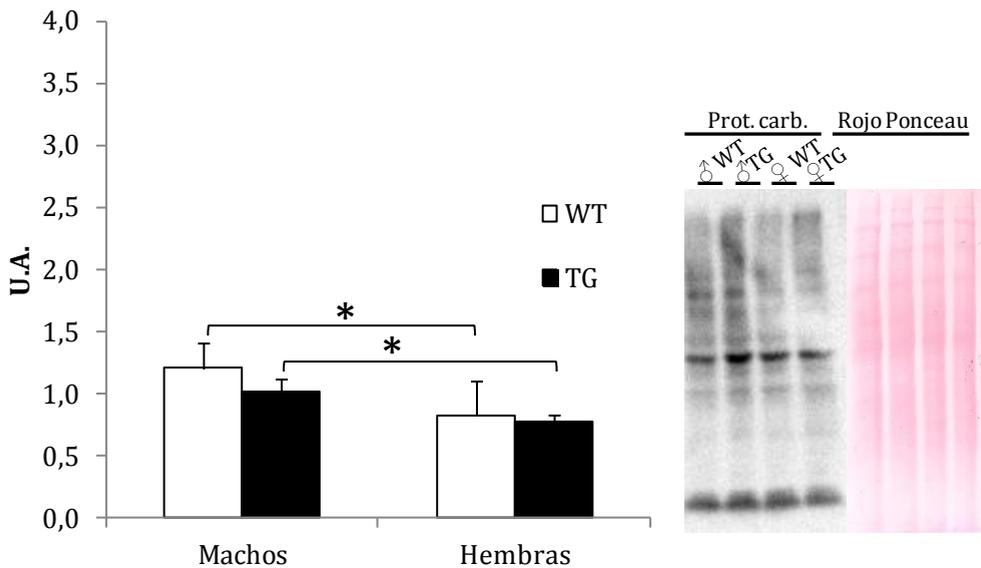


Figura 4.8 Carbonilación proteica en hígado de ratones de 20-26 meses.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $*=p<0,05$. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-6 ratones. Se ha utilizado el rojo ponceau como control de carga.

4.2.2.4 Proteínas carboniladas en hígado de ratones macho a distintas edades

En la figura 4.9 vemos la carbonilación proteica en hígado en los machos WT y TG con la edad, observamos que:

- En los ratones TG no hay diferencias significativas.
- En ratones WT hay un aumento significativo de carbonilación proteica en el grupo de 10-13 meses respecto al de 3-5 meses y al de 20-26 meses.

Lo que nos permite deducir que no se puede establecer una relación clara entre este parámetro y la edad. A pesar de que la estadística no sea significativa, sí que hay una clara tendencia del ratón TG a una menor carbonilación proteica con la edad.

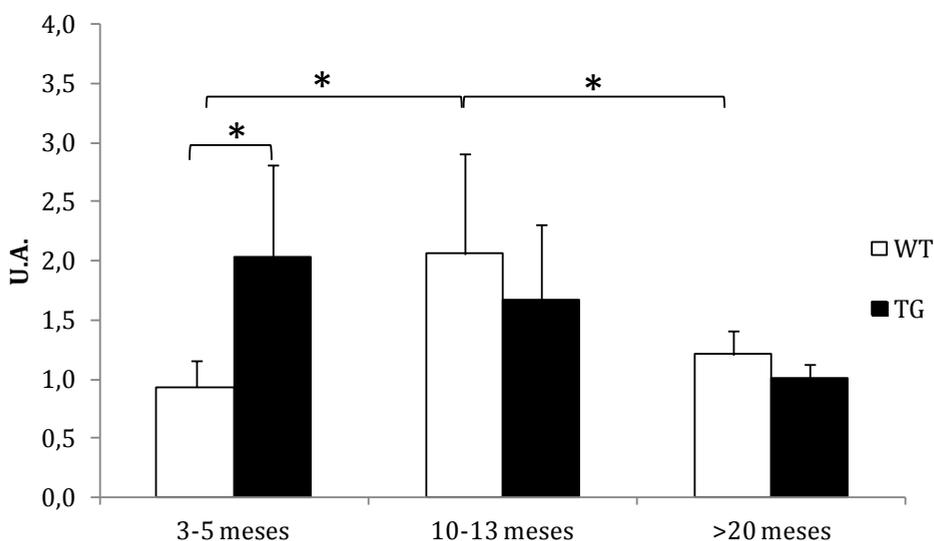


Figura 4.9 Carbonilación proteica en hígado de machos.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $*=p<0,05$. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-6 ratones.

4.2.2.5 Proteínas carboniladas en hígado de ratones hembra a distintas edades

En la figura 4.10 vemos la carbonilación proteica en hígado en las hembras WT y TG con la edad, observamos que:

- Entre los ratones TG no hay diferencias significativas.
- En ratones WT hay un nivel significativamente menor de carbonilación en el grupo de 20-26 meses respecto al de 10-13 meses.

De esto deducimos que no se puede establecer una relación clara en este parámetro en las hembras WT y TG con la edad.

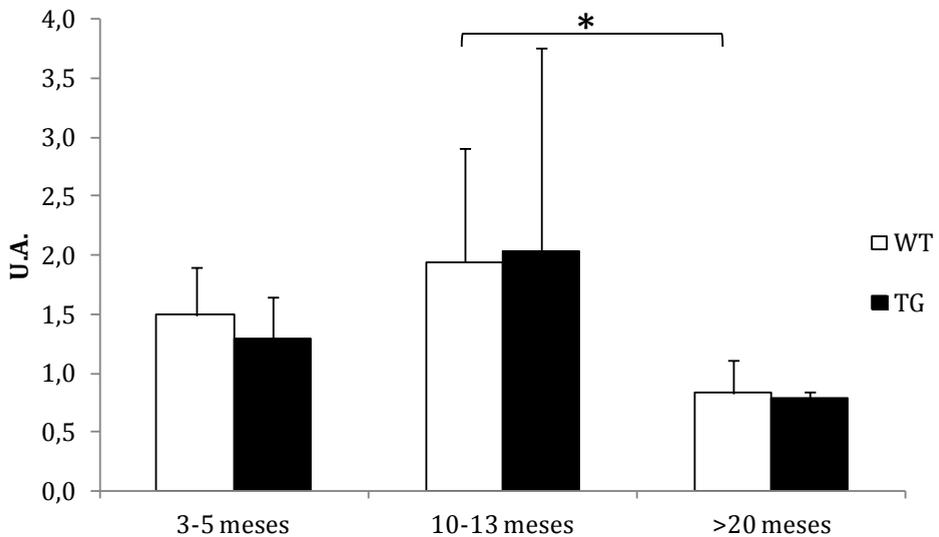


Figura 4.10 Carbonilación proteica en hígado de hembras.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $*=p<0,05$. En cada grupo experimental se utilizaron 5 ratones.

4.2.2.6 Discusión de proteínas carboniladas en hígado

Al comparar los diferentes grupos encontramos diferencias significativas debidas al tipo genético en la edad de 3-5 meses (figura 4.6). El ratón TG tiene más carbonilación proteica que el WT. Correlaciona con bastante exactitud con los datos obtenidos de la producción de peróxido de hidrógeno (figura 4.1), lo que permitiría explicarlo. Al haber menos producción de radicales libres, debe haber menos daño oxidativo.

También vemos diferencias debidas al sexo, a los 3-5 meses el ratón WT macho tiene menos carbonilos en los proteínas que la hembra (figura 4.6). Este es un hecho poco esperable, conocido el papel protector de los estrógenos en las hembras (Borras, C. 2003), y por el hecho de que no se repite el resultado visto en la producción de peróxido de hidrógeno (figura 4.1). También hay una diferencia muy clara en la edad de 20-26 meses (figura 4.8). Aquí vemos que los machos tienen una mayor carbonilación que las hembras, que puede ser atribuible, ahora sí, al papel protector de las hormonas femeninas. Este resultado no tiene una correlación exacta con la producción de peróxido de hidrógeno, debido seguramente a que hay más factores que influyen la oxidación de las proteínas (Dean, R.T. 1993).

Con la edad se puede destacar el descenso de la carbonilación proteica en los ratones TG (figuras 4.9-4.10), correlacionando de forma positiva con la producción de peróxido de hidrógeno (figuras 4.4-4.5), y confirmando así el descenso del estrés oxidativo en los ratones TG.

4.2.3 Malondialdehído en hígado

La lipoperoxidación es el proceso de la oxidación de los lípidos en las membranas biológicas, capaz de provocar una alteración estructural en las mismas que desemboca en una pérdida de fluidez y, por tanto, una pérdida de funcionalidad. El MDA es uno de los productos generados durante este proceso, y por ello, se usa para conocer el nivel de oxidación lipídica de las membranas celulares. La determinación del MDA se ha llevado a cabo mediante HPLC (ver apartado [3.2.7](#) de metodología).

4.2.3.1 MDA en hígado de ratones de 3-5 meses

En la figura 4.11 vemos los niveles de MDA en hígado en ratones de 3-5 meses machos y hembras, observamos que:

- Entre el ratón TG y el WT no hay diferencias significativas.
- Entre machos y hembras no hay diferencias significativas.

De esto podemos deducir que no se puede establecer una relación entre este parámetro y el tipo genético a la edad de 3-5 meses, ni en el sexo a esta edad.

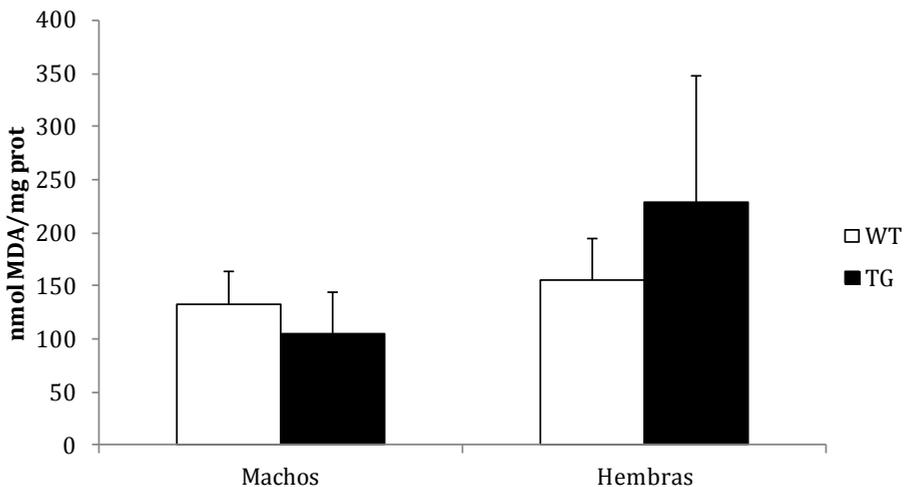


Figura 4.11 Niveles de MDA en hígado de ratones de 3-5 meses.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 5 ratones.

4.2.3.2 MDA en hígado de ratones de 10-13 meses

En la figura 4.12 vemos los niveles de MDA en hígado en ratones de 10-13 meses machos y hembras, observamos que:

- Entre el ratón TG y el WT no hay diferencias significativas.
- Entre machos y hembras sí que observamos diferencias significativas. Las hembras tienen más MDA que los machos.

De esto podemos deducir que las hembras tienen mayor lipoperoxidación que los machos WT y TG a esta edad en hígado.

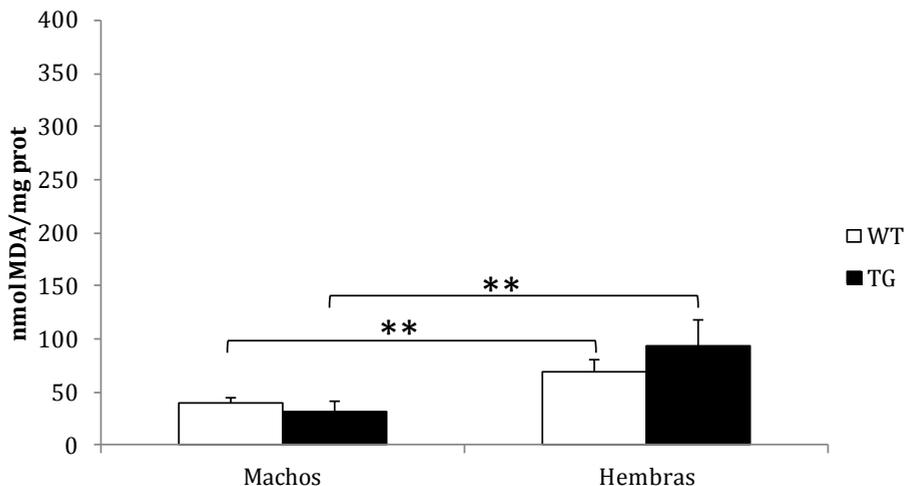


Figura 4.12 Niveles de MDA en hígado de ratones de 10-13 meses.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $**=p<0,01$. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-5 ratones.

4.2.3.3 MDA en hígado de ratones de 20-26 meses

En la figura 4.13 vemos los niveles de MDA en hígado en ratones de 20-26 meses machos y hembras, observamos que:

- Entre el ratón TG y el WT no hay diferencias significativas.
- Entre machos y hembras no hay diferencias significativas.
- En hembras hay diferencias significativas. El WT tiene mayor nivel de MDA que el TG.

Lo que nos permite deducir que no se puede establecer una relación entre este parámetro y el sexo a la edad de 20-26 meses. Hay una mayor lipoperoxidación en el ratón WT frente al TG en hígado.

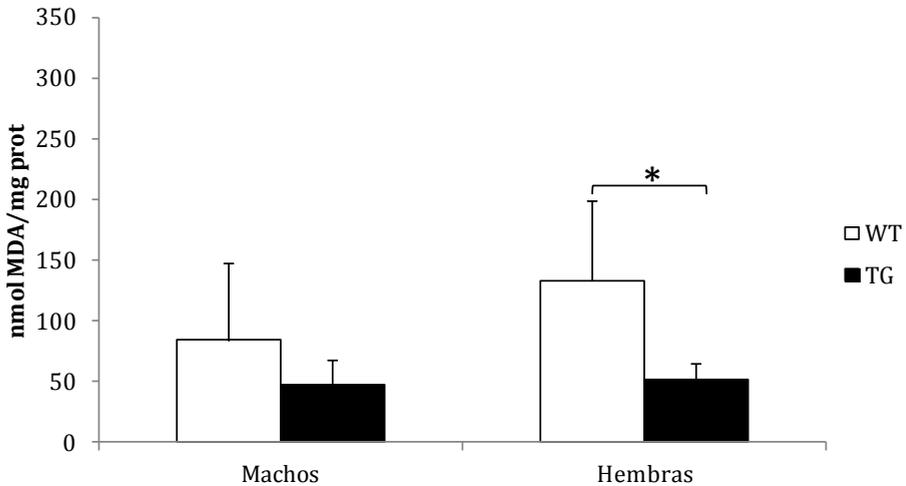


Figura 4.13 Niveles de MDA en hígado de ratones de 20-26 meses.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $*=p<0,05$. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-6 ratones.

4.2.3.4 MDA en hígado de ratones macho a distintas edades

En la figura 4.14 vemos los niveles de MDA en hígado en ratones machos WT y TG con la edad, observamos que:

- En los ratones TG hay diferencias significativas. El grupo de 3-5 meses tiene mayor nivel de MDA que los grupos de 10-13 y de 20-26 meses.
- En los ratones WT hay diferencias significativas. El grupo de 3-5 meses tiene mayor nivel de MDA que el de 10-13 meses.

A partir de esto podemos deducir que hay menor lipoperoxidación en hígado con la edad en ratones WT y TG machos.

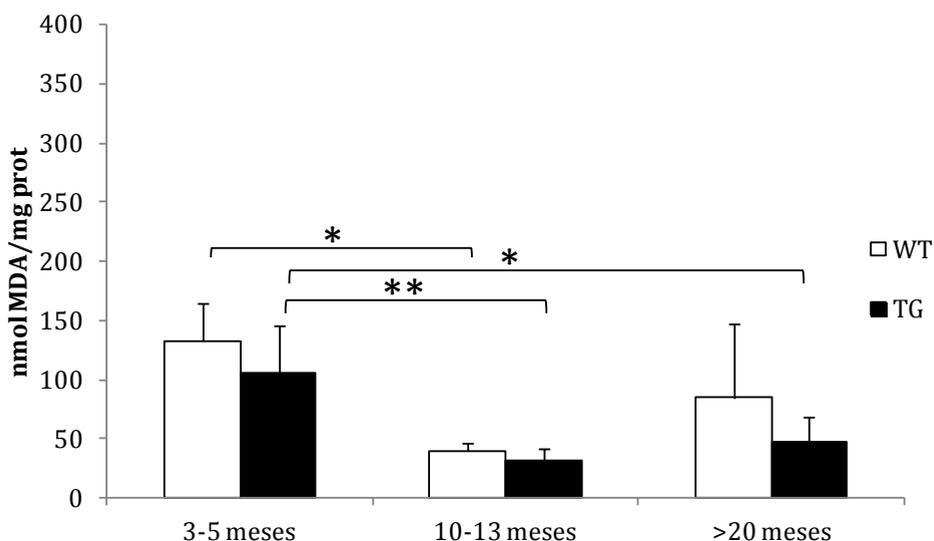


Figura 4.14 Niveles de MDA en hígado de machos.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $*=p<0,05$ $**=p<0,01$. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-6 ratones.

4.2.3.5 MDA en hígado de ratones hembra a distintas edades

En la figura 4.15 vemos los niveles de MDA en ratones hembras WT y TG con la edad, observamos que:

- En los ratones TG hay diferencias significativas. El grupo de 3-5 meses tiene mayor nivel de MDA que los grupos de 10-13 y de 20-26 meses.
- En ratones WT no hay diferencias significativas entre las distintas edades.

A partir de esto podemos deducir que hay menor lipoperoxidación en hígado con la edad en ratones TG hembras.

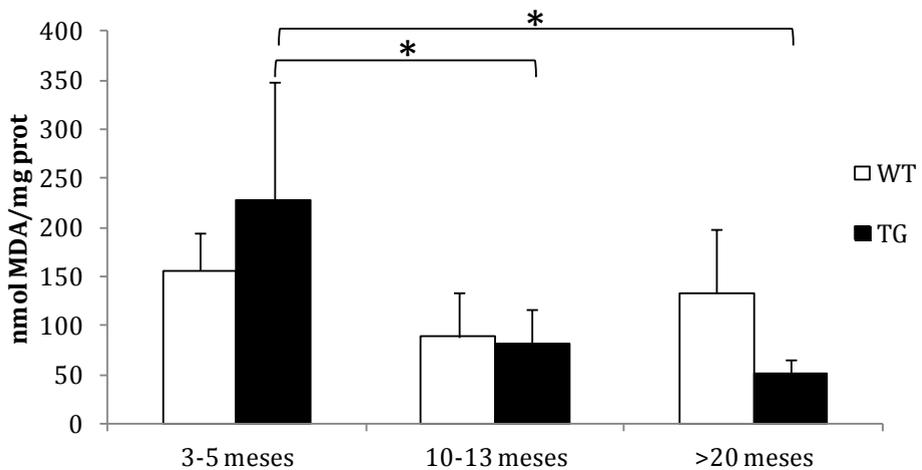


Figura 4.15 Niveles de MDA en hígado de hembras.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $*=p<0,05$. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-5 ratones.

4.2.3.6 Discusión de malondialdehído en hígado

Solo en uno de los grupos vemos diferencias significativas debidas al tipo genético. Es en hembras de 20-26 meses (figura 4.13). Aquí observamos que las hembras WT tienen más MDA que las TG. No hay una explicación clara para esto, ya que no observamos correlación en los mismos grupos para la producción de peróxido de hidrógeno (figura 4.3).

Sí que vemos diferencias debidas al sexo. A los 10-13 meses los machos tienen menos MDA que las hembras (figura 4.12). De nuevo tenemos un hecho poco esperable, ya que vemos que en este caso los estrógenos no poseen el papel protector que esperamos. Tampoco vemos una correlación con la producción de peróxido de hidrógeno ni con la carbonilación proteica, en que no habíamos visto ninguna diferencia (figuras 4.2-4.7).

Encontramos una diferencia significativa en los ratones WT de 3-5 meses y los de 10-13 meses, en los que el primer grupo tiene niveles más altos de MDA que el segundo. En este punto tampoco vemos una correlación positiva con la producción de peróxido de hidrógeno.

Una posible explicación para la falta de correlación en estos grupos es que hay más factores que han influenciado el estrés oxidativo, recordemos que hay muchos más radicales capaces de afectar este parámetro (Cheeseman, K.H. 1993).

Es comparando la edad de los ratones TG cuando se ven diferencias importantes. Hay que destacar el descenso de los niveles de MDA en los ratones TG machos y hembras (figuras 4.14-4.15), correlacionando de forma positiva con la producción de peróxido de hidrógeno (figuras 4.4-4.5) y con la carbonilación proteica (figuras 4.9-4.10).

Llegados a este punto podemos decir con claridad que el estrés oxidativo hepático disminuye durante el envejecimiento en el modelo de ratón APP/PS1 para la enfermedad de Alzheimer. Las causas de este resultado tratamos de explicarlas en los siguientes apartados.

4.2.4 Discusión de los resultados de estrés oxidativo en hígado

4.2.4.1 Hipótesis varias

Para explicar la causa de la reducción de la producción de radicales libres y el daño oxidativo en hígado tenemos varias hipótesis.

Pueden deberse a que el hígado esté generando β A (Sutcliffe, J.G. 2011), hecho muy poco probable debido a que los transgenes que codifican para la EA del ratón TG están vehiculados al sistema nervioso central (Jankowsky, J.L. 2004). Además, está descrito que el β A sale del cerebro (Trommsdorff, M. 1998; Shibata, M. 2000; Deane, R. 2004), se transporta por la sangre (Sagare, A. 2007; Zlokovic, B.V. 2010), y que el hígado es el principal órgano donde se capta y se degrada (Ghisso, J. 2004; Tamaki, C. 2006).

Se ha descrito que las células en proliferación tienen mayor estrés oxidativo (García-Giménez, J.L. 2012). También se ha visto que el hígado pierde capacidad de regeneración durante el envejecimiento (Iakova, P. 2003). Si este órgano ve menguada su tasa de renovación, podría ir acompañada de una reducción del estrés oxidativo. Descartamos esta hipótesis ya que si es cierta y el factor fundamental es la edad, en los ratones WT también habría una pérdida de funcionalidad, y por tanto observaríamos un descenso en los parámetros oxidativos medidos igual al que vemos en el ratón TG.

Sabiendo que el β A es capaz de llegar al hígado, otra hipótesis en la que pensamos es la de la hormesis. La hormesis es un concepto que nos dice que pequeñas agresiones continuas acaban provocando una respuesta adaptativa, que reduce el daño provocado (Calabrese, E.J. 1987). En este caso las agresiones a las células hepáticas por el β A durante la vida de los ratones sería una manera de explicar el cambio que observamos en la producción de peróxido de hidrógeno mitocondrial en el hígado a lo largo de la edad. La situación se puede identificar con el principio de la hormesis, a los 3-5 meses aún no se ha producido una adaptación al estrés oxidativo causado. En ratones de 10-13 meses el animal ya empieza a tener una cierta resistencia al β A, y en ratones de 20-26 meses ya hay una clara protección frente al péptido amiloideo (ver figuras 4.4-4.5-4.9-4.10-4.14-4.15).

Los niveles de β A que se han encontrado en el suero sanguíneo en ratones doble transgénicos no son suficientes para provocar un déficit cognitivo (Liu, L. 2003), pero sí para inducir un proceso hormético, que hará que los ratones tengan menos estrés oxidativo, en el caso de que el β A sea el responsable. Si tenemos en cuenta la hipótesis de que el β A provoca estrés oxidativo (Smith, M.A. 1996; Lloret, A. 2008), el modelo se asemejaría más al humano en edades tempranas, de 3-5 meses. No obstante, estos estudios se refieren a nivel del sistema nervioso.

También existe la posibilidad de que en humanos se dé la misma situación, que exista un proceso de hormesis en una fase preclínica, el cual produciría una adaptación en el hígado que lo acabaría protegiendo frente al estrés oxidativo durante el transcurso de la enfermedad. Todo esto nos sugiere que se estaría desarrollando algún mecanismo adaptativo en los hepatocitos, por el que se reduce el estrés oxidativo asociado a la EA.

Finalmente tenemos la hipótesis de que en el proceso de detoxificación del β A se generan radicales libres. Si asumimos que cuanto mayor es el animal más β A tiene, debería llegar en mayor cantidad al hígado. También es cierto que la mayoría del péptido se acumula en las placas en el cerebro, por tanto es posible que haya un menor flujo hacia fuera del cerebro. Así explicaríamos que al no llegar tanto β A al hígado se redujera el estrés oxidativo.

Para confirmar alguna de estas hipótesis se debe profundizar más en la investigación, tratar de determinar si una de ellas es la correcta, si son falsas o si en el proceso oxidativo se dan de forma conjunta.

4.2.4.2 Valoración global del estrés oxidativo en hígado

Según la teoría del envejecimiento de los radicales libres de Harman (Harman, D. 1956) los animales deberían mostrar un aumento del estrés oxidativo con la edad. No obstante, esta teoría se demuestra cierta, pero solo en parte. Por ejemplo en ciertos estudios se demuestra que a mayor estrés oxidativo mayor longevidad (Yang, W. 2010). Hay que pensar también que el hígado tiene una tasa de regeneración muy alta, y puede mantenerse en mejor estado que otros órganos como el cerebro.

Si comparamos los diferentes parámetros medidos, vemos que hay una correlación bastante alta entre la producción de radicales libres y el daño oxidativo. En los animales WT vemos que no hay cambios importantes con la edad. Esta ausencia de diferencias en las medidas de MDA y proteínas carboniladas puede deberse a que se han determinado en hígado entero, en lugar de en mitocondrias, que es donde se generan la mayor parte de los radicales libres (Miquel, J. 1980).

En cuanto a las diferencias de sexo vemos que no correlacionan entre sí. En la carbonilación proteica en ratones de 20-26 meses (figura 4.8) hay más carbonilación en los machos, hecho que no se corresponde con la producción de peróxido de hidrógeno (figura 4.3) ni con los niveles de MDA (figura 4.13), en que no observamos diferencias. Tampoco vemos correlación en los niveles de MDA a los 10-13 meses (figura 4.12) en que hay un mayor nivel en las hembras, respecto a las medidas de la producción de peróxido de hidrógeno (figura 4.2) ni con los de

carbonilación proteica (figura 4.7). No debería sorprendernos que no exista prácticamente diferencias entre machos y hembras, puesto que se ha descrito que si no hay diferencias en la longevidad entre sexos no hay diferencias en el estrés oxidativo (Sanz, A. 2007). Se confirma al comprobar que en el ratón C57/Bl6 no hay diferencias de longevidad asociadas al sexo, y estas aparecen si se induce un cambio en el estrés oxidativo (Ali, S.S. 2006).

En la comparación de las edades de los animales TG la reducción de la tasa de producción de peróxido de hidrógeno va acompañada del descenso en los niveles de proteínas carboniladas y de MDA. Esto explica que hay menor producción de radicales, y se traduce en menor daño oxidativo. Sugiere que la defensa antioxidante no tiene un papel relevante en este aspecto. Si se activara alguna de las enzimas encargadas de detoxificar el peróxido de hidrógeno, la catalasa o la glutatión peroxidasa (ver apartado [1.2.3](#) de la introducción) veríamos que la producción de radicales sería alta y el daño oxidativo no cambiaría.

Como hemos comentado, el hecho de que la producción de peróxido de hidrógeno se correlaciona con los niveles de oxidación medidos no significa necesariamente que tenga una relación causal, ya que hay otras fuentes de radicales libres (ver apartado [1.2.2](#) de la introducción). La medida de la expresión de genes antioxidantes, así como su actividad enzimática también sería de mucha utilidad. Sobre todo la expresión de la glutatión peroxidasa y catalasa, principales detoxificadoras del peróxido de hidrógeno, y superóxido dismutasa, la regulación de los cuales indicaría el estado en que están las defensas antioxidantes de la célula.

La fosforilación de p38 (p-p38) es un indicador de estrés oxidativo. Las medidas pueden ser muy interesantes, ya que los niveles de β A y p-p38 están relacionados, si bajan los niveles de β A baja también la fosforilación de p38, y también al contrario, si disminuye p-p38 también hay una disminución del β A (Zhu, X. 2005). Por tanto medir la fosforilación de p38 puede ser indicativo de la cantidad del péptido amiloideo. Si baja p-p38 puede ser que haya un descenso de los niveles de β A somáticos, explicando así el descenso en el estrés oxidativo. No obstante, si no vemos cambios en p-p38, la disminución del estrés oxidativo que observamos con la edad en los ratones transgénicos puede ser por una adaptación a la toxicidad del β A, que el organismo se vuelva resistente a su acción.

Con los datos de los que disponemos no se puede emitir un juicio claro sobre el modelo animal doble transgénico APP^{swe}/PS1^{dE9} para la EA en relación al hígado. Está claro que hay una adaptación al estrés oxidativo que pueden provocar los transgenes. No sabemos si este comportamiento está relacionado con lo que ocurre en humanos, puesto que hasta la fecha no hay estudios que lo corroboren.

4.3 CONSUMO DE GLUCOSA CEREBRAL

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que provoca la pérdida gradual de las funciones cognitivas, y que está ligada al envejecimiento y al estrés oxidativo. La aparición de placas del péptido β A y los ovillos neurofibrilares de la proteína TAU inducen una neurodegeneración en el cerebro. Esto provoca que el consumo de glucosa disminuya en pacientes con EA respecto a individuos sanos de edad equivalente, y durante la evolución de la enfermedad (Newberg, A. 2002; Pascual, B. 2010).

La comprobación de este hecho en un modelo animal puede ayudar a valorar posibles tratamientos y líneas de investigación que, por evidentes razones éticas, no es posible realizar en humanos.

Para estimar el consumo de glucosa se mide su captación por los tejidos mediante tomografía por emisión de positrones (ver apartado [3.2.9](#) de metodología).

En la EA el cerebro se atrofia de forma gradual, motivo por el que la patología evoluciona en diferentes fases. Este hecho se puede determinar a partir del consumo de glucosa. Los órganos tienen una cierta tasa de consumo, que disminuye si pierden parte de su funcionalidad. Una manera de valorar a un paciente con EA es a través de la tomografía por emisión de positrones, que sirve para determinar el consumo de glucosa y comprobar así el estado del cerebro. Valoramos el consumo de glucosa comparando entre machos y hembras, y entre ratones WT y TG. También contamos con 3 grupos de diferentes edades, de esta manera podemos ver la evolución de la patología a lo largo de la vida del animal. El diseño experimental de esta parte lo encontramos en el apartado [3.2.15](#) de metodología.

4.3.1 Tomografía por emisión de positrones en cerebro

4.3.1.1 PET en cerebro de ratones de 3-5 meses

En la figura 4.16 vemos la captación de glucosa cerebral en ratones de 3-5 meses machos y hembras, observamos que:

- En ratones de 3-5 meses macho es significativamente mayor en el ratón TG frente al WT.
- En hembras no se observan diferencias entre WT y TG.
- Los ratones TG macho captan de forma significativa más glucosa que las hembras TG.

De esto podemos deducir que el ratón TG macho tiene un mayor consumo de glucosa que no se corresponde con la realidad en humanos.

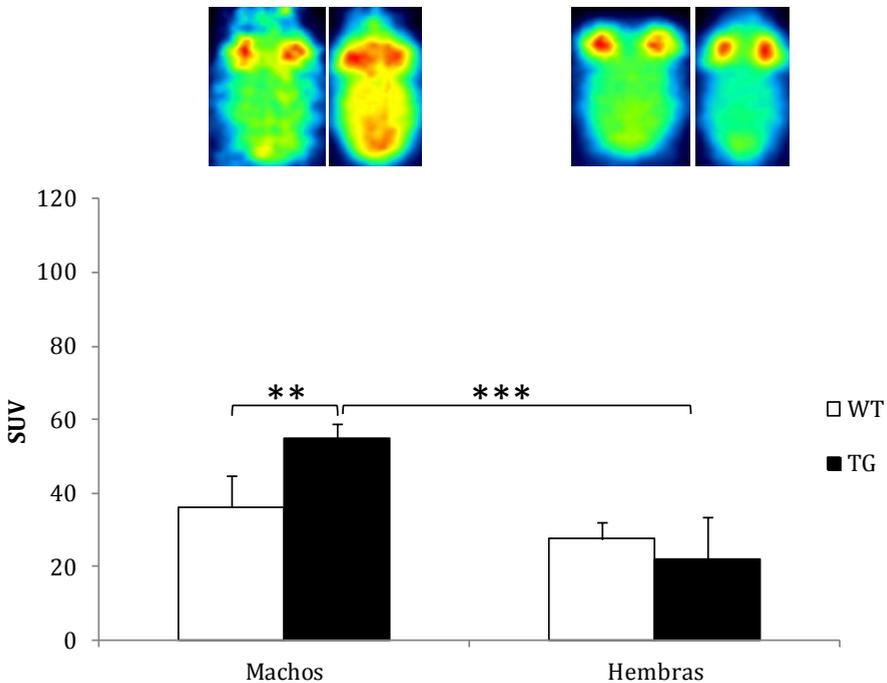


Figura 4.16 Captación de glucosa en cerebro de ratones de 3-5 meses.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $**=p<0,01$. $***=p<0,001$. En cada grupo experimental se utilizaron 5 ratones.

4.3.1.2 PET en cerebro de ratones de 10-13 meses

En la figura 4.17 vemos la captación de glucosa cerebral en ratones de 10-13 meses machos y hembras, observamos que:

- No hay diferencias significativas entre ratones WT y TG.
- No hay diferencias significativas entre sexos.

De lo que podemos deducir que no se corresponde con la realidad en humanos.

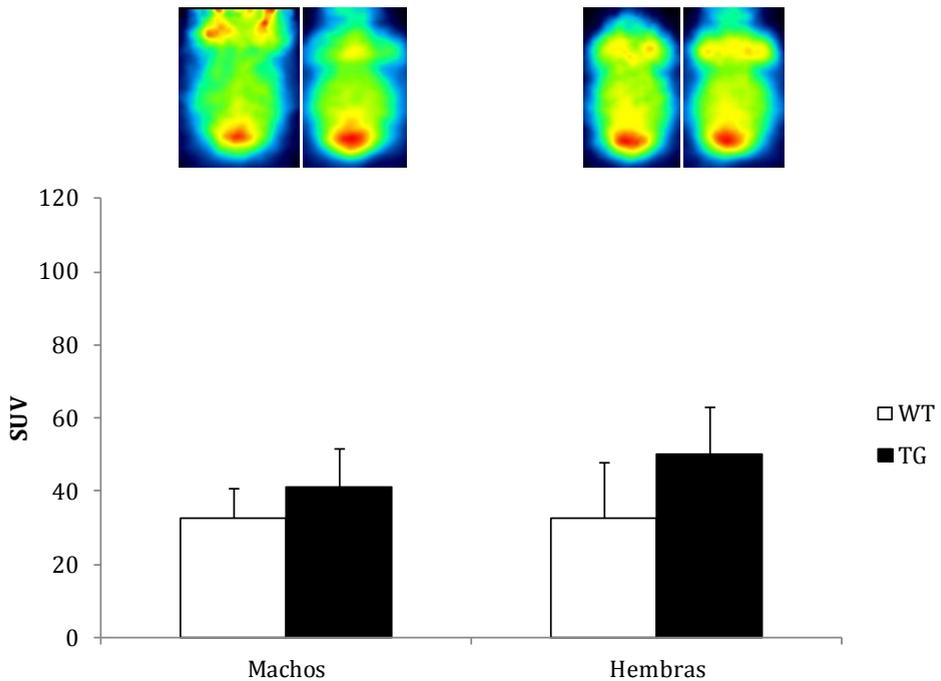


Figura 4.17 Captación de glucosa en cerebro de ratones de 10-13 meses.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron de 5-7 ratones.

4.3.1.3 PET en cerebro de ratones de 20-26 meses

En la figura 4.18 vemos la captación de glucosa cerebral en ratones de 20-26 meses machos y hembras, observamos que:

- No hay diferencias significativas entre ratones WT y TG.
- No hay diferencias significativas entre sexos.

De lo que podemos deducir que no se corresponde con la realidad en humanos.

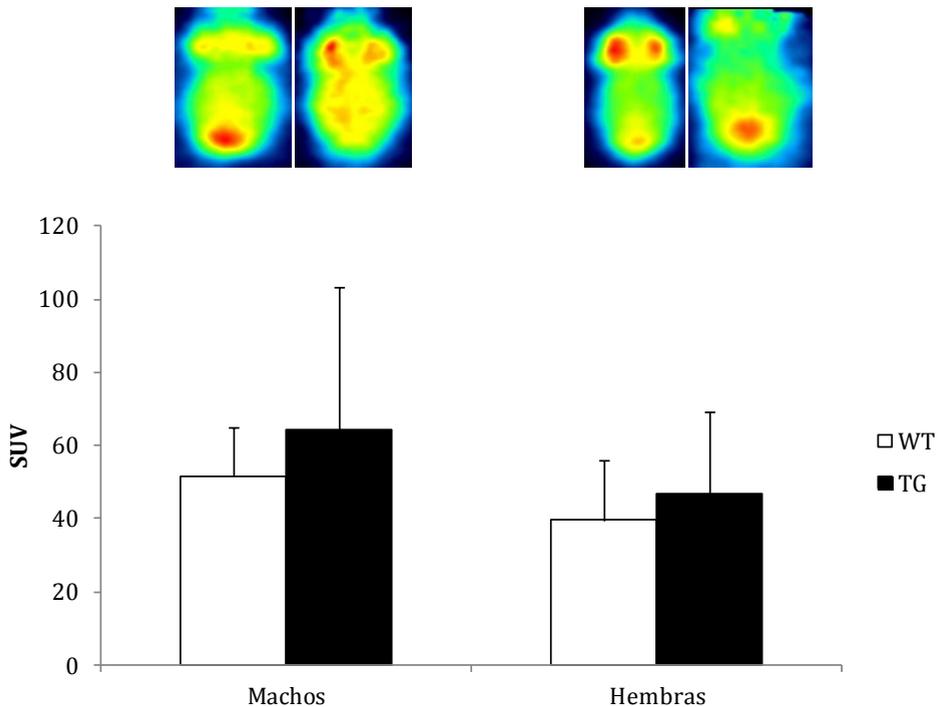


Figura 4.18 Captación de glucosa en cerebro de ratones de 20-26 meses.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-6 ratones.

4.3.1.4 PET en cerebro de ratones de macho a distintas edades

En la figura 4.19 vemos la captación de glucosa en ratones WT y TG machos en las distintas edades, observamos que:

- No hay diferencias entre los ratones TG.
- En el ratón WT el grupo de 20-26 meses tiene un mayor consumo de glucosa que el de 10-13 meses. No hay diferencias con el de 3-5 meses.

De lo que podemos deducir que no se corresponde con la realidad observada en humanos.

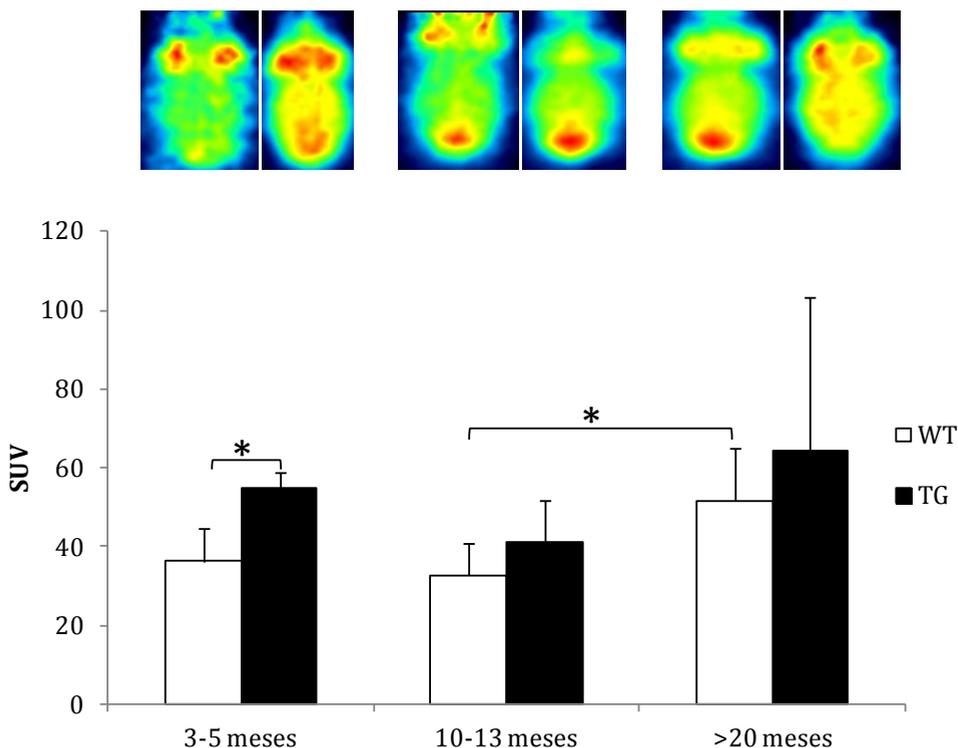


Figura 4.19 Captación de glucosa en cerebro de machos.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $*=p<0,05$. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-6 ratones.

4.3.1.5 PET en cerebro de ratones de hembra a distintas edades

En la figura 4.20 vemos la captación de glucosa cerebral en ratones WT y TG hembras en las distintas edades, observamos que:

- En el ratón TG hay un consumo significativamente mayor en la edad de 10-13 meses respecto a la edad de 3-5 meses.
- En ratones WT no hay diferencias significativas entre las distintas edades.

De lo que podemos deducir que no se corresponde con la realidad observada en humanos.

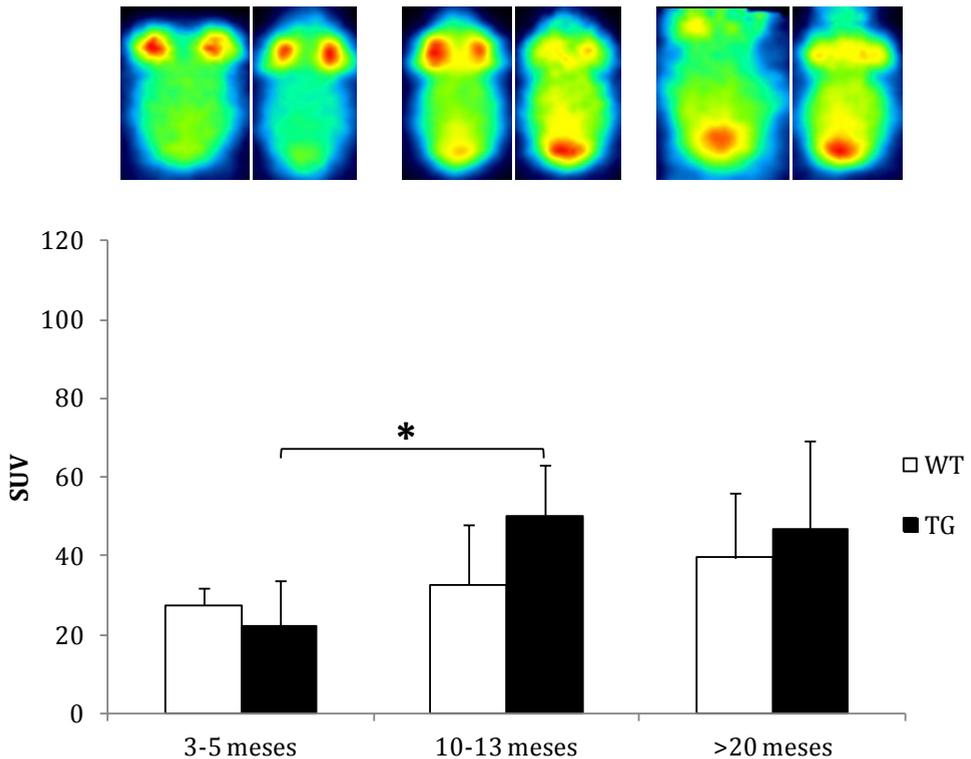


Figura 4.20 Consumo de glucosa cerebral en hembras.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $*=p<0,05$. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-6 ratones.

4.3.2 Discusión de los resultados del consumo de glucosa cerebral

4.3.2.1 Tomografía por emisión de positrones en cerebro total

Los resultados obtenidos muestran que en el grupo de 3-5 meses el ratón TG macho consume más glucosa que el WT, y más que las hembras de su mismo tipo genético (figura 4.31). En el resto de grupos no observamos diferencias significativas, aunque sí que se observa una clara tendencia del ratón TG a consumir más glucosa en todos ellos (figuras 4.31 a 4.33).

Esto no correlaciona con la realidad que se observa en humanos, en que el cerebro de pacientes con EA consume menos glucosa que en personas sanas. También se sabe que con el progreso de la EA el cerebro sufre una neurodegeneración cada vez mayor, lo que implica el descenso del consumo de glucosa a medida que avanza la patología (Newberg, A. 2002; Mosconi, L. 2005a; Mosconi, L. 2005b; Pascual, B. 2010). También en personas sanas se observa una reducción del consumo de glucosa durante el envejecimiento (Mosconi, L. 2008; Shen, X. 2013), aunque no de forma tan acusada como en la EA.

En este punto, al comparar las edades de los ratones, vemos que no solo no desciende el consumo en ningún grupo, sino que incluso aumenta de forma significativa en las hembras TG (figuras 4.34-4.35). Si el modelo replicara la progresión humana observaríamos un descenso del consumo de glucosa con la edad.

Experimentos previos de nuestro grupo muestran que el consumo de glucosa en el cerebro tiene una correlación inversa con el envejecimiento, a más edad menor consumo (Borras, C. 2009; Lopez-Grueso, R. 2010). Cabría esperar que se reprodujera la misma situación al comparar los distintos grupos durante el envejecimiento. No obstante no vemos que esto se corresponda con nuestros experimentos. Ni siquiera en los ratones WT vemos un descenso del consumo de glucosa con la edad. Estos resultados confirman lo visto por Poisnel et al. (Poisnel, G. 2011) de forma más extensa. Observan un aumento del consumo de glucosa asociado la edad en ratones APP/PS1, y además en las regiones más próximas a las placas. También se ha visto que hay una hiperactividad de células nerviosas como las neuronas y astrocitos, asociada al envejecimiento y a las placas amiloideas en modelos murinos de EA (Busche, M.A. 2008; Kuchibhotla, K.V. 2009).

4.3.2.2 Hipótesis varias

Según esta última observación, la progresión de la patología amiloidea en los ratones TG podría explicar el mayor consumo de glucosa, al haber cada vez más

placas. El motivo por el que se da este fenómeno puede deberse a la degradación del β A por los astrocitos y la microglía. La degradación del péptido está mediada principalmente por apoE (Holtzman, D.M. 2001; Zlokovic, B.V. 2005a; Zlokovic, B.V. 2005b; Jiang, Q. 2008). Al sintetizarse en los astrocitos principalmente, implicaría un aumento en el metabolismo de estas células, y por tanto del consumo de glucosa. Efectivamente, se ha visto que los astrocitos tienen un mayor consumo de glucosa que las neuronas (Bolanos, J.P. 1995; Figley, C.R. 2011).

Siguiendo la línea del aumento del metabolismo cerebral debido al aumento de placas, podría existir un aumento en el flujo sanguíneo para nutrir las células, que aportaría más glucosa al cerebro. De esta manera explicaríamos el aumento de su consumo. No obstante, se ha observado que el flujo sanguíneo cerebral disminuye a causa del β A (Niwa, K. 2000; Niwa, K. 2002; Meyer, E.P. 2008; Bell, R.D. 2009), por lo que el aumento del flujo sanguíneo no puede ser la causa del aumento en el consumo de glucosa cerebral.

La relación entre la EA y el metabolismo de la glucosa es clara, al relacionarse de forma estrecha con la diabetes (Bierhaus, A. 2005; Kroner, Z. 2009; Han, W. 2010; Correia, S.C. 2012). Se ha visto que la enzima degradadora de la insulina (IDE) es capaz de degradar β A (Farris, W. 2003; Jiang, Q. 2008). De esta manera se establecería una competencia enzimática entre el β A y la glucosa. El aumento visto con la edad en los ratones TG se puede achacar a que haya más placas de β A, al no estar libre se reduciría su disponibilidad como sustrato para la IDE, resultando en una mayor captación de glucosa. De la misma manera, también se podría explicar el aumento en el consumo de glucosa visto en los ratones TG frente a los WT, ya que en los primeros hay una cantidad de β A que no tenemos en los ratones WT.

En cualquier caso, los resultados obtenidos no concuerdan con la realidad observada en humanos.

4.4 DEL CEREBRO AL HÍGADO

El estrés oxidativo que hemos visto en el hígado se provoca de alguna manera por la EA en el modelo animal. El camino que sigue el β A desde el cerebro al hígado es el siguiente eslabón de la cadena en la presente investigación.

Para determinar este camino medimos los transportadores LRP1, tanto en hígado como en cerebro, y RAGE solo en cerebro. También cuantificamos la concentración de β A en plasma.

Ya que en este modelo animal el β A propio de la EA se forma en el sistema nervioso central, el siguiente paso sería describir el mecanismo por el que se produce una interacción entre cerebro e hígado. En este punto de la investigación utilizamos solo machos. Al encontrar diferencias entre sexos en algunos parámetros de estrés oxidativo, como hemos descrito anteriormente, decidimos continuar la investigación solo en machos. El diseño experimental de esta parte lo encontramos en el apartado 3.2.13 de metodología.

4.4.1 Niveles de LRP1

LRP1 es un receptor implicado en el transporte del β A. La eliminación del péptido β A a través de la barrera hematoencefálica desde el cerebro hacia la sangre está mediada por este transportador. Esta circulación sistémica acaba en el hígado, donde también media la entrada del β A. Una vez en este punto se degrada, con la consiguiente eliminación del organismo (ver apartado 1.1.3.3 de la introducción). Hemos medido los niveles del transportador por *western blotting* (ver apartado 3.2.5 de metodología).

4.4.1.1 Resultados de los niveles de LRP1 en cerebro

En la figura 4.21 vemos los niveles de LRP1 en cerebro de ratones macho, observamos que:

- No hay diferencias entre los ratones WT y TG dentro de cada una de las distintas edades.
- En los ratones TG hay un menor nivel en el grupo de 20-26 meses que en los grupos de 3-5 meses y 10-13 meses.
- En los ratones WT hay un menor nivel en el grupo de 20-26 meses que en los grupos de 3-5 meses y 10-13 meses.

Lo que nos permite deducir que habrá una menor salida de β A del cerebro en los ratones TG y WT de 20-26 meses.

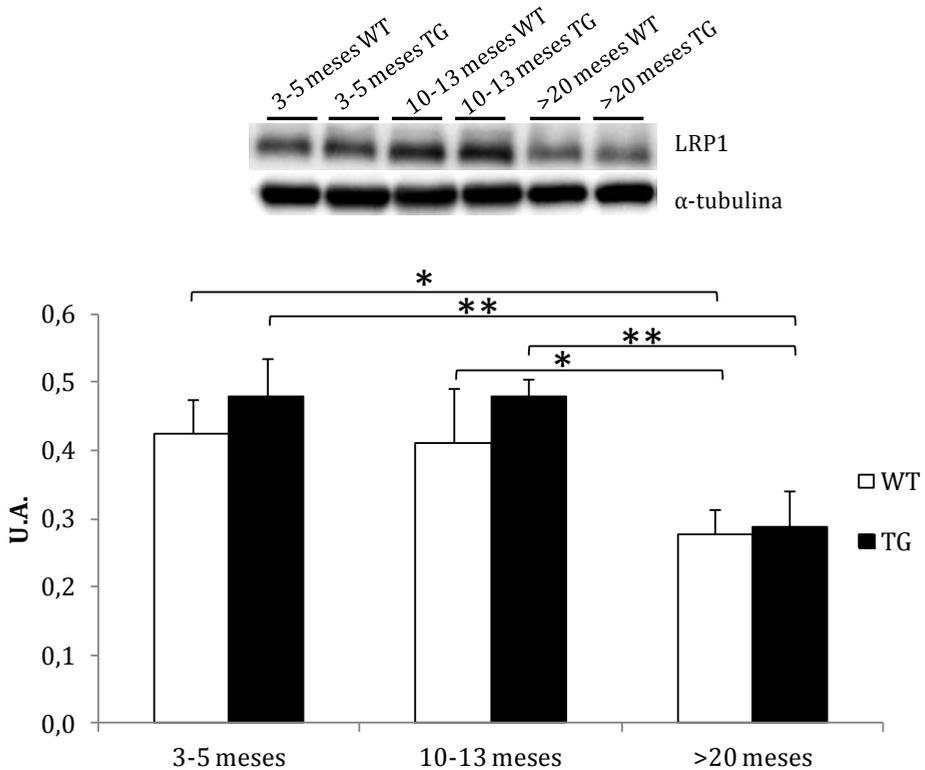


Figura 4.21 Niveles de LRP1 en cerebro.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-6 ratones.

4.4.1.2 Resultados de los niveles de LRP1 en hígado

En la figura 4.22 vemos los niveles de LRP1 en hígado de ratones macho, observamos que:

- En ratones TG hay mayor nivel que en el WT en las edades de 3-5 meses y de 10-13 meses.
- En ratones de 20-26 meses no hay ninguna diferencia significativa.
- En ratones TG no hay diferencias significativas entre las distintas edades.
- En ratones WT no hay diferencias significativas entre las distintas edades.

Lo que nos permite deducir que el receptor LRP1 en el hígado se sobreexpresa en ratones TG, y que esta sobreexpresión desaparece con la edad.

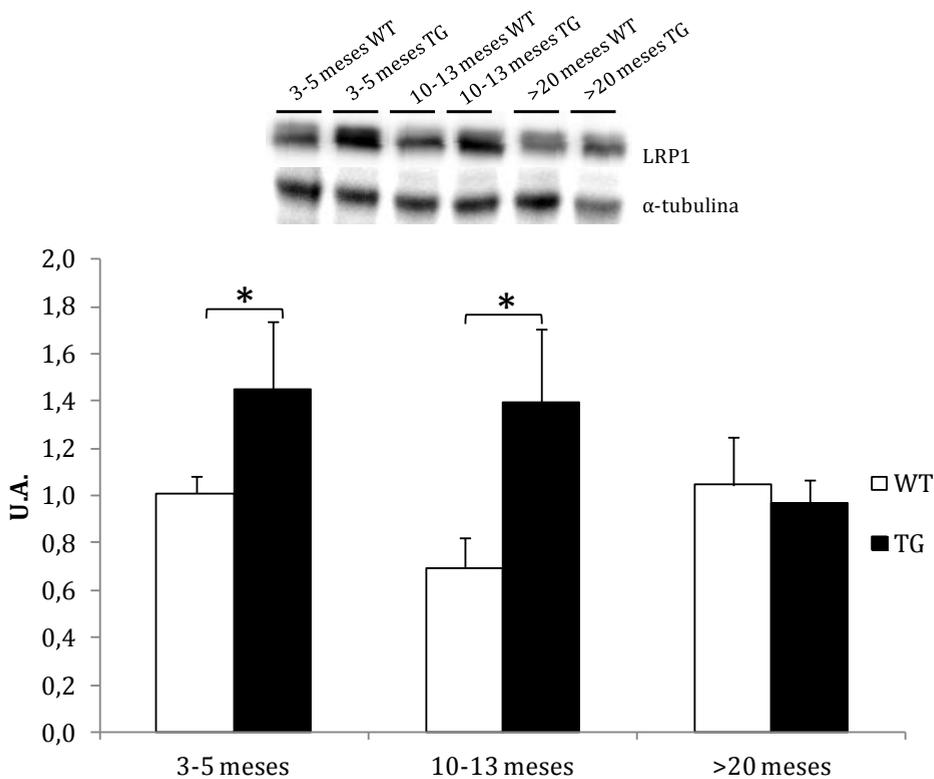


Figura 4.22 Niveles de LRP1 en hígado.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $*=p<0,05$. En cada grupo experimental se utilizaron de 2-5 ratones.

4.4.1.3 Discusión de los niveles de LRP1

El transportador LRP1 parece tener un papel fundamental en los cambios en el estrés oxidativo observados en el hígado, ya que se encarga de sacarlo del cerebro e introducirlo en el hígado, en donde se degradará (Ghiso, J. 2004; Tamaki, C. 2006) (ver apartado 1.1.3.3 de la introducción).

A nivel del cerebro (figura 4.16) vemos que no hay cambios entre ratones WT y TG, pero sí que observamos cambios con la edad. Es en el grupo de 20-26 meses tanto en ratones WT como TG, donde hay un menor nivel que encajaría con la disminución del estrés oxidativo en ratones TG. Como hemos dicho en la introducción (ver apartado 1.1.3.3 de la introducción), el LRP1 interviene en la formación del β A, y en este proceso se reprime su expresión (Ulery, P.G. 2000; Pietrzik, C.U. 2002). Se ha visto que el cambio en el LRP1 no afecta a la deposición de β A en el hipocampo (Xu, G. 2012), por lo que la formación debe ser mayoritariamente de β A soluble, que sí que puede inducir cambios en el estrés oxidativo sistémico (Zerbinatti, C.V. 2004).

Si durante toda la vida del animal TG se ha formado β A, con la consiguiente represión de la expresión del LRP1, explicaría por qué hay menos transportador. No obstante también se reduce de la misma manera en el ratón WT, que no tiene una formación de β A como el ratón TG, lo que sugiere que el envejecimiento es el factor fundamental que regula la expresión del transportador LRP1.

Hay que destacar que la parte extracelular del LRP1 se puede escindir y actúa como transportador de β A por la sangre (Sagare, A. 2007). De esta manera contribuirá en mayor medida a su circulación sistémica, y por tanto a los cambios en el estrés oxidativo somáticos.

A nivel del hígado (figura 4.17) observamos que el ratón TG tiene mayor nivel que el WT, excepto en el grupo de 20-26 meses. De alguna manera se induce una sobreexpresión del LRP1 hepático en los ratones TG de 3-5 meses y 10-13 meses. En el grupo de 20-26 meses ambos tipos genéticos tienen los mismos niveles, que han disminuido en el ratón TG respecto a las edades más tempranas. Esta reducción con la edad encaja perfectamente con lo observado en el cerebro en animales TG, no así en los animales WT en los que no hay cambios a nivel hepático. Ya que la captación de β A por el hígado está mediada por el LRP1 (Ghiso, J. 2004; Tamaki, C. 2006), es acertado suponer que los cambios en el estrés oxidativo debido al péptido observados están relacionados con los cambios en este transportador.

Evidentemente el ratón WT no está generando β A. Si tenemos la hipótesis de que este péptido es el origen del desequilibrio oxidativo, sería normal que el LRP1 no

Resultados y discusión

influyera en el estado de este tipo genético. En cuanto a los ratones TG, si hay menos LRP1 con la edad, habrá menos salida de β A del cerebro, y es posible que llegue menos al hígado y que por este motivo haya una reducción de la oxidación. De igual manera, al haber menos LRP1 hepático con la edad, habrá menos captación por el hígado, lo que también explicaría la reducción de la oxidación. Puede ser perfectamente una acción conjunta a distinto nivel, cerebral y hepático.

Llegados a este punto podemos hipotetizar que los cambios en el transportador LRP1 son los responsables del estrés oxidativo hepático. Cuando los animales TG son jóvenes sale β A del cerebro y es captado por el hígado, que en el proceso de degradación produce estrés oxidativo. Cuando son viejos, sale menos β A del cerebro, y además entra menos en el hígado, lo cual supone un descenso en el estrés oxidativo, tal y como hemos visto anteriormente. Esto explica la reducción del estrés oxidativo hepático con la edad en el ratón TG.

4.4.2 Niveles de RAGE en cerebro

El RAGE es un transportador multiligando, entre los que encontramos el β A. Uno de los hechos importantes para la EA es que este transportador es capaz de introducir β A desde la sangre al cerebro. En este proceso también se provoca estrés oxidativo (ver apartado 1.1.3.4 de la introducción). Hemos medido los niveles del transportador por *western blotting* (ver apartado 3.2.5 de metodología).

4.4.2.1 Resultados de los niveles de RAGE en cerebro

En la figura 4.23 vemos los niveles de RAGE en cerebro de ratones macho, observamos que:

- No hay diferencias entre los ratones WT y TG dentro de cada una de las distintas edades.
- No hay diferencias significativas entre las distintas edades en el ratón TG.
- No hay diferencias significativas entre las distintas edades en el ratón WT.

De esto podemos deducir que no se puede establecer una relación entre el transportador RAGE y los cambios en el transporte del β A.

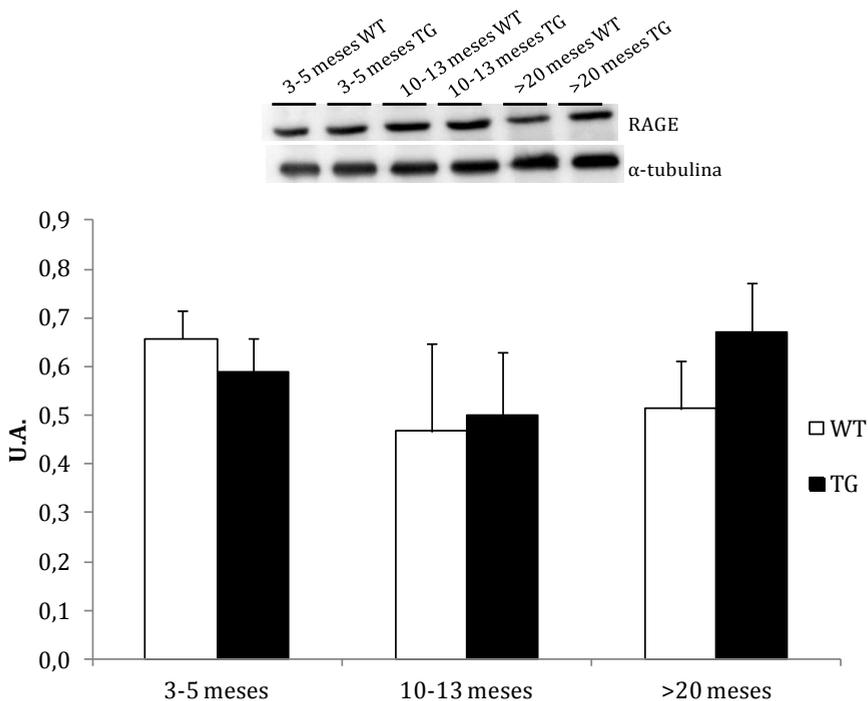


Figura 4.23 Niveles de RAGE en cerebro.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-6 ratones.

4.4.2.2 Discusión de los niveles de RAGE

El transportador RAGE tiene, entre otras, la propiedad de introducir β A desde el torrente sanguíneo hacia el cerebro a nivel de la barrera hematoencefálica (Deane, R. 2003). Por lo tanto puede estar influyendo en el estrés oxidativo sistémico.

Observamos que no hay cambios importantes en los niveles de RAGE (figura 4.23) en cuanto al tipo genético, ni en cuanto a la edad de los grupos. Por tanto parece que no se ve influido por los transgenes insertados en el ratón, ni por la edad. Cambios de RAGE con el envejecimiento se han demostrado importantes en el estado del hígado (Kuhla, A. 2013).

Así pues, al no haber observado cambios en los niveles del transportador con el envejecimiento, no debería tener una influencia decisiva en el estrés oxidativo hepático, y tampoco en las diferencias observadas en la circulación sistémica del β A.

La hipótesis de que el responsable de los cambios es el LRP1 va ganando fuerza si descartamos el RAGE como implicado en este proceso.

4.4.3 Concentración de β -amiloide 40 en sangre

Tal y como hemos visto anteriormente, el β A es capaz de introducirse en el torrente sanguíneo y llegar a los diferentes órganos del cuerpo. Los cambios en los transportadores que hemos descrito pueden hacer que el flujo de β A a los órganos sea variable y puede afectar al grado de oxidación de los órganos. El hecho de medir el β A 40 es debido a que es más soluble que el β A 42. La cuantificación se ha realizado por ELISA (ver apartado [3.2.8](#) de metodología).

4.4.3.1 Resultados de los niveles de β -amiloide 40 en sangre

En la figura 4.24 vemos la concentración de β A 40 medida en plasma de ratones macho, observamos que:

- En ratones de 3-5 meses no hay diferencias significativas en el ratón TG frente al WT.
- En ratones de 10-13 y 20-26 meses la concentración es significativamente más alta en el ratón TG que en el WT.
- En los ratones TG, hay menor concentración en el grupo de 3-5 meses respecto a los de 10-13 meses y 20-26 meses.
- En ratones WT no hay diferencias significativas entre las distintas edades.

Esto nos permite deducir que una parte del β A 40 se está acumulando en sangre.

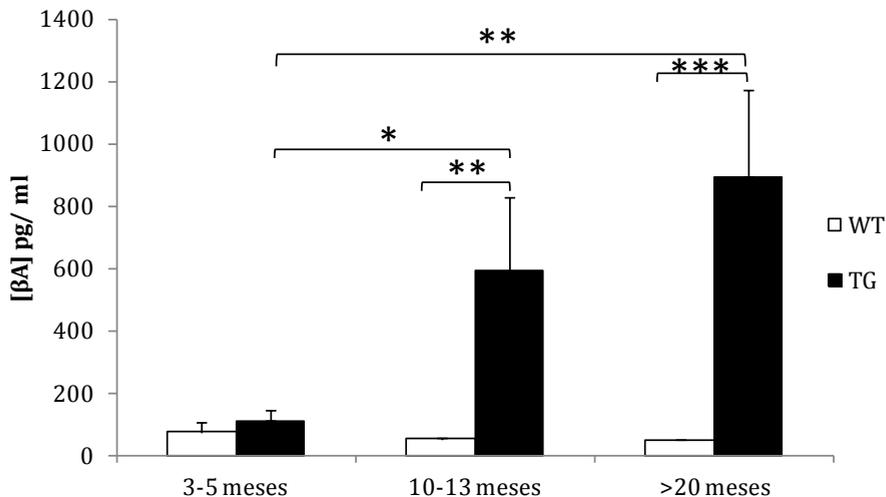


Figura 4.24 Concentración de β A en plasma.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $*=p<0,05$, $**=p<0,01$. $***=p<0,001$. En cada grupo experimental se utilizaron de 4-6 ratones.

4.4.3.2 Discusión de la concentración de β -amiloide 40 en sangre

Medimos la concentración de β A 40 en sangre para determinar si cambia con la edad. Partiendo de la base de que el hígado es el principal órgano implicado en la degradación del β A (Ghiso, J. 2004), si es cierto que hay menor flujo de llegada al hígado se confirmaría nuestra hipótesis de que al haber menos degradación también habría menos estrés oxidativo. El hecho de medir el β A 40 y no el β A 42 se debe a que esta forma es la más soluble, y tendrá más facilidad para integrarse en el sistema circulatorio y salir fuera del sistema nervioso (Prelli, F. 1988).

Al observar los resultados (figura 4.19) vemos que la concentración de β A 40 aumenta con la edad en los ratones TG. En los ratones WT aparece un nivel residual que no cambia entre las edades. Esto va en contra de lo que podíamos esperar, ya que hemos visto que el LRP1, que se encarga de sacarlo del cerebro, disminuye con la edad, y aún así hay más β A 40 circulante. Cómo explicar, que habiendo más β A en sangre, afecte en menor medida a la oxidación asociada al hígado. La respuesta pensamos que se debe a los transportadores.

4.4.4 Discusión de los resultados de la vía del cerebro al hígado

4.4.4.1 Hipótesis varias

Está claro que encontramos menos LRP1 en cerebro con la edad, lo que hará que haya una disminución en el aclaramiento cerebral. Aún así hay más β A en sangre, por lo tanto hipotetizamos que la degradación debida al hígado debe ser menor. Este descenso en la degradación nos hace formular 2 hipótesis.

Una de ellas es que la maquinaria enzimática encargada de su degradación no funcione correctamente a edades avanzadas. Es poco probable, ya que los hepatocitos tienen una capacidad de regeneración extraordinaria (Gilbert, S.F. 2006), y a no ser que exista un proceso cirrótico, no debería haber problemas para que el hígado eliminara esta toxina.

La otra hipótesis con la que trabajamos, ilustrada en la figura 4.25, es que el efecto de los receptores está siendo crítico para el proceso de eliminación del β A del organismo. Descartado el RAGE para un papel principal, nos centramos en el LRP1. Su disminución en los hepatocitos puede ser la clave. Al reducirse la captación del β A, se degradaría en menor cantidad, y así habría menor producción de radicales libres, y por tanto menor daño oxidativo, acompañado de mayores niveles en plasma.

Evidentemente hay que profundizar más en estos experimentos. Los siguientes pasos a dar serían comprobar el estado de la barrera hematoencefálica, ya que es

el punto en que se va a regular el tránsito del β A entre el sistema nervioso y el resto del cuerpo. También sería muy interesante medir la degradación por hepatocitos aislados de ratones pertenecientes a los mismos grupos con los que hemos trabajado. También se debería medir la degradación en un homogenado de hígado de ratones pertenecientes a los mismos grupos con los que hemos trabajado, para eliminar el efecto del receptor y confirmar que no es la degradación enzimática la que cambia.

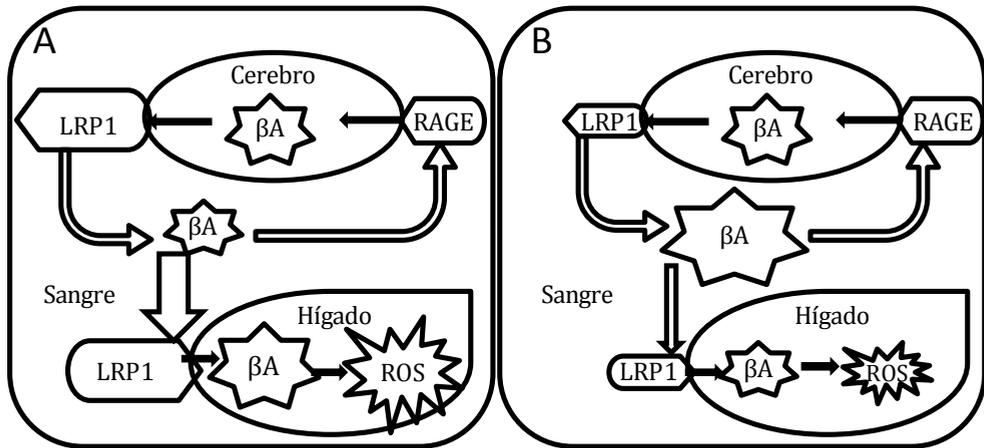


Figura 4.25 Hipótesis de los receptores en el estrés oxidativo hepático.

A: edades tempranas. B: edades avanzadas. En A, el transportador LRP1 está en niveles altos, por lo que se introduce en el hígado en mayor cantidad y se degrada produciendo altos niveles de estrés oxidativo. En B, el transportador LRP1 tiene niveles más bajos, por lo que no entra en tanta cantidad en el hígado, hay menor degradación y se producen menos radicales libres.

4.4.4.2 Valoración global de la vía del cerebro al hígado

Hemos visto que el RAGE no cambia con la edad, de manera que no le podemos atribuir un papel importante en el estrés oxidativo hepático.

También hemos visto que el LRP1 disminuye con la edad, en cerebro y en hígado, hecho que se corrobora comparando con otros estudios (Tamaki, C. 2006). El hecho de que haya menos en cerebro determinará que haya un flujo menor hacia fuera del cerebro. También se ha sugerido que el β A produce la oxidación del transportador y por esto será menos funcional (Owen, J.B. 2010). Tiene la propiedad de que ayuda al transporte sistémico del β A a través de la sangre (Zlokovic, B.V. 2010). Al haber menos LRP1 en cerebro, podríamos pensar que también se verá menguada su disponibilidad para transportarlo. No obstante la concentración que encontramos en sangre es mayor cuanto menor transportador hay. Puede explicarse si el β A no solo se transporta asociado al LRP1, sino

también disuelto o asociado a otro elemento, como se sugiere al ver que en las plaquetas hay un acúmulo (Skovronsky, D.M. 2001). Estos factores pueden determinar que el péptido amiloideo no esté disponible para su captación por el hígado. Al no poder captarlo, explicaría que disminuya la oxidación hepática.

De todas formas no se ha demostrado que la captación de β A por parte del hígado esté influida por sus posibles transportadores. De hecho, Ghiso y colaboradores (Ghiso, J. 2004) al inyectar β A marcado radiactivamente en ratones observaron una captación por parte de este órgano mucho mayor que por cualquier otro órgano. Comprobaron que un porcentaje pequeño de la radiación total inyectada se distribuye de forma uniforme entre el resto de órganos del cuerpo, y por tanto es de suponer que la parte que no se puede captar por el hígado es despreciable. No obstante, en este estudio no tienen en cuenta el factor de la edad, solo trabajan en animales jóvenes, que es equiparable a nuestro grupo de edad de 3-5 meses. En este punto en nuestras observaciones no vemos que haya niveles de β A elevados en sangre (figura 4.24). Si en el artículo de Ghiso y colaboradores el modelo se comporta igual, el mayor nivel de LRP1 a edades tempranas haría que capte casi todo el β A. Así no se podría comprobar el efecto del transportador en la captación, ya que no hay condiciones en las que cambie el LRP1.

Así pues podemos sugerir que el LRP1 a nivel del hígado es el principal responsable de los cambios observados en el estrés oxidativo hepático en los ratones APP^{swe}/PS1^{dE9} y de la acumulación de β A en plasma.

4.5 EFECTOS AGUDOS DEL TRATAMIENTO CON BEXAROTENO Y GENISTEÍNA

Una vez entendido el funcionamiento de la dinámica sistémica del β A, realizamos un estudio experimental para determinar un posible tratamiento para la EA con bexaroteno y genisteína. Este experimento lo realizamos solo en ratones TG, ya que estamos valorando una acción terapéutica sobre una patología, que no existe en los ratones WT. Utilizamos hembras porque la EA es más común en mujeres que en hombres. También se ovariectomizó a estos animales para simular las condiciones en que una mujer desarrolla la EA, que es a partir de la menopausia. Se intenta reproducir de esta manera el momento en que se pierde la gran mayoría de la defensa hormonal que suponen los estrógenos.

Llegados a este punto diseñamos un experimento para ver los efectos de la adición de genisteína al tratamiento con bexaroteno (ver apartado [3.2.14](#) de metodología).

4.5.1 β -amiloide en cerebro

La acumulación del péptido β A en el cerebro es una de las características de la EA. La disminución de los niveles en el cerebro puede ayudar a reducir la patología. El flujo que saldrá del cerebro a la sangre, y la propia fagocitosis por la microglía son los mecanismos por los que disminuye la acumulación del péptido en el cerebro (LaFerla, F.M. 2012). Hay 2 formas mayoritarias del péptido β A, de 40 y de 42 aminoácidos. La forma de 40 es más soluble y tendrá mayor importancia intracelular y mayor tendencia a salir a la circulación sistémica. La forma de 42 aminoácidos es más insoluble, por lo que será la forma predominante en las placas (Prelli, F. 1988; Cummings, B.J. 1995; Selkoe, D.J. 2000). Hemos medido los niveles de β A 40 y 42 por ELISA (ver apartado [3.2.8](#) de metodología).

4.5.1.1 Niveles de β -amiloide 40 en cerebro

En la figura 4.26 vemos la concentración de β A 40 medida en cerebro, observamos que:

- El tratamiento con genisteína baja de forma significativa los niveles de β A 40 en cerebro.
- El tratamiento con bexaroteno más genisteína baja de forma significativa los niveles de β A 40 en cerebro.
- No hay diferencias significativas en el tratamiento con bexaroteno.

De esto podemos deducir que los tratamientos con genisteína, por sí sola y de manera sinérgica con el bexaroteno, reducen la patología amiloidea asociada a la EA en el modelo animal APPswe/PS1dE9.

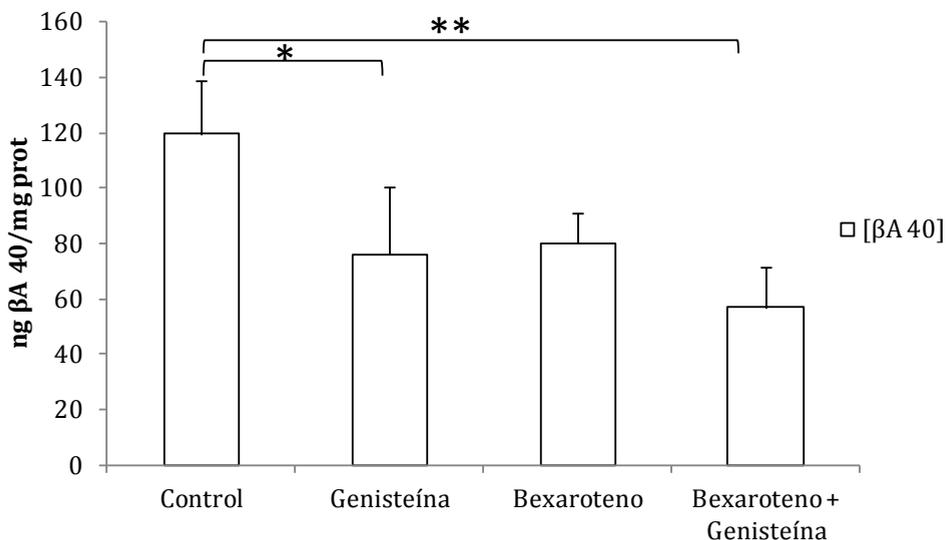


Figura 4.26 Niveles β A 40 en cerebro.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos *= p <0,05, **= p <0,01. En cada grupo experimental se utilizaron de 3-4 ratones.

4.5.1.2 Niveles de β -amiloide 42 en cerebro

En la figura 4.27 vemos la concentración de β A 42 medida en cerebro, observamos que:

- El tratamiento con bexaroteno más genisteína baja de forma significativa los niveles de β A 42.
- No hay diferencias significativas en el tratamiento con genisteína.
- No hay diferencias significativas en el tratamiento con bexaroteno.

De esto podemos deducir que el tratamiento con genisteína y bexaroteno reduce la patología amiloidea asociada a la EA en el modelo animal APPswe/PS1dE9.

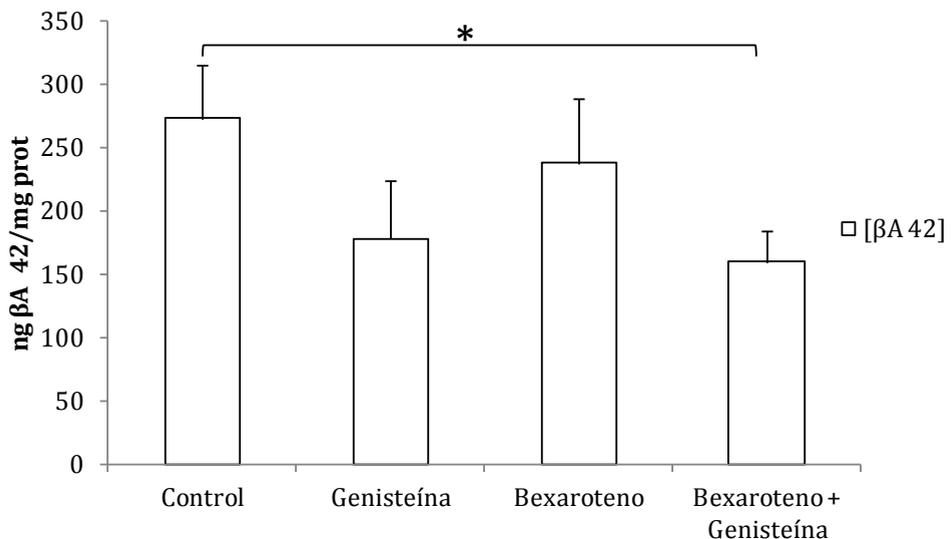


Figura 4.27 Niveles β A 42 en cerebro.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. Valores estadísticamente significativos $^* = p < 0,05$. En cada grupo experimental se utilizaron de 3-4 ratones.

4.5.1.3 Discusión de β -amiloide en cerebro

Como hemos comentado anteriormente, en el estudio del grupo de Gary Landreth (Cramer, P.E. 2012), observaron que el tratamiento con bexaroteno reducía la patología amiloidea asociada a la EA en modelos animales. Este medicamento es un agonista del receptor retinoide X (RXR), el cual funciona formando un dímero con el receptor activado de proliferación de los peroxisomas γ (PPAR γ), que hace que se sobreexpresen la apoE. Esta proteína mediará la degradación del β A (Jiang, Q. 2008). Nuestro grupo publicó hace unos años que la genisteína incrementa los niveles de PPAR γ (Valles, S.L. 2010). Por tanto, si aumentamos la disponibilidad del factor de transcripción se debería potenciar el efecto del medicamento.

Para ello diseñamos un experimento (ver apartado 3.2.14 de metodología) con el objetivo de ver si el tratamiento combinado era efectivo para reducir la patología amiloidea en los ratones APP/PS1. En un primer paso medimos la concentración de β A, tanto de 40 como de 42 aminoácidos.

Los resultados obtenidos a partir del ELISA muestran cómo la concentración de β A40 en cerebro baja de forma significativa con el tratamiento con genisteína y de forma más acusada en el tratamiento con genisteína más bexaroteno. Con el tratamiento con bexaroteno también se observa una bajada, aunque no significativa (figura 4.26). En relación al β A42 observamos un patrón similar de bajada, aunque en menor medida (figura 4.27). Este descenso en la cantidad de β A debido a los tratamientos es mayor en el caso del β A40, probablemente porque es más soluble que el β A42 (Prelli, F. 1988; Cummings, B.J. 1995; Selkoe, D.J. 2000), y por tanto se movilizará con mayor facilidad para su eliminación.

La bajada del péptido era esperable en el tratamiento con bexaroteno, como estaba previamente publicado (Cramer, P.E. 2012). Nuestra hipótesis de que el efecto de este medicamento se vería potenciado por la genisteína se ve confirmada con el resultado obtenido del tratamiento conjunto. Al principio del experimento no esperábamos observar un efecto en el tratamiento con genisteína, pero sería perfectamente posible. Si el efecto que tiene es incrementar PPAR γ (Valles, S.L. 2010), y sabiendo que media la expresión de apoE, podemos pensar que de esta manera también estará aumentando el aclaramiento cerebral del β A. Resultados que aparecieron publicados casi a la vez que realizábamos estos experimentos confirman que la genisteína tiene un efecto por sí sola en el aclaramiento cerebral de β A (Bagheri, M. 2012), e incluso que puede ser capaz de mejorar la cognición (Bagheri, M. 2011).

4.5.2 Niveles de β -amiloide 40 en sangre

Tal y como hemos visto anteriormente, el β A es capaz de introducirse en el torrente sanguíneo y llegar a los diferentes órganos del cuerpo, por los cambios en los transportadores que hemos descrito (ver apartado 1.1.5 de la introducción). El tratamiento administrado a los ratones puede hacer que el aclaramiento cerebral de β A aumente. El hecho de medir el β A 40 es debido a que es más soluble que el β A 42. La cuantificación se ha realizado por ELISA (ver apartado 3.2.8 de metodología).

4.5.2.1 Resultados de β -amiloide 40 en sangre

En la figura 4.28 vemos la concentración de β A 40 en sangre, observamos que:

- No hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

De lo que podemos deducir que el β A resultante del aclaramiento cerebral no se acumula en sangre, porque es detoxificado por el hígado.

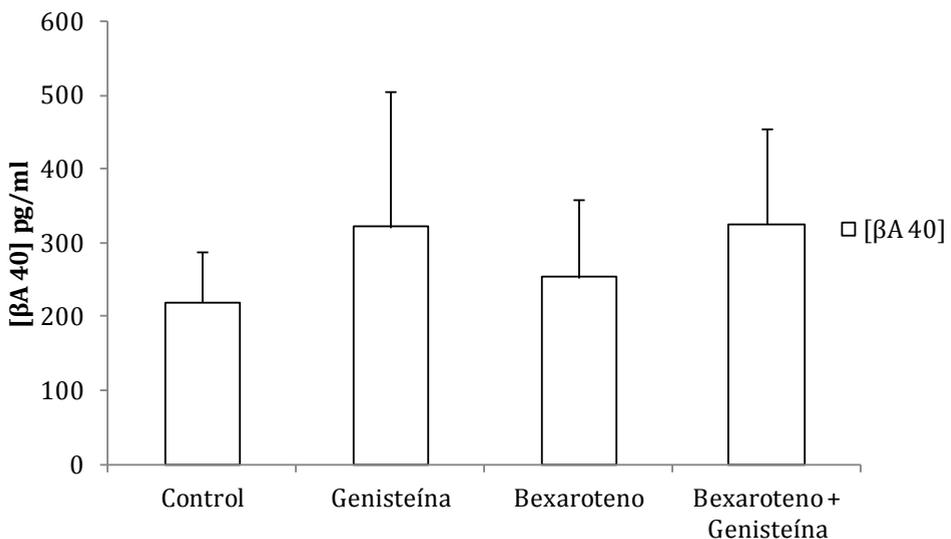


Figura 4.28 Niveles de β A 40 en sangre.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron de 3-4 ratones.

4.5.2.2 Discusión de los niveles de β -amiloide 40 en sangre

El hecho de medir el β A40 y no el β A42 se debe a que es más soluble (Prelli, F. 1988), y tendrá más facilidad para atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a la sangre. Si se aumenta el aclaramiento cerebral, tal y como hemos descrito, el β A40 no puede desaparecer. Como se ha visto con anterioridad, sabemos que el hígado es capaz de degradar β A (Ghisso, J. 2004; Tamaki, C. 2006). Si este órgano está funcionando correctamente debería eliminarlo del torrente sanguíneo. No hay indicios de que tenga un malfuncionamiento, como se desprende de los resultados de las transaminasas que mostraremos más adelante (figuras 4.35-4.36). Si no funcionara bien, veríamos un incremento de estas enzimas que indicarían un daño hepático.

En los resultados no observamos diferencias significativas en la concentración de β A40 en sangre con los diferentes tratamientos (figura 4.28). Sí que se observa un aumento en los grupos que han recibido genisteína. Esto nos sugiere que el efecto principal de la genisteína está enfocado a eliminar el péptido del cerebro a través de la barrera hematoencefálica, mientras que el bexaroteno parece que tiene mayor efecto en la eliminación del β A *in situ*, a través de la microglía.

Por tanto podemos decir que el hígado está degradando correctamente el péptido amiloideo y es normal que no veamos cambios importantes de concentración en sangre, a pesar de que haya un mayor flujo hacia fuera del cerebro. También hemos de decir que el aclaramiento del β A40 no solo se debe al transporte a través de la barrera hematoencefálica, sino también a la acción fagocítica de la microglía dentro del cerebro (Jiang, Q. 2008). Así pues que no observemos cambios sustanciales en los niveles de β A40 en sangre no es un hecho que deba sorprendernos.

4.5.3 Placas de β -amiloide en cerebro

El β A se agrega formando placas en el cerebro (figuras 1.7 y 1.16 de la introducción), con la consiguiente pérdida de funcionalidad de las zonas afectadas, estableciéndose una correlación inversamente proporcional entre el volumen ocupado por las placas y el índice en la escala Mini Mental State Examination (Cummings, B.J. 1995), lo que significa que a mayor volumen de depósitos amiloideos mayor demencia. Hemos determinado las placas en los distintos grupos de animales por microscopía óptica (ver apartado [3.2.11](#) de metodología).

En la figura 4.29 vemos unas imágenes de estas placas.

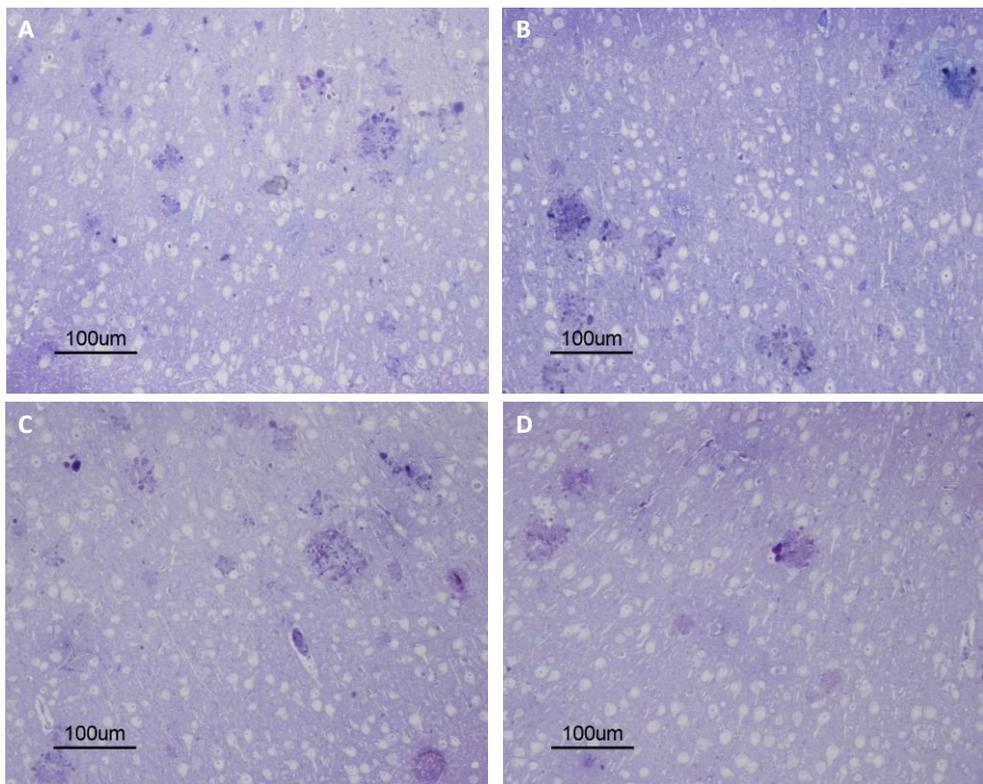


Figura 4.29 Placas de β A en cerebro en los distintos grupos de tratamientos. A: control; B: genisteína; C: bexaroteno; D: genisteína + bexaroteno. Se muestra una imagen representativa.

4.5.3.1 Número de placas

En la figura 4.30 vemos el número de placas en cerebro, observamos que:

- No hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

De lo que podemos deducir que los tratamientos no son efectivos para reducir el número de placas en el cerebro del modelo animal para la EA APPswe/PS1dE9, aunque existe una tendencia a que disminuya.

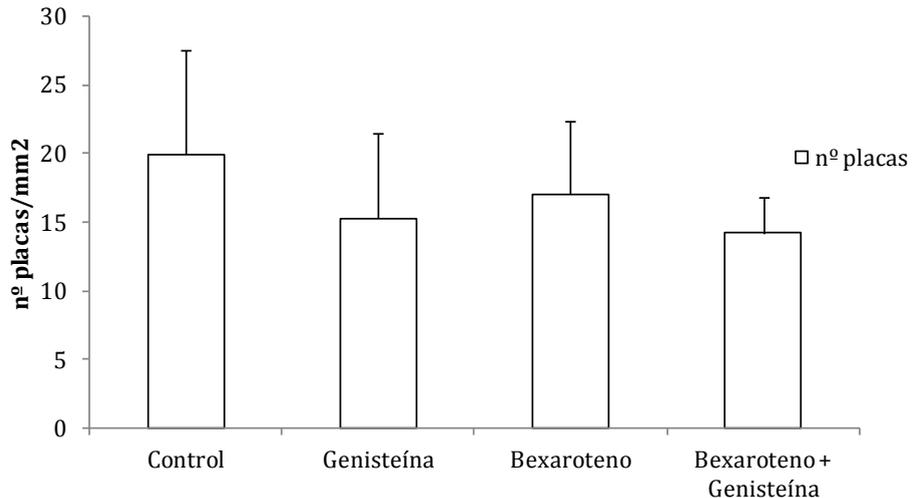


Figura 4.30 Número de placas de β A en cerebro.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 4 ratones.

4.5.3.2 Índice del área de placas

En la figura 4.31 vemos índice del área de placas en cerebro, observamos que:

- No hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

De lo que podemos deducir que los tratamientos no son efectivos para reducir el área de las placas respecto al total del cerebro en el modelo animal para la EA APPswe/PS1dE9, aunque existe una tendencia a que disminuya.

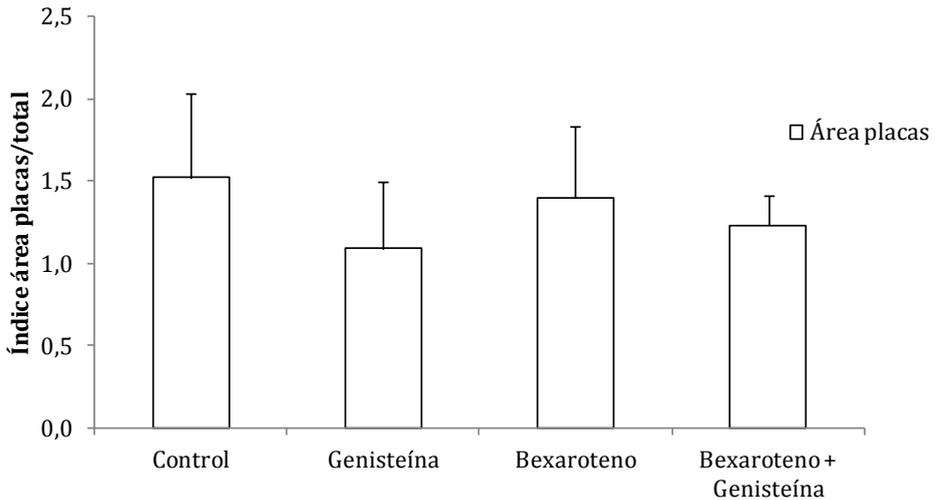


Figura 4.31 Índice del área de las placas de β A en cerebro.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 4 ratones.

4.5.3.3 Tamaño de las placas

En la figura 4.32 vemos el tamaño de las placas en cerebro, observamos que:

- No hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

De lo que podemos deducir que los tratamientos no son efectivos para reducir el tamaño de las placas de β A en el cerebro del modelo animal para la EA APPswe/PS1dE9.

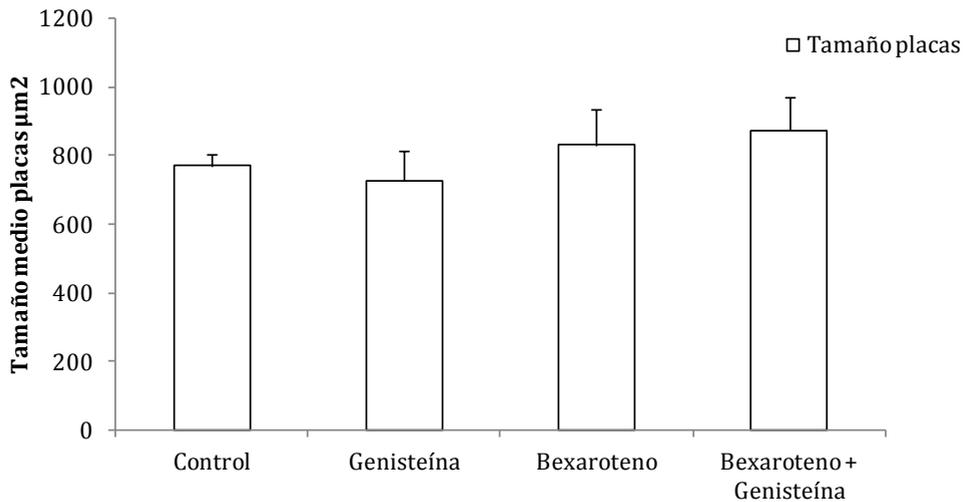


Figura 4.32 Tamaño de las placas de β A en cerebro.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 4 ratones.

4.5.3.4 Discusión de las placas de beta-amiloide

Las lesiones en el cerebro que observamos por causa del β A son placas de agregados extracelulares del péptido. Como hemos comentado anteriormente, hemos sido capaces de eliminar una cierta cantidad de β A del cerebro. Así pues, también se tendría que haber aliviado en parte estas lesiones.

Siguiendo con el diseño experimental, determinamos por microscopía el número, índice del área, y tamaño de las placas de β A en cerebro de los ratones APP/PS1.

Los resultados muestran cómo no cambia el número de placas (figura 4.30), ni el área de las placas respecto al total del cerebro (figura 4.31), ni tampoco el tamaño de las placas (figura 4.32).

Aunque estadísticamente no sea significativa, sí que observamos una cierta reducción de la patología amiloidea. Si comparamos con los resultados de la medida por ELISA de β A40 y β A42 (figuras 4.26 y 4.27), vemos una correlación positiva de los datos obtenidos en cuanto al número y área de las placas. Si confrontamos los resultados con el tamaño de las placas no hay una correlación respecto al ELISA ni con los otros datos de microscopía.

Como hemos visto, el tratamiento con genisteína demuestra tener algún efecto sobre las placas, confirmando lo visto por otros grupos (Bagheri, M. 2012). El grupo tratado con bexaroteno también tiene un efecto, de forma muy similar a la genisteína, hecho que corrobora las observaciones previas, ya que como se ha visto, este medicamento es capaz de reducirlo (Cramer, P.E. 2012).

El tamaño de las placas incluso parece que aumente con los tratamientos. Esto último no encaja con lo visto hasta el momento. Hay que tener en cuenta que los cortes que se analizan son en un plano, y la placa realmente tiene una estructura ovoide. Si los cortes pasan por distintas zonas de la placa, es perfectamente posible que debido al azar no aparezcan reflejados los resultados de los otros parámetros.

El grupo con el tratamiento de ambos productos, no muestra ningún cambio con los tratamientos por separado, cambio que sí que habíamos observado en los ELISA de β A (figuras 4.20 y 4.21), en que este grupo tenía una disminución más pronunciada del péptido amiloideo. De nuevo las diferencias son mínimas y perfectamente atribuibles al azar.

Así pues parece que se confirma que los tratamientos con genisteína y/o bexaroteno ayudan al aclaramiento cerebral del β A.

Resultados y discusión

Llegados a este punto hemos de decir que los análisis de microscopía todavía no están completos, y la información que todavía falta por tener puede ser fundamental para ver o no los resultados esperados.

4.5.4 Mecanismo de acción del aclaramiento cerebral

4.5.4.1 Niveles de PPAR γ en cerebro

PPAR γ es un factor de transcripción se expresa en el tejido adiposo, en cerebro, células vasculares, y en células inmunes e inflamatorias (Michalik, L. 2006). La importancia que tiene en este punto se resume en que promueve la síntesis de apoE en astrocitos, hecho que mediará la degradación y aclaramiento del β A en el cerebro (Farris, W. 2003; Jiang, Q. 2008). Hemos medido los niveles de la molécula por *western blotting* (ver apartado 3.2.5 de metodología).

En la figura 4.33 vemos los niveles de PPAR γ en cerebro, observamos que:

- No hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

De lo que podemos deducir que no se puede establecer una relación entre el aclaramiento del β A en el cerebro y el factor de transcripción PPAR γ , al menos en homogenado de cerebro completo.

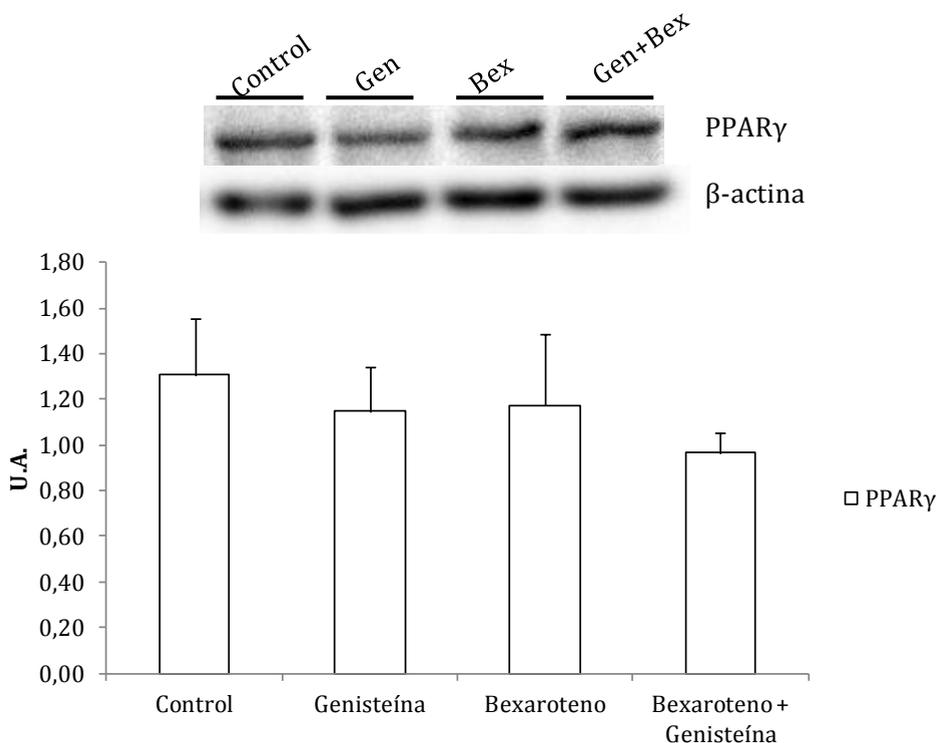


Figura 4.33 Niveles de PPAR γ en cerebro.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron de 2-4 ratones.

4.5.4.2 Niveles de apolipoproteína E en cerebro

La apoE es principalmente una proteína transportadora de lípidos en sangre. A nivel de la EA, en el cerebro media la degradación del β A mediante 2 vías. Por un lado promueve la degradación intracelular del β A por la microglía, y por otro lado de forma extracelular mediando la degradación por la vía de la enzima degradadora de insulina (Farris, W. 2003). Además facilita la eliminación del cerebro hacia la sangre (Jiang, Q. 2008). Hemos medido los niveles de la molécula por *western blotting* (ver apartado 3.2.5 de metodología).

En la figura 4.34 vemos los niveles de apoE en cerebro, observamos que:

- No hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

De lo que podemos deducir que no se puede establecer una relación entre el aclaramiento del β A en el cerebro y la apolipoproteína E, al menos en homogenado de cerebro completo.

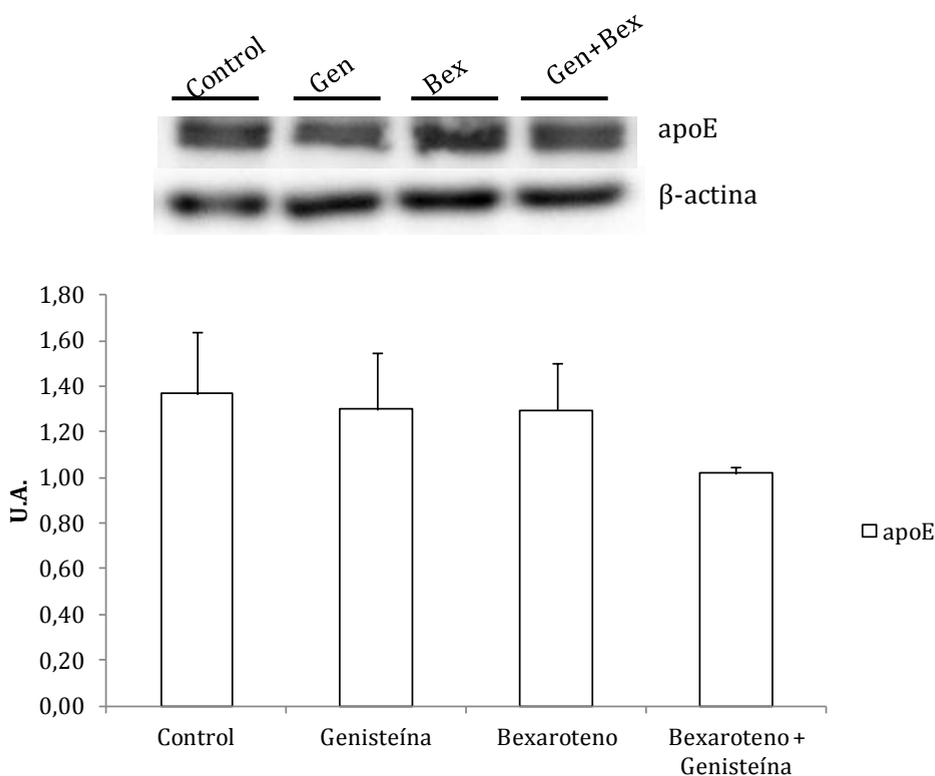


Figura 4.34 Niveles de apoE en cerebro.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron de 2-4 ratones.

4.5.4.3 Discusión del mecanismo de acción del aclaramiento cerebral

A partir de los cambios observados en los experimentos, decidimos investigar si realmente son debidos a la ruta propuesta. Esta es por el aumento de la expresión de apoE, a través de la activación del dímero PPAR γ -RXR. Recordemos que el aclaramiento del β A del cerebro puede deberse a la microglía (Jiang, Q. 2008), que lo fagocitará, o que el β A se elimine hacia el torrente sanguíneo por mediación del transportador LRP1 (Shibata, M. 2000; Deane, R. 2004; Zlokovic, B.V. 2010).

Según nuestras hipótesis previas esperaríamos que en los grupos tratados con genisteína hubiera un mayor nivel de PPAR γ , ya que como publicamos este fitoestrógeno eleva los niveles del factor de transcripción (Valles, S.L. 2010). También esperaríamos que los niveles de apoE se incrementaran en el grupo tratado con genisteína, por el incremento de PPAR γ , y en el grupo tratado con bexaroteno, por la acción sobre el RXR (Cramer, P.E. 2012). Asimismo, en el grupo tratado con genisteína y bexaroteno el incremento de apoE debería ser mayor, puesto que estamos actuando sobre su expresión por los 2 lados.

En los resultados observamos que no hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (figuras 4.26 y 4.27) para los niveles de PPAR γ y apoE. Vemos que los 2 parámetros se correlacionan entre sí con gran exactitud, por lo que sí que somos capaces de establecer una conexión entre ellos.

De esto podemos pensar que el aclaramiento amiloideo no se da por esta vía de actuación. Hay otros caminos para degradar β A, como a través de la enzima degradadora de insulina (Farris, W. 2003), aunque esta vía puede estar favorecida por apoE (Jiang, Q. 2008), no es exclusivamente dependiente de este factor. El transportador LRP1 es otro de los mecanismos conocido de eliminación de β A del cerebro (Shibata, M. 2000; Deane, R. 2004; Zlokovic, B.V. 2010), y de la misma manera puede estar favorecido por apoE, pero no es completamente dependiente de este. También se ha sugerido que se puede eliminar del cerebro por mecanismos no del todo conocidos, pero que en principio no parecen tener relación con apoE (Ito, S. 2010).

Aunque excepcionalmente en las neuronas se puede sintetizar apoE en el caso de que haya un daño cerebral (Xu, Q. 2000; Xu, Q. 2006), no parece ser este el caso. Aparte de las placas, en el cerebro de los ratones no hemos apreciado ningún tipo de lesiones que sean indicativas de esta situación.

La explicación más razonable la tenemos en que estas mediciones las realizamos en cerebro entero. Como sabemos, apoE dentro del cerebro se sintetiza principalmente en los astrocitos (Brown, M.S. 1986), de esta manera el resultado

Resultados y discusión

puede estar enmascarado, ya que es imposible separar los astrocitos del cerebro entero una vez extraído y congelado para realizar estas medidas.

A pesar de que existen otras vías para eliminar β A del cerebro, entendemos que la mediada por apoE es un factor fundamental, y posiblemente la principal. Basando esta afirmación en que la posesión del alelo ϵ 4 de la apoE es, tras la edad avanzada, el factor de riesgo más importante para la EA senil (Corder, E.H. 1993; Polvikoski, T. 1995). No solo interviene en la degradación, sino que también tiene un papel antioxidante, y protege frente a la apoptosis neuronal (Hayashi, H. 2009).

Los heterocigotos ϵ 4 tienen un riesgo 4 veces mayor, y los homocigotos ϵ 4 hasta 10 veces mayor de desarrollar EA que una persona sin alelos ϵ 4 (Mayeux, R. 1998). Así pues, si con solo un cambio en un alelo de la apoE hay un incremento considerable de padecer la EA, es normal pensar que este es el principal camino por el que progresan los mecanismos responsables de esta patología.

4.5.5 Transaminasas en sangre

Las transaminasas son enzimas encargadas de reacciones de transaminación. Forman principalmente aminoácidos no esenciales, y en el mismo proceso también dan lugar a otros metabolitos como piruvato u oxalacetato, fundamentales en el metabolismo. Su localización es principalmente hepática. Si las encontramos en sangre será porque el hígado está sufriendo un proceso tóxico, que conducirá a la muerte de los hepatocitos liberándolas así a la sangre (Lehninger, A.L. 1993; Mathews, C.K. 2000).

Las principales transaminasas son gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato-piruvato transaminasa (GPT). Se han medido en suero por un laboratorio especializado en análisis clínicos.

4.5.5.1 Gamma-glutamil transpeptidasa

Los niveles normales de la GGT son de 0-12 unidades por litro. Si encontramos niveles mayores de 12 U/L indica que hay un daño hepático.

Al medir los niveles de la transaminasa GGT en sangre, observamos que:

- Los niveles de GGT no son detectables en las muestras.

De lo que podemos deducir que no se produce un daño hepático asociado a los tratamientos.

4.5.5.2 Glutamato-oxalacetato transaminasa

Los niveles normales de la GOT son de 54-269 unidades por litro. Si encontramos niveles mayores de 269 U/L indica que hay un daño hepático.

En la figura 4.35 vemos los niveles de la transaminasa GOT en sangre, observamos que:

- No hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.
- Los niveles son mayores del límite establecido para el daño hepático.

De lo que podemos deducir que se produce un daño hepático pero no asociado a los tratamientos.

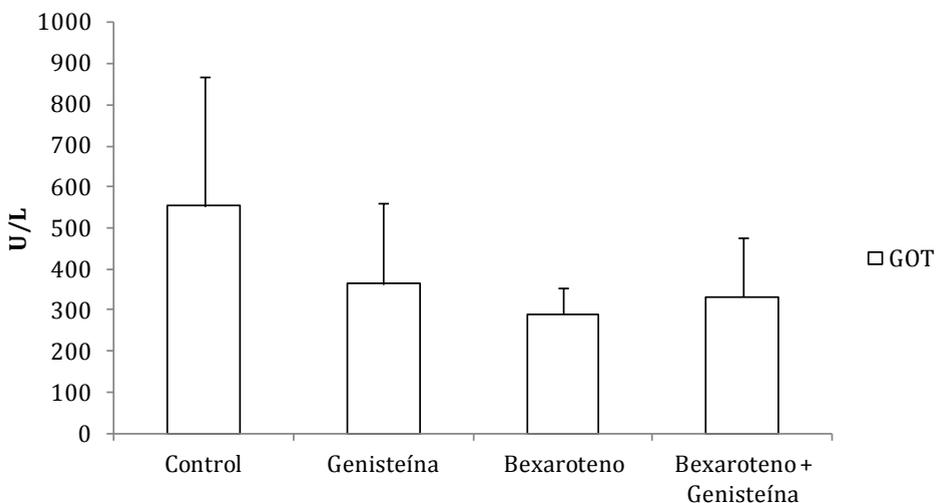


Figura 4.35 Niveles de GOT en sangre.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 4 ratones.

4.5.5.3 Glutamato-piruvato transaminasa

Los niveles normales de la GPT son de 26-77 unidades por litro. Si encontramos niveles mayores de 77 U/L indica que hay un daño hepático.

En la figura 4.36 vemos los niveles de la transaminasa GPT en sangre, observamos que:

- No hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.
- Los niveles están dentro del intervalo de normalidad.

De lo que podemos deducir que no se produce un daño hepático con los tratamientos.

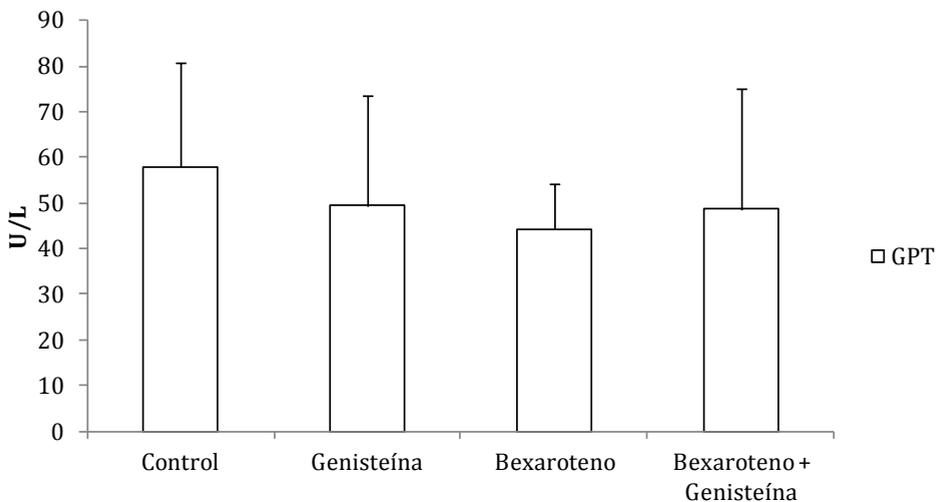


Figura 4.36 Niveles de GPT en sangre.

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 4 ratones.

4.5.5.4 Discusión de transaminasas en sangre

Como se ha visto con anterioridad, sabemos que el hígado es capaz de degradar β A (Ghiso, J. 2004; Tamaki, C. 2006). Si aumentamos el aclaramiento del β A llegará en mayor cantidad al hígado, y podría verse envuelto en un proceso hepatotóxico. El motivo de medir la concentración de transaminasas es determinar si existe un daño hepático.

En los resultados no observamos diferencias en los niveles de transaminasas en sangre con los diferentes tratamientos (figuras 4.34-4.35), por lo que no hay un daño hepático.

Partiendo de la base de que el hígado está degradando β A, se podría esperar que se produzca un daño, y por tanto una pérdida de funcionalidad del órgano. Esto es importante porque lo que realmente estamos haciendo con estos tratamientos es eliminar el β A del cerebro, lo que repercutirá en el resto del cuerpo.

De esta manera, si el hígado mantiene su funcionalidad, no deberíamos ver problemas asociados al incremento del aclaramiento cerebral del β A.

4.5.6 Valoración global de los efectos agudos del tratamiento con bexaroteno y genisteína

La ausencia de un tratamiento efectivo para la EA es una lacra social que perjudica cada año a millones de personas en todo el mundo (Alzheimer's Association, A. 2012). La importancia de una nueva terapia para esta enfermedad es de un valor incalculable si es efectiva no solo en ratones (Bagheri, M. 2011; Bagheri, M. 2012; Cramer, P.E. 2012), sino también en humanos.

La dificultad de estudiar la enfermedad de Alzheimer se basa principalmente en que es una enfermedad exclusivamente humana, y por obvias razones éticas se necesitan modelos animales. El estudio de ciertos parámetros no es posible en humanos. En este punto podemos incluir el análisis de órganos, y tratamientos experimentales con diversos compuestos, que no se sabe cómo pueden afectar al ser humano. Por tanto es obligada la experimentación previa en animales.

Los posibles tratamientos que planteamos son una opción viable para un ensayo con pacientes de EA. El bexaroteno ya se usa en el tratamiento del cáncer de piel en humanos. Por otra parte la genisteína no supone un riesgo para la salud, ya que no se considera un medicamento, sino un complemento alimenticio. También se puede tomar en la dieta, aunque en este estudio proponemos un uso terapéutico. El factor más importante que creemos que hemos conseguido, es el incremento de la eficacia de un medicamento como el bexaroteno mediante la adición de un

compuesto inocuo como la genisteína. Incluso por sí solo este fitoestrógeno tiene un efecto beneficioso en el aclaramiento cerebral de β A en los ratones, si en humanos funcionara de la misma manera podría ser altamente beneficioso. De hecho, en las poblaciones orientales en que consumen la genisteína en gran cantidad gracias a su dieta rica en soja, en poblaciones longevas como en Japón existe una de las menores incidencias del mundo para la EA (<http://www.worldlifeexpectancy.com/cause-of-death/alzheimers-dementia/by-country>). Además está por debajo de lo esperado en función de la abundancia del alelo apoE ϵ 4 en la población (Ward, A. 2012).

También sería un gran beneficio para la sociedad poder dar genisteína, no sólo por la mejoría en la EA, sino también porque tiene una relación coste/beneficio muy baja. Conseguir reducir costes en el tratamiento de cualquier enfermedad es una de las prioridades de los sistemas sanitarios de todo el mundo. Solo en la EA se calcula unos gastos realmente elevados. Los tratamientos farmacológicos, los gastos que genera mantener a pacientes totalmente dependientes, en cuanto a personal cualificado para atenderlos, mantenimiento en residencias etc. El coste llega a unos 2.000.000 millones de dólares en los Estados Unidos (Alzheimer's Association, A. 2012).

Hay que tener en cuenta que los tratamientos propuestos son vía la expresión de apoE. Tal y como hemos dicho, el alelo ϵ 4 de la apoE es uno de los principales causantes de EA (Corder, E.H. 1993; Polvikoski, T. 1995). El hecho que induciría la enfermedad sería que no es capaz de ejercer el papel protector que se le atribuye en la protección del sistema nervioso (Hayashi, H. 2009). Al no poder frenar el estrés oxidativo, la degradación del β A o la apoptosis neuronal, entre otras acciones, se desarrollaría la EA como consecuencia de estos procesos. Si lo que hacemos es sobreexpresar la apoE, hay que tener cuidado con los pacientes portadores de dicho alelo, que son mayoría en los enfermos de EA. Si esta forma de la apoE no es efectiva cumpliendo su función, un tratamiento que la sobreexpone no será muy útil, e incluso podría llegar a ser perjudicial.

Como consecuencia de la positividad de los resultados obtenidos, pensamos que los posibles tratamientos que hemos probado, y con los que seguimos trabajando son una posibilidad muy real de intervenir en el desarrollo de la EA. Aunque la posibilidad de curación es improbable, y por el hecho del alelo ϵ 4 de la apoE limite la población sobre la que se puede actuar, simplemente la mejora en la progresión de algunos pacientes sería algo que valdría la pena intentar.

4.6 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Evidentemente, este estudio tiene unas serias limitaciones, propias de trabajar con modelos animales. La limitación principal es la dificultad de extrapolar los resultados obtenidos a humanos, ya que no se puede afirmar que la patología en el modelo animal para la EA se corresponda con la descrita en humanos. Esta realidad es, después de todo, la que realmente nos interesa. Otra de las limitaciones de trabajar con animales es que consideramos a todos los individuos de un determinado grupo iguales entre sí. Esto es un error, ya que los ratones son animales jerárquicos, y tal vez pueden existir diferencias debidas al lugar que ocupa cada animal en la jerarquía. En hembras también puede haber diferencias debidas al punto del ciclo estral en que se encuentre el animal.

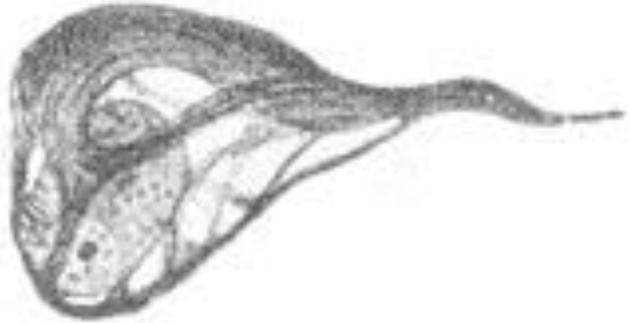
Hay que tener en cuenta que para determinar la vía del cerebro al hígado el nivel en el que los transportadores son efectivos para la circulación sistémica es a nivel de la barrera hematoencefálica, y los hemos medido en cerebro entero.

En el posible tratamiento para la EA experimentado en ratones hembra a las que se les ha practicado ovariectomía tenemos otra limitación. Lo que pretendemos es simular una menopausia, que no es equivalente a la cirugía aplicada a los animales. En humanos es un proceso gradual que se da de forma distinta al punto y aparte que supone la ovariectomía.

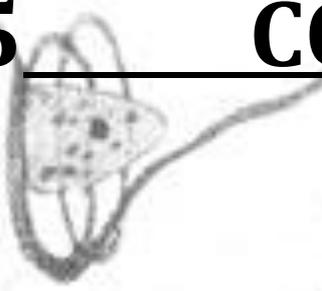
En el estudio sobre el consumo de glucosa *in vivo* la dificultad estriba en el nivel de desarrollo en el equipo de PET del que disponemos. Con esta tecnología no podemos distinguir zonas del cerebro concretas, como el hipocampo o la corteza cerebral, zonas más interesantes a cuantificar en la EA. Al no distinguir estas zonas, la cuantificación del consumo se hace con el cerebro total, y se pueden enmascarar diferencias importantes en las zonas de mayor interés. En pacientes con EA respecto a sujetos sanos, el consumo de glucosa disminuye solo en ciertas zonas cerebrales, como el córtex parieto-temporal (Pascual, B. 2010).

Las técnicas que empleamos para medir todos los parámetros que describimos en esta tesis son otro de los puntos en que se puede fallar. Los experimentos solo intentan aproximarse a la realidad, no la representan al 100%.

También es una limitación el error humano. Es obligado admitir que no somos infalibles, y que la manipulación de los animales y de las muestras está sujeta a cualquier tipo de error. Esto puede dar lugar a resultados que no reproducen con fiabilidad la realidad que pretendemos retratar.



5 CONCLUSIONES



5.1 CONCLUSIÓN PRINCIPAL

El transportador LRP1 disminuye con el envejecimiento en cerebro e hígado. Ello hace que el flujo de β A que entra al hígado sea menor, y por tanto se degradará en menor medida y disminuirá el estrés oxidativo hepático con la edad. Los tratamientos con bexaroteno y/o genisteína son efectivos para reducir la patología amiloidea, en el modelo animal APPswe/PS1dE9 para la enfermedad de Alzheimer.

5.2 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

A partir de los resultados obtenidos, podemos concluir:

1. El estrés oxidativo hepático disminuye en ratones APPswe/PS1dE9, machos y hembras con la edad.
2. El consumo de glucosa cerebral en ratones APPswe/PS1dE9, machos y hembras no se correlaciona con la realidad observada en humanos.
3. El β A se acumula en plasma en ratones APPswe/PS1dE9 machos.
4. El transportador LRP1 es el principal responsable de la circulación sistémica del β A entre el cerebro e hígado en ratones APPswe/PS1dE9 machos.
5. El tratamiento con genisteína es efectivo en el aclaramiento cerebral de β A en ratones APPswe/PS1dE9 hembras.
6. El tratamiento conjunto con genisteína y bexaroteno tiene un efecto sinérgico que potencia el aclaramiento cerebral de β A en ratones APPswe/PS1dE9 hembras.

- Adlercreutz, C. H., B. R. Goldin, S. L. Gorbach, K. A. Hockerstedt, S. Watanabe, E. K. Hamalainen, M. H. Markkanen, T. H. Makela, K. T. Wahala and T. Adlercreutz (1995). "Soybean phytoestrogen intake and cancer risk." **J Nutr** 125(3 Suppl): 757S-770S.
- Adlercreutz, H. (1984). "Does fiber-rich food containing animal lignan precursors protect against both colon and breast cancer? An extension of the "fiber hypothesis"." **Gastroenterology** 86(4): 761-4.
- Adlercreutz, H. (1990). "Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations." **Scand J Clin Lab Invest Suppl** 201: 3-23.
- Adlercreutz, H., H. Markkanen and S. Watanabe (1993). "Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men." **Lancet** 342(8881): 1209-10.
- Adlercreutz, H. and W. Mazur (1997). "Phyto-oestrogens and Western diseases." **Ann Med** 29(2): 95-120.
- Adlercreutz, H. (2002). "Phyto-oestrogens and cancer." **Lancet Oncol** 3(6): 364-73.
- Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya and Y. Fukami (1987). "Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases." **J Biol Chem** 262(12): 5592-5.
- Alberca, R. (2005). "Advanced dementia in Alzheimer's disease and memantine." **Rev Neurol** 40(3): 173-9.
- Albertini, R., S. Rindi, A. Passi, A. Bardoni, R. Salvini, G. Pallavicini and G. De Luca (1996). "The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation." **Arch Biochem Biophys** 327(2): 209-14.
- Ali, S. S., C. Xiong, J. Lucero, M. M. Behrens, L. L. Dugan and K. L. Quick (2006). "Gender differences in free radical homeostasis during aging: shorter-lived female C57BL6 mice have increased oxidative stress." **Aging Cell** 5(6): 565-74.
- Altman, R. and J. C. Rutledge (2010). "The vascular contribution to Alzheimer's disease." **Clin Sci (Lond)** 119(10): 407-21.
- Alzheimer's Association, A. (2012). "2012 Facts and figures." **Alzheimer's and Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**. 8(2): 131-68.
- Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige erkrankung der hirnrinde." **Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychiatrisch-gerichtliche Medizin** 64: 146-148.
- Ames, B. N. (1983). "Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases." **Science** 221(4617): 1256-64.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga and T. M. Hagen (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." **Proc Natl Acad Sci U S A** 90(17): 7915-22.

- Andersen, K., L. J. Launer, M. E. Dewey, L. Letenneur, A. Ott, J. R. Copeland, J. F. Dartigues, P. Kragh-Sorensen, M. Baldereschi, C. Brayne, A. Lobo, J. M. Martinez-Lage, T. Stijnen and A. Hofman (1999). "Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group." **Neurology** 53(9): 1992-7.
- Arora, A., M. G. Nair and G. M. Strasburg (1998). "Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system." **Free Radic Biol Med** 24(9): 1355-63.
- Atamna, H. and W. H. Frey, 2nd (2004). "A role for heme in Alzheimer's disease: heme binds amyloid beta and has altered metabolism." **Proc Natl Acad Sci U S A** 101(30): 11153-8.
- Attems, J., M. Quass, K. A. Jellinger and F. Lintner (2007). "Topographical distribution of cerebral amyloid angiopathy and its effect on cognitive decline are influenced by Alzheimer disease pathology." **J Neurol Sci** 257(1-2): 49-55.
- Austin, S. A., A. V. Santhanam and Z. S. Katusic (2010). "Endothelial nitric oxide modulates expression and processing of amyloid precursor protein." **Circ Res** 107(12): 1498-502.
- Azadbakht, L., M. Kimiagar, Y. Mehrabi, A. Esmailzadeh, F. B. Hu and W. C. Willett (2007). "Dietary soya intake alters plasma antioxidant status and lipid peroxidation in postmenopausal women with the metabolic syndrome." **Br J Nutr** 98(4): 807-13.
- Bagheri, M., M. T. Joghataei, S. Mohseni and M. Roghani (2011). "Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid beta(1-40) rat model of Alzheimer's disease." **Neurobiol Learn Mem** 95(3): 270-6.
- Bagheri, M., M. Roghani, M. T. Joghataei and S. Mohseni (2012). "Genistein inhibits aggregation of exogenous amyloid-beta(1)(-)(4)(0) and alleviates astrogliosis in the hippocampus of rats." **Brain Res** 1429: 145-54.
- Bansal, N. and M. Parle (2010). "Soybean supplementation helps reverse age- and scopolamine-induced memory deficits in mice." **J Med Food** 13(6): 1293-300.
- Barja, G., S. Cadenas, C. Rojas, R. Perez-Campo and M. Lopez-Torres (1994). "Low mitochondrial free radical production per unit O2 consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds." **Free Radic Res** 21(5): 317-27.
- Barja, G. (1998). "Kinetic measurement of mitochondrial oxygen radical production." **Methods in Aging Research** 23: 533-548.
- Barja, G. (1999). "Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity." **J Bioenerg Biomembr** 31(4): 347-66.

- Barnes, S., T. G. Peterson and L. Coward (1995). "Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer." **J Cell Biochem Suppl** 22: 181-7.
- Barnes, S. (1998). "Evolution of the health benefits of soy isoflavones." **Proc Soc Exp Biol Med** 217(3): 386-92.
- Bartus, R. T., R. L. Dean, 3rd, B. Beer and A. S. Lippa (1982). "The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction." **Science** 217(4558): 408-14.
- Baum, L. W. (2005). "Sex, hormones, and Alzheimer's disease." **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 60(6): 736-43.
- Becker, J. T. and A. A. Overman (2002). "[The semantic memory deficit in Alzheimer's disease]." **Rev Neurol** 35(8): 777-83.
- Beffert, U., M. Danik, P. Krzywkowski, C. Ramassamy, F. Berrada and J. Poirier (1998). "The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease." **Brain Res Brain Res Rev** 27(2): 119-42.
- Bell, R. D. and B. V. Zlokovic (2009). "Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease." **Acta Neuropathol** 118(1): 103-13.
- Benzi, G. and A. Moretti (1995). "Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system." **Free Radic Biol Med** 19(1): 77-101.
- Bermejo-Pareja, F., J. Benito-Leon, S. Vega, M. J. Medrano and G. C. Roman (2008). "Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain." **J Neurol Sci** 264(1-2): 63-72.
- Berrino, F. (2002). "[Western diet and Alzheimer's disease]." **Epidemiol Prev** 26(3): 107-15.
- Bielsky, B. H. G., J.M. (1977). "Application of radiation chemistry to biology." **Free radicals in biology**: 1-19.
- Bierhaus, A., P. M. Humpert, M. Morcos, T. Wendt, T. Chavakis, B. Arnold, D. M. Stern and P. P. Nawroth (2005). "Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products." **J Mol Med (Berl)** 83(11): 876-86.
- Bingham, S. A., C. Atkinson, J. Liggins, L. Bluck and A. Coward (1998). "Phytoestrogens: where are we now?" **Br J Nutr** 79(5): 393-406.
- Bjelakovic, G., D. Nikolova, L. L. Gluud, R. G. Simonetti and C. Gluud (2007). "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis." **Jama** 297(8): 842-57.
- Bokov, A., A. Chaudhuri and A. Richardson (2004). "The role of oxidative damage and stress in aging." **Mech Ageing Dev** 125(10-11): 811-26.

Bibliografía

- Bolanos, J. P., S. J. Heales, J. M. Land and J. B. Clark (1995). "Effect of peroxyxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture." **J Neurochem** 64(5): 1965-72.
- Bonte, F. J., J. Hom, R. Tintner and M. F. Weiner (1990). "Single photon tomography in Alzheimer's disease and the dementias." **Semin Nucl Med** 20(4): 342-52.
- Borras, C., J. Sastre, D. Garcia-Sala, A. Lloret, F. V. Pallardo and J. Vina (2003). "Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males." **Free Radic Biol Med** 34(5): 546-52.
- Borras, C., J. Gambini, M. C. Gomez-Cabrera, J. Sastre, F. V. Pallardo, G. E. Mann and J. Vina (2006). "Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFKappaB." **FASEB J** 20(12): 2136-8.
- Borras, C., S. Stvolinsky, R. Lopez-Grueso, T. Fedorova, J. Gambini, A. Boldyrev and J. Vina (2009). "Low in vivo brain glucose consumption and high oxidative stress in accelerated aging." **FEBS Lett** 583(13): 2287-93.
- Boveris, A., N. Oshino and B. Chance (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide." **Biochem J** 128(3): 617-30.
- Braak, H., E. Braak and J. Bohl (1993). "Staging of Alzheimer-related cortical destruction." **Eur Neurol** 33(6): 403-8.
- Brand, M. D. and M. P. Murphy (1987). "Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells." **Biol Rev Camb Philos Soc** 62(2): 141-93.
- Breen, A. P. and J. A. Murphy (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." **Free Radic Biol Med** 18(6): 1033-77.
- Brookmeyer, R., S. Gray and C. Kawas (1998). "Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset." **Am J Public Health** 88(9): 1337-42.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." **Science** 232(4746): 34-47.
- Bufill, E. and R. Blesa (2006). "[Alzheimer's disease and brain evolution: is Alzheimer's disease an example of antagonistic pleiotropy?]." **Rev Neurol** 42(1): 25-33.
- Burdick, D., B. Soreghan, M. Kwon, J. Kosmoski, M. Knauer, A. Henschen, J. Yates, C. Cotman and C. Glabe (1992). "Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs." **J Biol Chem** 267(1): 546-54.
- Busche, M. A., G. Eichhoff, H. Adelsberger, D. Abramowski, K. H. Wiederhold, C. Haass, M. Staufenbiel, A. Konnerth and O. Garaschuk (2008). "Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease." **Science** 321(5896): 1686-9.

- Cadenas, E., A. Boveris, C. I. Ragan and A. O. Stoppani (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria." **Arch Biochem Biophys** 180(2): 248-57.
- Calabrese, E. J., M. E. McCarthy and E. Kenyon (1987). "The occurrence of chemically induced hormesis." **Health Phys** 52(5): 531-41.
- Calleja, M., P. Pena, C. Ugalde, C. Ferreira, R. Marco and R. Garesse (1993). "Mitochondrial DNA remains intact during *Drosophila* aging, but the levels of mitochondrial transcripts are significantly reduced." **J Biol Chem** 268(25): 18891-7.
- Capdevila, J., L. Parkhill, N. Chacos, R. Okita, B. S. Masters and R. W. Estabrook (1981). "The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P-450." **Biochem Biophys Res Commun** 101(4): 1357-63.
- Cardoso, S., S. Correia, R. X. Santos, C. Carvalho, M. S. Santos, C. R. Oliveira, G. Perry, M. A. Smith, X. Zhu and P. I. Moreira (2009). "Insulin is a two-edged knife on the brain." **J Alzheimers Dis** 18(3): 483-507.
- Cassidy, A., S. Bingham and K. D. Setchell (1994). "Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women." **Am J Clin Nutr** 60(3): 333-40.
- Castellani, R. J., P. L. Harris, L. M. Sayre, J. Fujii, N. Taniguchi, M. P. Vitek, H. Founds, C. S. Atwood, G. Perry and M. A. Smith (2001). "Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine and hexitol-lysine." **Free Radic Biol Med** 31(2): 175-80.
- Corbisier, P. and J. Remacle (1990). "Involvement of mitochondria in cell degeneration." **Eur J Cell Biol** 51(1): 173-82.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines and M. A. Pericak-Vance (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." **Science** 261(5123): 921-3.
- Correia, S. C., R. X. Santos, C. Carvalho, S. Cardoso, E. Candeias, M. S. Santos, C. R. Oliveira and P. I. Moreira (2012). "Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation." **Brain Res** 1441: 64-78.
- Craig, D., A. Mirakhur, D. J. Hart, S. P. McIlroy and A. P. Passmore (2005). "A cross-sectional study of neuropsychiatric symptoms in 435 patients with Alzheimer's disease." **Am J Geriatr Psychiatry** 13(6): 460-8.
- Cramer, P. E., J. R. Cirrito, D. W. Wesson, C. Y. Lee, J. C. Karlo, A. E. Zinn, B. T. Casali, J. L. Restivo, W. D. Goebel, M. J. James, K. R. Brunden, D. A. Wilson and G. E. Landreth (2012). "ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models." **Science** 335(6075): 1503-6.

Bibliografía

- Crawford, D. R., Y. Wang, G. P. Schools, J. Kochheiser and K. J. Davies (1997). "Down-regulation of mammalian mitochondrial RNAs during oxidative stress." **Free Radic Biol Med** 22(3): 551-9.
- Cruts, M., H. Backhovens, S. Y. Wang, G. Van Gassen, J. Theuns, C. D. De Jonghe, A. Wehnert, J. De Voecht, G. De Winter, P. Cras and et al. (1995). "Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3." **Hum Mol Genet** 4(12): 2363-71.
- Cuenda, A. and S. Rousseau (2007). "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." **Biochim Biophys Acta** 1773(8): 1358-75.
- Cummings, B. J. and C. W. Cotman (1995). "Image analysis of beta-amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity." **Lancet** 346(8989): 1524-8.
- Cummings, J. L., M. Mega, K. Gray, S. Rosenberg-Thompson, D. A. Carusi and J. Gornbein (1994). "The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia." **Neurology** 44(12): 2308-14.
- Cummings, J. L. (2004). "Alzheimer's disease." **N Engl J Med** 351(1): 56-67.
- Czapski, G. and S. Goldstein (1995). "The role of the reactions of .NO with superoxide and oxygen in biological systems: a kinetic approach." **Free Radic Biol Med** 19(6): 785-94.
- Chance, B., H. Sies and A. Boveris (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." **Physiol Rev** 59(3): 527-605.
- Cheeseman, K. H. and T. F. Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry." **Br Med Bull** 49(3): 481-93.
- Chen, J. X. and S. S. Yan (2010). "Role of mitochondrial amyloid-beta in Alzheimer's disease." **J Alzheimers Dis** 20 Suppl 2: S569-78.
- Chen, W. P., I. Matsunari, A. Noda, D. Yanase, K. Yajima, N. Takeda, M. Yamada, S. Minoshima and S. Nishimura (2005). "Rapid scanning protocol for brain (18)F-FDG PET: a validation study." **J Nucl Med** 46(10): 1633-41.
- Chiu, S. L., C. M. Chen and H. T. Cline (2008). "Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo." **Neuron** 58(5): 708-19.
- Chun, W. and G. V. Johnson (2007). "The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death." **Front Biosci** 12: 733-56.
- Dai, D. F., L. F. Santana, M. Vermulst, D. M. Tomazela, M. J. Emond, M. J. MacCoss, K. Gollahon, G. M. Martin, L. A. Loeb, W. C. Ladiges and P. S. Rabinovitch (2009). "Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging." **Circulation** 119(21): 2789-97.

- Daly, N. L., M. J. Scanlon, J. T. Djordjevic, P. A. Kroon and R. Smith (1995). "Three-dimensional structure of a cysteine-rich repeat from the low-density lipoprotein receptor." **Proc Natl Acad Sci U S A** 92(14): 6334-8.
- Davies, K. J., A. T. Quintanilha, G. A. Brooks and L. Packer (1982). "Free radicals and tissue damage produced by exercise." **Biochem Biophys Res Commun** 107(4): 1198-205.
- Davies, K. J., M. E. Delsignore and S. W. Lin (1987a). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids." **J Biol Chem** 262(20): 9902-7.
- Davies, K. J., S. W. Lin and R. E. Pacifici (1987b). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein." **J Biol Chem** 262(20): 9914-20.
- Davignon, J., R. E. Gregg and C. F. Sing (1988). "Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis." **Arteriosclerosis** 8(1): 1-21.
- De Santi, S., M. J. de Leon, H. Rusinek, A. Convit, C. Y. Tarshish, A. Roche, W. H. Tsui, E. Kandil, M. Boppana, K. Daisley, G. J. Wang, D. Schlyer and J. Fowler (2001). "Hippocampal formation glucose metabolism and volume losses in MCI and AD." **Neurobiol Aging** 22(4): 529-39.
- Dean, R. T., S. Gieseg and M. J. Davies (1993). "Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins." **Trends Biochem Sci** 18(11): 437-41.
- Deane, R., S. Du Yan, R. K. Subramanian, B. LaRue, S. Jovanovic, E. Hogg, D. Welch, L. Manness, C. Lin, J. Yu, H. Zhu, J. Ghiso, B. Frangione, A. Stern, A. M. Schmidt, D. L. Armstrong, B. Arnold, B. Liliensiek, P. Nawroth, F. Hofman, M. Kindy, D. Stern and B. Zlokovic (2003). "RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain." **Nat Med** 9(7): 907-13.
- Deane, R., Z. Wu, A. Sagare, J. Davis, S. Du Yan, K. Hamm, F. Xu, M. Parisi, B. LaRue, H. W. Hu, P. Spijkers, H. Guo, X. Song, P. J. Lenting, W. E. Van Nostrand and B. V. Zlokovic (2004). "LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms." **Neuron** 43(3): 333-44.
- Degen, G. H. (1990). "Interaction of phytoestrogens and other environmental estrogens with prostaglandin synthase in vitro." **J Steroid Biochem** 35(3-4): 473-9.
- Dolado, I., A. Swat, N. Ajenjo, G. De Vita, A. Cuadrado and A. R. Nebreda (2007). "p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis." **Cancer Cell** 11(2): 191-205.
- Dolphin, D. (1988). "The generation of radicals during the normal and abnormal functioning of cytochromes P-450." **Basic Life Sci** 49: 491-500.
- Doolittle, R. F. (1992). "Stein and Moore Award address. Reconstructing history with amino acid sequences." **Protein Sci** 1(2): 191-200.

Bibliografía

- Doroshov, J. H., P. (1982). "*Redox cycling and the mechanism of action of antibiotics in neoplastic diseases.*" **New York: Academy Press** Pathology of Oxygen: 245-253.
- Ekinci, F. J., K. U. Malik and T. B. Shea (1999). "*Activation of the L voltage-sensitive calcium channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cells to beta-amyloid. MAP kinase mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration.*" **J Biol Chem** 274(42): 30322-7.
- Elshourbagy, N. A., W. S. Liao, R. W. Mahley and J. M. Taylor (1985). "*Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 82(1): 203-7.
- Ellis, R. J., J. M. Olichney, L. J. Thal, S. S. Mirra, J. C. Morris, D. Beekly and A. Heyman (1996). "*Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV.*" **Neurology** 46(6): 1592-6.
- Estrela, J. M., G. T. Saez, L. Such and J. Vina (1983). "*The effect of cysteine and N-acetyl cysteine on rat liver glutathione (GSH).*" **Biochem Pharmacol** 32(22): 3483-5.
- Fagan, A. M., L. M. Shaw, C. Xiong, H. Vanderstichele, M. A. Mintun, J. Q. Trojanowski, E. Coart, J. C. Morris and D. M. Holtzman (2011). "*Comparison of Analytical Platforms for Cerebrospinal Fluid Measures of {beta}-Amyloid 1-42, Total tau, and P-tau181 for Identifying Alzheimer Disease Amyloid Plaque Pathology.*" **Arch Neurol**.
- Farris, W., S. Mansourian, Y. Chang, L. Lindsley, E. A. Eckman, M. P. Frosch, C. B. Eckman, R. E. Tanzi, D. J. Selkoe and S. Guenette (2003). "*Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 100(7): 4162-7.
- Fenton, H. J. H. (1894). "*Oxidation of tartaric acid in the presence of iron.*" **J. Chem. Soc. Trans** 65: 899-910.
- Fernandez-Ballesteros, R. (1999). "*Aging in Europe - European Aging.*" **IVth European Congress of Gerontology. Berlin, Germany** Abstracts. Z Gerontol Geriatr(July 7-11, 1999): 32 Suppl 2: II1-298, 299-312.
- Ferri, C. P., M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P. R. Menezes, E. Rimmer and M. Scazufca (2005). "*Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study.*" **Lancet** 366(9503): 2112-7.
- Figley, C. R. and P. W. Stroman (2011). "*The role(s) of astrocytes and astrocyte activity in neurometabolism, neurovascular coupling, and the production of functional neuroimaging signals.*" **Eur J Neurosci** 33(4): 577-88.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "*Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.*" **Nature** 408(6809): 239-47.

- Folstein, M. F., S. E. Folstein and P. R. McHugh (1975). "*Mini-mental state*". *A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician.* **J Psychiatr Res** 12(3): 189-98.
- Forster, R. E. and R. W. Estabrook (1993). "*Is oxygen an essential nutrient?*" **Annu Rev Nutr** 13: 383-403.
- Forstrom, J. W., J. J. Zakowski and A. L. Tappel (1978). "*Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine.*" **Biochemistry** 17(13): 2639-44.
- Fotsis, T., M. Pepper, H. Adlercreutz, G. Fleischmann, T. Hase, R. Montesano and L. Schweigerer (1993). "*Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 90(7): 2690-4.
- Fowler, M. E. (1983). "*Plant poisoning in free-living wild animals: a review.*" **J Wildl Dis** 19(1): 34-43.
- Franco, S., M. A. Blasco, S. L. Siedlak, P. L. Harris, P. I. Moreira, G. Perry and M. A. Smith (2006). "*Telomeres and telomerase in Alzheimer's disease: epiphenomena or a new focus for therapeutic strategy?*" **Alzheimers Dement** 2(3): 164-8.
- Freeman, B. A. and J. D. Crapo (1982). "*Biology of disease: free radicals and tissue injury.*" **Lab Invest** 47(5): 412-26.
- Frei, B. (1994). "*Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action.*" **Am J Med** 97(3A): 5S-13S; discussion 22S-28S.
- Fridovich, I. (1974). "*Superoxide dismutase.*" **Adv Enzymol** 41: 35-97.
- Fridovich, I. (1986). "*Superoxide dismutases.*" **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol** 58: 61-97.
- Frolich, L., D. Blum-Degen, H. G. Bernstein, S. Engelsberger, J. Humrich, S. Laufer, D. Muschner, A. Thalheimer, A. Turk, S. Hoyer, R. Zochling, K. W. Boissl, K. Jellinger and P. Riederer (1998). "*Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease.*" **J Neural Transm** 105(4-5): 423-38.
- Fueger, B. J., J. Czernin, I. Hildebrandt, C. Tran, B. S. Halpern, D. Stout, M. E. Phelps and W. A. Weber (2006). "*Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice.*" **J Nucl Med** 47(6): 999-1006.
- Fukutake, M., M. Takahashi, K. Ishida, H. Kawamura, T. Sugimura and K. Wakabayashi (1996). "*Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products.*" **Food Chem Toxicol** 34(5): 457-61.
- Galasko, D., F. Schmitt, R. Thomas, S. Jin and D. Bennett (2005). "*Detailed assessment of activities of daily living in moderate to severe Alzheimer's disease.*" **J Int Neuropsychol Soc** 11(4): 446-53.
- Gambhir, S. S., J. R. Barrio, L. Wu, M. Iyer, M. Namavari, N. Satyamurthy, E. Bauer, C. Parrish, D. C. MacLaren, A. R. Borghai, L. A. Green, S. Sharfstein, A. J. Berk, S. R.

Bibliografía

- Cherry, M. E. Phelps and H. R. Herschman (1998). "*Imaging of adenoviral-directed herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene expression in mice with radiolabeled ganciclovir.*" **J Nucl Med** 39(11): 2003-11.
- Garcia-Gimenez, J. L., A. M. Ledesma, I. Esmoris, C. Roma-Mateo, P. Sanz, J. Vina and F. V. Pallardo (2012). "*Histone carbonylation occurs in proliferating cells.*" **Free Radic Biol Med** 52(8): 1453-64.
- Ghiso, J., M. Shayo, M. Calero, D. Ng, Y. Tomidokoro, S. Gandy, A. Rostagno and B. Frangione (2004). "*Systemic catabolism of Alzheimer's Abeta40 and Abeta42.*" **J Biol Chem** 279(44): 45897-908.
- Gilbert, S. F. (2006). **Developmental biology**. Sunderland, Mass., Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Giri, R., Y. Shen, M. Stins, S. Du Yan, A. M. Schmidt, D. Stern, K. S. Kim, B. Zlokovic and V. K. Kalra (2000). "*beta-amyloid-induced migration of monocytes across human brain endothelial cells involves RAGE and PECAM-1.*" **Am J Physiol Cell Physiol** 279(6): C1772-81.
- Giulivi, C. and K. J. Davies (1993). "*Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19 S) proteasome.*" **J Biol Chem** 268(12): 8752-9.
- Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "*Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.*" **Biochem Biophys Res Commun** 120(3): 885-90.
- Goodman, M. M., D. R. Elmaleh, K. J. Kearfott, R. H. Ackerman, B. Hoop, Jr., G. L. Brownell, N. M. Alpert and H. W. Strauss (1981). "*F-18-labeled 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose for the study of regional metabolism in the brain and heart.*" **J Nucl Med** 22(2): 138-44.
- Gotthardt, M., M. Trommsdorff, M. F. Nevitt, J. Shelton, J. A. Richardson, W. Stockinger, J. Nimpf and J. Herz (2000). "*Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction.*" **J Biol Chem** 275(33): 25616-24.
- Gotz, J., N. Deters, A. Doldissen, L. Bokhari, Y. Ke, A. Wiesner, N. Schonrock and L. M. Ittner (2007). "*A decade of tau transgenic animal models and beyond.*" **Brain Pathol** 17(1): 91-103.
- Green, L. A., S. S. Gambhir, A. Srinivasan, P. K. Banerjee, C. K. Hoh, S. R. Cherry, S. Sharfstein, J. R. Barrio, H. R. Herschman and M. E. Phelps (1998). "*Noninvasive methods for quantitating blood time-activity curves from mouse PET images obtained with fluorine-18-fluorodeoxyglucose.*" **J Nucl Med** 39(4): 729-34.
- Greenwald, R. A. and W. W. Moy (1980). "*Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid.*" **Arthritis Rheum** 23(4): 455-63.

- Grundke-Iqbal, I., A. B. Johnson, H. M. Wisniewski, R. D. Terry and K. Iqbal (1979). "Evidence that Alzheimer neurofibrillary tangles originate from neurotubules." **Lancet** 1(8116): 578-80.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, M. Quinlan, Y. C. Tung, M. S. Zaidi and H. M. Wisniewski (1986). "Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments." **J Biol Chem** 261(13): 6084-9.
- Gryglewski, R. J., R. M. Palmer and S. Moncada (1986). "Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor." **Nature** 320(6061): 454-6.
- Guglielmotto, M., M. Aragno, E. Tamagno, I. Vercellinatto, S. Visentin, C. Medana, M. G. Catalano, M. A. Smith, G. Perry, O. Danni, G. Boccuzzi and M. Tabaton (2012). "AGEs/RAGE complex upregulates BACE1 via NF-kappaB pathway activation." **Neurobiol Aging** 33(1): 196 e13-27.
- Haber, F. W., J. (1934). "The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts." **Proc. R. Soc. London** 147: 332-351.
- Hageman, J. J., A. Bast and N. P. Vermeulen (1992). "Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: analytical aspects." **Chem Biol Interact** 82(3): 243-93.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1986). "Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts." **Arch Biochem Biophys** 246(2): 501-14.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." **Methods Enzymol** 186: 1-85.
- Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease." **Am J Med** 91(3C): 14S-22S.
- Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?" **Lancet** 344(8924): 721-4.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1995). "The definition and measurement of antioxidants in biological systems." **Free Radic Biol Med** 18(1): 125-6.
- Halliwell, B. (1996). "Antioxidants in human health and disease." **Annu Rev Nutr** 16: 33-50.
- Halliwell, B. G., J.M.C. (1989). "Free radicals in biology and medicine." **Clarendon press, Oxford**.
- Hamilton, M. L., H. Van Remmen, J. A. Drake, H. Yang, Z. M. Guo, K. Kewitt, C. A. Walter and A. Richardson (2001). "Does oxidative damage to DNA increase with age?" **Proc Natl Acad Sci U S A** 98(18): 10469-74.
- Han, S. H., Y. H. Kim and I. Mook-Jung (2011). "RAGE: the beneficial and deleterious effects by diverse mechanisms of actions." **Mol Cells** 31(2): 91-7.

Bibliografía

- Han, W. and C. Li (2010). "*Linking type 2 diabetes and Alzheimer's disease.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 107(15): 6557-8.
- Handoko, M., M. Grant, M. Kuskowski, K. R. Zahs, A. Wallin, K. Blennow and K. H. Ashe (2013). "*Correlation of Specific Amyloid-beta Oligomers With Tau in Cerebrospinal Fluid From Cognitively Normal Older Adults.*" **JAMA Neurol**: 1-6.
- Hardy, J. A., M. J. Owen, A. M. Goate, L. A. James, A. R. Haynes, M. N. Rossor, P. Roques and M. J. Mullan (1989). "*Molecular genetics of Alzheimer's disease.*" **Biochem Soc Trans** 17(1): 75-6.
- Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "*Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis.*" **Science** 256(5054): 184-5.
- Harman, D. (1956). "*Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.*" **J Gerontol** 11(3): 298-300.
- Harman, D. (1978). "*Free radical theory of aging: Nutritional implications.*" **Age**. 1: 145-152.
- Harman, D. (2001). "*Aging: overview.*" **Ann N Y Acad Sci** 928: 1-21.
- Harrington, L. A. and C. B. Harley (1988). "*Effect of vitamin E on lifespan and reproduction in Caenorhabditis elegans.*" **Mech Ageing Dev** 43(1): 71-8.
- Harrison, F. E., J. Allard, R. Bixler, C. Usoh, L. Li, J. M. May and M. P. McDonald (2009). "*Antioxidants and cognitive training interact to affect oxidative stress and memory in APP/PSEN1 mice.*" **Nutr Neurosci** 12(5): 203-18.
- Hassan, H. M. and I. Fridovich (1977). "*Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in Escherichia coli. Induction by methyl viologen.*" **J Biol Chem** 252(21): 7667-72.
- Hayashi, H., R. B. Campenot, D. E. Vance and J. E. Vance (2009). "*Protection of neurons from apoptosis by apolipoprotein E-containing lipoproteins does not require lipoprotein uptake and involves activation of phospholipase Cgamma1 and inhibition of calcineurin.*" **J Biol Chem** 284(43): 29605-13.
- Holtzman, D. M. (2001). "*Role of apoE/Abeta interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy.*" **J Mol Neurosci** 17(2): 147-55.
- Hood, D. A., P. J. Adhihetty, M. Colavecchia, J. W. Gordon, I. Irrcher, A. M. Joseph, S. T. Lowe and A. A. Rungi (2003). "*Mitochondrial biogenesis and the role of the protein import pathway.*" **Med Sci Sports Exerc** 35(1): 86-94.
- Hopkins, F. G. (1921). "*On an Autoxidisable Constituent of the Cell.*" **Biochem J** 15(2): 286-305.
- Howes, R. M. (2006). "*The free radical fantasy: a panoply of paradoxes.*" **Ann N Y Acad Sci** 1067: 22-6.

- Hsieh, H. M., W. M. Wu and M. L. Hu (2009). "*Soy isoflavones attenuate oxidative stress and improve parameters related to aging and Alzheimer's disease in C57BL/6J mice treated with D-galactose.*" **Food Chem Toxicol** 47(3): 625-32.
- Huang, S. C., H. M. Wu, K. Shoghi-Jadid, D. B. Stout, A. Chatziioannou, H. R. Schelbert and J. R. Barrio (2004). "*Investigation of a new input function validation approach for dynamic mouse microPET studies.*" **Mol Imaging Biol** 6(1): 34-46.
- Huang, T. T., E. J. Carlson, A. M. Gillespie, Y. Shi and C. J. Epstein (2000). "*Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice.*" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 55(1): B5-9.
- Huang, T. T., M. Naeemuddin, S. Elchuri, M. Yamaguchi, H. M. Kozy, E. J. Carlson and C. J. Epstein (2006). "*Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase.*" **Hum Mol Genet** 15(7): 1187-94.
- Hutton, M., F. Busfield, M. Wragg, R. Crook, J. Perez-Tur, R. F. Clark, G. Prihar, C. Talbot, H. Phillips, K. Wright, M. Baker, C. Lendon, K. Duff, A. Martinez, H. Houlden, A. Nichols, E. Karran, G. Roberts, P. Roques, M. Rossor, J. C. Venter, M. D. Adams, R. T. Cline, C. A. Phillips, A. Goate and et al. (1996). "*Complete analysis of the presenilin 1 gene in early onset Alzheimer's disease.*" **Neuroreport** 7(3): 801-5.
- Iakova, P., S. S. Awad and N. A. Timchenko (2003). "*Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest.*" **Cell** 113(4): 495-506.
- Ignatius, M. J., P. J. Gebicke-Harter, J. H. Skene, J. W. Schilling, K. H. Weisgraber, R. W. Mahley and E. M. Shooter (1986). "*Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 83(4): 1125-9.
- Ilveskoski, E., M. Perola, T. Lehtimaki, P. Laippala, V. Savolainen, J. Pajarinen, A. Penttila, K. H. Lalu, A. Mannikko, K. K. Liesto, T. Koivula and P. J. Karhunen (1999). "*Age-dependent association of apolipoprotein E genotype with coronary and aortic atherosclerosis in middle-aged men: an autopsy study.*" **Circulation** 100(6): 608-13.
- Iqbal, K., F. Liu, C. X. Gong, C. Alonso Adel and I. Grundke-Iqbal (2009). "*Mechanisms of tau-induced neurodegeneration.*" **Acta Neuropathol** 118(1): 53-69.
- Ishii, N., N. Senoo-Matsuda, K. Miyake, K. Yasuda, T. Ishii, P. S. Hartman and S. Furukawa (2004). "*Coenzyme Q10 can prolong C. elegans lifespan by lowering oxidative stress.*" **Mech Ageing Dev** 125(1): 41-6.
- Ito, S., T. Ueno, S. Ohtsuki and T. Terasaki (2010). "*Lack of brain-to-blood efflux transport activity of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) for amyloid-beta peptide(1-40) in mouse: involvement of an LRP-1-independent pathway.*" **J Neurochem** 113(5): 1356-63.
- Iwatsubo, T., A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina and Y. Ihara (1994). "*Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific*

- A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43).* **Neuron** 13(1): 45-53.
- Jankowsky, J. L., D. J. Fadale, J. Anderson, G. M. Xu, V. Gonzales, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, M. K. Lee, L. H. Younkin, S. L. Wagner, S. G. Younkin and D. R. Borchelt (2004). *"Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase."* **Hum Mol Genet** 13(2): 159-70.
- Jarrett, J. T. and P. T. Lansbury, Jr. (1993). *"Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?"* **Cell** 73(6): 1055-8.
- Jensen, P. K. (1966). *"Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. I. pH dependency and hydrogen peroxide formation."* **Biochim Biophys Acta** 122(2): 157-66.
- Jiang, Q., C. Y. Lee, S. Mandrekar, B. Wilkinson, P. Cramer, N. Zelcer, K. Mann, B. Lamb, T. M. Willson, J. L. Collins, J. C. Richardson, J. D. Smith, T. A. Comery, D. Riddell, D. M. Holtzman, P. Tontonoz and G. E. Landreth (2008). *"ApoE promotes the proteolytic degradation of Aβeta."* **Neuron** 58(5): 681-93.
- Johns, D. R. (1995). *"Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease."* **N Engl J Med** 333(10): 638-44.
- Jones, S. A., J. D. Wood, M. J. Coffey and O. T. Jones (1994). *"The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by an NADPH oxidase-like system in human fibroblasts."* **FEBS Lett** 355(2): 178-82.
- Kang, J., H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther and B. Muller-Hill (1987). *"The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor."* **Nature** 325(6106): 733-6.
- Kanofsky, J. R. and P. D. Sima (1993). *"Singlet-oxygen generation at gas-liquid interfaces: a significant artifact in the measurement of singlet-oxygen yields from ozone-biomolecule reactions."* **Photochem Photobiol** 58(3): 335-40.
- Karvaj, M., P. Beno and P. G. Fedor-Freybergh (2007). *"Positive effect of flavonoids to cardiovascular and central nervous system."* **Neuro Endocrinol Lett** 28 Suppl 4: 1-3.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984). *"Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents."* **Nucleic Acids Res** 12(4): 2137-45.
- Katzman, R. (1976). *"Editorial: The prevalence and malignancy of Alzheimer disease. A major killer."* **Arch Neurol** 33(4): 217-8.
- Kepe, V., J. R. Barrio, S. C. Huang, L. Ercoli, P. Siddarth, K. Shoghi-Jadid, G. M. Cole, N. Satyamurthy, J. L. Cummings, G. W. Small and M. E. Phelps (2006). *"Serotonin*

- 1A receptors in the living brain of Alzheimer's disease patients." Proc Natl Acad Sci U S A* 103(3): 702-7.
- Ketterer, B. (1986). "Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases." *Xenobiotica* 16(10-11): 957-73.
- Kidd, M. (1963). "Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease." *Nature* 197: 192-3.
- Kim, J., P. Herrero, T. Sharp, R. Laforest, D. J. Rowland, Y. C. Tai, J. S. Lewis and M. J. Welch (2006). "Minimally invasive method of determining blood input function from PET images in rodents." *J Nucl Med* 47(2): 330-6.
- Kim, J., M. Takahashi, T. Shimizu, T. Shirasawa, M. Kajita, A. Kanayama and Y. Miyamoto (2008). "Effects of a potent antioxidant, platinum nanoparticle, on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*." *Mech Ageing Dev* 129(6): 322-31.
- Kinoshita, A., C. M. Whelan, C. J. Smith, I. Mikhailenko, G. W. Rebeck, D. K. Strickland and B. T. Hyman (2001). "Demonstration by fluorescence resonance energy transfer of two sites of interaction between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein: role of the intracellular adapter protein Fe65." *J Neurosci* 21(21): 8354-61.
- Korycka-Dahl, M. and T. Richardson (1980). "Initiation of oxidative changes in foods." *J Dairy Sci* 63(7): 1181-98.
- Kounnas, M. Z., R. D. Moir, G. W. Rebeck, A. I. Bush, W. S. Argraves, R. E. Tanzi, B. T. Hyman and D. K. Strickland (1995). "LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation." *Cell* 82(2): 331-40.
- Krinsky, N. (1994). "Natural antioxidants in human health and disease." **San Diego: Academic Press:** 239-262.
- Kroner, Z. (2009). "The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes?" *Altern Med Rev* 14(4): 373-9.
- Kuchibhotla, K. V., C. R. Lattarulo, B. T. Hyman and B. J. Bacskai (2009). "Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice." *Science* 323(5918): 1211-5.
- Kuhla, A., M. Hauke, K. Sempert, B. Vollmar and D. Zechner (2013). "Senescence-dependent impact of anti-RAGE antibody on endotoxemic liver failure." **Age (Dordr).**
- Kuiper, G. G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson and J. A. Gustafsson (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." *Endocrinology* 138(3): 863-70.
- Kuiper, G. G., J. G. Lemmen, B. Carlsson, J. C. Corton, S. H. Safe, P. T. van der Saag, B. van der Burg and J. A. Gustafsson (1998). "Interaction of estrogenic chemicals and

Bibliografía

- phytoestrogens with estrogen receptor beta.* **Endocrinology** 139(10): 4252-63.
- Lace, G. L., S. B. Wharton and P. G. Ince (2007). "A brief history of tau: the evolving view of the microtubule-associated protein tau in neurodegenerative diseases." **Clin Neuropathol** 26(2): 43-58.
- LaFerla, F. M. (2012). "Preclinical success against Alzheimer's disease with an old drug." **N Engl J Med** 367(6): 570-2.
- Laforest, R., T. L. Sharp, J. A. Engelbach, N. M. Fetting, P. Herrero, J. Kim, J. S. Lewis, D. J. Rowland, Y. C. Tai and M. J. Welch (2005). "Measurement of input functions in rodents: challenges and solutions." **Nucl Med Biol** 32(7): 679-85.
- Lage, J. M. (2006). "100 Years of Alzheimer's disease (1906-2006)." **J Alzheimers Dis** 9(3 Suppl): 15-26.
- Lapointe, J. and S. Hekimi (2010). "When a theory of aging ages badly." **Cell Mol Life Sci** 67(1): 1-8.
- Larson, E. B., M. F. Shadlen, L. Wang, W. C. McCormick, J. D. Bowen, L. Teri and W. A. Kukull (2004). "Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease." **Ann Intern Med** 140(7): 501-9.
- Lee, V. M. and J. Q. Trojanowski (1999). "Neurodegenerative tauopathies: human disease and transgenic mouse models." **Neuron** 24(3): 507-10.
- Lee, Y. B., H. J. Lee and H. S. Sohn (2005). "Soy isoflavones and cognitive function." **J Nutr Biochem** 16(11): 641-9.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson and M. M. Cox (1993). **Principles of biochemistry**. New York, NY, Worth Publishers.
- Levine, R. L., J. A. Williams, E. R. Stadtman and E. Shacter (1994). "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins." **Methods Enzymol** 233: 346-57.
- Li, L. and C. Holscher (2007). "Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review." **Brain Res Rev** 56(2): 384-402.
- Li, M., H. Guo and Z. Damuni (1995). "Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney." **Biochemistry** 34(6): 1988-96.
- Liggins, J., L. J. Bluck, S. Runswick, C. Atkinson, W. A. Coward and S. A. Bingham (2000). "Daidzein and genistein contents of vegetables." **Br J Nutr** 84(5): 717-25.
- Lillis, A. P., L. B. Van Duyn, J. E. Murphy-Ullrich and D. K. Strickland (2008). "LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies." **Physiol Rev** 88(3): 887-918.

- Liochev, S. I. and I. Fridovich (1994). "The role of O₂·- in the production of HO·: in vitro and in vivo." **Free Radic Biol Med** 16(1): 29-33.
- Lippman, R. D. (1985). "Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man." **Exp Gerontol** 20(1): 1-5.
- Lissin, L. W. and J. P. Cooke (2000). "Phytoestrogens and cardiovascular health." **J Am Coll Cardiol** 35(6): 1403-10.
- Little, M. and T. Seehaus (1988). "Comparative analysis of tubulin sequences." **Comp Biochem Physiol B** 90(4): 655-70.
- Liu, L., T. Tapiola, S. K. Herukka, M. Heikkilä and H. Tanila (2003). "Abeta levels in serum, CSF and brain, and cognitive deficits in APP + PS1 transgenic mice." **Neuroreport** 14(1): 163-6.
- Lopez-Gruoso, R., C. Borrás, J. Gambini and J. Vina (2010). "Aging and ovariectomy cause a decrease in brain glucose consumption in vivo in Wistar rats." **Rev Esp Geriatr Gerontol** 45(3): 136-40.
- Luo, S., T. Lan, W. Liao, M. Zhao and H. Yang (2012). "Genistein inhibits Abeta(2)(5)(-)(3)(5) -induced neurotoxicity in PC12 cells via PKC signaling pathway." **Neurochem Res** 37(12): 2787-94.
- Lustbader, J. W., M. Cirilli, C. Lin, H. W. Xu, K. Takuma, N. Wang, C. Caspersen, X. Chen, S. Pollak, M. Chaney, F. Trinchese, S. Liu, F. Gunn-Moore, L. F. Lue, D. G. Walker, P. Kuppusamy, Z. L. Zewier, O. Arancio, D. Stern, S. S. Yan and H. Wu (2004). "ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease." **Science** 304(5669): 448-52.
- Lloret, A., M. C. Badia, N. J. Mora, A. Ortega, F. V. Pallardo, M. D. Alonso, H. Atamna and J. Vina (2008). "Gender and age-dependent differences in the mitochondrial apoptogenic pathway in Alzheimer's disease." **Free Radic Biol Med** 44(12): 2019-25.
- Lloret, A., M. C. Badia, N. J. Mora, F. V. Pallardo, M. D. Alonso and J. Vina (2009). "Vitamin E paradox in Alzheimer's disease: it does not prevent loss of cognition and may even be detrimental." **J Alzheimers Dis** 17(1): 143-9.
- Ma, D. F., L. Q. Qin, P. Y. Wang and R. Katoh (2008). "Soy isoflavone intake increases bone mineral density in the spine of menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials." **Clin Nutr** 27(1): 57-64.
- Madej, A., E. Persson, T. Lundh and Y. Ridderstrale (2002). "Thyroid gland function in ovariectomized ewes exposed to phytoestrogens." **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci** 777(1-2): 281-7.
- Maezawa, I., L. W. Jin, R. L. Woltjer, N. Maeda, G. M. Martin, T. J. Montine and K. S. Montine (2004). "Apolipoprotein E isoforms and apolipoprotein AI protect from amyloid precursor protein carboxy terminal fragment-associated cytotoxicity." **J Neurochem** 91(6): 1312-21.

Bibliografía

- Magee, P. J. and I. R. Rowland (2004). "*Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer.*" **Br J Nutr** 91(4): 513-31.
- Mahley, R. W. (1988). "*Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology.*" **Science** 240(4852): 622-30.
- Mahn, K., C. Borrás, G. A. Knock, P. Taylor, I. Y. Khan, D. Sugden, L. Poston, J. P. Ward, R. M. Sharpe, J. Vina, P. I. Aaronson and G. E. Mann (2005). "*Dietary soy isoflavone induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo.*" **FASEB J** 19(12): 1755-7.
- Manning, C. A., M. E. Ragozzino and P. E. Gold (1993). "*Glucose enhancement of memory in patients with probable senile dementia of the Alzheimer's type.*" **Neurobiol Aging** 14(6): 523-8.
- Markovits, J., S. Junqua, F. Goldwasser, A. M. Venuat, C. Luccioni, J. Beaumatin, J. M. Saucier, A. Bernheim and A. Jacquemin-Sablon (1995). "*Genistein resistance in human leukaemic CCRF-CEM cells: selection of a diploid cell line with reduced DNA topoisomerase II beta isoform.*" **Biochem Pharmacol** 50(2): 177-86.
- Masliah, E., M. Mallory, N. Ge, M. Alford, I. Veinbergs and A. D. Roses (1995). "*Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice.*" **Exp Neurol** 136(2): 107-22.
- Mason, R. P. (1982). "*Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance.*" **Free radicals biology** (New York: Academic Press. (ed Pryor WA)): pp. 262-165.
- Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald and K. Beyreuther (1985). "*Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 82(12): 4245-9.
- Mathews, C. K., K. E. Van Holde and K. G. Ahern (2000). **Biochemistry**. San Francisco, Calif, Benjamin Cummings.
- Matson, S. C. and K. A. Haglund (2000). "*Relationship between scholastic and health behaviors and reading level in adolescent females.*" **Clin Pediatr (Phila)** 39(5): 275-80.
- May, P., Y. K. Reddy and J. Herz (2002). "*Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain.*" **J Biol Chem** 277(21): 18736-43.
- Mayeux, R. (1998). "*Gene-environment interaction in late-onset Alzheimer disease: the role of apolipoprotein-epsilon4.*" **Alzheimer Dis Assoc Disord** 12 Suppl 3: S10-5.
- Mazziotta, J. C., R. S. Frackowiak and M. E. Phelps (1992). "*The use of positron emission tomography in the clinical assessment of dementia.*" **Semin Nucl Med** 22(4): 233-46.

- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "*Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein).*" **J Biol Chem** 244(22): 6049-55.
- McCord, J. M. (1974). "*Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase.*" **Science** 185(150): 529-31.
- Melov, S., J. Ravenscroft, S. Malik, M. S. Gill, D. W. Walker, P. E. Clayton, D. C. Wallace, B. Malfroy, S. R. Doctrow and G. J. Lithgow (2000). "*Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics.*" **Science** 289(5484): 1567-9.
- Messina, M. (2010). "*Soybean isoflavone exposure does not have feminizing effects on men: a critical examination of the clinical evidence.*" **Fertil Steril** 93(7): 2095-104.
- Messina, M. J., V. Persky, K. D. Setchell and S. Barnes (1994). "*Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data.*" **Nutr Cancer** 21(2): 113-31.
- Meyer, E. P., A. Ulmann-Schuler, M. Staufenbiel and T. Krucker (2008). "*Altered morphology and 3D architecture of brain vasculature in a mouse model for Alzheimer's disease.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(9): 3587-92.
- Michalik, L., J. Auwerx, J. P. Berger, V. K. Chatterjee, C. K. Glass, F. J. Gonzalez, P. A. Grimaldi, T. Kadowaki, M. A. Lazar, S. O'Rahilly, C. N. Palmer, J. Plutzky, J. K. Reddy, B. M. Spiegelman, B. Staels and W. Wahli (2006). "*International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors.*" **Pharmacol Rev** 58(4): 726-41.
- Miles, A. M., D. S. Bohle, P. A. Glassbrenner, B. Hansert, D. A. Wink and M. B. Grisham (1996). "*Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide.*" **J Biol Chem** 271(1): 40-7.
- Miquel, J. and A. C. Economos (1979). "*Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and life span of Drosophila and mice.*" **Exp Gerontol** 14(5): 279-85.
- Miquel, J., A. C. Economos, J. Fleming and J. E. Johnson, Jr. (1980). "*Mitochondrial role in cell aging.*" **Exp Gerontol** 15(6): 575-91.
- Moncada, S., R. M. Palmer and E. A. Higgs (1991). "*Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.*" **Pharmacol Rev** 43(2): 109-42.
- Morais Cardoso, S., R. H. Swerdlow and C. R. Oliveira (2002). "*Induction of cytochrome c-mediated apoptosis by amyloid beta 25-35 requires functional mitochondria.*" **Brain Res** 931(2): 117-25.
- Mosconi, L. (2005a). "*Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD.*" **Eur J Nucl Med Mol Imaging** 32(4): 486-510.
- Mosconi, L., W. H. Tsui, S. De Santi, J. Li, H. Rusinek, A. Convit, Y. Li, M. Boppana and M. J. de Leon (2005b). "*Reduced hippocampal metabolism in MCI and AD: automated FDG-PET image analysis.*" **Neurology** 64(11): 1860-7.

Bibliografía

- Mosconi, L., S. De Santi, J. Li, W. H. Tsui, Y. Li, M. Boppana, E. Laska, H. Rusinek and M. J. de Leon (2008). "*Hippocampal hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging.*" **Neurobiol Aging** 29(5): 676-92.
- Muller, F. L., M. S. Lustgarten, Y. Jang, A. Richardson and H. Van Remmen (2007). "*Trends in oxidative aging theories.*" **Free Radic Biol Med** 43(4): 477-503.
- Newberg, A., A. Alavi and M. Reivich (2002). "*Determination of regional cerebral function with FDG-PET imaging in neuropsychiatric disorders.*" **Semin Nucl Med** 32(1): 13-34.
- Nilsen, J., S. Chen, R. W. Irwin, S. Iwamoto and R. D. Brinton (2006). "*Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function.*" **BMC Neurosci** 7: 74.
- Niwa, K., G. A. Carlson and C. Iadecola (2000). "*Exogenous A beta1-40 reproduces cerebrovascular alterations resulting from amyloid precursor protein overexpression in mice.*" **J Cereb Blood Flow Metab** 20(12): 1659-68.
- Niwa, K., K. Kazama, S. G. Younkin, G. A. Carlson and C. Iadecola (2002). "*Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein.*" **Neurobiol Dis** 9(1): 61-8.
- Noble, W., E. Planel, C. Zehr, V. Olm, J. Meyerson, F. Suleman, K. Gaynor, L. Wang, J. LaFrancois, B. Feinstein, M. Burns, P. Krishnamurthy, Y. Wen, R. Bhat, J. Lewis, D. Dickson and K. Duff (2005). "*Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 102(19): 6990-5.
- Nunomura, A., G. Perry, M. A. Pappolla, R. Wade, K. Hirai, S. Chiba and M. A. Smith (1999). "*RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease.*" **J Neurosci** 19(6): 1959-64.
- Oddo, S., A. Caccamo, M. Kitazawa, B. P. Tseng and F. M. LaFerla (2003). "*Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease.*" **Neurobiol Aging** 24(8): 1063-70.
- Odetti, P., G. Angelini, D. Dapino, D. Zaccheo, S. Garibaldi, F. Dagna-Bricarelli, G. Piombo, G. Perry, M. Smith, N. Traverso and M. Tabaton (1998). "*Early glycoxidation damage in brains from Down's syndrome.*" **Biochem Biophys Res Commun** 243(3): 849-51.
- Oliver, C. N. (1987). "*Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils.*" **Arch Biochem Biophys** 253(1): 62-72.
- Orgogozo, J. M., S. Gilman, J. F. Dartigues, B. Laurent, M. Puel, L. C. Kirby, P. Jouanny, B. Dubois, L. Eisner, S. Flitman, B. F. Michel, M. Boada, A. Frank and C. Hock (2003). "*Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization.*" **Neurology** 61(1): 46-54.

- Orr, W. C. and R. S. Sohal (1994). "Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*." **Science** 263(5150): 1128-30.
- Owen, J. B., R. Sultana, C. D. Aluise, M. A. Erickson, T. O. Price, G. Bu, W. A. Banks and D. A. Butterfield (2010). "Oxidative modification to LDL receptor-related protein 1 in hippocampus from subjects with Alzheimer disease: implications for Abeta accumulation in AD brain." **Free Radic Biol Med** 49(11): 1798-803.
- Pacifici, R. E. and K. J. Davies (1991). "Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited." **Gerontology** 37(1-3): 166-80.
- Pahnke, J., L. C. Walker, K. Scheffler and M. Krohn (2009). "Alzheimer's disease and blood-brain barrier function-Why have anti-beta-amyloid therapies failed to prevent dementia progression?" **Neurosci Biobehav Rev** 33(7): 1099-108.
- Pan, M., H. Han, C. Zhong and Q. Geng (2012). "Effects of genistein and daidzein on hippocampus neuronal cell proliferation and BDNF expression in H19-7 neural cell line." **J Nutr Health Aging** 16(4): 389-94.
- Parkes, T. L., A. J. Elia, D. Dickinson, A. J. Hilliker, J. P. Phillips and G. L. Boulianne (1998). "Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons." **Nat Genet** 19(2): 171-4.
- Pascual, B., E. Prieto, J. Arbizu, J. Marti-Climent, J. Olier and J. C. Masdeu (2010). "Brain glucose metabolism in vascular white matter disease with dementia: differentiation from Alzheimer disease." **Stroke** 41(12): 2889-93.
- Perez-Campo, R., M. Lopez-Torres, S. Cadenas, C. Rojas and G. Barja (1998). "The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach." **J Comp Physiol B** 168(3): 149-58.
- Perez, V. I., A. Bokov, H. Van Remmen, J. Mele, Q. Ran, Y. Ikeno and A. Richardson (2009a). "Is the oxidative stress theory of aging dead?" **Biochim Biophys Acta** 1790(10): 1005-14.
- Perez, V. I., H. Van Remmen, A. Bokov, C. J. Epstein, J. Vijg and A. Richardson (2009b). "The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice." **Aging Cell** 8(1): 73-5.
- Perry, G., R. J. Castellani, K. Hirai and M. A. Smith (1998). "Reactive Oxygen Species Mediate Cellular Damage in Alzheimer Disease." **J Alzheimers Dis** 1(1): 45-55.
- Pflanzner, T., M. C. Janko, B. Andre-Dohmen, S. Reuss, S. Weggen, A. J. Roebroek, C. R. Kuhlmann and C. U. Pietrzik (2011). "LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid-beta across the blood-brain barrier." **Neurobiol Aging** 32(12): 2323 e1-11.
- Phiel, C. J., C. A. Wilson, V. M. Lee and P. S. Klein (2003). "GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides." **Nature** 423(6938): 435-9.

Bibliografía

- Philpot, R. M. (1991). "Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues." **Methods Enzymol** 206: 623-31.
- Phillips, J. P., S. D. Campbell, D. Michaud, M. Charbonneau and A. J. Hilliker (1989). "Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 86(8): 2761-5.
- Pietrzik, C. U., T. Busse, D. E. Merriam, S. Weggen and E. H. Koo (2002). "The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing." **EMBO J** 21(21): 5691-700.
- Pognonec, P., H. Kato and R. G. Roeder (1992). "The helix-loop-helix/leucine repeat transcription factor USF can be functionally regulated in a redox-dependent manner." **J Biol Chem** 267(34): 24563-7.
- Poirier, J., A. Baccichet, D. Dea and S. Gauthier (1993). "Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats." **Neuroscience** 55(1): 81-90.
- Poisnel, G., A. S. Herard, N. El Tannir El Tayara, E. Bourrin, A. Volk, F. Kober, B. Delatour, T. Delzescaux, T. Debeir, T. Rooney, J. Benavides, P. Hantraye and M. Dhenain (2011). "Increased regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 model of Alzheimer's disease." **Neurobiol Aging** 33(9): 1995-2005.
- Polvikoski, T., R. Sulkava, M. Haltia, K. Kainulainen, A. Vuorio, A. Verkkoniemi, L. Niinisto, P. Halonen and K. Kontula (1995). "Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein." **N Engl J Med** 333(19): 1242-7.
- Postlethwait, E. M., S. D. Langford, L. M. Jacobson and A. Bidani (1995). "NO2 reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids." **Free Radic Biol Med** 19(5): 553-63.
- Prelli, F., E. M. Castano, S. G. van Duinen, G. T. Bots, W. Luyendijk and B. Frangione (1988). "Different processing of Alzheimer's beta-protein precursor in the vessel wall of patients with hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type." **Biochem Biophys Res Commun** 151(3): 1150-5.
- Priller, C., T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H. A. Kretschmar and J. Herms (2006). "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein." **J Neurosci** 26(27): 7212-21.
- Querfurth, H. W. and F. M. LaFerla (2010). "Alzheimer's disease." **N Engl J Med** 362(4): 329-44.
- Quick, K. L., S. S. Ali, R. Arch, C. Xiong, D. Wozniak and L. L. Dugan (2008). "A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice." **Neurobiol Aging** 29(1): 117-28.
- Raina, A. K., X. Zhu, C. A. Rottkamp, M. Monteiro, A. Takeda and M. A. Smith (2000). "Cyclin' toward dementia: cell cycle abnormalities and abortive oncogenesis in Alzheimer disease." **J Neurosci Res** 61(2): 128-33.

- Reddy, P. H. and M. F. Beal (2005). "Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease?" **Brain Res Brain Res Rev** 49(3): 618-32.
- Reynolds, C. H., A. R. Nebreda, G. M. Gibb, M. A. Utton and B. H. Anderton (1997). "Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro." **J Neurochem** 69(1): 191-8.
- Rickwood, R., M. T. Wilson and V. M. Darley-Usmar (1987a). "Mitochondria: a practical approach." **Oxford: IRL press Ltd.**: 1-16.
- Rickwood, R., M. T. Wilson and V. M. Darley-Usmar (1987b). Isolation and characteristics of intact mitochondria. Mitochondria, a practical approach. R. Rickwood, M. T. Wilson and V. M. Darley-Usmar, Ed. IRL Press, Ltd. Reino Unido.: 1-16.
- Richter, C., J. W. Park and B. N. Ames (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." **Proc Natl Acad Sci U S A** 85(17): 6465-7.
- Rissman, R. A., W. W. Poon, M. Blurton-Jones, S. Oddo, R. Torp, M. P. Vitek, F. M. LaFerla, T. T. Rohn and C. W. Cotman (2004). "Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology." **J Clin Invest** 114(1): 121-30.
- Rivera, E. J., A. Goldin, N. Fulmer, R. Tavares, J. R. Wands and S. M. de la Monte (2005). "Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine." **J Alzheimers Dis** 8(3): 247-68.
- Rodriguez, A. M., P. M. Carrico, J. E. Mazurkiewicz and J. A. Melendez (2000). "Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H(2)O(2)." **Free Radic Biol Med** 29(9): 801-13.
- Roe, C. M., M. I. Behrens, C. Xiong, J. P. Miller and J. C. Morris (2005). "Alzheimer disease and cancer." **Neurology** 64(5): 895-8.
- Rogaev, E. I., R. Sherrington, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda and et al. (1995). "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene." **Nature** 376(6543): 775-8.
- Rolyan, H., A. Scheffold, A. Heinrich, Y. Begus-Nahrman, B. H. Langkopf, S. M. Holter, D. M. Vogt-Weisenhorn, B. Liss, W. Wurst, D. C. Lie, D. R. Thal, K. Biber and K. L. Rudolph (2011). "Telomere shortening reduces Alzheimer's disease amyloid pathology in mice." **Brain** 134(Pt 7): 2044-56.
- Rosen, W. G., R. C. Mohs and K. L. Davis (1984). "A new rating scale for Alzheimer's disease." **Am J Psychiatry** 141(11): 1356-64.

Bibliografía

- Roses, A. D. (1996). "Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease." **Annu Rev Med** 47: 387-400.
- Ruan, H., X. D. Tang, M. L. Chen, M. L. Joiner, G. Sun, N. Brot, H. Weissbach, S. H. Heinemann, L. Iverson, C. F. Wu and T. Hoshi (2002). "High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase." **Proc Natl Acad Sci U S A** 99(5): 2748-53.
- Sagare, A., R. Deane, R. D. Bell, B. Johnson, K. Hamm, R. Pendu, A. Marky, P. J. Lenting, Z. Wu, T. Zarcone, A. Goate, K. Mayo, D. Perlmutter, M. Coma, Z. Zhong and B. V. Zlokovic (2007). "Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors." **Nat Med** 13(9): 1029-31.
- Salmon, A. B., A. Richardson and V. I. Perez (2010). "Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?" **Free Radic Biol Med** 48(5): 642-55.
- Sano, M., C. Ernesto, R. G. Thomas, M. R. Klauber, K. Schafer, M. Grundman, P. Woodbury, J. Growdon, C. W. Cotman, E. Pfeiffer, L. S. Schneider and L. J. Thal (1997). "A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study." **N Engl J Med** 336(17): 1216-22.
- Sanz, A., A. Hiona, G. C. Kujoth, A. Y. Seo, T. Hofer, E. Kouwenhoven, R. Kalani, T. A. Prolla, G. Barja and C. Leeuwenburgh (2007). "Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice." **Exp Gerontol** 42(3): 173-82.
- Sastre, J., M. Asensi, E. Gasco, F. V. Pallardo, J. A. Ferrero, T. Furukawa and J. Vina (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration." **Am J Physiol** 263(5 Pt 2): R992-5.
- Sastre, J., F. V. Pallardo, R. Pla, A. Pellin, G. Juan, J. E. O'Connor, J. M. Estrela, J. Miquel and J. Vina (1996). "Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes." **Hepatology** 24(5): 1199-205.
- Sastre, J., A. Millan, J. Garcia de la Asuncion, R. Pla, G. Juan, Pallardo, E. O'Connor, J. A. Martin, M. T. Droy-Lefaix and J. Vina (1998). "A *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress." **Free Radic Biol Med** 24(2): 298-304.
- Sawyer, D. T. (1988). "The redox thermodynamics for dioxygen species (O₂, O₂⁻, HOO[·], HOOH, and HOO⁻) and monooxygen species (O, O⁻, ·OH, and -OH) in water and aprotic solvents." **Basic Life Sci** 49: 11-20.
- Sayre, L. M., D. A. Zelasko, P. L. Harris, G. Perry, R. G. Salomon and M. A. Smith (1997). "4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease." **J Neurochem** 68(5): 2092-7.

- Sclan, S. G. and B. Reisberg (1992). "Functional assessment staging (FAST) in Alzheimer's disease: reliability, validity, and ordinality." **Int Psychogeriatr** 4 Suppl 1: 55-69.
- Schellenberg, G. D., T. D. Bird, E. M. Wijsman, H. T. Orr, L. Anderson, E. Nemens, J. A. White, L. Bonnycastle, J. L. Weber, M. E. Alonso and et al. (1992). "Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14." **Science** 258(5082): 668-71.
- Schenk, D., R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandevent, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games and P. Seubert (1999). "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse." **Nature** 400(6740): 173-7.
- Schiffer, W. K., M. M. Mirrione and S. L. Dewey (2007). "Optimizing experimental protocols for quantitative behavioral imaging with 18F-FDG in rodents." **J Nucl Med** 48(2): 277-87.
- 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.
- Setchell, K. D., S. P. Borriello, P. Hulme, D. N. Kirk and M. Axelson (1984). "Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease." **Am J Clin Nutr** 40(3): 569-78.
- Setchell, K. D. (2001). "Soy isoflavones--benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs)." **J Am Coll Nutr** 20(5 Suppl): 354S-362S; discussion 381S-383S.
- Sevanian, A., K. J. Davies and P. Hochstein (1985). "Conservation of vitamin C by uric acid in blood." **J Free Radic Biol Med** 1(2): 117-24.
- Shemesh, M., H. R. Lindner and N. Ayalon (1972). "Affinity of rabbit uterine oestradiol receptor for phyto-oestrogens and its use in a competitive protein-binding radioassay for plasma coumestrol." **J Reprod Fertil** 29(1): 1-9.
- Shen, X., H. Liu, Z. Hu, H. Hu and P. Shi (2013). "The relationship between cerebral glucose metabolism and age: report of a large brain PET data set." **PLoS One** 7(12): e51517.
- Shen, Z. X. (2004). "Brain cholinesterases: III. Future perspectives of AD research and clinical practice." **Med Hypotheses** 63(2): 298-307.
- Shibamura, A., T. Ikeda and Y. Nishikawa (2009). "A method for oral administration of hydrophilic substances to *Caenorhabditis elegans*: Effects of oral supplementation with antioxidants on the nematode lifespan." **Mech Ageing Dev** 130(9): 652-5.

Bibliografía

- Shibata, M., S. Yamada, S. R. Kumar, M. Calero, J. Bading, B. Frangione, D. M. Holtzman, C. A. Miller, D. K. Strickland, J. Ghiso and B. V. Zlokovic (2000). "Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier." **J Clin Invest** 106(12): 1489-99.
- Shigenaga, M. K., T. M. Hagen and B. N. Ames (1994). "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." **Proc Natl Acad Sci U S A** 91(23): 10771-8.
- Shimoji, K., L. Ravasi, K. Schmidt, M. L. Soto-Montenegro, T. Esaki, J. Seidel, E. Jagoda, L. Sokoloff, M. V. Green and W. C. Eckelman (2004). "Measurement of cerebral glucose metabolic rates in the anesthetized rat by dynamic scanning with ¹⁸F-FDG, the ATLAS small animal PET scanner, and arterial blood sampling." **J Nucl Med** 45(4): 665-72.
- Shoff, S. M., P. A. Newcomb, J. A. Mares-Perlman, B. E. Klein, S. M. Haffner, B. E. Storer and R. Klein (1998). "Usual consumption of plant foods containing phytoestrogens and sex hormone levels in postmenopausal women in Wisconsin." **Nutr Cancer** 30(3): 207-12.
- Sierens, J., J. A. Hartley, M. J. Campbell, A. J. Leathem and J. V. Woodside (2001). "Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay." **Mutat Res** 485(2): 169-76.
- Sies, H. (1983). "Biochemistry of oxidative stress. In *Glutathione: storage, transport and turnover in mammals*." **Science Press** Japan Scientific Press, Tokyo and UNU., Utrech: pp. 63-69.
- Sies, H. (1985). "Oxidative stress: Introductory remarks." **London Academic Press** Oxidative stress: 1-7.
- Sies, H. (1986). "Biochemistry of oxidative stress." **Angew Chem** 25: 1058-1071.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." **Eur J Biochem** 215(2): 213-9.
- Skovronsky, D. M., V. M. Lee and D. Pratico (2001). "Amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in human platelets. Role of cyclooxygenase and protein kinase C." **J Biol Chem** 276(20): 17036-43.
- Skulachev, V. P. (1996). "Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants." **Q Rev Biophys** 29(2): 169-202.
- Slater, T. F. (1984). "Free-radical mechanisms in tissue injury." **Biochem J** 222(1): 1-15.
- Slemmon, J. R., C. L. Painter, S. Nadanaciva, F. Catana, A. Cook, R. Motter and P. Seubert (2007). "Distribution of Aβ peptide in whole blood." **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci** 846(1-2): 24-31.
- Smith, M. A., G. Perry, P. L. Richey, L. M. Sayre, V. E. Anderson, M. F. Beal and N. Kowall (1996). "Oxidative damage in Alzheimer's." **Nature** 382(6587): 120-1.

- Sohal, R. S., B. H. Sohal and U. T. Brunk (1990). "Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species." **Mech Ageing Dev** 53(3): 217-27.
- Sohal, R. S. and B. H. Sohal (1991). "Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging." **Mech Ageing Dev** 57(2): 187-202.
- Sohal, R. S., H. H. Ku and S. Agarwal (1993). "Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species." **Biochem Biophys Res Commun** 196(1): 7-11.
- Sohn, O. S., E. S. Fiala, P. Upadhyaya, Y. H. Chae and K. El-Bayoumy (1999). "Comparative effects of phenylenebis(methylene)selenocyanate isomers on xenobiotic metabolizing enzymes in organs of female CD rats." **Carcinogenesis** 20(4): 615-21.
- Soininen, H., O. Kosunen, S. Helisalmi, A. Mannermaa, L. Paljarvi, S. Talasniemi, M. Ryyanen and P. Riekkinen, Sr. (1995). "A severe loss of choline acetyltransferase in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein epsilon 4 allele." **Neurosci Lett** 187(2): 79-82.
- Sparrow, C. P. and J. Olszewski (1993). "Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transition metal ions." **J Lipid Res** 34(7): 1219-28.
- Stadtman, E. R. (1992). "Protein oxidation and aging." **Science** 257(5074): 1220-4.
- Stadtman, E. R. (1993). "Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions." **Annu Rev Biochem** 62: 797-821.
- Steen, E., B. M. Terry, E. J. Rivera, J. L. Cannon, T. R. Neely, R. Tavares, X. J. Xu, J. R. Wands and S. M. de la Monte (2005). "Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes?" **J Alzheimers Dis** 7(1): 63-80.
- Stopa, E. G., P. Butala, S. Salloway, C. E. Johanson, L. Gonzalez, R. Tavares, V. Hovanesian, C. M. Hulette, M. P. Vitek and R. A. Cohen (2008). "Cerebral cortical arteriolar angiopathy, vascular beta-amyloid, smooth muscle actin, Braak stage, and APOE genotype." **Stroke** 39(3): 814-21.
- Sunita, P. and S. P. Pattanayak (2011). "Phytoestrogens in postmenopausal indications: A theoretical perspective." **Pharmacogn Rev** 5(9): 41-7.
- Sutcliffe, J. G., P. B. Hedlund, E. A. Thomas, F. E. Bloom and B. S. Hilbush (2011). "Peripheral reduction of beta-amyloid is sufficient to reduce brain beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease." **J Neurosci Res** 89(6): 808-14.
- Suter, M. and C. Richter (1999). "Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases." **Biochemistry** 38(1): 459-64.
- Takada, A., J. Nei, Y. Matsuda and R. Kanayama (1982). "Clinicopathological study of alcoholic fibrosis." **Am J Gastroenterol** 77(9): 660-6.

Bibliografía

- Takashima, A., K. Noguchi, K. Sato, T. Hoshino and K. Imahori (1993). "*Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 90(16): 7789-93.
- Takechi, R., S. Galloway, M. Pallegage-Gamarallage, C. Wellington, R. Johnsen and J. C. Mamo (2009). "*Three-dimensional colocalization analysis of plasma-derived apolipoprotein B with amyloid plaques in APP/PS1 transgenic mice.*" **Histochem Cell Biol** 131(5): 661-6.
- Tamaki, C., S. Ohtsuki, T. Iwatsubo, T. Hashimoto, K. Yamada, C. Yabuki and T. Terasaki (2006). "*Major involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in the clearance of plasma free amyloid beta-peptide by the liver.*" **Pharm Res** 23(7): 1407-16.
- Terry, R. D. (1963). "*The Fine Structure of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease.*" **J Neuropathol Exp Neurol** 22: 629-42.
- Thal, D. R., E. Capetillo-Zarate, S. Larionov, M. Staufenbiel, S. Zurbuegg and N. Beckmann (2009). "*Capillary cerebral amyloid angiopathy is associated with vessel occlusion and cerebral blood flow disturbances.*" **Neurobiol Aging** 30(12): 1936-48.
- Tikkanen, M. J., K. Wahala, S. Ojala, V. Vihma and H. Adlercreutz (1998). "*Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance.*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(6): 3106-10.
- Tiraboschi, P., L. A. Hansen, E. Masliah, M. Alford, L. J. Thal and J. Corey-Bloom (2004). "*Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease.*" **Neurology** 62(11): 1977-83.
- Tiret, L., P. de Knijff, H. J. Menzel, C. Ehnholm, V. Nicaud and L. M. Havekes (1994). "*ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS Study. European Atherosclerosis Research Study.*" **Arterioscler Thromb** 14(10): 1617-24.
- Tolbert, N. E. and E. Essner (1981). "*Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes.*" **J Cell Biol** 91(3 Pt 2): 271s-283s.
- Trommsdorff, M., J. P. Borg, B. Margolis and J. Herz (1998). "*Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein.*" **J Biol Chem** 273(50): 33556-60.
- Turner, P. R., K. O'Connor, W. P. Tate and W. C. Abraham (2003). "*Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory.*" **Prog Neurobiol** 70(1): 1-32.
- Ulery, P. G., J. Beers, I. Mikhailenko, R. E. Tanzi, G. W. Rebeck, B. T. Hyman and D. K. Strickland (2000). "*Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease.*" **J Biol Chem** 275(10): 7410-5.

- Vademécum (2003). **Vademécum Internacional Medicom**. Madrid.
- Valles, S. L., C. Borrás, J. Gambini, J. Furriol, A. Ortega, J. Sastre, F. V. Pallardo and J. Vina (2008). "Estradiol or genistein rescues neurons from amyloid beta-induced cell death by inhibiting activation of p38." **Aging Cell** 7(1): 112-8.
- Valles, S. L., P. Dolz-Gaiton, J. Gambini, C. Borrás, A. Lloret, F. V. Pallardo and J. Vina (2010). "Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR gamma expression in cultured astrocytes." **Brain Res** 1312: 138-44.
- Verdeal, K., R. R. Brown, T. Richardson and D. S. Ryan (1980). "Affinity of phytoestrogens for estradiol-binding proteins and effect of coumestrol on growth of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumors." **J Natl Cancer Inst** 64(2): 285-90.
- Vina, J., G. T. Saez, D. Wiggins, A. F. Roberts, R. Hems and H. A. Krebs (1983). "The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes." **Biochem J** 212(1): 39-44.
- Vina, J., C. Borrás, J. Gambini, J. Sastre and F. V. Pallardo (2005). "Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds." **FEBS Lett** 579(12): 2541-5.
- Vina, J., A. Lloret, S. L. Valles, C. Borrás, M. C. Badia, F. V. Pallardo, J. Sastre and M. D. Alonso (2007). "Mitochondrial oxidant signalling in Alzheimer's disease." **J Alzheimers Dis** 11(2): 175-81.
- Vina, J. and A. Lloret (2010). "Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide." **J Alzheimers Dis** 20 Suppl 2: S527-33.
- Vina, J., J. Gambini, R. Lopez-Gruoso, K. M. Abdelaziz, M. Jove and C. Borrás (2011). "Females live longer than males: role of oxidative stress." **Curr Pharm Des** 17(36): 3959-65.
- Viña, J. (1990). "Glutathione: Metabolism and physiological functions." **CRC press, Boca Raton, Florida**.
- Viña, J., J. Sastre, F. Pallardo and C. Borrás (2003). "Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males." **Antioxid Redox Signal** 5(5): 549-56.
- Viña, J., C. Borrás, J. Gambini, J. Sastre and F. V. Pallardo (2005a). "Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones." **Sci Aging Knowledge Environ** 2005(23): pe17.
- Viña, J., C. Borrás, J. Gambini, J. Sastre and F. V. Pallardo (2005b). "Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds." **FEBS Lett** 579(12): 2541-5.

Bibliografía

- Viña, J., A. Lloret, S. L. Valles, C. Borrás, M. C. Badia, F. V. Pallardo, J. Sastre and M. D. Alonso (2007). "Mitochondrial oxidant signalling in Alzheimer's disease." **J Alzheimers Dis** 11(2): 175-81.
- Viña, J. and A. Lloret (2010). "Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide." **J Alzheimers Dis** 20 Suppl 2: S527-33.
- Vitek, M. P., K. Bhattacharya, J. M. Glendening, E. Stopa, H. Vlassara, R. Bucala, K. Manogue and A. Cerami (1994). "Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease." **Proc Natl Acad Sci U S A** 91(11): 4766-70.
- Ward, A., S. Crean, C. J. Mercaldi, J. M. Collins, D. Boyd, M. N. Cook and H. M. Arrighi (2012). "Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/e4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis." **Neuroepidemiology** 38(1): 1-17.
- Watkins, P. B., H. J. Zimmerman, M. J. Knapp, S. I. Gracon and K. W. Lewis (1994). "Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease." **JAMA** 271(13): 992-8.
- Watson, G. S. and S. Craft (2004). "Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease." **Eur J Pharmacol** 490(1-3): 97-113.
- Wei, H., R. Bowen, Q. Cai, S. Barnes and Y. Wang (1995). "Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein." **Proc Soc Exp Biol Med** 208(1): 124-30.
- Weisgraber, K. H., S. C. Rall, Jr. and R. W. Mahley (1981). "Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms." **J Biol Chem** 256(17): 9077-83.
- Westmark, C. J., P. R. Westmark and J. S. Malter (2013). "Soy-based diet exacerbates seizures in mouse models of neurological disease." **J Alzheimers Dis** 33(3): 797-805.
- White, R. P. (1990). "Responses of isolated cerebral arteries to vasoactive agents." **Neurosurg Clin N Am** 1(2): 401-15.
- Wilson, P. W., E. J. Schaefer, M. G. Larson and J. M. Ordovas (1996). "Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis." **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 16(10): 1250-5.
- Wiseman, H., J. D. O'Reilly, H. Adlercreutz, A. I. Mallet, E. A. Bowey, I. R. Rowland and T. A. Sanders (2000). "Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans." **Am J Clin Nutr** 72(2): 395-400.
- Wisniewski, T. (2001). "Henry M. Wisniewski M.D. Ph.D." **J Alzheimers Dis** 3(1): 7-22.

- Wong, S. H., J. A. Knight, S. M. Hopfer, O. Zaharia, C. N. Leach, Jr. and F. W. Sunderman, Jr. (1987). "Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct." **Clin Chem** 33(2 Pt 1): 214-20.
- Xu, G., C. C. Green, S. E. Fromholt and D. R. Borchelt (2012). "Reduction of low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) in hippocampal neurons does not proportionately reduce, or otherwise alter, amyloid deposition in APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice." **Alzheimers Res Ther** 4(2): 12.
- Xu, Q., Y. Li, C. Cyras, D. A. Sanan and B. Cordell (2000). "Isolation and characterization of apolipoproteins from murine microglia. Identification of a low density lipoprotein-like apolipoprotein J-rich but E-poor spherical particle." **J Biol Chem** 275(41): 31770-7.
- Xu, Q., A. Bernardo, D. Walker, T. Kanegawa, R. W. Mahley and Y. Huang (2006). "Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus." **J Neurosci** 26(19): 4985-94.
- Yamamoto, S., T. Sobue, M. Kobayashi, S. Sasaki and S. Tsugane (2003). "Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan." **J Natl Cancer Inst** 95(12): 906-13.
- Yan, R., M. J. Bienkowski, M. E. Shuck, H. Miao, M. C. Tory, A. M. Pauley, J. R. Brashier, N. C. Stratman, W. R. Mathews, A. E. Buhl, D. B. Carter, A. G. Tomasselli, L. A. Parodi, R. L. Henrikson and M. E. Gurney (1999). "Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity." **Nature** 402(6761): 533-7.
- Yang, W. and S. Hekimi (2010). "A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*." **PLoS Biol** 8(12): e1000556.
- Zerbinatti, C. V., D. F. Wozniak, J. Cirrito, J. A. Cam, H. Osaka, K. R. Bales, M. Zhuo, S. M. Paul, D. M. Holtzman and G. Bu (2004). "Increased soluble amyloid-beta peptide and memory deficits in amyloid model mice overexpressing the low-density lipoprotein receptor-related protein." **Proc Natl Acad Sci U S A** 101(4): 1075-80.
- Zhao, W. Q. and D. L. Alkon (2001). "Role of insulin and insulin receptor in learning and memory." **Mol Cell Endocrinol** 177(1-2): 125-34.
- Zhu, X., M. Mei, H. G. Lee, Y. Wang, J. Han, G. Perry and M. A. Smith (2005). "P38 activation mediates amyloid-beta cytotoxicity." **Neurochem Res** 30(6-7): 791-6.
- Zlokovic, B. V. (2005a). "Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration." **Trends Neurosci** 28(4): 202-8.
- Zlokovic, B. V., R. Deane, J. Sallstrom, N. Chow and J. M. Miano (2005b). "Neurovascular pathways and Alzheimer amyloid beta-peptide." **Brain Pathol** 15(1): 78-83.

Bibliografía

- Zlokovic, B. V., R. Deane, A. P. Sagare, R. D. Bell and E. A. Winkler (2010). "*Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid beta-peptide elimination from the brain.*" **J Neurochem** 115(5): 1077-89.
- Zou, S., J. Sinclair, M. A. Wilson, J. R. Carey, P. Liedo, A. Oropeza, A. Kalra, R. de Cabo, D. K. Ingram, D. L. Longo and C. A. Wolkow (2007). "*Comparative approaches to facilitate the discovery of prolongevity interventions: effects of tocopherols on lifespan of three invertebrate species.*" **Mech Ageing Dev** 128(2): 222-6.