



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Juan L. Hancke O.

INSTITUTO: Farmacología

FACULTAD: Medicina Veterinaria

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dra. Angara Zambrano A.

INSTITUTO: Microbiología

FACULTAD: Ciencias

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ANDROGRAFOLIDO EN LA AGREGACIÓN Y
DESAGREGACIÓN DE LAS FIBRAS AMILOIDES”

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico.

CLAUDIA GENOVEVA BARRIENTOS ACCARDI

VALDIVIA - CHILE

2007



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Juan L. Hancke O.

INSTITUTO: Farmacología

FACULTAD: Medicina Veterinaria

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dra. Angara Zambrano A.

INSTITUTO: Microbiología

FACULTAD: Ciencias

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ANDROGRAFOLIDO EN LA AGREGACIÓN Y
DESAGREGACIÓN DE LAS FIBRAS AMILOIDES”

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico.

CLAUDIA GENOVEVA BARRIENTOS ACCARDI

VALDIVIA – CHILE

2007

A Dios, madre y hermana.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a:

Dr. Juan Hancke, quién me acogió con mucho entusiasmo y amabilidad en su Instituto, brindándome su ayuda y tiempo para la culminación de ésta investigación.

Dra. Angara Zambrano, por toda su paciencia y gran apoyo, además de sus consejos y tiempo dedicados para el desarrollo y finalización de ésta investigación.

Dr. Rafael Burgos, por su paciencia, ayuda y tiempo dedicados para la realización de ésta investigación.

A Angélica, por sus buenos consejos y sobre todo su amistad durante el desarrollo de ésta investigación.

A todas las personas y amigos que trabajan en: Instituto de farmacología, Instituto de Microbiología e Instituto de Bioquímica por hacer un ambiente ameno donde trabajar.

Al financiamiento de esta Tesis FONDEF D03I1002.

A mi adorada madre, por creer en mí y siempre apoyarme.

INDICE

	Página
CAPITULO I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes Teóricos.....	2
1.1.1 Etiopatogenía.....	2
1.1.2 Epidemiología.....	3
1.1.3 Técnicas empleadas para observar cambios cerebrales.....	3
1.1.4 Alteraciones anatomopatológicas.....	4
1.1.5 Hipótesis del origen de la enfermedad.....	5
1.1.6 Factores de riesgo.....	6
1.1.7 Péptido β amiloide.....	8
1.1.8 Mecanismos de muerte neuronal.....	10
1.1.9 Tratamientos	12
1.1.9.1 Anticolinesterásicos.....	13
1.1.9.2 Anti-inflamatorios.....	15
1.1.9.3 Alternativas terapéuticas de origen natural.....	16
1.2 Planteamiento del problema.....	18
1.3 Hipótesis.....	19
1.4 Objetivos.....	19
1.4.1 Objetivo general.....	19
1.4.2 Objetivos Específicos.....	19
CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.1 Materiales.....	21

2.1.1	Reactivos químicos.....	21
2.2	Métodos.....	22
2.2.1	Preparación péptido β -amiloide sintético ($A\beta$).....	22
2.2.2	Preparación de andrografolido (AP).....	22
2.2.3	Ensayos de agregación del péptido $A\beta$ mediante análisis de turbidimetría.....	22
2.2.4	Análisis del péptido $A\beta$ mediante SDS-PAGE.....	23
2.2.5	Ensayos de desagregación de péptido $A\beta$ mediante análisis de microscopía de fluorescencia basado en ThT.....	24
2.2.6	Ensayos de desagregación de péptido $A\beta$ mediante análisis de fluorimetría basado en ThT.....	25
2.2.7	Ensayos de toxicidad en cultivo primario de neuronas.....	26
2.2.8	Análisis cuantitativo del largo de los procesos neuronales en cultivo primario de neuronas.....	27
2.2.9	Análisis estadístico.....	27
CAPITULO III RESULTADOS.....		28
3.1	Andrografolido inhibe la agregación del péptido $A\beta$	29
3.2	Andrografolido causa la depolimerización de fibras amiloides.....	32
3.3	Andrografolido reduce la neurotoxicidad de $A\beta$ <i>in vitro</i>	35

CAPITULO IV DISCUSIÓN.....	38
4.1 Discusión.....	39
4.2 Conclusión.....	45
4.3 Proyecciones.....	46
CAPITULO V BIBLIOGRAFÍA.....	47
CAPITULO VI ANEXOS.....	63

RESUMEN

En esta investigación se evaluó el efecto de andrografolido sobre la agregación y desagregación del péptido β -amiloide. Una de las lesiones observadas en un paciente con enfermedad de Alzheimer son las placas seniles, las cuales están formadas por la deposición extracelular de estos agregados amiloideos. Estos agregados corresponden a un autoensamblaje del péptido $A\beta_{1-40}$ de forma monomérica, (que es un producto normal del metabolismo y no es tóxico para las células neuronales), a formas multiméricas y poliméricas con una potente toxicidad.

El seguimiento del proceso de agregación del péptido *in vitro* se realizó por turbidimetría a 405 nm y se midió la absorbancia de la reacción que contiene el péptido $A\beta_{1-40}$, en ausencia y presencia de andrografolido. La desagregación del péptido *in vitro* fue seguida por fluorimetría con tioflavina (ThT) que se une específicamente al amiloide, siendo monitoreada por excitación a 437 nm y emisión a 485 nm. Por otro lado, es importante resaltar que el péptido $A\beta_{1-40}$ agregado, tiene un claro efecto neurotóxico y neurodegenerativo. En este trabajo se estudio el efecto de andrografolido en cultivo primario de neuronas corticales en presencia de $A\beta_{1-40}$ agregado, para lo cual se utilizaron anticuerpos anti-tubulina tirosinada y anti-MAP-2, lo que fue observado bajo el microscopio de fluorescencia.

Se concluyó que andrografolido es un compuesto que inhibe la agregación del péptido $A\beta_{1-40}$ en fibras amiloide, además también es capaz de inducir la desagregación de las fibras amiloides formadas, siendo este proceso tiempo y concentración dependiente. Por otra parte, presenta un efecto neuroprotector, pues mantiene la morfología de las neuronas en presencia de agregados amiloidogénicos.

SUMMARY

The present investigation evaluated the effect of andrographolide on the aggregation and disaggregation of β -amyloid peptide. One of the lesions observed in Alzheimer's patients are the senile plaques, formed by the extracellular deposition of amyloid aggregates. These aggregates are the result of the self-assembly of monomeric $A\beta_{1-40}$ peptides, (which are normal products of metabolism and non-toxic for neuronal cells), into multimeric and polymeric forms of high neurotoxicity.

The *in-vitro* peptide aggregation process was performed by turbidimetry at 405 nm and the absorbance of the reaction of $A\beta_{1-40}$ -containing peptides was determined in presence and absence of andrographolide. The *in-vitro* peptide disaggregation was evaluated by Thioflavin T (ThT) fluorimetry that binds specifically to the amyloid and monitored by excitation at 437 nm and emission at 485 nm. On the other hand, it is important to mention that the $A\beta_{1-40}$ peptide aggregates has a significant neurotoxic and neurodegenerative effect. Therefore, in this work we also studied the effect of andrographolide on a primary culture of cortical neurons in the presence of $A\beta_{1-40}$ aggregates, by means of tyrosinated antitubuline and anti-Map-2 antibodies, and evaluated by fluorescence microscopy.

Finally, it can be concluded that andrographolide is a compound that inhibits the fibrillar aggregation of $A\beta_{1-40}$. Moreover, it also induces disaggregation of formed amyloid fibers, a process time and concentration dependent. On the other hand, it possesses a neuroprotective effect, since it maintains the morphology of neurons in the presence of amyloidogenic aggregates.

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES TEORICOS

1.1.1 ETIOPATOGENIA

El aumento progresivo de la longevidad humana está dando origen a la presentación de nuevos síndromes psicopatológicos invalidantes, entre los cuales destaca prioritariamente la enfermedad de Alzheimer (González, 2000), que es una de las enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC) de mayor incidencia en la vejez (Ostrosky-Solís, 1999). Corresponde a un desorden neurodegenerativo progresivo, considerado actualmente como la principal causa de demencia (Ostrosky-Solís, 1999). Esta demencia se caracteriza por un trastorno de las habilidades cognitivas que es de inicio gradual (Goodman & Gilman, 2001). Conforme progresa el trastorno, se van dañando funciones cognitivas, entre ellas las habilidades para efectuar cálculos, ejercicios, manipular objetos e instrumentos comunes (Goodman & Gilman, 2001). De acuerdo con la edad de inicio del cuadro clínico se han definido dos grupos (Nalbantoglu et al., 1990). La forma temprana (presenil) o enfermedad de Alzheimer familiar que comienza antes de los 65 años, tiene mayor rapidez evolutiva y representa el 5-10% de los casos (Nalbantoglu et al., 1990). Está se caracteriza por manifestaciones temprana de la enfermedad, en algunos casos pacientes aproximadamente de 40 años (Rosenberg, 2000) y la forma tardía (senil) o enfermedad de Alzheimer esporádica, que se presenta después de los 65 años y representa el 90% de los casos, sin aparentes antecedentes familiares (Nalbantoglu et al., 1990). Es poco frecuente la forma de enfermedad de Alzheimer familiar (Bird et al., 1989) y clínicamente las manifestaciones son bastantes similares o casi indistinguible de la enfermedad de Alzheimer esporádica, ellas sólo difieren en la edad de presentación y rapidez evolutiva, aunque algunas familias pueden mostrar señales clínicas distintivas (Selkoe, 2001).

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA

Estudios epidemiológicos indican un aumento de la incidencia de esta enfermedad (Hebert et al., 2003), diagnosticada por primera vez en 1907, por el médico alemán Alois Alzheimer (1864-1915) (Selkoe, 2001). Según estimaciones globales, hay unos 12 millones de afectados en todo el mundo, de los que 7 millones se ubican en sociedades industrializadas (Hebert et al., 2003). Se estiman 4.5 millones de americanos con Alzheimer, si este número continua creciendo se estima que para el 2050 aumentara entre 11.3 millones a 16 millones (Hebert et al., 2003). El aumento de la edad es el principal factor de riesgo, el número de individuos afectados se dobla cada 5 años después de los 60 años (Townsend and Pratico, 2005), elevando la prevalencia desde 1%, a más del 40% en individuos mayores de 85 años de edad (Townsend and Pratico, 2005). La muerte en una persona con enfermedad de Alzheimer, suele sobrevenir en un plazo de 6 a 12 años después de iniciarse el trastorno (Goodman & Gilman, 2001). Una persona diagnosticada con la enfermedad sobrevivirá la mitad del tiempo, que una persona de la misma edad y sin demencia (Larson et al., 2004).

1.1.3 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA OBSERVAR CAMBIOS CEREBRALES

El diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer sólo puede establecerse después de la muerte por estudio necrópico (González, 2000). El papel de la neuroimagen en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias degenerativas es fundamentalmente descartar otras lesiones cerebrales lentamente progresivas que pudieran causar demencia, como son los tumores de lóbulo frontal o temporal o lesiones vasculares (Masdeu, 2004). Existen pruebas empleadas para observar cambios en el cerebro entre las que se destaca la Resonancia Magnética (RM) y la Tomografía por emisión de positrones (PET).

La Resonancia Magnética (RM): muestra cambios estructurales en el cerebro de personas con riesgo de desarrollar la enfermedad, pero que todavía son asintomáticas (Krasuski et al., 2002; Schott et al., 2003). Además, la facilidad de llevar a cabo estudios de RM avala la utilidad de la neuroimagen estructural en el seguimiento y detección preclínica de la enfermedad de Alzheimer (Du et al., 2003; Schott et al., 2003). La Tomografía por emisión de positrones (PET): estudia cambios en el metabolismo o perfusión cerebral y puede determinar la distribución cerebral regional de más de 500 trazadores biológicos, entre los que se encuentran sustratos de enzimas y transportadores, medicamentos y oligonucleótidos (Phelps, 2000; Song et al., 2000). Además, estudios de PET avala la utilidad de la neuroimagen funcional que hasta el momento ha sido lo suficientemente sensible y específica para detectar alteraciones tempranas en la génesis de la enfermedad de Alzheimer (Masdeu, 2004). Sin embargo, el diagnóstico en vida de la enfermedad se basa en la valoración clínica cuidadosa del paciente (Goodman & Gilman, 2001).

1.1.4 ALTERACIONES ANATOMOPATOLÓGICAS

Desde el punto de vista patológico se observan en el cerebro de un paciente con Alzheimer pérdidas neuronales y se distinguen dos tipos de lesiones características: agregados extracelulares del péptido β amiloide llamados placas seniles y agregados intracelulares de la proteína Tau llamados ovillos neurofibrilares (Selkoe, 2001).

En los ovillos neurofibrilares, la proteína Tau, de asociación al citoesqueleto, se encuentra en un estado hiperfosforilado, lo cual le impide cumplir su función y provoca su autoensamblaje en filamentos helicoidales pareados o PHF (Goedert, 1993). Las placas seniles son depósitos extracelulares insolubles del péptido β amiloide ($A\beta$), que están asociado a daño axonal y dendrítico generalmente encontrado en regiones límbicas y de asociación a la corteza (Dickson,

1997). La distrofia neuronal ocurre dentro del depósito amiloide y alrededor de éste, los procesos neuronales se dilatan a menudo y son tortuosos (Selkoe, 2001). A las placas están íntimamente asociadas la microglía y se rodean por astrocitos reactivos (Selkoe, 2001).

1.1.5 HIPÓTESIS DEL ORIGEN DE LA ENFERMEDAD

Aún no se ha encontrado la explicación para el origen de la enfermedad, aunque existen 5 tipos de hipótesis:

Hipótesis de la cascada amiloide: La cual plantea que la etiología de la enfermedad de Alzheimer, es por la aparición de una mutación en los genes que producen la proteína precursora de amiloide, la proteína Tau o en enzimas que participan en los procesos de APP, como la presinilina 1 y 2 (Findeis, 2002). Todas estas alteraciones actuarían sobre la proteína β -amiloide ($A\beta$), el último desencadenante de la muerte de las neuronas (Selkoe, 2001).

Hipótesis de la proteína Tau: La proteína Tau es una proteína multifuncional que esta asociada a los microtúbulos y juega un rol importante en su ensamblaje, además de su estabilización, contra una dinámica inestable (Kosik et al., 1986). La proteína Tau alterada produciría una degeneración neuronal, con estructuras características, los ovillos o nudos neurofibrilares (Kosik et al., 1986).

Hipótesis de la acetilcolina: Según la cual la deficiencia de acetilcolina tiene importancia crítica en la génesis de los síntomas de esta entidad patológica (Goodman & Gilman, 2001), donde la pérdida de neuronas colinérgicas parece ser la responsable de gran parte de la deficiencia de aprendizaje y memoria de la enfermedad de Alzheimer (Rang, 2004).

Hipótesis del calcio: Hay un desequilibrio de calcio en los enfermos de Alzheimer, puesto que los radicales libres inducen una entrada masiva de calcio en las células neuronales

(MacManus et al., 2000), por lo tanto el exceso de calcio puede provocar la destrucción de las células nerviosas (MacManus et al., 2000).

Hipótesis inflamatoria: Esta postula que la degeneración de neuronas en pacientes con Alzheimer es secundaria a una respuesta inflamatoria, más que a los rasgos característicos de placas seniles y ovillos neurofibrilares por sí mismos (Townsend and Pratico, 2005).

1.1.6 FACTORES DE RIESGO

Es difícil determinar quién va a desarrollar la enfermedad de Alzheimer, puesto que se trata de una alteración compleja, de causa desconocida, en la que al parecer intervienen múltiples factores que juegan un rol importante y aumentan las probabilidades de padecer esta patología, entre los factores de riesgo están:

Edad: Como se mencionó anteriormente esta enfermedad suele afectar a mayores de 65 años, dándose también algunos casos de pacientes aproximadamente de 40 años (Rosenberg, 2000). La edad media de diagnóstico es a los 80 años, puesto que se considera que la enfermedad de Alzheimer es favorecida por la edad (González, 2000).

Sexo: Aunque la severidad de esta enfermedad es similar en ambos sexos, la mujer presenta una dificultad mayor en tareas de memoria semántica (Henderson and Buckwalter, 1994), cuando los niveles de estrógeno son bajos en la menopausia; la terapia de reemplazo hormonal en pacientes puede restaurar la capacidad de memoria y retardar la aparición de perturbaciones de la enfermedad de Alzheimer (Maccioni et al., 2001). En el hombre la disminución de testosterona es gradual y las neuronas tienen la habilidad de convertir esta hormona en estradiol, lo cual puede explicar una incidencia menor de desórdenes cognitivos en pacientes varones mayores (Maccioni et al., 2001).

Genética: Los genes más implicados en la enfermedad de Alzheimer son aquellos que codifican para la proteína precursora de amiloide (APP), $\alpha 2$ macroglobulinas, presinilinas 1 y 2 y apolipoproteína E (Apo E) (Maccioni et al., 2001). Esta proteína está implicada en la movilización y redistribución del colesterol en la reparación, crecimiento y mantenimiento de la mielina y de las membranas neuronales durante el crecimiento o después de lesiones del SNC (González, 2000). La frecuencia de alelos de la Apo E ó el número de copias se encuentra correlacionado con un mayor riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer, disminución de la edad de presentación, aumento de la densidad de la placa senil y disminución de la actividad de la acetiltransferasa y de la densidad colinérgica neuronal (González, 2000). De todas las formas que presenta el gen de la Apo E, se ha comprobado que la Apo E4 pudiera ser la más influyente, aunque la enfermedad también aparece en sujetos que no tienen la Apo E4 (Lambert et al., 1998). Las mutaciones en la APP en la enfermedad de Alzheimer familiar, es menos frecuente que las mutaciones en las presinilinas, identificándose pacientes de hasta 30 años de edad (Prasher et al., 1998). La $\alpha 2$ macroglobulina se considera un importante factor de riesgo para la enfermedad por el polimorfismo de esta proteína (Blacker et al., 1998; Gibson et al., 2000), ella media la salida y degradación del péptido A β . Las presinilinas están involucradas, en el procesamiento normal de la APP, por lo tanto mutaciones que lleven a la presinilina 1 (PS1) a aparecer con alteraciones en diferentes sitios, son responsables de la división errónea de APP y la generación de péptidos A β (Xia et al., 1997). La PS1 también interactúa con glicógeno sintetasa kinasa (GSK 3b), una de las proteínas críticas envueltas en la fosforilación de la proteína Tau; al interactuar la PS1 anómala con GSK 3b podría aumentar las fosforilaciones en los sitios de Tau, generando una proteína Tau que le falta habilidad de asociación con el citoesqueleto y genera filamentos helicoidales pareados (PHF) (Takashima et al., 1998).

Estudios y educación: Diversos estudios indican que un bajo nivel educativo supone un factor de riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer, mientras un nivel elevado de educación confiere cierta protección (Katzman, 1993), lo que sugiere que la educación incrementa la reserva cerebral al aumentar su densidad (González, 2000). La mayor reserva circulatoria cerebral producida por la educación, especialmente en la región parietotemporal, exige mayores lesiones neuropatológicas para alcanzar niveles de gravedad clínica similar a lo observado en sujetos con menor nivel educativo (Stern et al., 1992).

Intoxicaciones ambientales: Metales como el hierro son promotores de la neurodegeneración al acumularse en el cerebro, induciendo daño neuronal por la producción de radicales libres (Egana et al., 2003).

Campos electromagnéticos: Sujetos expuestos prolongadamente a campos magnéticos tienen tres veces más la posibilidad de padecer la enfermedad, ya que en estos casos existe un notable aumento del ión calcio en las células nerviosas, lo cual favorece su muerte (Sobel y Mortimer, 1998)¹.

1.1.7 PÉPTIDO B AMILOIDE

El péptido β amiloide es de longitud variable 39 a 43 aminoácidos y un tamaño de 4 kDa, derivado de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP) (Glennner and Wong, 1984), que es codificada por el gen que está localizado en el cromosoma 21 (Maccioni et al., 2001). La proteína precursora de amiloide pertenece a un tipo de familia de glicoproteínas transmembrana que se expresa en varios tipos de células (Maccioni et al., 2001). La mitad del N-terminal de la APP es proyectado hacia el dominio extracelular o puede localizarse

¹ Sobel, E., Mortimer, J. Electromagnetic risk in Alzheimer disease. Fourth International Conference on AD. Minneapolis, 1998. Comunicación.

intracelularmente en el lumen de las vesículas, tal como en el retículo endoplasmico, aparato de Golgi y endosomas intracelulares (Neve et al., 2000). La región C-terminal de la APP queda en el dominio citoplasmático (Kang et al., 1987). La APP es sensible a la proteólisis de proteasas llamadas α , β y γ secretasa (Maccioni et al., 2001). Las secretasas son responsables de la producción del péptido A β (1-40) y la variante A β (1-42), con una capacidad significativamente más alta de agregarse (Citron et al., 1996). Las secretasas β y γ son promotoras de la formación de A β , mientras que la α secretasa es neuroprotectora. Se ha sugerido que en condiciones normales, la APP podría tener un efecto trófico sobre las neuronas (Neve et al., 2000; Qiu et al., 1995). El A β monomérico es una forma nuclear, que crece como protofibras solubles (Yankner et al., 1989), este es un producto normal del metabolismo de la APP y no es tóxico para las células neuronales (Lorenzo and Yankner, 1994), sin embargo el ensamblaje a formas multiméricas y poliméricas, otorgan al A β una potente toxicidad para las células neuronales (Pike et al., 1991). Así la formación de péptido A β insoluble, sería el responsable de la disfunción sináptica en la enfermedad de Alzheimer (Cleary et al., 2005). El A β constitutivamente secretado por células neuronales normales (Haass et al., 1992), se encuentra principalmente en el fluido cerebro espinal y en la sangre, también se ha visto que se acumula en los capilares cerebrales, arteriolas y venulas (Seubert et al., 1992). Los niveles de A β encontrados en el fluido cerebro espinal humano están en el rango de 3- 8 nM (Motter et al., 1995), considerando que el nivel en el plasma esta generalmente bajo 500 pM (Scheuner et al., 1996). En la enfermedad de Alzheimer se ha encontrado una marcada disminución de A β en el líquido cefalorraquídeo (Maccioni et al., 2004).

La participación de los depósitos A β en el cerebro como factor inductor de la enfermedad de Alzheimer es una hipótesis ampliamente aceptada y se basa principalmente en la asociación entre la enfermedad de Alzheimer de tipo familiar con diversas mutaciones en el gen APP o en

genes de proteínas encargadas de su secreción, tales como las presinilinas 1 y 2 (Maccioni et al., 2001). La hipótesis del amiloide ha sido una importante base para el actual conocimiento sobre esta enfermedad (Maccioni et al., 2001). Sin embargo, se ha observado la presencia de abundantes placas seniles conteniendo la forma agregada del péptido A β en cerebros de personas ancianas normales, incluso en la ausencia de síntomas de demencia (Neve et al., 2000; Terry et al., 1987), lo que sugiere que junto al A β existen otros factores determinantes en la patogénesis de la enfermedad (Maccioni et al., 2001).

1.1.8 MECANISMOS DE MUERTE NEURONAL

Investigaciones recientes de los mecanismos de muerte celular en la enfermedad de Alzheimer, han llevado a entender como la apoptosis y necrosis contribuyen a la neurodegeneración (Kusiak et al., 1996; Wolozin and Behl, 2000). Estudios neuropatológicos muestran un incremento en la razón de neuronas apoptóticas en muestras de cerebros postmortem de pacientes con esta enfermedad, comparado con pacientes controles (Yang et al., 1998).

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso esencial durante el desarrollo del sistema nervioso, permitiendo la selección de poblaciones neuronales adecuadas (Kuan et al., 2000; Oppenheim, 1991). La apoptosis presenta rasgos morfológicos característicos, entre ellos: condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y vesiculación de la membrana celular (Maccioni et al., 2001), produciendo un daño mínimo a las células vecinas generalmente sin inflamación (von Bernhardi, 2004), esta se ejecuta por una serie de eventos celulares que involucra la activación de caspasas (Maccioni et al., 2001). Las caspasas son una familia de proteasas, algunas existen como pro-enzimas, las cuales son claves para iniciar la activación de eventos celulares que finalmente llevan a la apoptosis (Maccioni et al., 2001).

En el sistema nervioso y especialmente durante el desarrollo, la apoptosis parece ser activada por carencia de factores tróficos (Maccioni et al., 2001), así por ejemplo, la pérdida de apoyo trófico puede producir la desfosforilación de BAD que interactúa con Bcl-2, inhibiéndola (Maccioni et al., 2001), lo que facilita la liberación de citocromo c por la mitocondria y el factor activador de apoptosis Apaf, el cual lleva finalmente a la activación de caspasa 3 (Dudek et al., 1997). También hay evidencia que la carencia de factores tróficos induce estrés oxidativo en las neuronas, involucrando la producción de óxido nítrico, superóxido y peroxinitrito, los cuales activan caspasa 3 (Estevez et al., 1999; Estevez et al., 1998). Peroxinitrito tiene más de un rol en la inducción de apoptosis, ya que se ha demostrado además que puede inhibir la proteína transductora de señales fosfatidilinositol 3 quinasa (PI 3K), la cual está implicada en la supervivencia celular (Spear et al., 1997).

La necrosis es una forma de muerte celular característica, también el inicio erróneo de la apoptosis en condiciones anormales o estresantes resulta en necrosis (Sastry and Rao, 2000). La necrosis presenta rasgos morfológicos característicos, tales como: tumefacción mitocondrial, dilatación del retículo endoplásmico y vacuolación del citoplasma; las células tumefactas se lisan y el contenido celular es liberado al espacio intercelular, dañando a las células vecinas y generando un proceso inflamatorio (von Bernhardi, 2004). Todas las células poseen mecanismos homeostáticos elaborados que pueden compensar cambios ambientales y mantener el compartimiento interno estable, pero la mantención de la integridad es limitada (von Bernhardi, 2004). La depleción energética aguda es una de las condiciones gatillantes de necrosis más potentes en las neuronas y se produce rápidamente en períodos de isquemia o hipoglicemia (Lipton, 1999). La acumulación de radicales de oxígeno, generados como productos de procesos metabólicos normales o aberrantes, puede gatillar tanto necrosis como apoptosis (von Bernhardi,

2004). Estos factores generalmente causan la muerte al sobrepasar los mecanismos regulatorios y homeostáticos, o al comprometer la integridad estructural de la célula (Andersen, 2004).

Es importante destacar que el mecanismo por el cual A β induce la muerte celular o apoptosis no está aún claramente definido (Mattson et al., 1992). Sin embargo, se conoce que A β altera los niveles de calcio, promoviendo la susceptibilidad a daño excitotóxico (Mattson et al., 1992) y la formación de radicales libres (Shearman et al., 1994). Se ha mostrado que A β causa la muerte de neuronas corticales e hipocampales *in vitro* (concentraciones 1-100 μ M) e *in vivo* (LaFerla et al., 1995; Yankner et al., 1990). En cultivos neuronales el tratamiento con A β induce las típicas características apoptóticas (Watt et al., 1994).

1.1.9 TRATAMIENTOS

Por el momento no existe ningún tratamiento que revierta el proceso de degeneración de esta enfermedad y sólo se disponen de tratamientos para minimizar o estabilizar los síntomas de la enfermedad de Alzheimer (Townsend and Pratico, 2005). Concretamente, se utilizan los inhibidores de la acetilcolinesterasa, fármacos aprobados por la FDA, que elevan los niveles de la acetilcolina en el cerebro (Florez, 1997; Rang, 2004), al inhibir a la enzima acetilcolinesterasa que es la encargada de metabolizar la acetilcolina a acetato y colina y por lo tanto poner fin a la acción de este neurotransmisor (Katzung, 1997). El interés de utilizar estos medicamentos de efecto colinérgico en el paciente con enfermedad de Alzheimer se basa en el hecho que en estos enfermos se observa una pérdida de neuronas colinérgicas subcorticales (Goodman & Gilman, 2001), en particular, las de la parte basal del cerebro anterior (núcleo basal de Meynert), que brindan inervación colinérgica a toda la corteza cerebral (Goodman & Gilman, 2001), por lo que

se intenta aumentar el sistema colinérgico, especialmente a expensas de la inhibición de la acetilcolinesterasa (González, 2000).

Por otra parte, las alteraciones conductuales y los trastornos psiquiátricos que estos enfermos pueden padecer exige otro tipo de intervención terapéutica que disminuya o anule tales complicaciones (González, 2000).

1.1.9.1 ANTICOLINESTERICOS

El primer inhibidor de la acetilcolinesterasa aprobado por la FDA fue el derivado acridínico Tacrina (Cognex®) en el año 1993 (Goodman & Gilman, 2001). Por su carácter hidrófobo cruza con facilidad la barrera hematoencefálica (Goodman & Gilman, 2001), para inhibir reversiblemente la acetilcolinesterasa y las butirilcolinesterasas, tanto cerebrales como plasmáticas (Florez, 1997). Además aumenta el número de receptores nicotínicos y antagoniza receptores muscarínicos M₂ que ejercen un control presináptico inhibitor sobre la liberación de acetilcolina, incrementando así el tono colinérgico residual (Florez, 1997). Su vida media de eliminación es de 3 horas, lo que obliga a administrarla cada 6 horas (Florez, 1997). Se liga a proteínas plasmáticas en un 55% y administrado por vía oral se absorbe rápidamente, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas en 1 a 2 horas (Vademécum, 2000). Los alimentos reducen su biodisponibilidad en un 30 a 40 %, razón por la cual se administra alejado de las comidas (Vademécum, 2000). Su dosis inicial es de 10 mg cuatro veces al día, esta dosis debe mantenerse por un mínimo de 6 semanas, con monitoreo semanal de los niveles de transaminasas (Vademécum, 2000). Luego se eleva la dosis a 20 mg cuatro veces al día, siempre que no haya elevaciones significativas de las transaminasas y el paciente tolere el tratamiento (Vademécum, 2000). Este fármaco ocasiona efectos adversos colinérgicos incluyendo, náuseas, vómito y

toxicidad hepática significativa (Katzung, 2005). Esta última se manifiesta por un incremento reversible en los valores de AST o ALT en el suero, aumento suficiente como para requerir la reducción o la supresión del medicamento (Katzung, 2005).

Otro inhibidor de la acetilcolinesterasa es el derivado piperídínico Donepezilo (Aricept®) utilizado desde el año 1996 (Florez, 1997). Por su carácter hidrófobo cruza con facilidad la barrera hematoencefálica (Goodman & Gilman, 2001), inhibiendo la acetilcolinesterasa de manera reversible y no competitiva, con mucha mayor afinidad por ésta que por las butilcolinesterasas (Florez, 1997). El donepezilo parece que muestra mayor actividad inhibidora que la tacrina por la acetilcolinesterasa cerebral y menor en cambio, por las de los tejidos periféricos (Florez, 1997). Es menos tóxico que la tacrina y posee una prolongada vida media de eliminación, aproximadamente 70 horas sin importar la dosis (Vademécum, 2000). El fármaco se tolera bien en dosis única diaria y no se ha observado hasta el momento signo de toxicidad hepática (Goodman & Gilman, 2001; Florez, 1997). Por lo general se proporcionan dosis de 5 mg por la noche durante cuatro a seis semanas; si esta dosis se tolera bien, es posible aumentarla a 10 mg/día (Goodman & Gilman, 2001). Se absorbe en forma rápida y completa en el tracto digestivo sin que sea afectado por la presencia de alimentos (Vademécum, 2000) y alcanza una óptima concentración sanguínea en 3-4 hrs (Florez, 1997). Esta droga se une a las proteínas plasmáticas, aproximadamente 96% (Florez, 1997). Los efectos adversos son en gran parte atribuibles a estimulación colinérgica excesiva; se informa con mayor frecuencia náusea, diarrea y vómito (Goodman & Gilman, 2001). También se encuentra el derivado de carbamato, la Rivastigmina (Exelón®) principio activo utilizado desde el año 2000 (Goodman & Gilman, 2001). Por su alta liposolubilidad cruza con facilidad la barrera hematoencefálica (Goodman & Gilman, 2001), este fármaco es de acción más prolongada, posiblemente más selectivo para el SNC (Rang, 2004). Su

absorción luego de una dosis oral es rápida y completa. Esta droga se une moderadamente a las proteínas plasmáticas, aproximadamente 40 % y su vida media plasmática es de 1 hora (Vademécum, 2000). Su dosis inicial es de 1,5 mg dos veces al día y la dosis de mantenimiento es de 1,5 mg a 8 mg repartida dos veces día, recomendándose como dosis máxima 12 mg al día (Vademécum, 2000). Sus efectos adversos comprenden náusea, diarrea, vómito e insomnio y no se relaciona con hepatotoxicidad (Goodman & Gilman 2001).

Otro inhibidor de la acetilcolinesterasa es un alcaloide natural derivado del *Galantus nivalis*. La Galantamina (Reminyl®) es un inhibidor de la acetilcolinesterasa de segunda generación (Florez, 1997), con adecuada penetración en el SNC (Katzung, 2005). La galantamina se absorbe rápida y completamente luego de la administración oral, produciéndose concentraciones máximas en 1 hora (Vademécum, 2004)². La absorción se ve retardada con los alimentos, aunque la magnitud de la absorción no se ve afectada (Vademécum, 2004)². Se une a proteínas plasmáticas alrededor de un 18% (Vademécum, 2004)² y la vida media de eliminación es de aproximadamente 6 horas (Florez, 1997). Su dosis inicial es de 4 mg vía oral dos veces al día, si la dosis es bien tolerada luego de 4 semanas se aumenta la dosis a 8 mg dos veces al día, luego de 4 semanas se puede aumentar la dosis a 12 mg dos veces al día, siendo la dosis máxima recomendada 24 mg al día (Vademécum, 2004)². Sus efectos adversos comprenden náuseas, diarrea, vómito e insomnio y no se relaciona con hepatotoxicidad (Goodman & Gilman, 2001).

1.1.9.2 ANTINFLAMATORIOS

Las drogas anti-inflamatorias no esteroideas (AINES), pueden retardar o prevenir la progresión de la enfermedad de Alzheimer disminuyendo la severidad de los síntomas cognitivos

² Vademécum 2004 Chile. www.prvademecum.com

(in t' Veld et al., 2001; Szekeley et al., 2004), al suprimir la inflamación a través de la inhibición reversible de la ciclooxigenasas, lo cual resulta en una disminución de las prostaglandinas inflamatorias (Vane, 1971). El interés de utilizar estos medicamentos de efecto anti-inflamatorio se basa, en que los cerebros que presentan la enfermedad de Alzheimer exhiben varias anormalidades patológicas, como procesos inflamatorios, además de una gliosis reactiva profusa, activación microglial y pérdida profunda de sinápsis (Pratico and Trojanowski, 2000). La indometacina, ibuprofeno y flurbiprofeno, inhibidores no selectivos de la COX (ciclooxigenasa) reducen la activación de la microglia y astrocitos por supresión de los niveles de mediadores inflamatorios tal como las prostaglandinas E₂ (Netland et al., 1998; Prosperi et al., 2004). Además evidencias sugieren que algunos anti-inflamatorios no esteroideos tales como indometacina e ibuprofeno pueden directamente o indirectamente interferir con procesos de A β fibrilación, modulando la habilidad de estos péptidos para agregarse por lo menos *in vitro* (Thomas et al., 2001). Otros medicamentos utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer tal como inhibidores de acetilcolinesterasas no presentan esta propiedad, ni tampoco los esteroides como la prednisona (Thomas et al., 2001).

1.1.9.3 ALTERNATIVAS TERAPEUTICAS DE ORIGEN NATURAL

Entre las alternativas terapéuticas de origen natural para el tratamiento de esta enfermedad se encuentra el cúrcuma, hiperforina y andrografolido.

Andrographis paniculata, es una planta de la familia *Acanthaceae*, usada en los países asiáticos para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, tales como infecciones virales y artritis reumatoidea (Wang et al., 2004). Además, se le ha atribuido actividad antialérgica, inmunoestimulante, antitrombótica, hipoglicémica, hipotensiva (Rajagopal et al., 2003) y

anticancerígena (Kumar et al., 2004). *Andrographis paniculata* es una planta anual, con ramas erectas de medio a un metro de altura, que crece abundantemente al sureste de Asia: India, Pakistan e Indonesia, pero es cultivada extensivamente en China y Tailandia (Kumar et al., 2004). Las partes aéreas de las plantas (hojas y tallos) son usadas para la extracción de los principios activos, entre los que se encuentran: diterpenoides, flavonoides y esteroides; sin embargo su principal componente son las lactonas diterpenicas, de los cuales el andrografolido es el principal (Rajagopal et al., 2003).

Se sabe que andrografolido ejerce varias acciones anti-inflamatorias, incluyendo inhibición de la expresión de molécula-1 de adhesión intracelular (Mac-1) en monocitos activado por factor de necrosis tumoral α (Habtemariam, 1998), supresión de expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en células RAW 264.7 estimuladas por lipopolisacáridos (LPS) y interferon γ (Chiou et al., 2000; Chiou et al., 1998) e inhibición de la activación de la microglia a través de la inhibición de iNOS y expresión de ciclooxigenasa-2 (Wang et al., 2004). La producción desenfrenada de NO (óxido nítrico) y ROS (especies reactivas del oxígeno), tales como peróxido de hidrógeno y anión superóxido, podría llevar a la lesión del tejido durante la inflamación (Shen et al., 2002), además son importantes metabolitos tóxicos involucrados en la muerte intracelular (Shen et al., 2002). Por ejemplo, se sabe que la producción exagerada de ROS por neutrófilos es un factor patológico importante para muchos desórdenes inflamatorios, tales como inducción isquémica y daño por reperfusión (Ferrari et al., 1991). Los mediadores pro-inflamatorios tal como Mac-1, iNOS, COX-2 son proteínas reguladas por el factor NF κ -B (Barnes and Karin, 1997), un factor de transcripción encontrado ampliamente expresado en el SNC y presente tanto en células gliales como en neuronas (Townsend and Pratico, 2005), donde puede ser un regulador positivo de los genes que producen mediadores en la respuesta de fase

aguda, incluyendo NO y citoquinas inflamatorias (Yoshiyama et al., 2001). Resultados *in vitro* muestran que diferentes estímulos patogénicos pueden activar este factor, incluyendo el péptido A β (Townsend and Pratico, 2005) y diferentes anti-inflamatorios no esteroideos pueden prevenir directamente su activación con la consecuente reducción de la respuesta inflamatoria (Townsend and Pratico, 2005). Recientemente se ha encontrado que andrografolido inhibe la unión NF κ -B al DNA y por lo tanto reduce la expresión de proteínas pro-inflamatorias, tales como Mac-1, iNOS, COX-2 (Hidalgo et al., 2005).

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El péptido A β en sus formas multiméricas y poliméricas promueve efectos tóxicos para las neuronas mediante varios mecanismos; como la formación de radicales libres, alteración de los niveles de calcio y activación de vías inflamatorias ej. microglia. Se sabe que andrografolido tiene un efecto antioxidante y varias propiedades anti-inflamatorias, tales como inhibición de la expresión iNOS, inhibición de la activación de la microglia a través de inhibición de iNOS y expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) e inhibición de NF κ -B al DNA. Por lo tanto, andrografolido podría ser capaz de reducir las especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico que están asociadas a la formación de placas seniles y muerte neuronal, además de evitar todo un proceso inflamatorio al reducir la expresión de proteínas pro-inflamatorias tales como iNOS y COX-2 que podrían influenciar en la amiloidosis.

Por tal razón resulta interesante investigar el posible efecto de andrografolido sobre la agregación y desagregación de β -amiloide fibrilar *in vitro*.

1.3 HIPÓTESIS

El andrografolido inhibe la agregación y/o induce la desagregación de las fibras amiloides, *in vitro*.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

La presente investigación tiene como objetivo general:

Determinar el efecto de andrografolido en la agregación y desagregación de A β fibrilar *in vitro*.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para lograr el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el efecto de andrografolido sobre la agregación de A β . Estudios en el tiempo.
2. Determinar el efecto de andrografolido sobre la desagregación de A β . Estudios a diferentes concentraciones del compuesto.
3. Efecto de andrografolido en cultivo primario de neuronas corticales en presencia de A β agregado.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 REACTIVOS QUÍMICOS.

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- Péptido A β 1-40 PM 4329,9 grs/mol de Laboratorio Biochem.
- Andrografolido (98%) PM 350,46 grs/mol de Laboratorio Aldrich.
- Dimetilsulfóxido PM 78,13 grs/mol, Buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2, NaOH 1,05 M, HCl 1 M, Persulfato 1%, Glicina, Buffer muestra, Glicerol 25%, azul bromofenol 0,025%, carbón activado, Paraformaldehído, Triton X-100 al 3% de Laboratorio Merck.
- Tioflavina T PM 318,9 grs/mol de Laboratorio Calbiochem®.
- Acrilamida de Laboratorio Invitrogen.
- Temed, Tripsina 0,25% en PBS, Medio Eagle, MEM, Medio neurobasal, Suplemento B27, Glutamina 2 mM del Laboratorio GIBCO BRL.
- Bisacrilamida, estándar de peso molecular preteñido para geles de poliacrilamida-SDS, Tris/HCl pH 6,8, Tris/HCl pH 8,8, Buffer corrida, Tris 0,1 M, SDS 0,4%, SDS 5%, Reactivo para teñir geles, azul de coomassie, ácido acético glacial del Laboratorio Winkler Ltda (W&Z).
- Medio de montaje acuoso de Laboratorios DAKO.
- SBF 10% de laboratorio Hyclone.
- Inhibidor mitótico, anti-MAP-2, anti-tubulina tirosinada del Laboratorio Sigma.

Se usaron ratones de la cepa Rockefeller provenientes del vivero del instituto de inmunología de la Universidad Austral de Chile.

El equipo utilizado fue el siguiente: Balanza analítica Scientich SA 120 d=0,0001 g, Eppendorf (microtubos de centrífuga) 1,5 ml, Espectrofotometro UV-120-12 Shimadzu, Cubetas

de cuarzo 10 mm tipo18 Starna®, Agitador Orbital Gemmy modelo VRN 480, Pipetas, Tubo de centrifuga Falcon, Fluorimetro Spectrometer Luminescence Perkin Elmer LS 55, Cubetas de cuarzo 10 mm Hellma®, Cámara de electroforesis mini-PROTEAM® 3 Bio-RAD, Centrifuga Zentrifugen Hettich Mikro 22R, Placas, Cover, Cámara húmeda, Microscopio de fluorescencia Zeiss axioskop 2.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 PREPARACIÓN PÉPTIDO β -AMILOIDE SINTETICO ($A\beta$)

El péptido $A\beta$ 1-40 correspondiente a la secuencia humana, fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración patrón de 2,31 mM, para lo cual se disolvieron 5 mg de $A\beta$ 1-40 en 500 ml de DMSO, se alícuoto en 35 μ l cada tubo y se guardo a -20°C .

2.2.2 PREPARACIÓN DE ANDROGRAFOLIDO (AP)

El andrografolido, fue disuelto en DMSO a una concentración de 50 mM y se almacenó a -20°C , para ello se disolvieron 17,52 mg de AP en 1 ml de DMSO y se guardó a -20°C . Posteriormente se diluyo 10 veces el AP, para lo cual se tomó 50 μ l de la solución 50 mM y se agregó 450 μ l de DMSO, obteniéndose así una solución patrón de 5 mM.

2.2.3 ENSAYOS DE AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO $A\beta$ MEDIANTE ANÁLISIS DE TURBIDIMETRÍA

El ensayo de agregación se realizó según la descripción de Lansbury y col (Evans et al., 1995). La mezcla de la reacción contenía al péptido $A\beta$ en ausencia y presencia de andrografolido, además de un tampón fosfato salino (PBS) (anexo 6.3.1) a pH 7,2. Para el tubo

control se tomó 16,3 μl de la solución stock de $\text{A}\beta$ (2,31 mM) y se agregó 483,7 μl de PBS para obtener 500 μl de solución, en donde la concentración de $\text{A}\beta$ fue 75 μM . Para el tubo con AP se tomó 16,3 μl de la solución stock de $\text{A}\beta$ (2,31 mM), 5 μl de la solución stock AP (5 mM) y se agregó 478,7 μl de PBS para obtener 500 μl de solución, en donde la concentración de $\text{A}\beta$ fue 75 μM y la concentración de AP fue de 50 μM , luego se agregó a ambos tubos 5 μl de NaOH (1,05 M) para producir el shock básico e inmediatamente se agregó 7 μl HCl (1 M) para neutralizar y llevar a pH 7,2. El seguimiento del proceso de agregación se realizó por turbidimetría en un espectrofotómetro a 405 nm contra un blanco constituido por PBS y se midió la absorbancia cada 10 minutos durante 1 hora y luego se midió cada 15 minutos hasta completar 5 hrs de agregación, para ello las muestras fueron agitadas de manera continua en agitador orbital a 200-215 rpm, a temperatura ambiente.

2.2.4 ANÁLISIS DEL PÉPTIDO $\text{A}\beta$ MEDIANTE SDS-PAGE

El péptido $\text{A}\beta_{1-40}$ se resolvió usando SDS-PAGE tris-glicina al 15% (Schagger and von Jagow, 1987). Las muestras fueron analizadas después de los ensayos de agregación. Para ello se preparó el sistema de electroforesis y el gel separador (anexo 6.3.4). Luego, se preparó el gel espaciador (anexo 6.3.5) agregándolo sobre el primero y colocando inmediatamente la peineta que forman los pocillos. Una vez gelificado, se instaló el gel en el sistema de electroforesis, llenando la cámara con buffer de corrida 1X (anexo 6.3.2). Se cargaron las muestras teniendo cuidado que no salgan del pocillo y se conectó el sistema de electroforesis a la fuente de poder (Posser PAC 300) a 90 V por el tiempo necesario. Previamente las muestras que contenían el péptido $\text{A}\beta$ en ausencia y en presencia de AP fueron centrifugadas por 15 minutos a 14000 rpm y posteriormente fueron preparadas y cargadas de la siguiente manera:

Péptido A β : 10 μ l de pellet + 2,5 μ l de buffer muestra (anexo 6.3.3).

Péptido A β : 10 μ l de sobrenadante + 2,5 μ l de buffer muestra.

Péptido A β +AP: 10 μ l de pellet + 2,5 μ l de buffer muestra.

Péptido A β +AP: 10 μ l de sobrenadante + 2,5 μ l de buffer muestra.

Luego se sacaron los geles del sistema y se tiñeron con solución de tñido (anexo 6.3.6), mínimo 3 hrs. Posteriormente transcurrido el tiempo mínimo, se destiñeron los geles y se escanearon.

2.2.5 ENSAYOS DE DESAGREGACIÓN DE PÉPTIDO A β MEDIANTE ANÁLISIS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA BASADA EN ThT

Para la formación de las fibras amiloides el péptido A β ₁₋₄₀ fue agitado constantemente en agitador orbital entre 200-215 rpm a temperatura ambiente durante 24 hrs. Para ello se prepararon 2 tubos a cada uno se agregó 16,3 μ l de la solución stock de A β (2,31 mM) y se agregó 233,7 μ l de PBS para obtener 250 μ l de solución, en donde la concentración de A β fue 150 μ M. Luego se agregó 5 μ l de NaOH (1,05 M) para producir el shock básico e inmediatamente se agregó 7 μ l HCl (1 M) para neutralizar y llevar a pH 7,2. Después de transcurrido el tiempo para la formación de fibras (24 hrs), un tubo quedo como control y al otro se le agregó 2,5 μ l de la solución stock de AP (5 mM) para obtener una concentración de 50 μ M de AP y se incubo por 3 días (72 hrs). Transcurrido este tiempo se agregó tioflavina T (ThT) cuya concentración en la solución total es 10 μ M, este es un compuesto altamente afin a los agregados amiloidogénicos. Luego se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos y posteriormente el pellet, tanto del control como el que contiene AP se colocaron en un porta objeto de manera separada y se llevaron a la estufa por 20

minutos para fijar la muestra. Finalmente se montó con 1-2 μl de medio de montaje acuoso DAKO para observar bajo el microscopio de fluorescencia.

2.2.6 ENSAYOS DE DESAGREGACIÓN DE PÉPTIDO A β MEDIANTE ANÁLISIS DE FLUORIMETRÍA BASADA EN ThT

El péptido A β ₁₋₄₀ en tampón PBS a pH 7,2 es agitado constantemente para la formación de las fibras amiloides en un agitador orbital entre 200-215 rpm a temperatura ambiente, para ello se preparó 1 tubo al que se agregó 65 μl de la solución stock de A β (2,31 mM) y 935 μl de PBS para obtener 1 ml de solución, en donde la concentración de A β fue 150 μM . Luego se agregó 5 μl de NaOH (1,05 M) para producir el shock básico e inmediatamente se agregó 7 μl HCl (1 M) para neutralizar y llevar a pH 7,2; posteriormente se dejó agregar por 24 hrs en el agitador. Después de transcurridas las primeras 24 hrs, se obtuvieron 4 tubos de 250 μl cada uno. De los cuales uno se mantuvo como control y el resto de los tubos fueron incubados con andrografolido a distintas concentraciones 10 μM , 50 μM , 100 μM . Posteriormente se tomaron 50 μl de cada tubo, rotulando correctamente y se procedió a agregar 949 μl de PBS y 1 μl de tioflavina T (ThT), cuya concentración en la solución total fue 10 μM . Luego se midió la fluorescencia en un espectrofotómetro de luminiscencia, que correspondió al día 1°. Después de transcurridas las siguientes 24 hrs (día 2°), se realizó el mismo procedimiento anterior con el resto de la solución que continuó en agregación, control y en desagregación, los tubos con distintas concentraciones de AP, y así sucesivamente hasta completar 3 días (72 hrs) posteriores al día 1°. Estas mediciones se realizaron a distintos tiempos para observar los posibles cambios en la concentración de las fibras, lo cual se determinó semi-cuantitativamente por fluorescencia de ThT. La ThT se une específicamente al amiloide lo cual provoca un cambio en el espectro de emisión y aumenta la

señal fluorescente de forma proporcional a la cantidad de amiloide formado. La fluorescencia fue monitoreada por excitación a 437 nm y emisión a 485 nm (Inestrosa y col 1996).

2.2.7 ENSAYOS DE TOXICIDAD EN CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS

Los cultivos primarios de células de corteza fueron preparados a partir de 10 embriones de ratones Rockefeller de 16 días (Alvarez et al., 1999), se colocaron en solución salina balanceada Hank suplementada con 10 mM HEPES (pH 7,4), 50 mg/ml estreptomicina, 50 U/ml penicilina y 0,5% glucosa (HBSS). El tejido se lavó dos veces por decantación en HBSS (anexo 6.1.1) y luego fue incubado por 15 minutos en 0,25% de tripsina a 37°C. El tejido se lavó posteriormente con medio mínimo Eagle suplementado con 10% FBS (MEM-10) y fue disociado por trituración. Las células fueron sembradas en placas recubiertas con poli-lisina en medio MEM-10, con 50 mg/ml estreptomicina, 50 U/ml penicilina y 2 mM de L-glutamina. Luego se cambió el medio por Neurobasal suplementado con B27, 2 mM L-glutamina, 50 U/ml penicilina y 50 mg/ml estreptomicina. Las células corticales se mantuvieron a 37°C con 5% CO₂.

Los cultivos de neuronas de ratones crecieron en placas recubiertas con poli-lisina por 4 días para una inspección visual de ensayos de toxicidad, después de transcurridos los días se agregó en placa control: 66 µl de PBS, en placa Aβ: 66 µl de Aβ (10 µM), en placa Aβ + AP: 66 µl de Aβ (10 µM) + AP (50 µM). Se dejó reposar 24 hrs y luego los cultivos fueron lavados rápidamente 2 veces con PBS y fijados con paraformaldehído al 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego los cultivos fueron lavados 2 veces con PBS, para posteriormente ser bloqueados con BSA, leche descremada triton en PBS (anexo 6.2.1) por media hora a temperatura ambiente, así los sitios de unión inespecíficos son bloqueados. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS y se agregó el 1° anticuerpo (dilución 1/100) y se dejó incubando en cámara

húmeda toda la noche a 4°C con anti-tubulina tirosinada y anti-MAP-2. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS por 10 minutos cada vez y luego se colocó el segundo anticuerpo en forma correspondiente Mouse-FITC (verde), Mouse-TRITC (rojo), se dejó incubando en cámara húmeda mínimo 2 hrs a 4°C, posteriormente se lavó nuevamente 3 veces con PBS por 10 minutos cada vez. Finalmente se montó con 1-2 μ l por placa de medio de montaje acuoso DAKO y fue observado bajo el microscopio de fluorescencia Zeiss axioskop 2.

2.2.8 ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL LARGO DE LOS PROCESOS NEURONALES EN CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS

Las fotos de células neuronales obtenidas en el punto 2.2.7 con el microscopio de fluorescencia, fueron analizadas cuantitativamente con respecto al largo de los procesos neuronales. Para ello se realizaron 50 mediciones independientes de cada experimento. Todas las fotos fueron tomadas con la misma amplificación (250X).

2.2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los gráficos presentados se realizaron en el programa GRAPH PAD PRISM 3.0, usándose gráficos de barra y de puntos. Cada barra o punto corresponde al promedio aritmético de los valores obtenidos \pm error estándar.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Andrografolido inhibe la agregación del péptido amiloide

Los efectos de andrografolido en la agregación del péptido A β fueron evaluados primeramente por ensayos de turbidimetría como se describe en material y métodos (Fig. 1). El péptido amiloide fue incubado a temperatura ambiente por un rango de tiempo que varió de 0 a 5 hrs. En este ensayo cinético después de 300 minutos de agitación constante, el péptido A β mostró una curva sigmoidea típica con una fase de latencia cerca de 55 minutos. Esta curva concuerda con el modelo de polimerización dependiente de nucleación (Naiki et al., 1997). Al incubar el péptido A β con andrografolido se vio un incremento en la fase de latencia cerca de 90 minutos, además el incremento posterior fue muy lento.

Estos resultados sugieren que la presencia de andrografolido inhibe considerablemente el evento de nucleación y agregación característico del péptido A β ₁₋₄₀ *in vitro*.

Para comprobar los efectos de andrografolido en la agregación del péptido A β ₁₋₄₀, los productos agregados en ausencia y presencia de andrografolido con agitación continua durante 24 hrs, a temperatura ambiente son centrifugados durante 15 minutos a 14000 rpm para separar la parte soluble de la fracción insoluble. Cada fracción fue evaluada por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE) de tris-glicina al 15%, teñidos con Azul de Coomassie (Fig. 2). En el caso de A β polimerizado en ausencia de andrografolido, se observa claramente una mayor cantidad de la fracción insoluble o agregada en el pellet, sin embargo, cuando el péptido A β fue polimerizado en presencia de andrografolido, se observó una menor cantidad de la fracción insoluble en el pellet.

Este resultado corrobora lo observado en la Fig. 1, sugiriendo que andrografolido disminuye considerablemente la agregación del péptido amiloide.

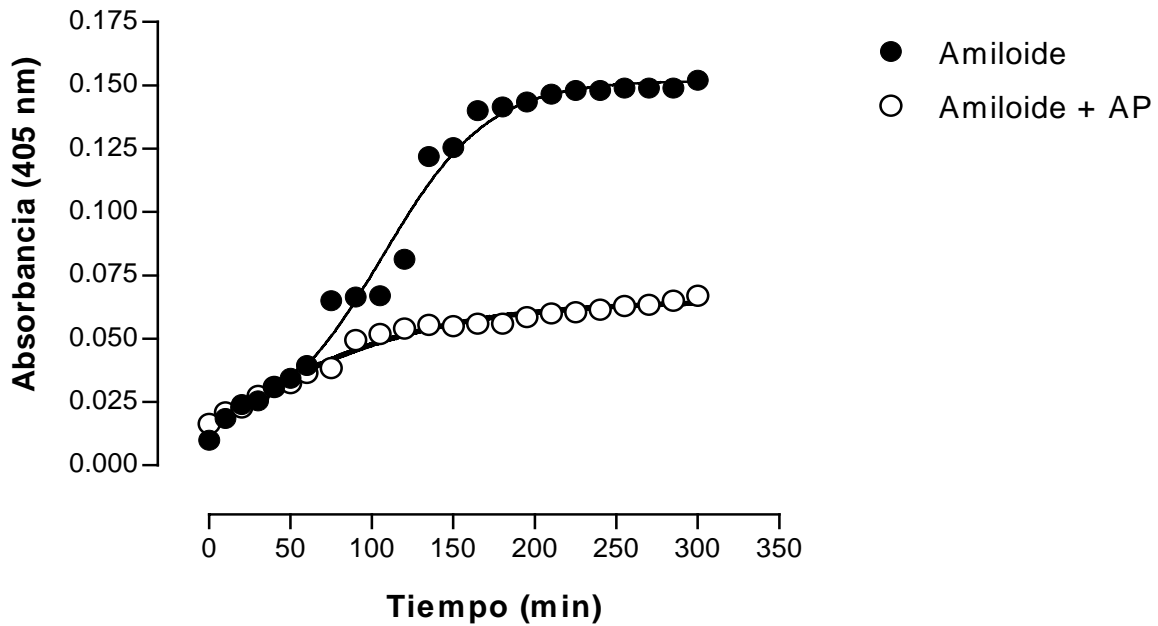


Figura 1. Efecto de andrografolido en la agregación del péptido β-amiloide analizado mediante Turbidimetría.

La agregación del péptido $A\beta_{1-40}$ se midió por turbidimetría a 405 nm. La figura muestra la cinética de agregación de 75 μM de $A\beta_{1-40}$ en ausencia (●) o en presencia de andrografolido 50 μM (○) incubado bajo agitación continua por 5 hrs. En todos los casos se realizó un shock básico, agregando NaOH 1,05 M y luego se ajustó pH a 7,2 con HCl 1 M para inducir la agregación. (Experimento en duplicado).

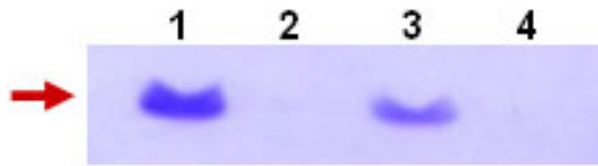


Figura 2. Efecto de andrografolido sobre la agregación del péptido β -amiloide analizado mediante SDS-PAGE tris-glicina 15%.

Se evaluó la agregación del péptido $A\beta_{1-40}$ por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE) de tris-glicina al 15%. La flecha indica incubación 75 μ M de $A\beta_{1-40}$ en ausencia (**carriles 1 y 2**) o en presencia de andrografolido 50 μ M (**carriles 3 y 4**) bajo agitación continúa por 24 hrs. **Carril 1:** Fracción insoluble del péptido agregado. **Carril 2:** Fracción soluble del péptido agregado. **Carril 3:** Fracción insoluble del péptido agregado. **Carril 4:** Fracción soluble de péptido agregado. Gel representativo de tres experimentos independientes.

3.2 Andrografolido causa la depolimerización de fibras amiloides

Para llevar a cabo este objetivo se agregó péptido amiloide por 24 hrs a temperatura ambiente con agitación continua. Finalizada la agregación se incubó este péptido agregado en ausencia o presencia de andrografolido (50 μM) por 3 días. Posteriormente mediante microscopia de fluorescencia utilizando tioflavina T (ThT) (10 μM), un compuesto altamente afin a los agregados amiloidogénicos (Fig. 3) se pudo observar claramente una mayor cantidad de $\text{A}\beta_{1-40}$ agregado en ausencia de andrografolido (Fig. 3A). Sin embargo, en presencia de andrografolido (Fig. 3B) se puede observar que son casi inexistentes los agregados de gran tamaño del péptido amiloide. Este resultado sugiere que andrografolido tiene un efecto considerable en la desagregación del péptido amiloide.

Para ratificar el efecto de andrografolido en la desagregación de las fibras, se observó la depolimerización mediante ensayos de fluorimetría con tioflavina T (10 μM), un compuesto que se une específicamente a las fibras amiloides y cuya fluorescencia es directamente proporcional a la agregación del péptido amiloide. Previo a los experimentos, se agregó péptido amiloide (150 μM) por 24 hrs a temperatura ambiente con agitación continua y posteriormente las fibras preformadas fueron incubadas con diferentes concentraciones de andrografolido (Fig. 4). La figura muestra que hay una disminución de la fluorescencia en el caso de la adición de andrografolido 50 μM y 10 μM , lo que nos indica la disminución del péptido en estado agregado. Sin embargo, altas concentraciones de andrografolido (100 μM) no muestran una disminución significativa de la fluorescencia. Lo que sugiere que habría un efecto diferencial dependiendo de la concentración de andrografolido utilizado.

Este resultado corrobora lo observado en la Fig. 3, sugiriendo que andrografolido tiene un efecto en la desagregación del péptido amiloide.

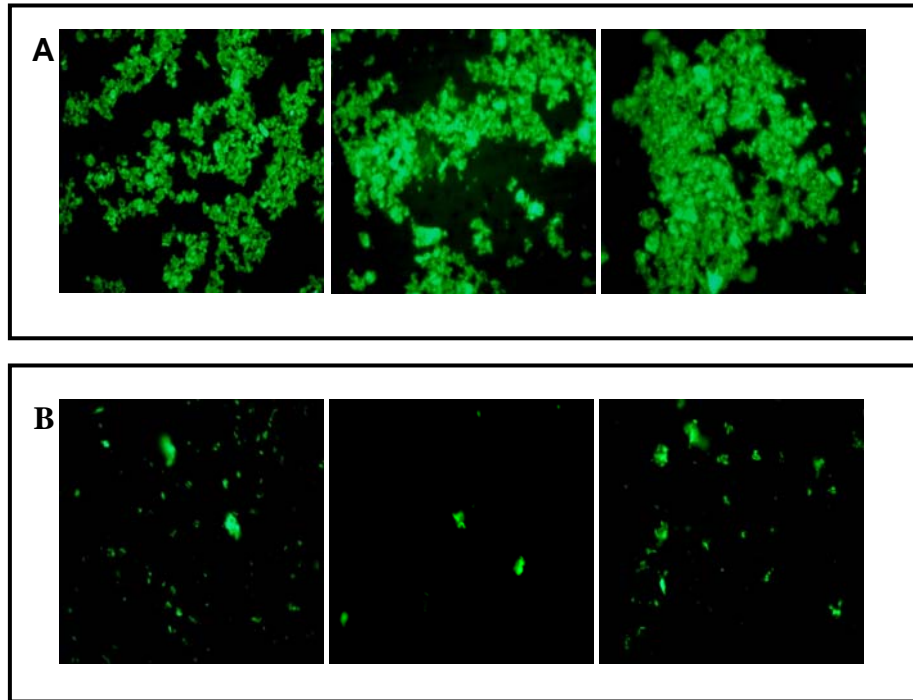


Figura 3. Efecto de andrografolido sobre la depolimerización de fibras amiloides analizado mediante Microscopía de fluorescencia basado en ThT

Se agregó 150 μM de $\text{A}\beta$ por 24 hrs, luego este péptido agregado fue incubado en ausencia (panel A) o presencia (panel B) de 50 μM de andrografolido, posteriormente los agregados se observaron mediante microscopia de fluorescencia, utilizando 10 μM de tioflavina T (ThT). (Fotos representativas de tres experimentos independientes).

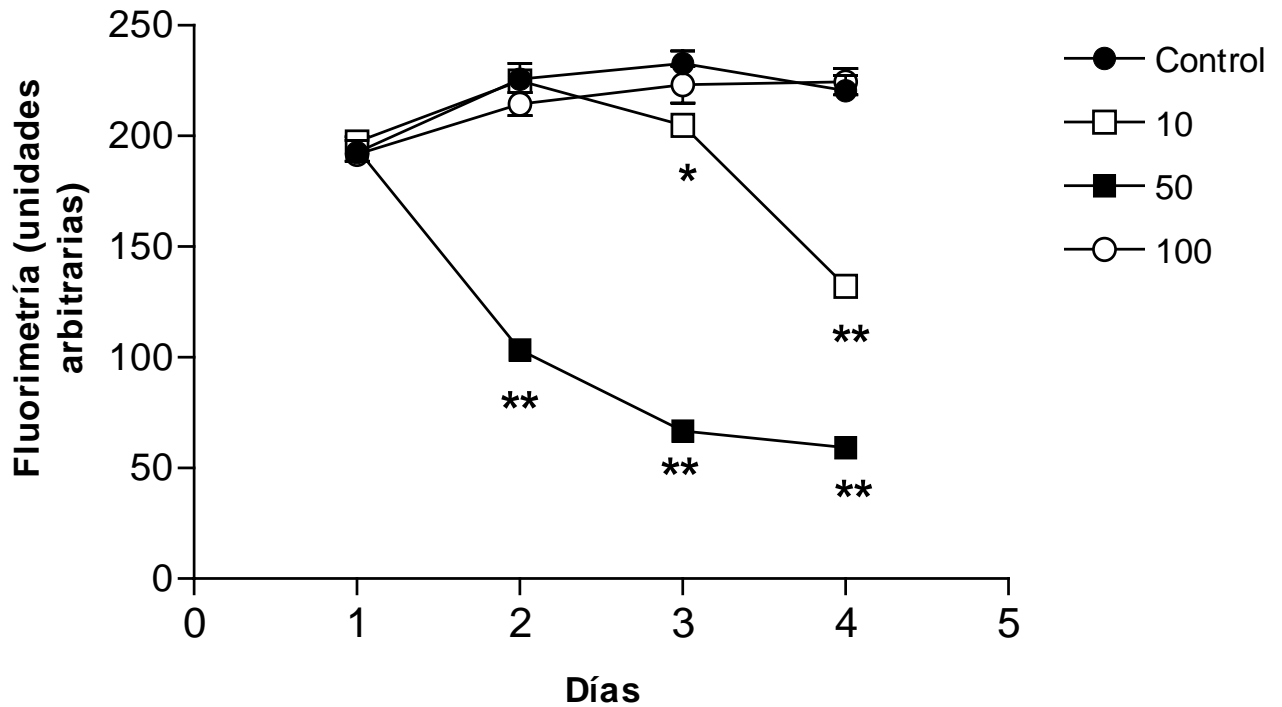


Figura 4. Efecto de andrografolido sobre la depolimerización de fibras amiloides analizado mediante Fluorimetría basado en ThT

La cinética de desagregación de fibras $A\beta_{1-40}$ fue seguida en un espectrofluorímetro por fluorescencia del compuesto tioflavina T (ThT) bajo agitación constante por 4 días. La figura muestra las diferentes concentraciones de andrografolido utilizadas en los ensayos: 0 μM (●, control), 10 μM (□), 50 μM (■), 100 μM (○). El control representa 150 μM $A\beta$ en ausencia de andrografolido. En todos los casos se realizó un shock básico, agregando NaOH 1,05 M y luego se ajustó PH a 7,2 con HCl 1 M, para favorecer la agregación del péptido $A\beta_{1-40}$. Cada punto del gráfico representa el promedio aritmético y error estándar de tres experimentos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.3 Andrografolido reduce la neurotoxicidad de A β *in vitro*

También se observó el efecto de andrografolido como neuroprotector de la toxicidad de A β *in vitro*. Para llevar a cabo este objetivo se utilizó, cultivos primarios de células de corteza de ratones Rockefeller de 16 días que fueron cultivadas por 4 días y luego tratadas con el producto final de ensayos de agregación de A β 10 μ M en ausencia y presencia de andrografolido 50 μ M por 24 hrs. Luego los cultivos fueron fijados y analizados mediante inmunofluorescencia.

Para analizar el efecto de andrografolido en cultivos primarios en presencia de A β se utilizaron anticuerpos anti- tubulina tirosinada (Fig. 5A) con lo cual se pudo observar la elongación y el mantenimiento de los procesos neuronales (Rapoport et al., 2002). Se pudo observar que A β causa un severo daño en las neuronas, pues sus elongaciones son mas cortas y hay una pérdida de la morfología clásica de las neuronas, comparado con el control, al mismo tiempo en las células tratadas con andrografolido se observa un mayor mantenimiento de la morfología neuronal y elongaciones más extensas.

También se encontró una degeneración severa al utilizar anti-MAP-2, un marcador específico de células neuronales (Fig. 5B), en células tratadas con A β , lo cual se puede observar a través de la formación de procesos tortuosos, la presencia de varicosidades a lo largo de las prolongaciones neuronales y la retracción de procesos neuronales (Ferreira et al., 1997; Rapoport et al., 2000), en comparación con las células controles no tratadas, al mismo tiempo se puede observar un efecto neuroprotector, al verse disminuidas estas características al utilizar andrografolido.

Para ratificar el efecto de andrografolido como neuroprotector de la toxicidad de A β *in vitro*, se realizó un análisis cuantitativo del largo de los procesos neuronales (Fig. 6) y se pudo observar que andrografolido en presencia de A β mantiene la longitud de los procesos neuronales casi de manera similar al control. En ausencia de andrografolido hay claramente una disminución de la longitud de los procesos neuronales por la acción tóxica del péptido A β .

Este resultado corrobora lo observado en la Fig. 4, sugiriendo que andrografolido tiene un efecto neuroprotector frente a la toxicidad de A β .

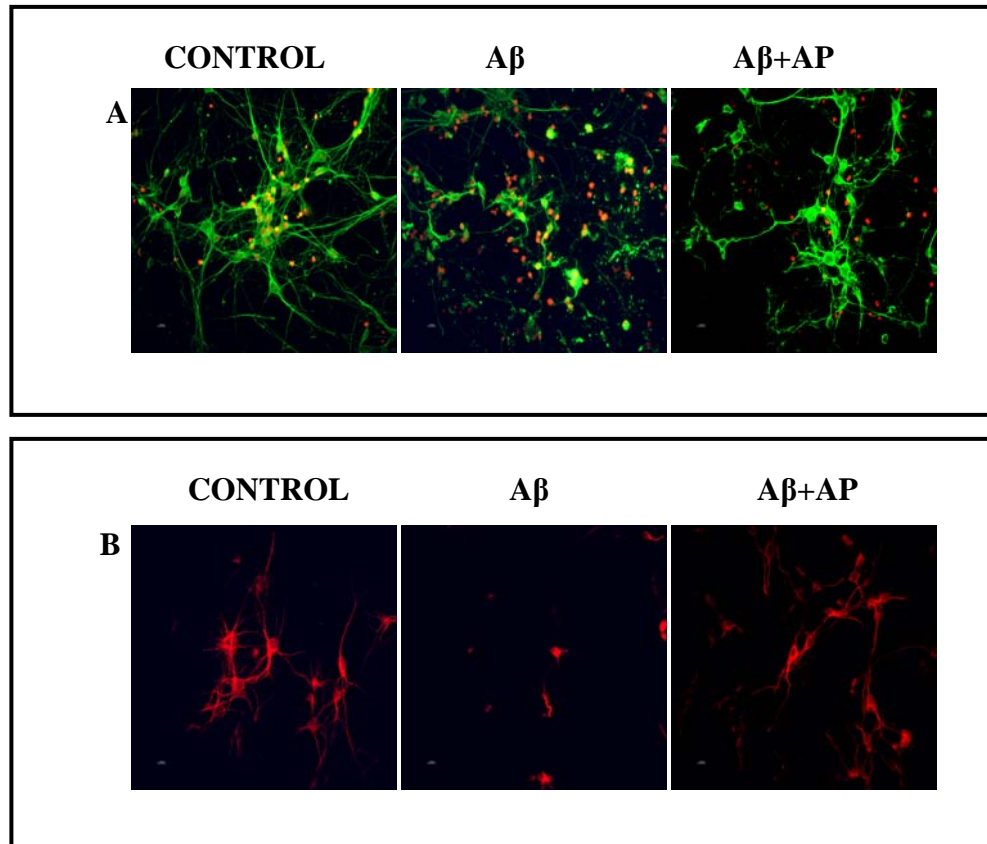


Figura 5. Efecto de andrografolido frente a la neurotoxicidad de A β *in vitro* en cultivo primario analizado por inmunofluorescencia

Cultivo primario de células de corteza fueron tratadas con el producto final de ensayos de agregación de A β 10 μ M en ausencia y presencia de andrografolido 50 μ M por 24 hrs. Las inmunofluorescencias muestran células de cultivo primario de corteza incubadas con anticuerpos anti-tubulina tirosinada (A) y anti-MAP2, un marcador específico de neuronas (B). (Fotos representativas de tres experimentos independientes con amplificación 250X).

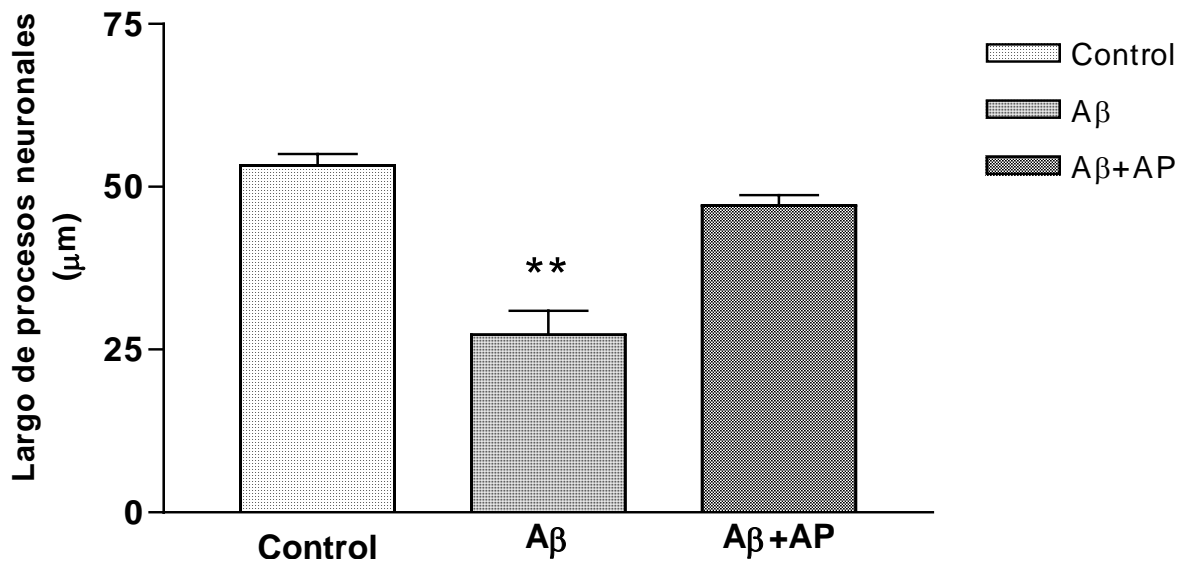


Figura 6. Andrografolido exhibe efecto neuroprotector frente a la toxicidad de A β *in vitro* en cultivo primario analizado por mediciones del largo de los procesos neuronales

Células neuronales de corteza tratadas con A β 10 μ M en ausencia y presencia de andrografolido 50 μ M fueron analizadas cuantitativamente con respecto al largo de los procesos neuronales. Cada barra del gráfico representa el promedio aritmético y el error estándar de 50 mediciones independientes. (** P< 0.01).

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

4.1 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se pudo demostrar que el compuesto andrografolido, es capaz de inhibir la agregación del péptido A β en fibras amiloides. La inhibición de la formación de fibras amiloides, refleja una alteración en el equilibrio entre monómero, oligomero y fibras. (Walsh et al., 1997). La capacidad de A β para unirse a sí mismo y promover un cambio conformacional que produce nucleación y formación de fibras, sugiere que existen sitios obligatorios para la polimerización de A β . Así una molécula que interactúe con este sitio puede interferir en la fibrilogenesis de A β y por ello actuar como un inhibidor de este proceso. Algunos ejemplos son el rojo congo y las tetraciclinas que tienen actividad anti-amiloidogénica e interrumpen la formación de fibras, lo que las relaciona con la propensión para unirse a sitios específicos de A β (Forloni et al., 2001; Lorenzo and Yankner, 1994; Pappolla et al., 1998; Soto et al., 1998). En la presencia de un inhibidor, la nucleación se retrasa y la cantidad final de amiloide observado puede reducirse, por lo tanto, potentes inhibidores podrían retrasar la nucleación indefinidamente.

Solo se conocen algunos aspectos sobre el mecanismo de acción de andrografolido, pero este parece ser lo suficientemente hidrófobo para interferir con interacciones importantes en la formación de fibras amiloides. Es así como en este trabajo se comprobó por medio de ensayos de turbidimetría que andrografolido interfiere con procesos de polimerización previniendo la formación de fibras amiloides (Fig. 1). Se pudo observar que el péptido A β en ausencia de andrografolido mostró una curva sigmoidea típica con una fase de latencia cerca de 55 minutos. Esta curva concuerda con el modelo de polimerización dependiente de nucleación (Naiki et al., 1997). Al incubar el péptido A β con andrografolido se vio un incremento en la fase de latencia

cerca de 90 minutos, además el incremento posterior fue muy lento. Lo que sugiere que andrografolido puede interactuar directamente con el péptido amiloide, de manera similar al compuesto rojo congo y las tetraciclinas que tienen actividad anti-amiloidogénica e interrumpen la formación de fibras amiloides. Para comprobar los efectos de andrografolido en la agregación del péptido A β ₁₋₄₀, los productos agregados en ausencia y presencia de andrografolido fueron evaluados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE) (Fig. 2). Se demostró claramente una mayor cantidad de la fracción insoluble o agregada en el pellet, cuando el péptido A β fue polimerizado en ausencia de andrografolido. Sin embargo, en presencia de andrografolido, se observó una menor cantidad de la fracción insoluble en el pellet. Es así, como estos resultados sugieren que la presencia de andrografolido inhibe considerablemente el evento de nucleación y agregación característico del péptido A β ₁₋₄₀ *in vitro*, apoyando la hipótesis planteada.

Además, en esta investigación se demostró que andrografolido causa la desagregación de fibras amiloides preformadas. La desagregación de estas fibras amiloides se analizó mediante microscopia de fluorescencia utilizando tioflavina T (ThT), un compuesto altamente afin a los agregados amiloidogénicos (Fig. 3) (LeVine.,1993). Se demostró claramente que andrografolido induce la desagregación de fibras amiloides, pues se observó una mayor cantidad de A β ₁₋₄₀ agregado en ausencia de andrografolido. Sin embargo, en presencia de andrografolido se observó que los agregados A β ₁₋₄₀ de gran tamaño son casi inexistentes, lo que sugiere que andrografolido tiene un efecto considerable en la desagregación del péptido β -amiloide. Estos resultados fueron confirmados mediante ensayos de fluorimetría con tioflavina T (ThT), un compuesto que se une específicamente a las fibras amiloides y cuya fluorescencia es directamente proporcional a la

agregación del péptido amiloide (Fig. 4). En este ensayo se pudo observar que después de la adición de andrografolido 50 μM hay una disminución de fluorescencia a partir del segundo día, lo que sugiere la disminución del péptido en estado agregado, siendo esta desagregación estadísticamente significativa a lo largo del tiempo con respecto al control. Hay que destacar que a bajas concentraciones de andrografolido (10 μM) se pudo observar una disminución gradual de la fluorescencia, lo que sugiere que hay una desagregación. Sin embargo, este proceso a estas concentraciones es más lento, siendo esta desagregación estadísticamente significativa a partir del tercer día. Lo cual sugiere que habría un efecto diferencial dependiendo de la concentración de andrografolido utilizado. Por otra parte, a altas concentraciones de andrografolido (100 μM) no se observó una disminución significativa de la fluorescencia, lo que sugiere que hubo un proceso de nucleación del andrografolido y posterior cristalización, bajando al mínimo la concentración de éste fármaco en la solución, por lo cual no se observó ningún efecto sobre la fluorescencia a esta concentración. Por lo tanto, se podría sugerir que los procesos son tiempo y concentración dependientes de andrografolido. Además, se podría asumir que las fibras amiloides son inestables en la presencia de este compuesto (Fig. 4). Estos resultados, apoyan la hipótesis que andrografolido causa desagregación de las fibras amiloides *in vitro*.

Por otra parte, se sabe que andrografolido tiene propiedades antioxidantes (Choudhury and Poddar, 1984; Shen et al., 2000) y propiedades anti-inflamatorias (Shen et al., 2002). Andrografolido inhibe la expresión de proteínas pro-inflamatorias tales como molécula-1 de adhesión intracelular (Mac-1) en monocitos activado por factor de necrosis tumoral α (Habtemariam., 1998), supresión de expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Chiou et al., 2000; Chiou et al., 1998) e inhibición de la activación de la microglia a través de la

inhibición de iNOS y expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Wang et al., 2004). Además, se sabe que estas proteínas pro-inflamatorias son proteínas reguladas por el factor NFκ-B (Hidalgo et al., 2005; Roebuck and Finnegan, 1999). Datos *in vitro* muestran que diferentes estímulos patogénicos pueden activar el factor NFκ-B, incluyendo el péptido Aβ (Townsend and Pratico, 2005). Recientemente se ha encontrado que andrografolido inhibe la unión NFκ-B al DNA y por lo tanto reduce la expresión de proteínas pro-inflamatorias, tales como Mac-1, iNOS, COX-2 (Hidalgo et al., 2005). La inhibición de COX-2, resulta en una disminución de las prostaglandinas inflamatorias (Vane, 1971). Se sabe que, incubaciones *in vitro* del péptido Aβ con prostaglandinas mejora la oligomerización del péptido Aβ (Boutaud et al., 2002), por lo tanto la prevención de síntesis de prostaglandinas, podría resultar en una menor formación de fibras amiloides.

Por otro lado, se sabe que la acción neurotóxica y pro-inflamatoria del péptido Aβ depende de la conformación hoja beta y de su agregación (Thomas et al., 2001). Además, también se conoce que el mecanismo de neurotoxicidad inducida por Aβ refuerza el estrés oxidativo e incrementa la vulnerabilidad neuronal y la probabilidad de muerte celular apoptótica, al aumentar la expresión de proteínas pro-apoptóticas, como caspasa 3 (Lee et al., 2005). Las especies reactivas del oxígeno, tales como superóxido y peróxido de hidrógeno activan el factor NFκ-B por liberación de IκB-α citoplasmático. Varios trabajos han demostrado que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos patogénicos más importantes en la enfermedad de Alzheimer (Mark.,1996; Good.,1996). Por lo tanto, moléculas que sean capaces de interferir con procesos de Aβ fibrilación y de atenuar o inhibir las especies reactivas del oxígeno pueden impedir el desarrollo y progreso de la enfermedad.

Por lo tanto, es posible sugerir que andrografolido por su efecto antioxidante y propiedades anti-inflamatorias podría ser capaz de reducir la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) que están asociados a la formación de placas seniles y muerte neuronal, pues A β promueve la formación especies reactivas del oxígeno (Shearman et al., 1994). Al mismo tiempo, andrografolido al inhibir la unión de NF κ -B al DNA reduce la expresión de proteínas pro-inflamatorias, tales como Mac-1, iNOS, COX-2, las cuales indirectamente podrían influenciar en la amiloidosis, ya que cerebros que presentan la patología de enfermedad de Alzheimer exhiben activación microglial y procesos crónicos inflamatorios que contribuyen a un prolongado curso degenerativo (Townsend and Pratico, 2005). El posible mecanismo de acción de andrografolido se podría basar en que, éste sería capaz de interferir con los procesos de A β fibrilación, causar depolimerización de las fibras amiloides, reducir la producción de especies reactivas del oxígeno e inhibir la unión de NF κ -B al DNA y por lo tanto inhibir todo el mecanismo inflamatorio implicado en la enfermedad de Alzheimer.

Luego haciendo un estudio *in vitro* en cultivo primario de células de corteza de ratón (Fig. 5), se observó que el A β es un inductor de muerte celular. La muerte de las neuronas es un proceso neurodegenerativo que pareciera estar mediada por la activación de procesos apoptóticos debido al estrés oxidativo. Está demostrado que A β causa la muerte de neuronas corticales tanto *in vivo* como *in vitro* (LaFerla et al., 1995; Yankner et al., 1990). La utilización de anticuerpos como anti- tubulina tirosinada, un marcador que da cuenta del grado dinámico del citoesqueleto neuronal, con el cual se puede observar las elongaciones y el mantenimiento de los procesos neuronales, ya que cualquier alteración en estas subunidades resulta en una disminución del crecimiento axonal y procesos neuronales (Ferreira et al., 1989). Hay que recordar que este

cambio postraduccional en las tubulinas indica una mayor dinámica de este set de microtúbulos (Rapoport et al., 2002). Se pudo observar que A β causa un severo daño en las neuronas, sus elongaciones son mas cortas y hay una pérdida de la morfología clásica de las neuronas. También se utilizó anticuerpos anti-MAP-2 un marcador específico de células neuronales, principalmente de los procesos neuronales tales como axones y dendritas. Se observó que A β causa una severa degeneración, con la formación de procesos tortuosos, presencia de varicosidades a lo largo de las prolongaciones neuronales y la retracción de procesos neuronales. Varios autores sugieren que en cultivos neuronales el tratamiento con A β induce estas típicas características apoptóticas (Watt et al., 1994). En este trabajo se pudo observar que las células tratadas con andrografolido muestran un mayor mantenimiento neuronal y elongaciones más extensas, sin presentar varicosidades ni procesos tortuosos, lo que afirma un efecto neuroprotector de andrografolido.

Finalmente para ratificar el efecto neuroprotector sugerido para andrografolido se realizó un análisis cuantitativo del largo de los procesos neuronales (Fig. 6) y se observó que andrografolido en presencia del péptido A β mantiene la longitud de los procesos neuronales de manera casi similar al control, no encontrándose diferencias significativas estadísticamente con respecto al control, en cambio en ausencia de andrografolido hay claramente una disminución de la longitud de los procesos neuronales, por la acción tóxica del péptido A β . Siendo esta disminución estadísticamente significativa con respecto al control. Es así como los resultados obtenidos, apoyan la hipótesis que andrografolido posee un efecto neuroprotector.

4.2 CONCLUSIÓN

Según los objetivos planteados para este trabajo de tesis se concluye lo siguiente:

- El andrografolido es un compuesto que inhibe la agregación del péptido $A\beta_{1-40}$ en fibras amiloides.
- El andrografolido induce la desagregación de las fibras amiloides y este proceso es tiempo y concentración dependiente.
- El andrografolido tiene un efecto neuroprotector, pues mantiene la morfología de las neuronas en presencia de agregados amiloidogénicos.

4.3 PROYECCIONES

En la actualidad, el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer consiste en la administración de anticolinesterásicos, que aumentan los niveles de acetilcolina cerebral. Esto se basa en la hipótesis de que la enfermedad se debe a una deficiencia de este neurotransmisor, planteada en la década del 80. Sin embargo, estos fármacos permiten, en el mejor de los casos, detener el avance de la enfermedad por períodos de hasta dos años.

Los nuevos hallazgos sugieren que el uso de anti-inflamatorios pueden servir como tratamiento profiláctico para la enfermedad de Alzheimer. Se sabe que andrografolido ejerce varias acciones anti-inflamatorias y según los resultados obtenidos en esta investigación andrografolido presenta la ventaja de ser un agente que interfiere con la agregación del péptido β -amiloide, además de causar depolimerización de las fibras preformadas y exhibir un efecto neuroprotector. Por lo tanto la inexistencia de un tratamiento farmacológico para la enfermedad de Alzheimer provee a esta investigación de una gran importancia y surge una nueva posibilidad de tratamiento de origen natural y de bajo costo para esta patología que debe ser posteriormente estudiada *in vivo*.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, A., Toro, R., Caceres, A. and Maccioni, R.B. (1999) Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett.*, 459, 421-426.
- Andersen, J.K. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.*, 10 Suppl, S18-25.
- Barnes, P.J. and Karin, M. (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.*, 336, 1066-1071.
- Bird, T.D., Sumi, S.M., Nemens, E.J., Nochlin, D., Schellenberg, G., Lampe, T.H., Sadovnick, A., Chui, H., Miner, G.W. and Tinklenberg, J. (1989) Phenotypic heterogeneity in familial Alzheimer's disease: a study of 24 kindreds. *Ann Neurol.*, 25, 12-25.
- Blacker, D., Wilcox, M.A., Laird, N.M., Rodes, L., Horvath, S.M., Go, R.C., Perry, R., Watson, B., Jr., Bassett, S.S., McInnis, M.G., Albert, M.S., Hyman, B.T. and Tanzi, R.E. (1998) Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet.*, 19, 357-360.
- Boutaud, O., Ou, J.J., Chaurand, P., Caprioli, R.M., Montine, T.J. and Oates, J.A. (2002) Prostaglandin H2 (PGH2) accelerates formation of amyloid beta1-42 oligomers. *J Neurochem.*, 82, 1003-1006.
- Cameron, H.A., Hazel, T.G. and McKay, R.D. (1998) Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol.*, 36, 287-306.
- Chiou, W.F., Chen, C.F. and Lin, J.J. (2000) Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. *Br J Pharmacol.*, 129, 1553-1560.

- Chiou, W.F., Lin, J.J. and Chen, C.F. (1998) Andrographolide suppresses the expression of inducible nitric oxide synthase in macrophage and restores the vasoconstriction in rat aorta treated with lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol.*, 125, 327-334.
- Choudhury, B.R. and Poddar, M.K. (1984) Andrographolide and kalmegh (*Andrographis paniculata*) extract: in vivo and in vitro effect on hepatic lipid peroxidation. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 6, 481-485.
- Citron, M., Diehl, T.S., Gordon, G., Biere, A.L., Seubert, P. and Selkoe, D.J. (1996) Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93, 13170-13175.
- Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J. and Ashe, K.H. (2005) Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci.*, 8, 79-84.
- Dickson, D.W. (1997) The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 56, 321-339.
- Dinamarca, M.C., Cerpa, W., Garrido, J., Hancke, J.L. and Inestrosa, N.C. (2006) Hyperforin prevents beta-amyloid neurotoxicity and spatial memory impairments by disaggregation of Alzheimer's amyloid-beta-deposits. *Mol Psychiatry.*, 11, 1032-1048.
- Du, A.T., Schuff, N., Zhu, X.P., Jagust, W.J., Miller, B.L., Reed, B.R., Kramer, J.H., Mungas, D., Yaffe, K., Chui, H.C. and Weiner, M.W. (2003) Atrophy rates of entorhinal cortex in AD and normal aging. *Neurology.*, 60, 481-486.

- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R. and Greenberg, M.E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science.*, 275, 661-665.
- Egana, J.T., Zambrano, C., Nunez, M.T., Gonzalez-Billault, C. and Maccioni, R.B. (2003) Iron-induced oxidative stress modify tau phosphorylation patterns in hippocampal cell cultures. *Biometals.*, 16, 215-223.
- Estevez, A.G., Crow, J.P., Sampson, J.B., Reiter, C., Zhuang, Y., Richardson, G.J., Tarpey, M.M., Barbeito, L. and Beckman, J.S. (1999) Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science.*, 286, 2498-2500.
- Estevez, A.G., Spear, N., Manuel, S.M., Radi, R., Henderson, C.E., Barbeito, L. and Beckman, J.S. (1998) Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J Neurosci.*, 18, 923-931.
- Evans, K.C., Berger, E.P., Cho, C.G., Weisgraber, K.H. and Lansbury, P.T., Jr. (1995) Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92, 763-767.
- Ferrari, R., Ceconi, C., Curello, S., Cargnoni, A., Alfieri, O., Pardini, A., Marzollo, P. and Visioli, O. (1991) Oxygen free radicals and myocardial damage: protective role of thiol-containing agents. *Am J Med.*, 91, 95S-105S.
- Ferreira, A., Lu, Q., Orecchio, L. and Kosik, K.S. (1997) Selective phosphorylation of adult tau isoforms in mature hippocampal neurons exposed to fibrillar A-beta. *Mol. Cell. Neurosci.*, 9, 220-234.

- Ferreira, A., Busciglio, J. and Caceres, A. (1989) Microtubule formation and neurite growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro: evidence for the involvement of the microtubule-associated proteins, MAP-1a, HMW-MAP2 and tau. *Dev. Brain. Res.*, 49, 215-228.
- Findeis, M.A. (2002) Peptide inhibitors of beta amyloid aggregation. *Curr Top Med Chem.*, 2, 417-423.
- Florez, J. (1997) *Farmacología humana*. 3ª. Ed. Masson, SA. Barcelona. pp. 595- 596.
- Forloni, G., Colombo, L., Girola, L., Tagliavini, F. and Salmona, M. (2001) Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro. *FEBS Lett.*, 487, 404-407.
- Gibson, A.M., Singleton, A.B., Smith, G., Woodward, R., McKeith, I.G., Perry, R.H., Ince, P.G., Ballard, C.G., Edwardson, J.A. and Morris, C.M. (2000) Lack of association of the alpha2-macroglobulin locus on chromosome 12 in AD. *Neurology.*, 54, 433-438.
- Glenner, G.G. and Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.*, 120, 885-890.
- Goedert, M. (1993) Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.*, 16, 460-465.
- González, R. (2000) *Enfermedad de Alzheimer. Clínica, tratamiento y rehabilitación*. Masson, S.A, Barcelona. pp.1, 3, 5, 6, 103, 112.
- Good, T.A and Murphy, R.M. (1996) Effect of beta-amyloid block of the fast-inactivating K⁺ channel on intracellular Ca²⁺ and excitability in a modeled neuron. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 15130-15135.

- Goodman & Gilman, A. (2001) *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 10^a. Ed. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V, México D.F. pp. 187, 197, 568- 570.
- Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B. and et al. (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.*, 359, 322-325.
- Habtemariam, S. (1998) Andrographolide inhibits the tumour necrosis factor-alpha-induced upregulation of ICAM-1 expression and endothelial-monocyte adhesion. *Phytotherapy Research.*, 12, 37-40.
- Hebert, L.E., Scherr, P.A., Bienias, J.L., Bennett, D.A. and Evans, D.A. (2003) Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol.*, 60, 1119-1122.
- Henderson, V.W. and Buckwalter, J.G. (1994) Cognitive deficits of men and women with Alzheimer's disease. *Neurology.*, 44, 90-96.
- Hidalgo, M.A., Romero, A., Figueroa, J., Cortes, P., Concha, II, Hancke, J.L. and Burgos, R.A. (2005) Andrographolide interferes with binding of nuclear factor-kappaB to DNA in HL-60-derived neutrophilic cells. *Br J Pharmacol.*, 144, 680-686.
- in t' Veld, B.A., Ruitenber, A., Hofman, A., Launer, L.J., van Duijn, C.M., Stijnen, T., Breteler, M.M. and Stricker, B.H. (2001) Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, 345, 1515-1521.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.*, 325, 733-736.

- Katzman, R. (1993) Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease. *Neurology.*, 43, 13-20.
- Katzung, B. (2005) Farmacología básica y clínica. 9ª. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V, México D.F. pp. 1001.
- Katzung, B. (1997) Farmacología: autoevaluación y repaso. 2ª. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V, México D.F. pp. 68.
- Kosik, K.S., Joachim, C.L. and Selkoe, D.J. (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 83, 4044-4048.
- Krasuski, J.S., Alexander, G.E., Horwitz, B., Rapoport, S.I. and Schapiro, M.B. (2002) Relation of medial temporal lobe volumes to age and memory function in nondemented adults with Down's syndrome: implications for the prodromal phase of Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry.*, 159, 74-81.
- Kuan, C.Y., Roth, K.A., Flavell, R.A. and Rakic, P. (2000) Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci.*, 23, 291-297.
- Kumar, R.A., Sridevi, K., Kumar, N.V., Nanduri, S. and Rajagopal, S. (2004) Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. *J Ethnopharmacol.*, 92, 291-295.
- Kusiak, J.W., Izzo, J.A. and Zhao, B. (1996) Neurodegeneration in Alzheimer disease. Is apoptosis involved? *Mol Chem Neuropathol.*, 28, 153-162.
- LaFerla, F.M., Tinkle, B.T., Bieberich, C.J., Haudenschild, C.C. and Jay, G. (1995) The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet.*, 9, 21-30.

- Lambert, J.C., Wavrant-De Vrieze, F., Amouyel, P. and Chartier-Harlin, M.C. (1998) Association at LRP gene locus with sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Lancet.*, 351, 1787-1788.
- Larson, E.B., Shadlen, M.F., Wang, L., McCormick, W.C., Bowen, J.D., Teri, L. and Kukull, W.A. (2004) Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease. *Ann Intern Med.*, 140, 501-509.
- Lee, S.Y., Lee, J.W., Lee, H., Yoo, H.S., Yun, Y.P., Oh, K.W., Ha, T.Y. and Hong, J.T. (2005) Inhibitory effect of green tea extract on β -amyloid-induced PC12 cell death by inhibition of the activation of NF- κ B and ERK/p38 MAP kinase pathway through antioxidant mechanisms. *Mol. Brain Research.*, 140, 45-54.
- LeVine, H. (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer disease β -amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.*, 2, 404-410.
- Lipton, P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.*, 79, 1431-1568.
- Lorenzo, A. and Yankner, B.A. (1994) Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91, 12243-12247.
- Maccioni, R.B., Lavados, M., Maccioni, C.B. and Mendoza-Naranjo, A. (2004) Biological markers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Curr Alzheimer Res.*, 1, 307-314.
- Maccioni, R.B., Munoz, J.P. and Barbeito, L. (2001) The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res.*, 32, 367-381.
- MacManus, A., Ramsden, M., Murray, M., Henderson, Z., Pearson, H.A. and Campbell, V.A. (2000) Enhancement of $(45)\text{Ca}^{2+}$ influx and voltage-dependent Ca^{2+} channel activity by beta-amyloid-(1-40) in rat cortical synaptosomes and cultured cortical neurons.

Modulation by the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Biol Chem.*, 275, 4713-4718.

- Mark, R.J., Blanc, E.M. and Mattson, M.P. (1996) Amyloid beta-peptide and oxidative cellular injury in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.*, 12, 211-224.
- Masdeu, J. (2004) Neuroimaging in Alzheimer's disease: an overview. *Rev. Neurol.*, 38, 1156-1165.
- Mattson, M.P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. and Rydel, R.E. (1992) beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci.*, 12, 376-389.
- Mayeux, R., Ottman, R., Maestre, G., Ngai, C., Tang, M.X., Ginsberg, H., Chun, M., Tycko, B. and Shelanski, M. (1995) Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology.*, 45, 555-557.
- Motter, R., Vigo-Pelfrey, C., Kholodenko, D., Barbour, R., Johnson-Wood, K., Galasko, D., Chang, L., Miller, B., Clark, C., Green, R. and et al. (1995) Reduction of beta-amyloid peptide₄₂ in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 38, 643-648.
- Naiki, H., Gejyo, F. and Nakakuki, K. (1997) Concentration-dependent inhibitory effects of apolipoprotein E on Alzheimer's beta-amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry.*, 36, 6243-6250.
- Nalbantoglu, J., Lacoste-Royal, G. and Gauvreau, D. (1990) Genetic factors in Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc.*, 38, 564-568.
- Netland, E.E., Newton, J.L., Majojcha, R.E. and Tate, B.A. (1998) Indomethacin reverses the microglial response to amyloid beta-protein. *Neurobiol Aging.*, 19, 201-204.

- Neve, R.L., McPhie, D.L. and Chen, Y.H. (2000) Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Research*. 886, 54-66.
- Oppenheim, R.W. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.*, 14, 453-501.
- Ostrosky-Solís, F., Gómez, E., Castillo, G., Franco, M., Aveleyra, E. (1999) Detección temprana y predictiva de la demencia: índices electrofisiológicos y cognoscitivos. *Neuropsicología, Neuropsiquiatría y Neurociencias.*, 1, 82-94.
- Pappolla, M., Bozner, P., Soto, C., Shao, H., Robakis, N.K., Zagorski, M., Frangione, B. and Ghiso, J. (1998) Inhibition of Alzheimer beta-fibrillogenesis by melatonin. *J Biol Chem.*, 273, 7185-7188.
- Phelps, M.E. (2000) Inaugural article: positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97, 9226-9233.
- Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G. and Cotman, C.W. (1991) In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.*, 563, 311-314.
- Prasher, V.P., Farrer, M.J., Kessling, A.M., Fisher, E.M., West, R.J., Barber, P.C. and Butler, A.C. (1998) Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann Neurol.*, 43, 380-383.
- Pratico, D. and Trojanowski, J.Q. (2000) Inflammatory hypotheses: novel mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration and new therapeutic targets? *Neurobiol Aging.*, 21, 441-445; discussion 451-443.
- Prospero, C., Scali, C., Barba, M., Bellucci, A., Giovannini, M.G., Pepeu, G. and Casamenti, F. (2004) Comparison between flurbiprofen and its nitric oxide-releasing

derivatives HCT-1026 and NCX-2216 on Abeta(1-42)-induced brain inflammation and neuronal damage in the rat. *Int J Immunopathol Pharmacol.*, 17, 317-330.

- P.R®Vademecum. (2000) 6ª.Ed. RL Editora Ltda, Santiago. pp. Sección III pp 83, 206, 218.
- Qiu, W.Q., Ferreira, A., Miller, C., Koo, E.H. and Selkoe, D.J. (1995) Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J Neurosci.*, 15, 2157-2167.
- Rabizadeh, S., Bitler, C.M., Butcher, L.L. and Bredesen, D.E. (1994) Expression of the low-affinity nerve growth factor receptor enhances beta-amyloid peptide toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91, 10703-10706.
- Rajagopal, S., Kumar, R.A., Deevi, D.S., Satyanarayana, C. and Rajagopalan, R. (2003) Andrographolide, a potential cancer therapeutic agent isolated from *Andrographis paniculata*. *J Exp Ther Oncol.*, 3, 147-158.
- Rang, H.P. (2004) Farmacología. 5ª. Ed. Elsevier España, SA, Madrid. pp. 496.
- Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P. and Ferreira, A. (2002) Tau is essential to beta-amyloid induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99 (9), 6364-6369.
- Rapoport, M. and Ferreira, A. (2000) PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons. *J. Neurochem.*, 74, 125-133.
- Roebuck, K.A. and Finnegan, A. (1999) Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J. Leukoc. Biol.*, 66, 876-888.
- Rosenberg, R.N. (2000) The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning: the 2000 Wartenberg lecture. *Neurology.*, 54, 2045-2054.

- Sastry, P.S. and Rao, K.S. (2000) Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem.*, 74, 1-20.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.*, 166, 368-379.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S. (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med.*, 2, 864-870.
- Schott, J.M., Fox, N.C., Frost, C., Scahill, R.I., Janssen, J.C., Chan, D., Jenkins, R. and Rossor, M.N. (2003) Assessing the onset of structural change in familial Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 53, 181-188.
- Selkoe, D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.*, 81, 741-766.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C. and et al. (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature.*, 359, 325-327.
- Shearman, M.S., Ragan, C.I. and Iversen, L.L. (1994) Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91, 1470-1474.

- Shen, Y.C., Chen, C.F. and Chiou, W.F. (2002) Andrographolide prevents oxygen radical production by human neutrophils: possible mechanism(s) involved in its anti-inflammatory effect. *Br J Pharmacol.*, 135, 399-406.
- Shen, Y.C., Chen, C.F. and Chiou, W.F. (2000) Suppression of rat neutrophil reactive oxygen production and adhesion by diterpenoid lactone andrographolide. *Planta Medica.*, 66, 314-317.
- Song, A.W., Popp, C.A., Mao, J. and Dixon, W.T. (2000) fMRI: methodology-acquisition and processing. *Adv Neurol.*, 83, 177-185.
- Soto, C., Sigurdsson, E.M., Morelli, L., Kumar, R.A., Castano, E.M. and Frangione, B. (1998) Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med.*, 4, 822-826.
- Spear, N., Estevez, A.G., Barbeito, L., Beckman, J.S. and Johnson, G.V. (1997) Nerve growth factor protects PC12 cells against peroxynitrite-induced apoptosis via a mechanism dependent on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neurochem.*, 69, 53-59.
- Stern, Y., Alexander, G.E., Prohovnik, I. and Mayeux, R. (1992) Inverse relationship between education and parietotemporal perfusion deficit in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 32, 371-375.
- Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V.M. (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.*, 69, 217-245.
- Szekely, C.A., Thorne, J.E., Zandi, P.P., Ek, M., Messias, E., Breitner, J.C. and Goodman, S.N. (2004) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review. *Neuroepidemiology.*, 23, 159-169.

- Takashima, A., Honda, T., Yasutake, K., Michel, G., Murayama, O., Murayama, M., Ishiguro, K. and Yamaguchi, H. (1998) Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res.*, 31, 317-323.
- Terry, R.D., Hansen, L.A., DeTeresa, R., Davies, P., Tobias, H. and Katzman, R. (1987) Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 46, 262-268.
- Thomas, T., Nadackal, T.G. and Thomas, K. (2001) Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit amyloid-beta aggregation. *Neuroreport.*, 12, 3263-3267.
- Townsend, K.P. and Pratico, D. (2005) Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Faseb J.*, 19, 1592-1601.
- Troy, C.M., Rabacchi, S.A., Friedman, W.J., Frappier, T.F., Brown, K. and Shelanski, M.L. (2000) Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid. *J Neurosci.*, 20, 1386-1392.
- Vane, J.R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.*, 231, 232-235.
- von Bernhardi, R. (2004) Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: apoptosis or necrosis. *Rev.Chil. Neuro-Psiquiat.*, 42(4), 281-292.
- Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M. and Teplow, D.B. (1997) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem.*, 272, 22364-22372.

- Wang, T., Liu, B., Zhang, W., Wilson, B. and Hong, J.S. (2004) Andrographolide reduces inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration in mesencephalic neuron-glia cultures by inhibiting microglial activation. *J Pharmacol Exp Ther.*, 308, 975-983.
- Watt, J.A., Pike, C.J., Walencewicz-Wasserman, A.J. and Cotman, C.W. (1994) Ultrastructural analysis of beta-amyloid-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.*, 661, 147-156.
- Wolozin, B. and Behl, C. (2000) Mechanisms of neurodegenerative disorders: Part 2: control of cell death. *Arch Neurol.*, 57, 801-804.
- Xia, W., Zhang, J., Perez, R., Koo, E.H. and Selkoe, D.J. (1997) Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94, 8208-8213.
- Yang, F., Sun, X., Beech, W., Teter, B., Wu, S., Sigel, J., Vinters, H.V., Frautschy, S.A. and Cole, G.M. (1998) Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.*, 152, 379-389.
- Yankner, B.A., Caceres, A. and Duffy, L.K. (1990) Nerve growth factor potentiates the neurotoxicity of beta amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 87, 9020-9023.
- Yankner, B.A., Dawes, L.R., Fisher, S., Villa-Komaroff, L., Oster-Granite, M.L. and Neve, R.L. (1989) Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science.*, 245, 417-420.
- Yoshiyama, Y., Arai, K. and Hattori, T. (2001) Enhanced expression of I-kappaB with neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Neuroreport.*, 12, 2641-2645.

- Zambrano, C.A., Egana, J.T., Nunez, M.T., Maccioni, R.B. and Gonzalez-Billault, C. (2004) Oxidative stress promotes tau dephosphorylation in neuronal cells: the roles of cdk5 and PP1. *Free Radic Biol Med.*, 36, 1393-1402.

CAPITULO VI

ANEXOS

6.1 SOLUCIONES USADAS EN CULTIVO PRIMARIO

6.1.1 HBSS 10X

Para 500 ml:

Hepes	10 mM	1,19 grs.
NaCl	80 mM	40 grs.
KCl	2,7 mM	2 grs.
Glucosa	2,8 mM	5 grs.
KH ₂ PO ₄	0,2 mM	0,3 grs.
Rojo Feud	0,02 mM	0,085 grs.
H ₂ O c.s.p		500 ml.

Ajustar pH 7,4.

Filtrar 0,2 μ M.

6.2 SOLUCIONES USADAS EN INMUNCITOQUIMICA

6.2.1 Solución bloqueadora

Para 30 ml:

Leche descremada	5 %	1,5 grs.
BSA	1 %	0,3 grs.
PBS 1X c.s.p		30 ml.

Guardar a - 20°C.

6.3 SOLUCIONES USADAS EN ELECTROFORESIS

6.3.1 PBS 10X (Buffer fosfato salino)

Para 200 ml:

NaCl	137 mM	1,6 grs.
Na ₂ HPO ₄	10 mM	0,3 grs.
H ₂ O c.s.p		200 ml.

6.3.2 Buffer corrida SDS electroforesis (5X)

Para 1000 ml:

Tris-base	0,1 M	15,1 grs.
Glicina	0,768 M	72,0 grs.
SDS	0,4 %	5,0 grs.
H ₂ O		1000 ml.

Ajustar pH 8,3.

6.3.3 Buffer muestra (5X)

Para 5 ml:

Tris-base	0,3125 M pH 6,8	0,19 grs.
SDS	5 %	0,25 grs.
Glicerol	25 %	2,5 ml.
Azul bromofenol	0,025 %	0,00125 grs.
H ₂ O c.s.p		5 ml.

Guardar a -20°C .

6.3.4 Gel Separador 15 %

Para 10 ml:

H ₂ O		2,10 ml.
Acril/bis		5,0 ml.
Tris/HCL	1,5 M pH 8,8	2,50 ml.
Persulfato	1 %	400 μl .
Temed		6 μl .

6.3.4.1 Tris/HCL 1,5 M

Tris/HCL	1,5 M pH 8,8	45,5 grs.
SDS	4 %	1 grs.
H ₂ O c.s.p		250 ml.

Guardar a 4°C .

6.3.4.2 Acrilamida/bisacrilamida 30:0,8

Acrilamida		150 grs.
Bisacrilamida		4 grs.
H ₂ O c.s.p		500 ml.

Agregar carbón activado y filtrar.

Guardar a 4°C .

6.3.5 Gel Espaciador

Para 5 ml:

H ₂ O		2,6 ml.
Acril/bis		640 µl.
Tris/HCL	0,5 M pH 6,8	1,26 ml.
Persulfato	1 %	500 µl.
Temed		6 µl.

6.3.5.1 Tris/HCL 0,5 M

Tris/HCL	0,5 M pH 6,8	15,14 grs.
SDS	4 %	1 grs.
H ₂ O c.s.p		250 ml.

Guardar a 4°C.

6.3.6 Reactivo para teñir geles

Para 100 ml:

Azul de Comassie		0,25 grs.
Metanol		45 ml.
H ₂ O		45 ml.
Ácido acético glacial		10 ml.

Filtrar en papel nº 1 a temperatura ambiente.

