



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA

Tesis de licenciatura

Efecto de la concentración del péptido $A\beta_{25-35}$ en el circuito septo-hipocampal sobre la memoria espacial, estrés nitrosativo y la lipoperoxidación en rata

Para obtener el título de:

Licenciado en Farmacia

Presenta:

Fredy Sanchez Cano

Director de tesis:

Dr. I. Daniel Limón Pérez de León

Laboratorio de Neurofarmacología



Noviembre 2015

**Los sujetos de experimentación fueron
proporcionados por el Bioterio Claude
Bernard de la Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla**



**Los estudios conductuales, bioquímicos e
histológicos fueron realizados en el laboratorio de
Neurofarmacología de la BUAP bajo la dirección del Dr.
I. Daniel Limón Pérez de León**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. I. Daniel Limón Pérez de León

Por haber formado parte de mi trayectoria académica, por la confianza para permitirme trabajar en el H. Lab. de Neurofarmacología, de donde aprendí que el que persevera alcanza y “que hay que comprar los reactivos antes de planear los experimentos”, mil gracias.

Al Dr. Cesar Feliciano Pastelin Rojas y A la Dra. Patricia Aguilar Alonso:

Por la ayuda para la obtención de los cortes histológicos

A la comisión revisora

Por el compromiso, profesionalismo y criterio hacia el presente trabajo.

A la Dra. Isabel Martínez García

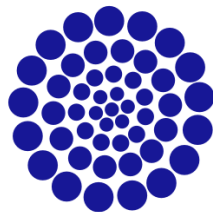
Por las críticas, comentarios y sugerencias

Al M.C. Felix Luna Morales

Por los comentarios y observaciones para el trabajo

Al L. en F. Juan Carlos Bastida Herrera

Por su interés y accesibilidad en el trabajo



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

El presente trabajo fue apoyado parcialmente por el proyecto CONACYT CB
169023



VIEP

Vicerrectoría de Investigación

y Estudios de Posgrado

El presente trabajo fue apoyado parcialmente por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla mediante el programa VIEP-BUAP Hc-2015.

ÍNDICE

I INTRODUCCION

1.1 El cerebro basal anterior.....	1
1.1.1 Región septal del cerebro basal anterior.....	2
1.1.2 Circuito septo-hipocampal.....	3
1.1.3 Población neuronal del <i>septum medial</i>	5
1.1.4 Sistema colinérgico.....	7
1.2 Enfermedad de Alzheimer.....	9
1.2.1 Hipótesis glutamatérgica.....	11
1.2.2 Hipótesis colinérgica.....	11
1.3 Aprendizaje y memoria.....	12
1.3.1 Clasificación de la memoria.....	12
1.3.2 Memoria de largo plazo.....	13
1.3.3 Memoria espacial.....	14
1.4 Mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria.....	15
1.5 El hipocampo es importante en la memoria espacial.....	16
1.6 El péptido A β	17
1.6.1 El A β_{25-35} en procesos conductuales.....	19
1.6.2 Toxicidad del A β_{25-35}	20
1.7 Papel del Óxido nítrico en el daño ocasionado por el A β_{25-35}	21
II JUSTIFICACIÓN.....	23
III HIPÓTESIS.....	24
IV OBJETIVO GENERAL.....	24
V OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
VI DIAGRAMA DE TRABAJO.....	25
VII METODOLOGIA.....	26
7.1 Sujetos de experimentación.....	26
7.2 Preparación del péptido A β_{25-35}	26
7.3 Administración del péptido A β_{25-35}	26

7.4 Cirugía estereotáxica.....	26
7.5 Protocolo de las pruebas conductuales.....	27
7.5.1 Protocolo de la prueba de memoria.....	28
7.6 Obtención de la muestra.....	29
7.7 Determinación de peroxidación de lípidos.....	29
Fundamento (método de Gerard-Monnier)	
Metodología	
7.8 Determinación de nitritos y proteínas totales.....	31
7.8.1 Determinación de proteínas totales.....	31
7.8.2 Normalización de MDA y NO ₂ por miligramo de proteína.....	32
7.9 Muestras para incluir en parafina y cortes.....	33
7.9.1 Inmunohistoquímica para 3-nitrotirosina.....	33
VIII RESULTADOS.....	35
8.1 Determinación del sitio de lesión.....	35
8.2 Efecto de diferentes concentraciones del péptido A β ₂₅₋₃₅ en el <i>septum medial</i> sobre el aprendizaje y memoria.....	36
8.3 Efecto de la administración de A β ₂₅₋₃₅ en el SM sobre la trayectoria de navegación.....	38
8.4 La administración de A β ₂₅₋₃₅ en el septum medial, aumenta la concentración de nitritos de manera concentración dependiente.....	40
8.5 La administración de A β ₂₅₋₃₅ en el septum medial, aumenta la concentración de Malondialdehído de manera concentración dependiente.....	42
8.6 Efecto de la administración de A β ₂₅₋₃₅ en el SM sobre la inmunorreactividad a 3-NT.....	44
IX DISCUSIÓN.....	47
X CONCLUSIONES.....	54
XI REFERENCIAS.....	56
XII CONGRESOS.....	62

Índice de figuras

Figura 1. Inervación colinérgica del cerebro basal anterior.....	2
Figura 2. Corte sagital y coronal de cerebro de rata.....	3
Figura 3. Comunicación septum-hipocampo.....	4
Figura 4. Modelo hipotético del circuito septo-hipocampal.....	6
Figura 5. Efecto de la administración del A β ₂₅₋₃₅ sobre la expresión de ChAT y NeuN.....	7
Figura 6. Neurotransmisión colinérgica.....	9
Figura 7. Placas seniles y marañas neurofibrilares presentes en pacientes con EA.....	10
Figura 8. Clasificación de la memoria.....	13
Figura 9. Mecanismo molecular hipotético del aprendizaje y memoria en mamíferos.....	16
Figura 10. Metabolismo de la proteína APP.....	18
Figura 11. Efecto de la administración del A β ₂₅₋₃₅ en la corteza temporal.....	22
Figura 12. Aparato de cirugía estereotáxica y bomba de infusión.....	27
Figura 13. Laberinto Acuático de Morris.....	28
Figura 14. Curva de calibración de malondialdehido por el método de Gerard-Monier...30	
Figura 15. Curva de calibración de nitritos por la técnica de Griess.....	31
Figura 16. Curva de calibración por el método de Bradford.....	32
Figura 17. Localización del sitio de lesión.....	35
Figura 18. Prueba de aprendizaje evaluada en el laberinto acuático de Morris.....	37
Figura 18.1 Registro del tiempo de permanencia en el cuadrante blanco y el numero De cruces por el punto de la plataforma.....	37
Figura 19. Representación de las trayectorias de navegación.....	39
Figura 20. Determinación de nitritos por el método de Griess en ratas lesionadas en el septum medial.....	41

Figura 21. Determinación de MDA por el método de Gerard-Monier en ratas lesionadas en el septum medial.....	43
Figura 22. Se muestra la cuantificación de células inmunorreactivas a 3-NT en el septum medial.....	45
Figura 23. Se muestra la cuantificación de células inmunorreactivas a 3-NT en la CA1 de hipocampo.....	46
Figura 24. Mecanismo hipotético de la toxicidad del $A\beta_{25-35}$	54

ABREVIATURAS

EA:	Enfermedad de Alzheimer
SM:	Septum Medial
GD:	Giro dentado
NBM:	Núcleo basal de Meynert
BDHB:	Banda diagonal horizontal de Broca
SL:	Septum Lateral
NPS:	Núcleo Posterior Septal
GABA:	Ácido Gama aminobutírico
ChAT:	Colina Acetiltransferasa
ACh:	Acetilcolina
AChE:	Acetil colinesterasa
ChT:	Transportador de Colina
VAcHT:	Transportador Vesicular de Acetilcolina
THA:	Tetra-aminotacrina
NMDA:	N-metil-D-aspartato
LTP:	Potenciación a largo plazo
AMPA:	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropionato
AMPc:	Adenosin monofosfato
PKA:	Proteína Kinasa A
ATP:	Adenosin trifosfato
CREB:	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
Aβ:	Amiloide beta
NOS:	Sintasa del óxido nítrico

NO: Óxido nítrico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

FMN: Flavin mononucleótido

FAD: Flavin adenín dinucleótido

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

nNOS: Sintasa del óxido nítrico neuronal

iNOS: Sintasa del óxido nítrico inducible

NO₂: Nitritos

AP: Anteroposterior

L: Lateralidad

P: Profundidad

rpm: Revoluciones por minuto

MDA: Malondialdehído

nm: Nanómetros

uV: Ultravioleta

SSI: Solución salina isotónica

3-NT: Tres nitrotirosina

PBS: Buffer de fosfatos

ONOO⁻: Peroxinitrito

O₂⁻: Anión superóxido

ERN: Especies reactivas de oxígeno

I INTRODUCCIÓN

1.1 El cerebro basal anterior

La región del cerebro basal anterior comprende un conjunto de estructuras heterogéneas encefálicas en la parte medial y ventral del hemisferio cerebral. Se ha descrito que el sistema neuronal del cerebro basal anterior está involucrado en un número de funciones conductuales, incluida motivación, emoción, aprendizaje y la memoria (Olton, 1991). La inervación colinérgica del manto cortical, bulbo olfatorio, hipocampo y amígdala en el cerebro de mamíferos se origina en los cuerpos celulares localizados en el cerebro basal anterior. Una población de células que parecen ser necesarias para ciertas funciones de memoria, y que es el principal centro de atención por la temprana degeneración en la enfermedad de Alzheimer (EA), es el sistema colinérgico del cerebro basal anterior (Hedreen, 1984). El cerebro basal anterior, incluye al *septum* medial (SM), núcleo basal de Meynert (NBM), la banda diagonal vertical (BDVB), la banda diagonal horizontal de Broca (BDHB) y los núcleos pedunculopotinos. Las proyecciones colinérgicas han sido clasificadas en seis vías centrales (Ch1-Ch6, nomenclatura de Mesulam, 1990) relacionadas con el núcleo donde se originan. El SM (Ch1) y la BDVB (Ch2) envían sus proyecciones hacia el hipocampo, principalmente a la región CA1 y CA3; mientras que la BDHB (Ch3) inerva el bulbo olfatorio. El NBM (Ch4) inerva la corteza con una organización rostrocaudal, ventrodorsal y mediolateral, los grupos restantes lo constituyen los núcleos pedunculopotinos, que envían sus proyecciones hacia el hipotálamo (figura 1). Estas regiones específicas del cerebro basal anterior tienen un papel importante en funciones como la atención, la percepción, la conciencia, el aprendizaje y la memoria.

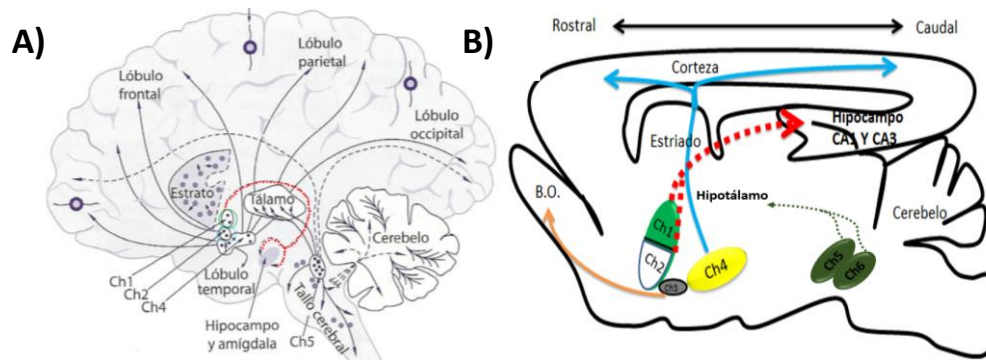


Figura 1. Inervación colinérgica del cerebro basal anterior. A) Se muestran los grupos celulares de los cuales parte la inervación colinérgica, dónde Ch1 y Ch2 envían axones al hipocampo B) Se muestra un esquema de corte sagital de cerebro de rata, con la misma distribución colinérgica que en cerebro de humano. (Tomado y modificado de Meunier y cols., 2003)

Este sistema neuronal provee de inervación colinérgica a estructuras cerebrales corticales y límbicas, específicamente, neuronas situadas en el septum medial inervan predominantemente el hipocampo, mientras las bandas diagonal y vertical de broca proyectan hacia la corteza y bulbo olfatorio respectivamente. Aunque algunas neuronas de la banda diagonal vertical de broca proyectan hacia el hipocampo. El núcleo basal de Meynert, por otra parte, provee inervación colinérgica a la amígdala y el manto cortical. El hipocampo recibe la mayor entrada colinérgica del septum medial, y estas neuronas colinérgicas pueden regular procesos de aprendizaje y memoria hipocampo-dependientes. El septum medial y el hipocampo están recíprocamente conectados vía neuronas GABAérgicas (ácido gama-aminobutírico). La disfunción colinérgica del cerebro basal anterior en humanos, ha sido asociada con demencias seniles, una de ellas la enfermedad de Alzheimer (EA).

1.1.1 Región septal del cerebro basal anterior

La región septal es una parte anterior y ventral del cerebro basal anterior. En roedores, el septum tiene forma de barril, franqueado por los ventrículos laterales y techado por el cuerpo calloso (figura 2A). Puede ser dividido en cuatro regiones principales. La primera es el septum lateral (SL), la segunda es la región del septum medial. Los núcleos ventrales y laterales adyacentes a la comisura anterior, núcleos de lecho de la estría

terminal, constituyen la tercera región. Finalmente la cuarta región comprende al núcleo posterior septal (SP) incluyendo los núcleos septo-fimbriales y triangulares (figura 2B).

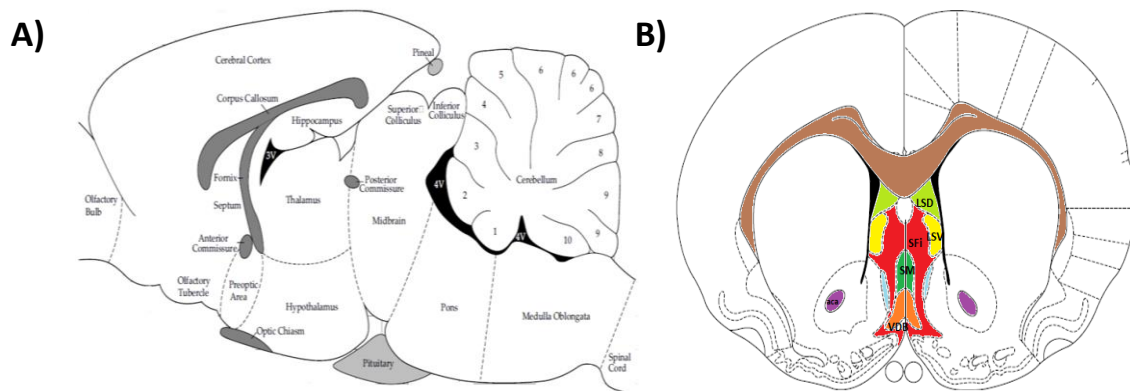


Figura 2. Corte sagital y coronal de cerebro de rata. A) Sección sagital del cerebro de rata, en esta sección se pueden observar al *septum*, B) corte coronal del cerebro de una rata dónde se puede observar detalladamente las regiones que conforman al *septum*, septum medial (SM, verde oscuro), núcleos septo-fimbriales (SFi, rojo), septum lateral (LSV, amarillo) (tomado y modificado de Paxinos y Watson, 1986).

1.1.2 Circuito septo-hipocampal

El *septum* y el hipocampo están altamente interconectados a través del sistema fimbria-fornix y se complementan funcionalmente. A menudo le refieren como el sistema septo-hipocampal (Colom V. 2006). Se ha descrito que el septum medial se proyecta sobre el hipocampo propio y el Giro dentado (GD). Estudios inmunohistoquímicos para determinar acetil colinesterasa, demuestran que la formación hipocámpica recibe inervación colinérgica del área SM-BDB a través del fórnix. El sistema septo-hipocampal utiliza acetilcolina como neurotransmisor, siendo el componente colinérgico aproximadamente el 50 % de las proyecciones. Las proyecciones colinérgicas establecen contacto con las células piramidales, granulosas e interneuronas. También se ha demostrado que el principal componente del remanente 50% de la vía septo-hipocámpica es GABAérgico, y estas proyecciones GABAérgicas del complejo SM-BDB establecen contacto con interneuronas hipocámpicas GABAérgicas.

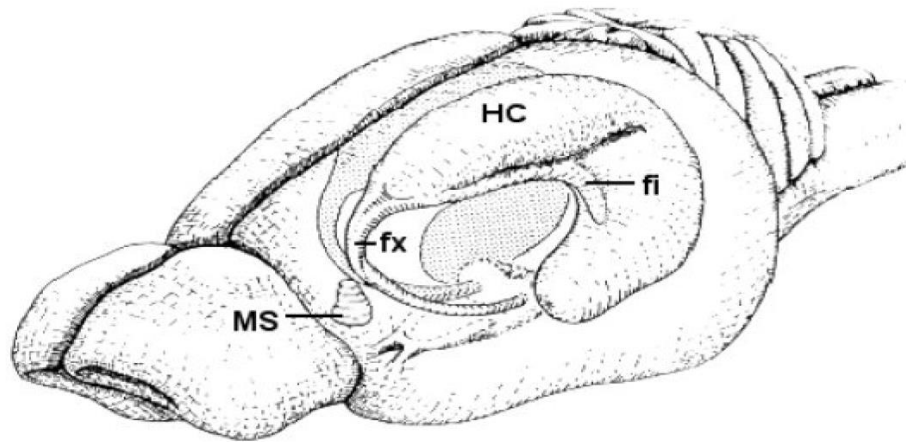


Figura 3. Comunicación septum-hipocampo. Se muestra una animación de cerebro de rata, en el cual se pueden apreciar las conexiones septo-hipocámpicas, el septum medial y el hipocampo se comunican a través del fimbria fornix, a esta comunicación la denominan vía septo-hipocámpica.

La región CA1-CA3 del hipocampo propio proyecta al septum lateral (SL), el cual se conecta extensamente con el área del SM-BDB. Las células de esta región mandan axones principalmente al GD pero también al hipocampo propio, cerrando así el circuito septo-hipocámpico. Tombol y Petsche (1969) describieron, mediante tinción de Golgi, en la región septal dos tipos celulares diferentes: 1) células medianas y grades con axones que presumiblemente se proyectan hacia el hipocampo y 2) pequeñas células.

En conclusión las interconexiones del septum e hipocampo son recíprocas. Las conexiones ascendentes del septum hacia el hipocampo provienen del SM y la parte ventral de la banda diagonal de Broca (BDB). Principalmente de dos tipos de conexión: colinérgica y GABAérgica. Más del 90 % de la innervación colinérgica que llega al hipocampo viene del septum medial. Esta influencia colinérgica es la principal aferencia moduladora de las células principales GABAérgicas del hipocampo. Las proyecciones GABAérgicas vienen del septum medial e inervan las interneuronas GABAérgicas del propio hipocampo, esto ocasiona una desinhibición de las células piramidales del hipocampo. Ambas poblaciones colinérgicas y GABAérgicas proporcionan una modulación sincronizada de todo el hipocampo (Chrobak J. 2000).

Recientes estudios electrofisiológicos y anatómicos han mostrado que existe una subpoblación septal de proyecciones glutamatérgicas hacia el hipocampo, constituyendo el

23% de la proyección del circuito septo-hipocampal. Así el sistema septo-hipocampal comprende tres principales vías de neurotransmisores, los cuales se encargan de regular procesos como el aprendizaje y la memoria, así como de la actividad eléctrica de estas regiones.

Diversas líneas de investigación indican que el septum desempeña un papel importante en la actividad eléctrica del hipocampo. La actividad eléctrica del hipocampo depende de la proporción de neuronas provenientes del septum para llevar a cabo dicha estimulación eléctrica, diversos estudios donde lesionan el septum y por otro lado bloquean la actividad eléctrica del hipocampo, demostraron que existen deficiencias en los procesos de memoria (Leung y cols., 1994). La actividad eléctrica juega un papel importante en la plasticidad sináptica, la codificación de la información y también desempeña un papel la integración sensitivo-motora.

1.1.3 Población neuronal del *septum medial*

Los grupos neuronales que utilizan GABA y acetilcolina como neurotransmisores, han sido bien estudiados en la región septal (Kimura H. 1980). Reciente evidencia muestra que las neuronas glutamatérgicas también están presentes en esta región (Manns D. 2001). Así el septum comprende tres poblaciones neuronales (Colinérgicas, GABAérgicas y Glutamatérgicas) que usan acetilcolina, GABA y glutamato como neurotransmisores (figura 4). Ambos grupos neuronales, colinérgicas y glutamatérgicas se concentran en el complejo SM-DBB. Por otra parte las neuronas GABAérgicas, se encuentran en ambas regiones, el circuito SM-DBB y el septum lateral (SL), constituyendo la prevalencia de la población neuronal de este último.

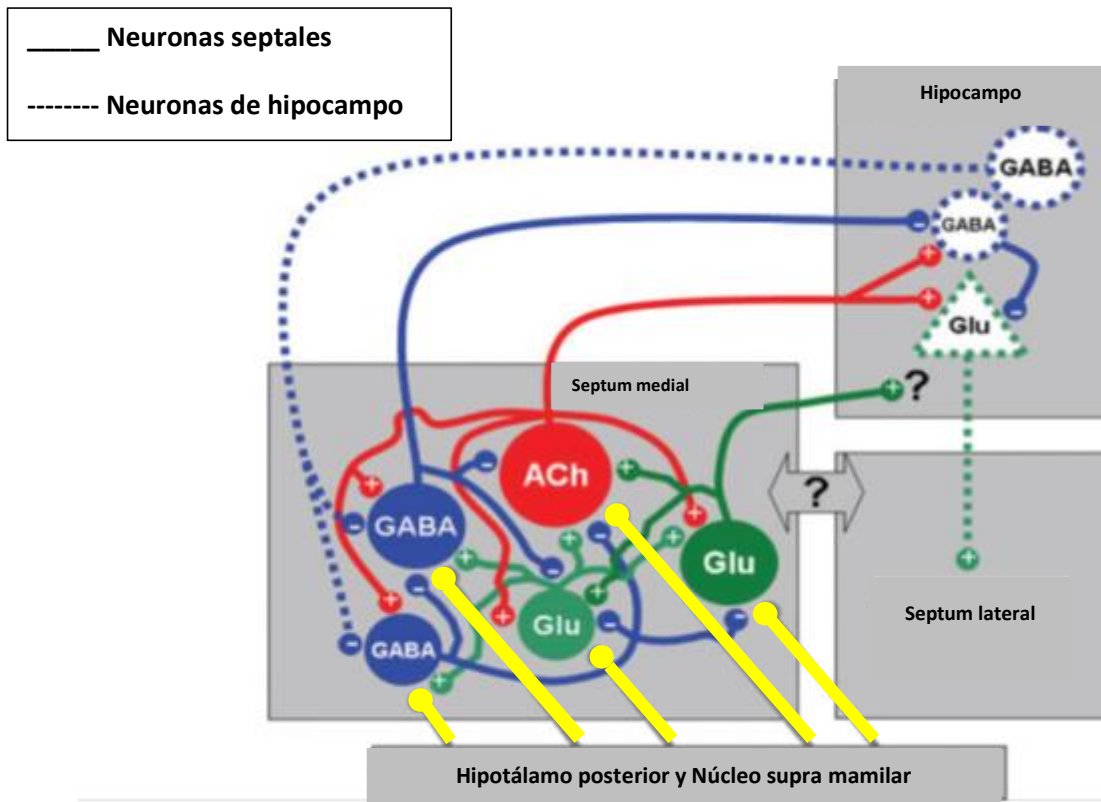


Figura 4. Modelo hipotético del circuito septo-hipocámpal. Involucra tres principales poblaciones de neuronas: colinérgicas (rojas), GABAérgicas (azul) y glutamatérgicas (verdes). Las proyecciones septales son denotadas por líneas continuas y las del hipocampo por líneas punteadas. Las aferencias ascendentes del núcleo supra mamilar y del hipotálamo posterior son denotadas en negro. El signo de interrogación indica sitios sinápticos desconocidos de las terminales glutamatérgicas del circuito septo-hipocámpal. Tomado y modificado de Colom 2005.

La pérdida de las neuronas a la inmunorreactividad de la colina-acetiltransferasa (ChAT), relacionadas con la edad, se ha descrito, que se produce en el área del cerebro basal anterior en ratas (Smith y cols., 1993). Por otro lado, estudios realizados por Stepanichev y cols. en 2013 muestran que el $A\beta_{25-35}$ al ser administrado en el septum medial en ratas, se reduce la inmunoreactividad a ChAT (ver figura 5). Por otra parte, el estudio de otros marcadores que expresan las neuronas colinérgicas septales, indican una significativa pérdida neuronal en esta región (figura 5). Estos hallazgos sugieren que las neuronas del cerebro basal anterior presenta una mayor vulnerabilidad a perturbaciones, que pueden contribuir a los cambios que se observan en estas neuronas en el envejecimiento y en demencias en general (EA). Una consecuencia final de todos estos eventos que se ven disminuidos, es un déficit en la liberación de acetilcolina (ACh).

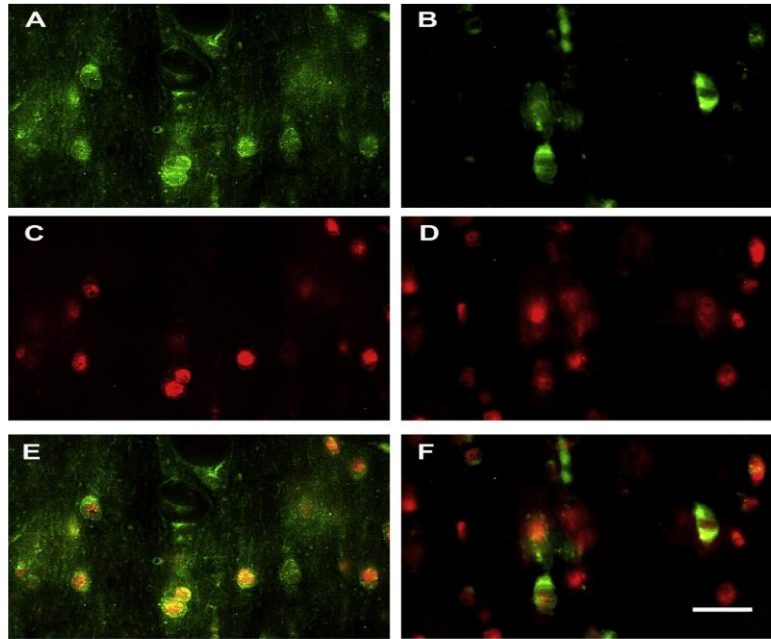


Figura 5. Se muestra el efecto de la administración del $A\beta_{25-35}$ sobre la expresión de ChAT y NeuN en el septum medial de ratas (n=5 por grupo). ChAT y NeuN fueron determinadas por inmunohistoquímica utilizando sus anticuerpos específicos correspondientes. Inmunoreactividad a la ChAT (A,B), NeuN (C,D) y el merged (E,F). Grupo control (A, C y E) y grupo tratado con $A\beta_{25-35}$ (B, D y F). (Stepanichev M. y cols., 2013)

1.1.4 Sistema colinérgico

La neurotransmisión colinérgica juega un papel esencial en una gran variedad de procesos fisiológicos, en el sistema nervioso central como a nivel de sistema nervioso periférico. Las neuronas colinérgicas usan al neurotransmisor acetilcolina (ACh) para comunicarse con sus blancos celulares. En la periferia, ACh es el neurotransmisor usado por el músculo esquelético para la función neuromuscular mientras que en el sistema nervioso central, las acciones de la acetilcolina están involucradas en una gran variedad de procesos como la atención, aprendizaje y memoria, el sueño y la modulación de la información sensitiva.

La acetilcolina (ACh) es sintetizada en la terminal de neuronas colinérgicas a partir de los precursores colina y acetilcoenzima-A por acción de la colina acetiltransferasa (ChAT), y es almacenada dentro de vesículas sinápticas a partir del transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT) (Prado, 2002). La despolarización de las terminales nerviosas causa un proceso de exocitosis, en el cual las vesículas sinápticas se fusionan con la membrana pre

sináptica especializadas en la liberación hacia el espacio sináptico. Este es un proceso dependiente de Calcio que involucra la acción de muchas proteínas presinápticas como las SNARE y las Rab. Una vez fusionadas las vesículas con la membrana pre sináptica, la acetilcolina es difundida en el espacio sináptico donde puede unirse a sus receptores muscarínicos o nicotínicos localizados tanto en células postsinápticas como presinápticas. La señalización de la acetilcolina es terminada al ser retirada del espacio sináptico por la acción de la enzima de hidrólisis la acetil colinesterasa (AChE), que hidroliza a la acetilcolina en colina y acetato. La colina derivada de la hidrólisis de ACh es reciclada en la presinápsis por el transportador de colina dependiente de sodio (CHT), para la re síntesis de ACh. El ciclo de la ACh de síntesis, almacenamiento, liberación e hidrólisis está ampliamente descrito a nivel celular y molecular como se muestra en la figura 6. La acetilcolina ejerce su acción a través de receptores nicotínicos (ionotrópicos) y muscarínicos (metabotrópicos), que se localizan en las células presinápticas y postsinápticas. Los receptores nicotínicos son miembros de la super-familia de canales ionotrópicos, la activación de los receptores nicotínicos resulta en una rápida despolarización que permite la entrada de iones Na^+ y Ca^{2+} . Los receptores muscarínicos pertenecen a la súper familia de receptores acoplados a proteínas Gs (de tipo estimulador) o Gi (de tipo inhibitorio). Existen 5 tipos de receptores muscarínicos (M1-M5). La activación de los receptores colinérgicos tiene una importante participación en la regulación de la liberación pre-sináptica de la mayoría de los neurotransmisores, dopamina, norepinefrina, serotonina, glutamato y GABA. Un ejemplo, es en el hipocampo la liberación de glutamato es regulada por la activación de los receptores muscarínicos pre-sinápticos M2 de tipo inhibitorio, lo cual repercute en una disminución de la liberación de glutamato (De Sevilla y cols., 2002)

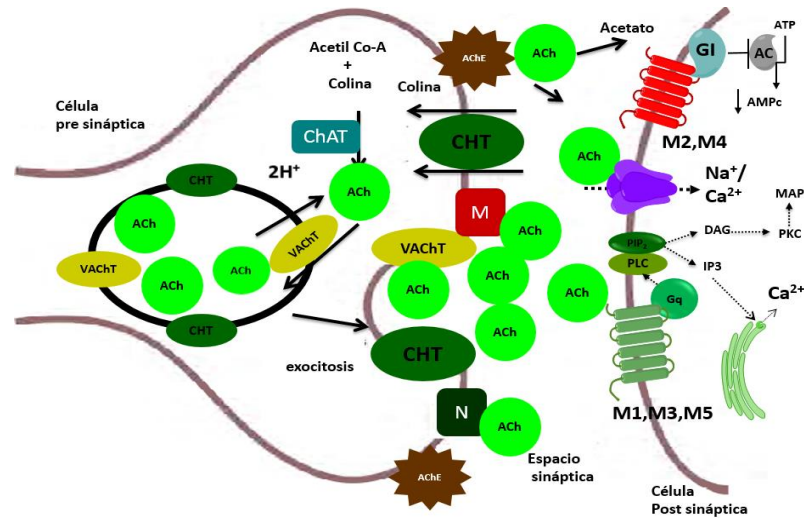


Figura 6. Mecanismo que involucra la síntesis, liberación, almacenamiento e hidrólisis de la ACh en la sinapsis colinérgica. Abreviaturas. Acetil Co-a, Acetil Coenzima-A; ACh, acetilcolina; AChE, acetil colinesterasa; ChAT, colina acetiltransferasa; CHT, transportador de colina de alta afinidad dependiente de sodio; M, receptor muscarínico; N, receptor nicotínico; SV, vesícula sináptica; VAcHT, transportador vesicular de acetilcolina.

La disfunción de la neurotransmisión colinérgica es aparente en un número de desórdenes neurológicos como EA, enfermedad de Parkinson, Huntington, esquizofrenia y la esclerosis lateral amiotrofica (Mesulam, 2004). El cerebro basal anterior comprende a un conjunto de núcleos (mencionados anteriormente), que contienen los cuerpos celulares de las neuronas colinérgicas que proyectan hacia el hipocampo, amígdala, bulbo olfatorio y todas las áreas de la corteza cerebral (Woolf y Butcher, 2010) tiene un papel importante en procesos como la atención, aprendizaje, memoria y la percepción, procesos que en ciertas enfermedades neurodegenerativas se ven afectados.

1.2 Enfermedad de Alzheimer

En 1906, Alois Alzheimer describe un trastorno que afecta principalmente a ancianos y que en la actualidad se conoce como la enfermedad de Alzheimer (EA) (Maurer et al., 1997). La etiología de la EA es de origen multifactorial, es la causa más común de demencia en los ancianos, aproximadamente el 10% de las personas mayores de 65 años y hasta el 50% de mayores de 85 años padecen esta enfermedad (Juan de J. y cols., 2002). Se caracteriza clínicamente por un deterioro en la memoria de largo plazo impidiéndoles retener y almacenar información, así como también deterioro en la personalidad y el

intelecto, a medida que las neuronas mueren y diferentes zonas del cerebro se atrofian. Neuropatológicamente se caracteriza por la presencia de placas neuríticas y marañas neurofibrilares, así como sistemas de neurotransmisión se ven afectados, predominantemente el sistema colinérgico y glutamatérgico. Las placas neuríticas son formadas por depósitos extracelulares de la proteína amiloide beta ($A\beta$), los iniciales depósitos corresponden al péptido $A\beta$ de 42 aminoácidos ($A\beta_{1-42}$) y que se encuentra en estado no fibrilar, conforme la enfermedad avanza se hacen presentes depósitos de $A\beta$ de 40 aminoácidos ($A\beta_{1-40}$), que corresponden a la forma fibrilar e insoluble asociada a la muerte neuronal. Por otra parte las marañas neurofibrilares están formadas por la proteína de unión a microtubulos (tau), la tau sufre múltiples fosforilaciones, esa hiperfosforilación promueve la formación de elementos helicoidales apareados que es uno de los principales marcadores neuropatológicos en la EA que promueve la neurodegeneración (Mann, 1998) (figura 7 A, B).

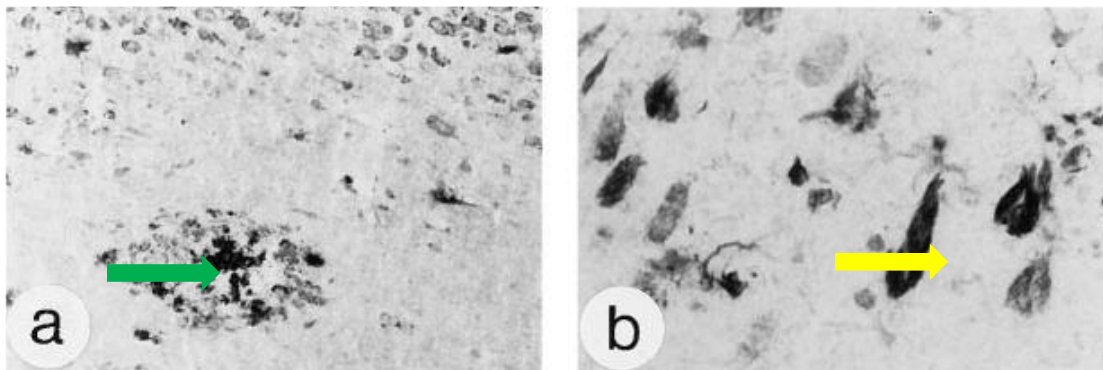


Figura 7. Placas seniles y marañas neurofibrilares presentes en pacientes con EA. Las secciones cerebrales de pacientes con EA son marcadas con técnicas inmunohistoquímicas para revelar la presencia de **a)** placas neuríticas y **b)** marañas neurofibrilares. Las placas neuríticas son amorfas (flecha verde) y están constituidas por el péptido $A\beta$ y neuritas distróficas (indicado con flecha verde) y las marañas neurofibrilares están constituidas de la proteína tau hiperfosforilada (flecha amarilla).

Aunque la enfermedad de Alzheimer se ha reconocido y clínicamente diferenciado desde el siglo pasado, se ha buscado nuevas hipótesis que pudiesen ayudar a la explicación de dicha enfermedad y su sintomatología. Existen dos principales hipótesis que tratan de explicar las disfunciones observadas en la enfermedad, cada una basada en la pérdida específica de ciertas neuronas en el cerebro. Múltiples estudios muestran una alteración en la actividad colinérgica a nivel cortical y a nivel de hipocampo (Wevers y cols., 2000), así

como en el sistema septo hipocampal (Maki y cols., 2002). De igual forma, los reportes indican la disminución de las terminales nerviosas glutamatérgicas en el hipocampo y la corteza cerebral de pacientes con EA.

1.2.1 Hipótesis glutamatérgica

La hipótesis glutamatérgica sostiene que la causa principal de la enfermedad de Alzheimer es una pérdida de las neuronas glutamatérgicas, esto es apoyado por estudios realizados como el de Hyman y cols., 1987. Donde al analizar a la vía perforante, una zona del hipocampo altamente enriquecida de terminales nerviosas glutamatérgicas encontraron una marcada reducción en la concentración de glutamato. Esto probablemente refleja pérdida del neurotransmisor glutamato y así indica pérdida de la vía perforante en la EA. Por otra parte evidencia indirecta de la pérdida de las neuronas glutamatérgicas en la EA surgió de observar elevadas concentraciones de glutamato en el neocórtex, esto posiblemente como un mecanismo de compensación de la pérdida de neuronas glutamatérgicas corticoestriatales.

1.2.2 Hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica de la enfermedad de Alzheimer, emerge como una consecuencia directa de tres reportes publicados en 1976-1977, que indican que la actividad de la enzima responsable de la síntesis de acetilcolina, la colina acetiltransferasa, se encuentra sustancialmente reducida en la región de la neocórtex y el hipocampo. La “hipótesis colinérgica” propone que la disminución de la función colinérgica es la principal causa de la neuropatología y la demencia en la EA, a partir de este hecho se realizó la búsqueda de terapias basadas en agonistas colinérgicos. En la actualidad es contradictorio, que después del descubrimiento de la pérdida colinérgica en la EA, las evidencias muestran que no solo es importante en un sentido funcional (cognición, memoria), sino que tiene una importancia fundamental en la parte molecular de dicha patología. En 1986 se realizó un estudio con el fármaco tetrahidroaminotacrina (THA; tacrina), un inhibidor de la

colinesterasa, se mostró una notable recuperación en un grupo pequeño de pacientes con EA (Summers y cols., 1986). Con este estudio se iniciaron décadas de subsecuentes estudios de ese y otros inhibidores de la colinesterasa. El mecanismo por el cual el fármaco realizaba su acción, es por inhibir la degradación de la acetilcolina (ACh), por lo cual la acción de la acetilcolina en la sinapsis se aumentaba. Por otra parte, algunos estudios han demostrado que al administrar un antagonista de los receptores de ACh (escopolamina) se logra observar un efecto amnésico, en ratas, al medir su rendimiento en el laberinto acuático de Morris, con estos estudios se demuestra la importancia que tiene el sistema colinérgico sobre procesos de aprendizaje y memoria.

1.3 Aprendizaje y memoria

El aprendizaje y la memoria son de los parámetros más importantes que se han estudiado en los seres vivos. Y para ser más específicos estos conceptos, algunos autores han definido a estos. El aprendizaje es el proceso por el cual adquirimos nuevos conocimientos sobre los eventos del medio ambiente, y que se ve reflejado en una modificación de la conducta (Squire y cols., 2000). La memoria no es una función estática, aislada o individual; la memoria puede ser mejor descrita como un complejo de redes de diferentes funciones interrelacionadas trabajando juntas para manejar la información. Por esta razón, puede ser más apropiado definirla en términos de sistemas de memoria. Así un sistema de memoria puede ser definido como una función cerebral cuyo propósito es clasificar, codificar, almacenar y recuperar una amplia diversidad de información. La memoria se define como el proceso mediante el cual la información que ha sido previamente adquirida es almacenada y recuperada (Squire y cols., 2000).

1.3.1 Clasificación de la memoria

Una de las formas de clasificar a la memoria es subdividir los procesos de ésta según la duración de la retención de la información. La memoria de corto plazo es capaz de retener información por segundos o minutos e inclusive unas pocas horas. La memoria de largo plazo es capaz de retener la información durante horas, días y años (Kesner 2007). Otra

clasificación de la memoria subdivide a esta en memoria declarativa; referente a la información que es transmitida o expresada, y no declarativa representando la información acerca de habilidades motoras o habilidades de percepción, que no pueden ser transmitidas oralmente (Tulving E. y Schacter DL. 1990).

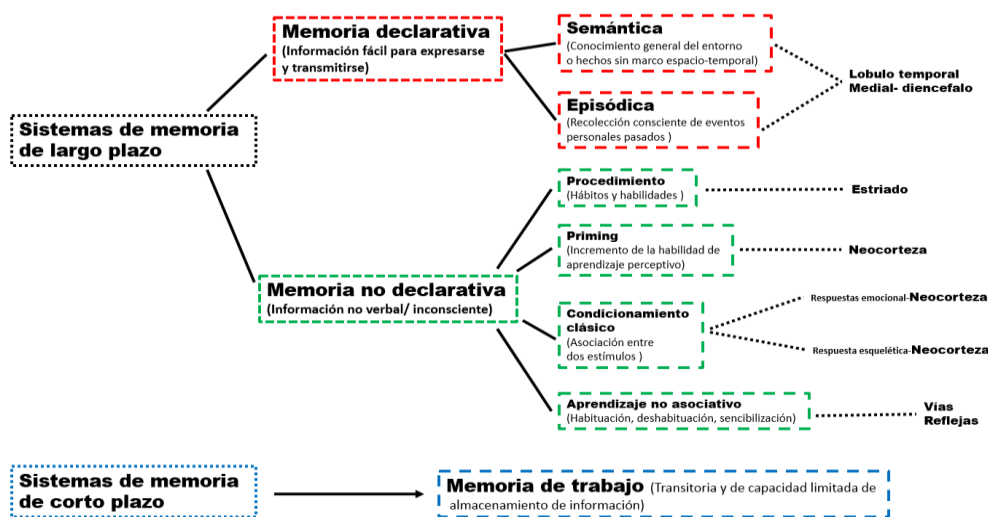


Figura 8. Representación esquemática de los dos grupos principales en los cuales es clasificada la memoria, de largo plazo y corto plazo. (Tomado y modificado de Carrillo-Mora Paul y cols., 2009).

1.3.2 Memoria de largo plazo

Este tipo de memoria tiene que ver con nuestra visión del mundo con fuerte influencia de la percepción y atención. Puede durar de horas a semanas, o de por vida si hay evocación repetida de los recuerdos, es decir ejercitación, ósea consolidación. Es un sistema cerebral para guardar una gran cantidad de información durante un tiempo indefinido, implica la transferencia gradual de la información hasta consolidarla. A diferencia de la memoria a corto plazo, es una memoria duradera y muy poco vulnerable a las interferencias. Se ha propuesto que la memoria a largo plazo se puede dividir en la memoria que es dependiente del lóbulo temporal medial, como la memoria declarativa, que proporciona un recuerdo a través de una búsqueda consciente de los hechos y acontecimientos, y una no hipocampal como la memoria no declarativa, la cual no requiere de un acceso consciente a la información. La diferencia entre estos dos tipos de memoria radica en la forma de su medición, para la memoria declarativa se utilizan pruebas de

medición explícitas y para la no declarativa se utilizan pruebas implícitas. Las pruebas explícitas son aquellas que requieren de una búsqueda consciente de la información; y las implícitas son aquellas en que la experiencia altera la conducta inconscientemente.

1.3.3 Memoria espacial

La memoria espacial implica la capacidad para codificar, almacenar y codificar la información acerca de lugares, no es un sistema unitario, si no que compone de múltiples mecanismos cognitivos especializados. Aprender y recordar la localización del alimento, la localización de los depredadores y familiares inmediatos, las vías de evacuación, es quizá una de las formas más esenciales de procesamiento cognitivo en los mamíferos. El estudio de la memoria espacial en animales ha hecho grandes contribuciones para comprender la memoria humana (Bird y Burgess., 2009).

La memoria es altamente dependiente del hipocampo, tanto para animales como para humanos (Sweatt, 2002). Gran variedad de estudios han demostrado que lesiones moleculares o anatómicas en el hipocampo llevan a un deterioro de la memoria espacial, uno de los estudios más importantes propone la teoría del mapa cognitivo (O'keefe y Nadel., 1979). Dicha teoría engloba las estrategias en las que se apoyan los roedores para realizar tareas espaciales, como la táctica (estrategia de guía y orientación), y cartografía (la formación de un mapa del entorno de acuerdo a una estrategia).

Existen evidencias que demuestran que las células del hipocampo, tanto en roedores como en primates, se activan cuando los animales son sometidos a una tarea espacial. Por ejemplo, se encontró que las células piramidales de la región CA1 y CA3 del hipocampo, solo aumentan su actividad cuando una rata pasa por una región particular de una cámara. Cuando los potenciales de acción de dichas células del hipocampo fueron registrados se dispararon, demostrando así, que la actividad de ciertas células depende de la ubicación del animal en un medio ambiente, cuando la rata salió de esta ubicación la actividad de las células se redujo casi por completo. La actividad de cada célula parecía indicar una ubicación específica en el entorno de la rata, por lo que a estas células se les denominó "células de

lugar”, con lo cual se demostró la participación del hipocampo en la memoria espacial (O’keefe y Dostrovsky, 1971).

1.4 Mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria

Desde hace algunas décadas, los científicos han mostrado un gran interés por describir los mecanismos moleculares por los cuales se lleva a cabo el aprendizaje y la memoria. Han propuesto que la información se puede almacenar por medio de cambios en la comunicación sináptica. Santiago Ramón y Cajal propuso una teoría para el almacenamiento de la información, que postula que la información se almacena en el cerebro por medio de cambios anatómicos entre las conexiones de las neuronas. En 1949 se propone que la memoria se forma por un incremento en la fuerza entre las conexiones sinápticas (Balderas y cols., 2004). Posteriormente se descubrió que la estimulación de células del hipocampo provocaba incrementos en la respuesta postsináptica, lo que se denominó potenciación a largo plazo (LTP), que es un incremento sostenido en la fuerza de comunicación sináptica debido a la activación sostenida de una vía (Bliss y Lomo, 1996).

Los mecanismos moleculares por los cuales pudiese explicarse el fenómeno de la LTP, es en primer lugar la acción del glutamato, que aumenta la conductancia de iones, a través de la unión con sus receptores postsinápticos alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropionato (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA). Cuando el glutamato se une a sus receptores AMPA provoca la entrada de Na^+ que lleva a una despolarización de la membrana y en consecuencia la activación de los receptores NMDA que permiten la entrada de Ca^{2+} . El flujo de Ca^{2+} en la postsinapsis activa diversas enzimas como la calcio calmodulina. La activación de la calcio calmodulina provoca la fosforilación de la GluR1 una subunidad del receptor AMPA, esta fosforilación provoca un incremento en la conductancia de sodio y por lo tanto una mayor actividad de la sinapsis, lo que implica que este proceso se lleve a cabo por un mayor tiempo.

También el aumento en la concentración de calcio lleva a la activación de otras enzimas como la adenilato ciclasa que cataliza la conversión de adenosin trifosfato (ATP) a adenosin

monofosfato cíclico (AMPC), el cual activa la proteína cinasa a (PKA), dicha activación provoca que la subunidad catalítica se trasloque al núcleo donde fosforila factores de transcripción como la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB), iniciándose la síntesis de proteínas (Barco y cols., 2006).

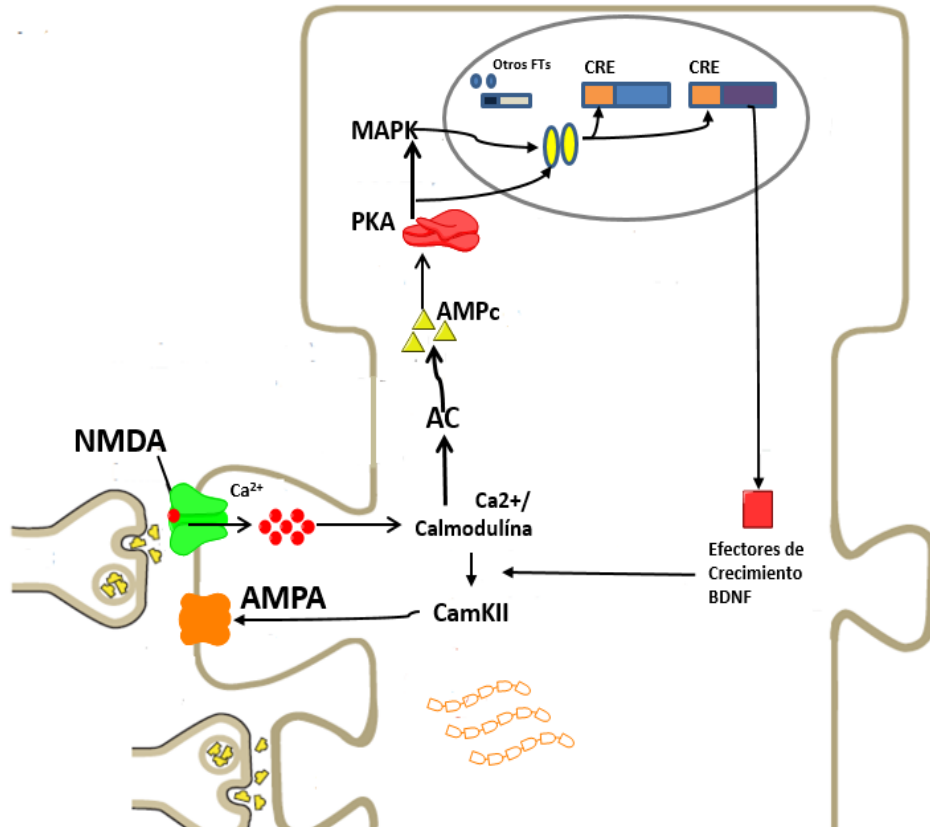


Figura 9. Mecanismo molecular hipotético del aprendizaje y memoria en mamíferos. Tomado y modificado de Barco y cols., 2006.

1.5 El hipocampo es importante en la memoria espacial

Se ha mostrado la importancia del hipocampo en la memoria espacial, ya que cuando se lesiona el hipocampo se causan graves deficiencias en la capacidad de los roedores para aprender y recordar un lugar en el espacio (Morris y cols., 1982). Se ha demostrado que cuando se daña la región CA1 del hipocampo, se causan grandes deficiencias en las tareas de adquisición y de memoria espacial en el laberinto radial de 8 brazos y en el laberinto acuático de Morris en comparación con el daño observado en otras

áreas lesionadas con el GD y la CA3, lo cual sugiere la importancia de la CA1 para resolver este tipo de tareas (Stubley-Weatherly y cols., 1996).

El estudio de procesos cognitivos, como es el aprendizaje y la memoria requiere del uso de modelos experimentales, que pueden ser utilizados para caracterizar las conductas asociadas con la memoria, entre estos se encuentran los laberintos para roedores. Hoy en día, hay una gran variedad de laberintos que son ampliamente utilizados para evaluar el aprendizaje y la memoria en roedores; entre estos laberintos destaca el laberinto acuático, propuesto por Richard G.M. Morris en 1981, fue desarrollado para evaluar el papel de señales visuales específicas, como referencia visual y distal para la memoria espacial en ratas, este requiere de una motivación de supervivencia que es el nado. El aprendizaje es más rápido en este modelo que en otros laberintos (laberinto radial, laberinto circular) posiblemente a la estimulación aversiva. El laberinto acuático se utiliza para evaluar los daños en la memoria que se ven afectados por la acción de una gran variedad de Neurotoxinas, también sirve para evaluar la participación de las estructuras cerebrales implicadas en los procesos de aprendizaje y memoria. Es de importancia señalar que el laberinto acuático de Morris es ampliamente utilizado como modelo para el estudio del daño cognitivo característico en algunas enfermedades neurodegenerativas como lo es la enfermedad de Alzheimer (Frautschy SA. Y cols., 1996).

1.6 El péptido A β

El A β es un péptido de 40-42 aminoácidos (4 kDa), se genera a partir de la ruptura de la proteína precursora del A β (APP). La APP es una glicoproteína transmembrana que posee un dominio largo extracelular N-terminal y un dominio corto citoplasmático C-terminal. La APP es susceptible a la ruptura por proteínas denominadas secretasas (α -secretasa, β -secretasa y γ -secretasa). La actividad de la α -secretasa que corta a la APP impide la formación de A β , debido a que el corte se realiza dentro del dominio A β entre los residuos de lisina 16 y leucina 17 (Lys 16 y Leu 17) (Esch y cols., 1990). Por lo tanto es conocida como la vía no amiloidogénica. La producción del A β es el resultado del procesamiento anormal de la APP y es relacionado con la actividad de la β y γ secretasas

(Shoji y cols., 1992). La β -secretasa lleva a cabo el corte proteolítico de la APP entre los residuos de metionina y aspartato 1 (Met y Asp 1), el Asp 1 corresponde al primer aminoácido del $A\beta$. El evento final de la producción de $A\beta$ es llevado a cabo por la γ -secretasa, la cual realiza su acción en el entorno hidrofóbico de la doble capa lipídica de la membrana celular. La γ -secretasa corta la parte que corresponde al dominio C-terminal del péptido $A\beta$, de esta manera se genera el péptido $A\beta$ de 40-42 aminoácidos, esta ruta es conocida como la vía amiloidogénica (figura 10).

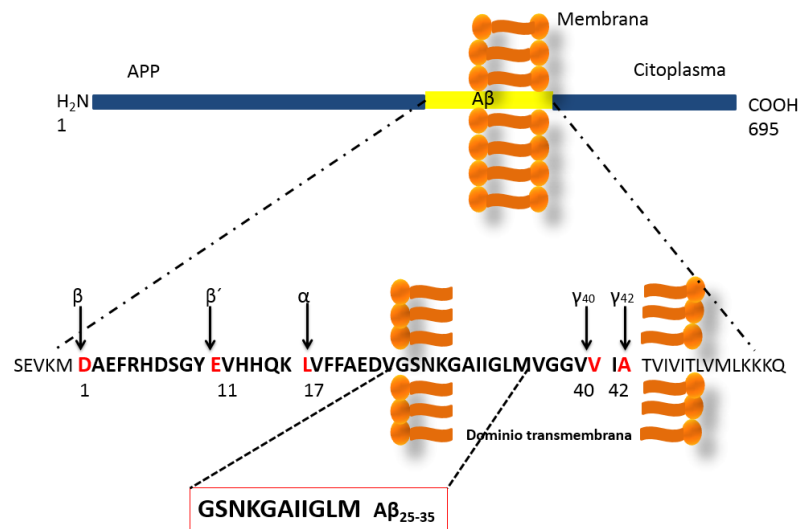


Figura 10. Se muestra la estructura de la APP, posee un dominio extracelular (N-terminal) y un dominio intracelular (C-terminal). En amarillo se representa la fracción $A\beta_{25-35}$, los sitios de hidrólisis realizados por la α , β y γ secretasas se indican con flechas y números iniciando por el extremo N-terminal del $A\beta$. Tomado y modificado de Thinakaran y Koo, 2008.

Diversos estudios han propuesto que la fracción $A\beta_{25-35}$ representa la parte activa de todo el péptido $A\beta$ completo, ya que contiene una gran cantidad de cadenas- β y representa la parte más tóxica del péptido completo (Pike y cols., 1995). El $A\beta_{25-35}$ está formado por 11 aminoácidos (GSNKGAIIGLM) y tiene un peso molecular de 1060 Daltons. Diversos estudios han mostrado que la fracción $A\beta_{25-35}$ es neurotóxica ya que causa retracción axonal y dendrítica, seguida de la muerte neuronal (Yankner y cols., 1990). Estudios in vivo del $A\beta_{25-35}$ han mostrado que su administración en el hipocampo y la corteza inducen un daño similar al ocasionado por el péptido $A\beta_{1-42}$. Por las propiedades que ha mostrado, el $A\beta_{25-35}$ ha sido utilizado como modelo para estudiar la toxicidad del $A\beta$ como ocurre en la EA.

1.6.1 El $A\beta_{25-35}$ en procesos conductuales

Se ha mostrado que la administración del $A\beta_{25-35}$ puede dañar la memoria de corto y largo plazo en ratas (Olariu y cols., 2001). Efecto que se mantiene incluso después de 6 meses después de realizar la lesión. Los resultados de estudios con $A\beta_{25-35}$ demuestran que daña la memoria en el laberinto en Y, e incluso este daño se observa 17, 36 y 180 días después de la lesión. También daña la memoria de corto plazo de tipo no espacial en una tarea de reconocimiento social 110 días después de la lesión y la memoria espacial en un laberinto radial de ocho brazos, pero no daña la memoria de largo plazo en las cajas de evitación pasiva (Stepanichev y cols., 2003).

Al realizar una sola administración del $A\beta_{25-35}$ a una concentración de 10 nM en los ventrículos, se observa un déficit en la memoria de trabajo y de referencia cuando los animales son entrenados en el laberinto radial de ocho brazos (Holscher y cols., 2007). Cuando se administra al mismo péptido a una concentración de 15 nM en los ventrículos ocasiona muerte de neuronas principalmente de la región CA1 del hipocampo, además se evaluó el número de errores cometidos por los animales en el laberinto radial de ocho brazos, se encontró que la disminución del número de neuronas se correlacionaba directamente con el número de errores. Estos datos indican que el déficit en el aprendizaje y memoria inducidos por el $A\beta_{25-35}$ están relacionados con un daño en la región CA1 del hipocampo (Stepanichev y cols., 2004).

En el laboratorio de neurofarmacología se ha mostrado que la administración del $A\beta_{25-35}$ con una concentración de 100 μ M administrados en hipocampo y corteza temporal de rata, induce un déficit en procesos de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto radial de ocho brazos y en el laberinto acuático de Morris (Pérez-Severiano y cols., 2004; Limón y cols., 2009). Así como también se ha analizado el efecto de diferentes concentraciones del $A\beta_{25-35}$, que van desde concentraciones nM hasta mM, en la región CA1 del hipocampo, demostrando que el $A\beta_{25-35}$ puede generar un déficit en el aprendizaje y la memoria de ratas en el laberinto radial de ocho brazos (García Tela. tesis de licenciatura. 2009)

1.6.2 Toxicidad del A β ₂₅₋₃₅

Se ha mostrado que el A β ₂₅₋₃₅ contiene un residuo de metionina en la posición 35 (Met35), este residuo resulta ser clave para la formación de radicales libres y por consiguiente el desarrollo de estrés oxidativo (Butterfield y Kanski, 2002). Por otra parte se ha estudiado el efecto del A β ₂₅₋₃₅ en algunos modelos conductuales, se ha encontrado que es capaz de disminuir los procesos de aprendizaje y memoria en el laberinto radial de 8 brazos, laberinto acuático de Morris y el laberinto en Y (Stepanichev y cols., 2003, 2004; Limón et al., 2009), probablemente efecto de la neurodegeneración de dicho péptido. El A β ₂₅₋₃₅ puede incrementar la concentración de especies reactivas de oxígeno, así como la oxidación de lípidos probablemente como resultado de una alteración en la homeostasis del Ca²⁺. El deterioro en la homeostasis del Ca²⁺ está involucrado en la disfunción sináptica y muerte neuronal en la EA. Por otra parte, el péptido A β puede inducir una disminución de los receptores de insulina en las membranas de las neuronas y afectar la actividad de diversas cinasas que participan en la potenciación a largo plazo (Towsend y cols., 2007). También puede inhibir a los receptores de captura de glutamato, produciendo un incremento de dicho neurotransmisor en la sinápsis y ocasionando una sobre activación de los receptores alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropionato (AMPA) y N-metil-D-aspartato (MND A) (Fernandez-Tome. 2004). Se ha demostrado que el A β ₂₅₋₃₅ tiene afinidad a los sitios de glutamato y glicina del receptor MND A (Cowburn., 1997). La sobre activación de este receptor da como resultado un proceso de excitotoxicidad, al alterar la homeostasis a nivel intracelular, lo que ocasiona la activación de diversas enzimas entre ellas las sintasas de óxido nítrico (NOS). Como consecuencia de esta cascada de señalización activada por el A β ₂₅₋₃₅, hay un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que genera peroxidación de lípidos, daño a la mitocondria, nitración de proteínas y finalmente la muerte neuronal (Torreilles, 1999). Cabe señalar que el NO juega un papel importante en el daño excitotóxico, además se ha demostrado que está implicado en la toxicidad del A β ₂₅₋₃₅, por ejemplo, se ha demostrado que cuando se administra el péptido en la corteza

temporal de rata genera un aumento en la concentración de óxido nítrico NO así como provocar un aumento en el daño (Limón y cols., 2009).

1.7 Papel del Óxido nítrico en el daño ocasionado por el A β ₂₅₋₃₅

El óxido nítrico (NO) es una molécula diatómica, hidrofóbica, altamente reactiva, con un tiempo de vida corta, aproximadamente 5 segundos, se difunde libremente a través de la membrana celular, de acuerdo a su gradiente de concentración. Se define como un radical libre que es rápidamente oxidado en el ambiente, por lo que no puede ser almacenado (Guzmán Grenfell A. y cols., 2006).

El NO es sintetizado por una familia de enzimas denominadas sintetas del óxido nítrico (NOS), las cuales requieren de los cofactores FMN, el FAD y el NADPH para catalizar la reacción de L-arginina a L-citrulina y una molécula de NO. El óxido nítrico tiene un papel muy importante a nivel periférico en la dilatación de los vasos sanguíneos, citotoxicidad contra patógenos y tumores, coordinación del ritmo cardíaco y regulación de la actividad respiratoria celular. En el sistema nervioso central se propone que el NO participa en procesos de neurotransmisión y directamente en procesos de proliferación, diferenciación y sinaptogénesis. Sin embargo, existen sustancias como el A β ₂₅₋₃₅ que tiene la capacidad de aumentar las concentraciones basales de NO (Limón y cols., 2009) (ver fig. 11). En el laboratorio de Neurofarmacología han mostrado que la administración intrahipocampal de A β ₂₅₋₃₅ aumenta las concentraciones de NO en el hipocampo, la corteza frontal, la corteza temporal y la corteza parietal debido a que el A β ₂₅₋₃₅ incrementa la activación de las enzimas nNOS e iNOS. Este proceso ocasiona la producción incontrolada de NO y con ello promueve la neurodegeneración.

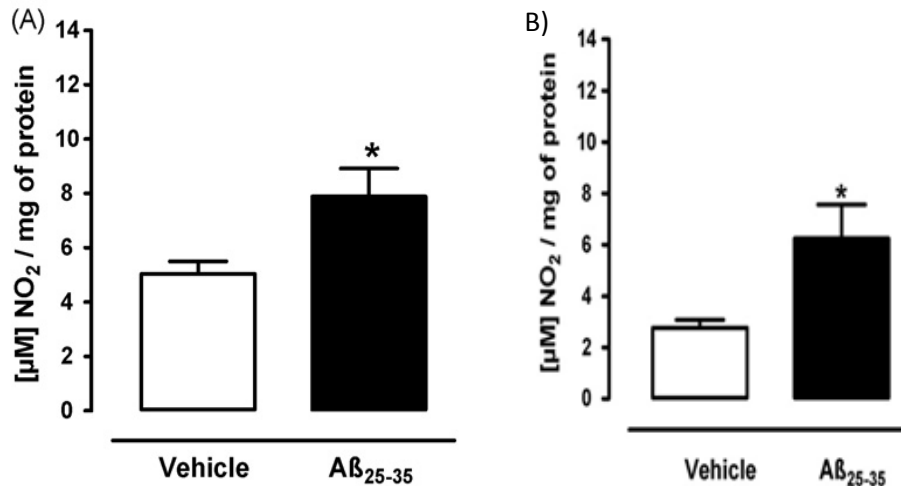


Figura 11. Efecto de la administración del Aβ₂₅₋₃₅ en la corteza temporal, sobre los niveles de óxido nítrico en corteza temporal e hipocampo de ratas. En A y C se muestra los niveles de óxido nítrico para la corteza temporal e hipocampo del grupo control y el grupo con Aβ₂₅₋₃₅. Los valores son representados como la media de los nitritos en [μM]/ mg de proteína ± ESM P < 0.05 con una t de student. (Limón y cols., 2009).

El óxido nítrico tiene la capacidad de aumentar la concentración de radicales libres, al inhibir la fosforilación oxidativa, ya que se une al grupo hemo de la cadena transportadora de electrones (complejos I y IV mitocondrial) y provoca la muerte neuronal por deficiencia de ATP (Moncada y Bolaños., 2006). Además es capaz de interactuar con el ion superóxido (O²⁻) para formar el peroxinitrito (ONOO⁻) (Stewart., 2002). El ONOO⁻ es una molécula altamente inestable, al disociarse en más radicales como el radical hidroxilo y el dióxido de nitrógeno, estas sustancias son capaces de provocar la peroxidación lipídica, que da por resultado la activación de la glía, que a su vez incrementa la liberación de radicales libres. En las neuronas, el ONOO⁻ es capaz de dañar a los neurofilamentos, ya que nitra los residuos de tirosina en algunas proteínas.

II JUSTIFICACIÓN

Estudios tanto *in-vitro* como *in-vivo* han mostrado que el péptido amiloide- β ejerce un efecto tóxico sobre neuronas de tipo colinérgico. En el laboratorio de Neurofarmacología se han realizado estudios sobre el modelo $A\beta_{25-35}$ en los cuales se ha abordado el estudio de diferentes regiones cerebrales como el hipocampo, la corteza frontal, la corteza temporal y la amígdala entre otros. Sin embargo, en la actualidad se conoce que no solo estas regiones se ven afectadas en diferentes tipos de demencias si no también regiones como el cerebro basal anterior. Colom y cols. (2011), demostró que la inyección intrahipocámpal del $A\beta$ (1-40) daña las neuronas del *septum* medial en ratas. El núcleo septal, que forma parte del cerebro basal anterior, se ve afectado en enfermedades neurodegenerativas como EA.

Por otra parte, estudios recientes han mostrado que la lesión del *septum* medial causa déficit en procesos de aprendizaje y la memoria, al igual que en estudios electrofisiológicos se evidencia una disminución en la actividad eléctrica de la formación hipocámpal. Por lo tanto, la pérdida progresiva de las entradas colinérgicas hacia la formación hipocámpal en pacientes con enfermedad de Alzheimer, contribuye al daño en procesos como la adquisición de la información, así como su almacenamiento, características sintomatológicas de la enfermedad. La fracción $A\beta_{25-35}$ mimetiza los efectos tóxicos del péptido completo ($A\beta_{1-42}$), este péptido es capaz de dañar la memoria y causar eventos neurodegenerativos, por mecanismos como excitotoxicidad, estrés oxidativo y nitrosativo y neuroinflamación, cuando es administrado en la corteza temporal o en el hipocampo. Sin embargo aún hay interrogantes sobre si la administración del Amiloide- β_{25-35} en el *septum* medial es capaz de incrementar el estrés nitrosativo y la lipoperoxidación, y si este daño es dependiente de la concentración de Amiloide- β_{25-35} , es por ello que buscamos examinar en un modelo *in-vivo* si el daño en la adquisición y la memoria ocasionado por Amiloide- β_{25-35} al ser administrado de manera intraseptal se relaciona con la concentración inyectada.

III HIPÓTESIS

El deterioro en la adquisición y la recuperación de la memoria dependiente del circuito septo-hipocampal depende de la concentración administrada del péptido $A\beta_{25-35}$ en dicho circuito.

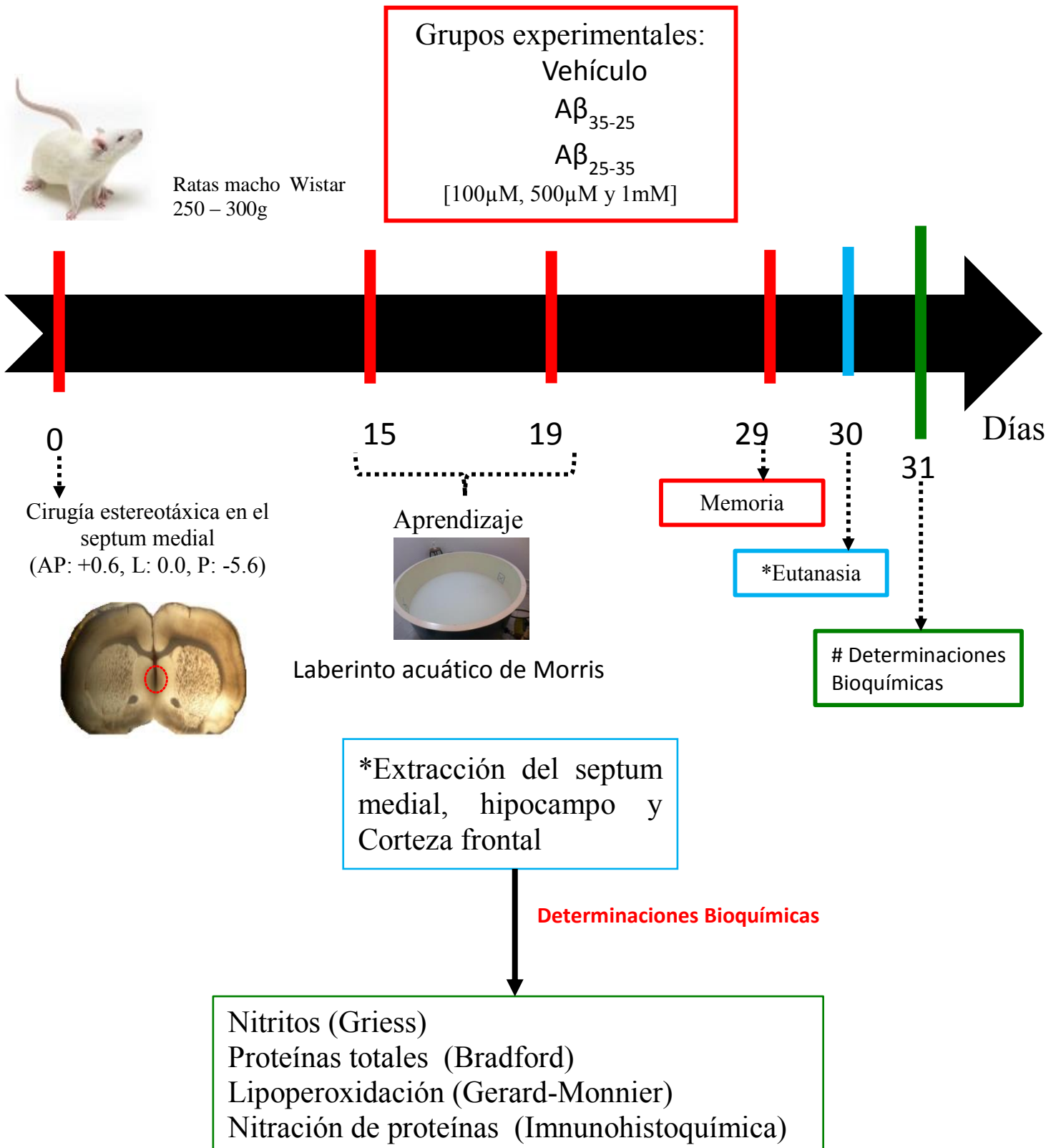
IV OBJETIVO GENERAL

- ❖ Estudiar el efecto a diferentes concentraciones de $A\beta_{25-35}$ en el circuito *septo-hipocampal* sobre de memoria espacial, estrés nitrosativo y la lipoperoxidación en rata.

V OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Evaluar el efecto a diferentes concentraciones de $A\beta_{25-35}$ en el circuito *septo-hipocampal* sobre la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.
- ❖ Evaluar el efecto a diferentes concentraciones del $A\beta_{25-35}$ sobre el estrés nitrosativo en el circuito *septo-hipocampal*.
- ❖ Evaluar el efecto a diferentes concentraciones del $A\beta_{25-35}$ sobre la lipoperoxidación en el circuito *septo-hipocampal*.

VI DIAGRAMA DE TRABAJO



VII METODOLOGIA

7.1 Sujetos de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, proveniente del bioterio Claude Bernard de la BUAP, con un peso aproximado de 250-300 g. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico transparentes, con acceso libre de agua y alimento, la estancia de los animales se mantuvo a una temperatura de 24 °C y con ciclos luz/oscuridad, de 12/12 horas. El sustentante del presente trabajo cursó y aprobó la capacitación teórica y práctica de “manejo y vías de administración en ratas de laboratorio” impartido por el Bioterio Claude Bernard de la BUAP.

7.2 Preparación del péptido A β ₂₅₋₃₅

La solución stock del fragmento A β ₃₅₋₂₅ y A β ₂₅₋₃₅ se encontraban a una concentración de 1mM, almacenada a -80°C. Para la cirugía estereotáxica se prepararon diferentes soluciones a diferentes concentraciones del péptido A β ₂₅₋₃₅ (Sigma Aldrich) (100 μ M, 500 μ M y 1 mM) y su fracción reversa a las mismas concentraciones A β ₃₅₋₂₅ (que su utilizó como control) a partir de una solución stock. Cada solución se incubó en baño maría a una temperatura de 37 °C por 36 horas.

7.3 Administración del péptido A β ₂₅₋₃₅

Los animales fueron seleccionados al azar para formar los grupos control y los grupos problema. Los grupos control recibieron cada una de las diferentes concentraciones de A β ₃₅₋₂₅, con una $n=12$ y los grupos problema recibieron cada una de las diferentes concentraciones de A β ₂₅₋₃₅ con una $n=12$.

7.4 Cirugía estereotáxica

Para poder realizar la lesión intraseptal, cada animal fue anestesiado con solución de ketamina/xilacina a una dosis de 70:10 mg/kg por vía intraperitoneal. Posteriormente

los animales fueron afeitados antes de realizar la incisión. Con ayuda del aparato estereotáxico para roedores pequeños (Stoelting Co. Wood Dale, figura 12), se sujetaron al marco del aparato con ayuda de las barras auditivas, se realizaron los procedimientos quirúrgicos asépticos necesarios en el área donde se realizó la incisión, la cual fue aproximadamente de 1.5 cm. Se remueve el periostio y se localizó los puntos de referencia estereotáxica; bregma y lambda. Basándonos en el atlas de Paxinos y Watson (1998) se tomarán coordenadas para el septum medial, AP: +0.6, L: 0.0, P: -5.6. Posteriormente se realizó una perforación con un taladro para proceder a administrar 2 μ L de $A\beta_{25-35}$ o $A\beta_{35-25}$ en sus diferentes concentraciones.

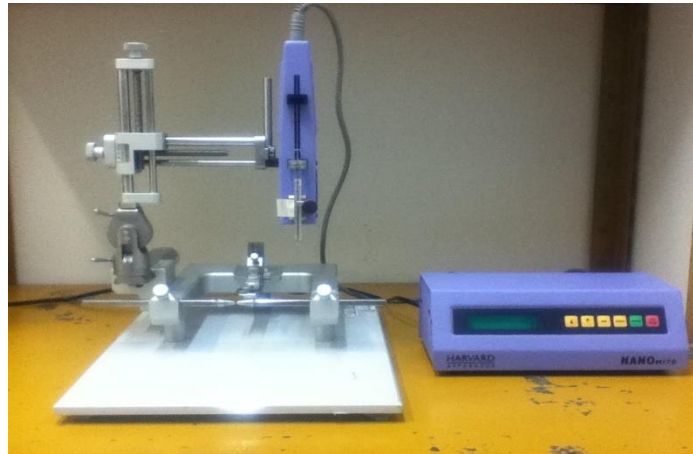


Figura 12. Aparato de cirugía estereotáxica y bomba de infusión. En la imagen, a la derecha se muestra el aparato de cirugía estereotáxica para pequeñas especies (Stoelting Co) y a la izquierda la bomba de infusión (Harvard Apparatus).

7.5 Protocolo de las pruebas conductuales

Una de las pruebas más comúnmente utilizadas por los investigadores para el estudio de la memoria espacial, es el laberinto acuático diseñado por Morris. La prueba se desarrolla en una tina circular dividida en cuatro cuadrantes imaginarios (designados como noroeste, suroeste, noreste y sureste) que dispone de una plataforma móvil, designada como torre de escape, oculta y parcialmente sumergida. En uno de los cuatro cuadrantes se sitúa la torre de escape, que debe quedar a una altura de 0.5-1 cm por debajo del nivel del agua. Las dimensiones de la tina son de 1.50 m de diámetro y 80 cm de alto, la cual contiene en su interior un cilindro de 40 cm de alto y 15 cm de diámetro, el cual es conocida

como torre de escape, a dicha torre la cubre agua coloreada con dióxido de titanio para que no sea visible, la torre permanecerá en el cuadrante IV durante todo el experimento (figura 13). La prueba de aprendizaje consiste de cinco días consecutivos de evaluación. El primer día de la evaluación los sujetos realizan un total de cuatro ensayos, teniendo como tiempo límite 90 segundos para localizar la torre de escape y retirarlos de la tina, en dado caso que no puedan localizar la torre de escape se les conduce sobre el agua hacia la localización de la torre de escape, se les da un tiempo de 20 segundos para que reconozca su entorno lo cual le ayudará a recordar la ubicación de la torre de escape en posteriores ensayos. Cada ensayo consiste en colocar a los sujetos de experimentación dentro de la tina desde cada uno de los puntos cardinales, empezando por sur, este, norte y finalmente oeste. A partir del segundo día y hasta el quinto día los sujetos se colocan en el laberinto acuático de Morris, desde cada uno de los puntos indicados en el primer día con un total de 4 ensayos por día. Se contabilizó el tiempo de latencia para localizar la torre de escape con un tiempo límite de 90 segundos en cada ensayo y el número de visitas a los cuadrantes por ensayo.

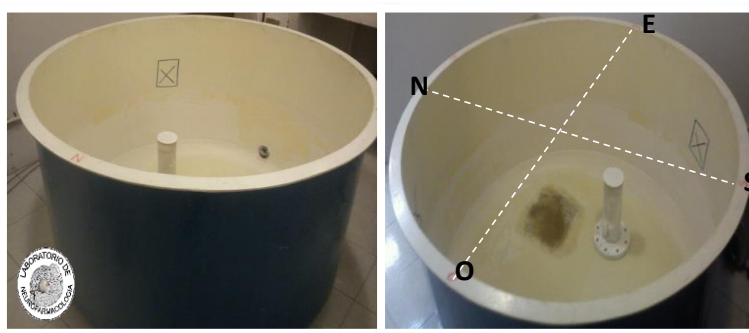


Figura 13. Laberinto acuático de Morris. Fotografía tomada en el laboratorio de Neurofarmacología FCQ-BUAP. Para los resultados obtenidos se cuantifica el tiempo de latencia a partir de cada cuadrante hasta llegar a la plataforma de escape, cubierta por un líquido coloreado, en un tiempo no mayor a 90 segundos.

7.5.1 Protocolo de la prueba de memoria

La prueba de memoria se realizó diez días después de que finalizó la prueba de un solo día con un total de 4 ensayos, el procedimiento es similar solo que la torre de escape se retira de la tina, esto con el fin de que los animales recordaran donde se localizaba la torre de escape, se evaluó el tiempo de latencia al primer cruce por el punto donde se

localizaba la plataforma con un tiempo no mayor a 90 segundos y se contabilizó el número de visitas y el tiempo que permanecen en cada cuadrante.

7.6 Obtención de la muestra

Finalizada la prueba de memoria espacial, se aplicó eutanasia a los animales por decapitación, se extrajo el cerebro para ser colocado rápidamente en una base fría y posteriormente disecar los núcleos; septum medial, hipocampo y corteza frontal. Los núcleos se homogenizaron con una solución buffer de fosfatos (pH= 7.4), con ayuda de un homogeneizador con pistón de teflón, para después centrifugarlos a 12500 rpm durante 30 minutos a una temperatura de 4°C, en una microcentrifuga (Hittech 200R, UK). El sobrenadante se recolectó de cada una de las muestras para cuantificar el índice de peroxidación de lípidos por el método de Gerard-monnier, la concentración de nitritos (NO₂) por la reacción de Griess (modificada para microplaca) (Muñoz y cols, 2003), y proteínas totales por la técnica de Bradford, 1976.

7.7 Determinación de peroxidación de lípidos

Fundamento (método de Gerard-Monnier)

El malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenes son importantes productos tóxicos de la lipoperoxidación (oxidación de ácidos grasos), se forman de la ruptura de ácidos grasos poliinsaturados, la cuantificación de las cantidades de tales aldehídos es un índice adecuado para la cuantificación de la magnitud de las reacciones de lipoperoxidación.

Este ensayo se basa en la reacción entre N-metil-2-fenilindol con malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxi-alquenes (4-HDA) a 45°C y en un medio ácido. Una molécula de MDA o 4-HDA reaccionan con dos moléculas de N-metil-2-fenilindol, proporcionando un cromóforo estable que absorbe a 586 nm. El empleo de esta longitud de onda y de la temperatura de incubación (45°C) minimiza las interferencias presentes en otros métodos para determinar aldehídos, derivados del proceso de peroxidación lipídica.

Metodología

La peroxidación de lípidos se cuantificó en el septum medial, hipocampo y corteza frontal, mediante el método de Gerard-Monnier.

Se tomó una alícuota del homogenizado que se obtuvo previamente. A esta alícuota se le añadió 650 μL de N-metil-2-fenilindol 10.3 mM (el cual contenía 38 mg de N-metil-2-fenilindol, 18 ml de acetonitrilo y 6 ml de metanol), seguido de 100 μL de agua y 150 μL de ácido metanosulfónico, posteriormente se agitaron las muestras y se incubaron las muestras a 45°C en baño maría por 60 minutos. Posteriormente se dejó enfriar las muestras para centrifugarlas 3000 rpm durante 15 minutos. Se tomó el sobrenadante, cada muestra fue analizada por triplicado y leídas en el espectrofotómetro UV-Visible (VARIAN) a 586 nm. Los niveles de lipoperoxidación se registraron como nmol de malondialdehído (MDA), al extrapolar los datos en la curva de calibración.

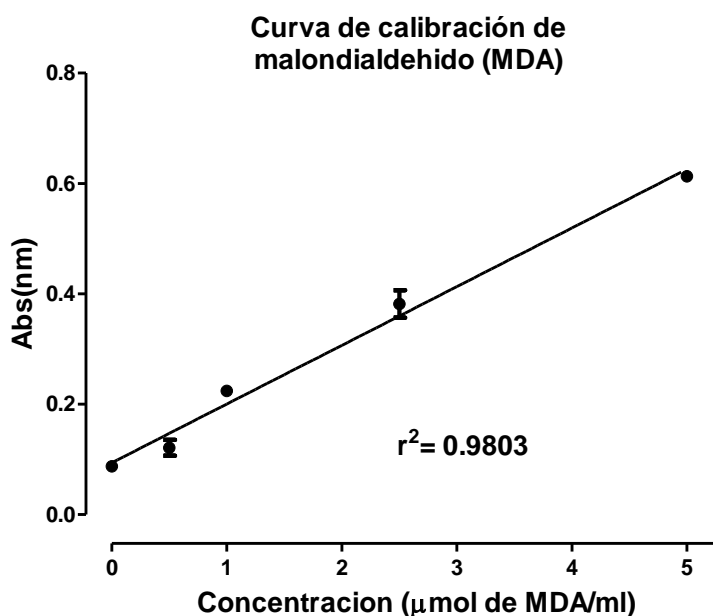


Figura 14. Curva de calibración de malondialdehído (MDA) por el método de Gerard-monnier. Se realizó una curva de calibración con concentraciones desde 0 hasta 5 μM .

7.8 Determinación de nitritos y proteínas totales

El óxido nítrico se cuantificó en el septum medial, hipocampo y corteza frontal como (NO_2) un metabolito estable de NO con ayuda de una técnica espectrofotométrica basada en la reacción de Griess. Esta técnica utiliza nitrito de sodio (Sigma Co) [0.1M] como solución estándar para elaborar una curva de calibración, sulfanilamida (Sigma Co) al 1%, dihidrocloruro de N-naftiletilendiamina 0.1%. Se adicionan volúmenes iguales (200 μL) al sobrenadante de las muestras homogenizadas (200 μL). Las muestras se procesan por triplicado y se lee a una longitud de onda de 540 nm. Las concentraciones de nitritos se obtendrán al extrapolar los datos de absorbancia en la curva de calibración.

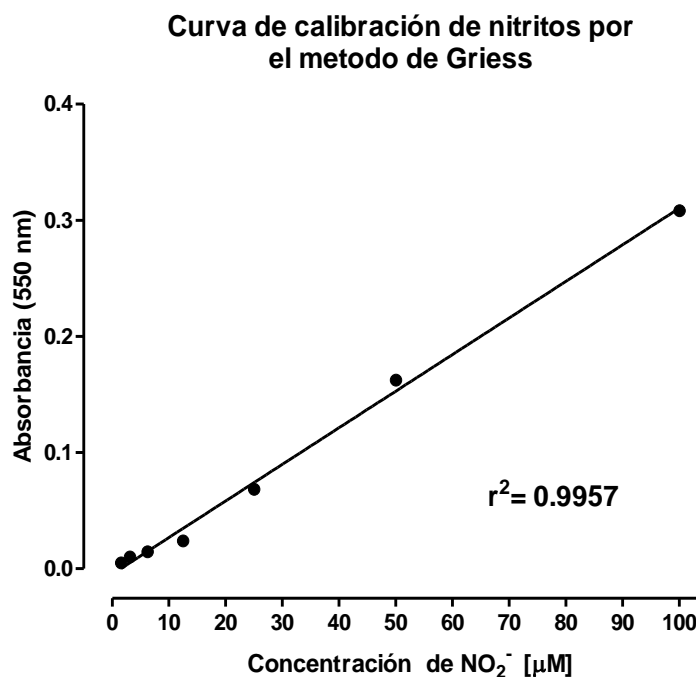


Figura 15. Curva de calibración de nitritos (NO_2), realizada por la técnica de Griess. Se realizó una curva de calibración con concentraciones desde 1.56 hasta 100 μM .

7.8.1 Determinación de proteínas totales

Fundamento

Esta técnica está basada en la reacción de los aminoácidos de la muestra con una mezcla de azul brillante de coomassie R-250 (reactivo de Bradford). Los aminoácidos

producen compuestos de color azul característicos, cuya intensidad está en función de la concentración de los aminoácidos.

Metodología

Las proteínas totales se determinarán por la reacción de Bradford, en los núcleos septum medial, hipocampo y corteza frontal. Mediante la construcción de una curva de calibración de albumina de suero bovino (ABS). Se prepararon a partir de una solución stock de ABS (0.25 mg/ml) a concentraciones de 0.0125, 0.0250, 0.0375, 0.0750, 0.1500, 0.1875 y 0.2250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (=mg/ml). Las muestras fueron diluidas de la siguiente manera: hipocampo 1:20, corteza frontal 1:20, el *septum medial* no fue diluido. Para determinar la cantidad de proteína, se toma un volumen de 20 μL del homogenizado y se coloca en una placa por triplicado, se agregan 180 μL del reactivo de Bradford y se leen las muestras a 630 nm. Para conocer la concentración de proteína de las muestras solo basta con interpolar los valores de la absorbancia en la curva de calibración.

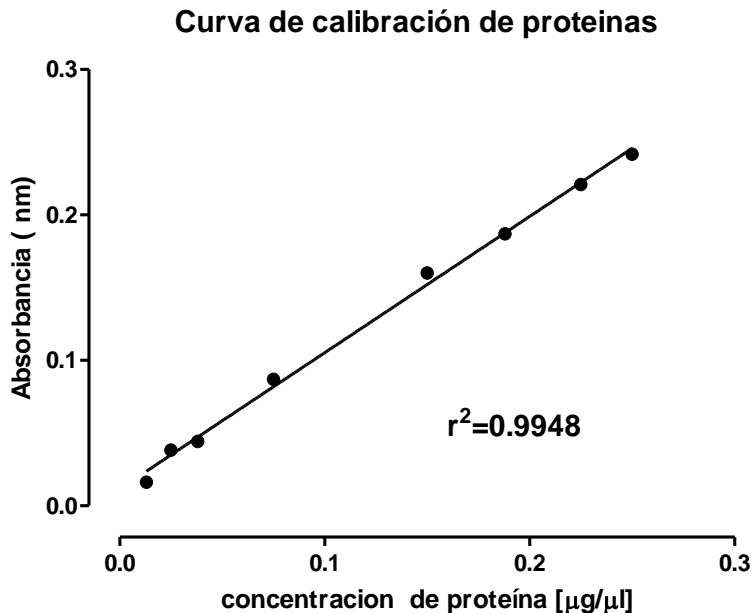


Figura 16. Curva de calibración de proteínas, por la técnica de Bradford. Se realizó una curva de calibración con concentraciones desde 1 hasta 20 μg .

7.8.2 Normalización de Malondialdehído y NO_2^- por miligramo de proteína

Para graficar los datos de la concentración de malondialdehído y NO₂ se realizaron las normalizaciones de cada núcleo. La normalización consistió en obtener el cociente de las concentraciones de MDA o de NO₂⁻ entre los miligramos de proteína, contenidos en 20 microlitros de muestra.

7.9 Muestras para incluir en parafina y cortes

Un día después de terminada la prueba conductual, se realizó el sacrificio de los animales (3por grupo), se anestesiaron con ketamina-xilazina (100:13.3 mg/kg) para realizar perfusión intracardiaca (con SSI y, paraformaldehído al 4%). Los cerebros se extrajeron y colocaron en solución de paraformaldehído al 4% por un tiempo de 3 días. Posteriormente se realizó la inclusión en parafina de los tejidos de la siguiente manera: se realizó un corte del cerebro coronalmente a la altura de las estructuras de interés, para introducir estas secciones en cassettes de inclusión. Se realizó la deshidratación de los tejidos, primeramente con agua destilada por un lapso de 30 min, continuando con alcohol de concentraciones crecientes (alcohol al 80%, alcohol al 96%, alcohol al 100% (2veces), etanol-xilol y finalmente xilol por 1 hora cada uno. Posteriormente fueron colocados en parafina fundida por una hora, para finalmente ser incluidos en parafina con ayuda de unas placas de metal, las cuales nos permiten obtener bloques de parafina. Finalmente los bloques fueron sometidos a cortes con ayuda de un micrótopo (Leica RM2125) con un grosor de entre 5-8 micras y colocados en portaobjetos previamente gelatinizados.

7.9.1 Inmunohistoquímica para 3-nitrotirosina

La detección de 3-nitrotirosina se realizó por inmunofluorecencia. El procedimiento es el siguiente: se hidrataron los cortes coronales de cerebro tratándolos con las soluciones siguientes: xilol2, xilol1, etanol al 100%2, etanol al 100% 1, etanol al 96% y etanol al 80%, hasta agua destilada por 5 min cada uno. Posteriormente se realiza una exposición antigénica con ayuda de un buffer de citratos (citrato de sodio 0.1 M y ácido cítrico 0.1 M, pH=6) por un lapso de 1.5 min. Se hizo un lavado de los tejidos 3 veces con una solución

que es una mezcla de buffer de fosfatos (PBS, pH=7.4) y triton al 2%. Se continua con la incubación de los tejidos con solución de albumina de suero bovino al 1% durante 2 horas en una cámara húmeda, se realiza un segundo lavado con PBS para posterior incubación con tritón X-100 al 0.2% durante 10 min. Se realizan tres lavados con solución de PBS. Enseguida se incuba el anticuerpo primario anti 3-NT dilución A 1:200 durante toda una noche a 4 °C en cámara húmeda; al día siguiente se realizan tres lavados con solución PBS y posterior incubación con el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC, cabra, anti-mouse, 1:100, Jackson InmunoResearch) por 2 h a temperatura ambiente, en oscuridad. Finalmente se realizan tres lavados y se montan con Vecta-Shield conjugado con DAPI (4,6- diamino-2-fenilindol).

VIII RESULTADOS

8.1 Determinación del sitio de lesión

Como parte importante de este trabajo fue necesario corroborar el sitio de lesión en la región del *septum* medial, la cual fue comprobada mediante una microinyección con 1 μ L de azul de metileno al 2 %, se tomaron por referencia las coordenadas propuestas por Paxinos y Wattson en 1998.

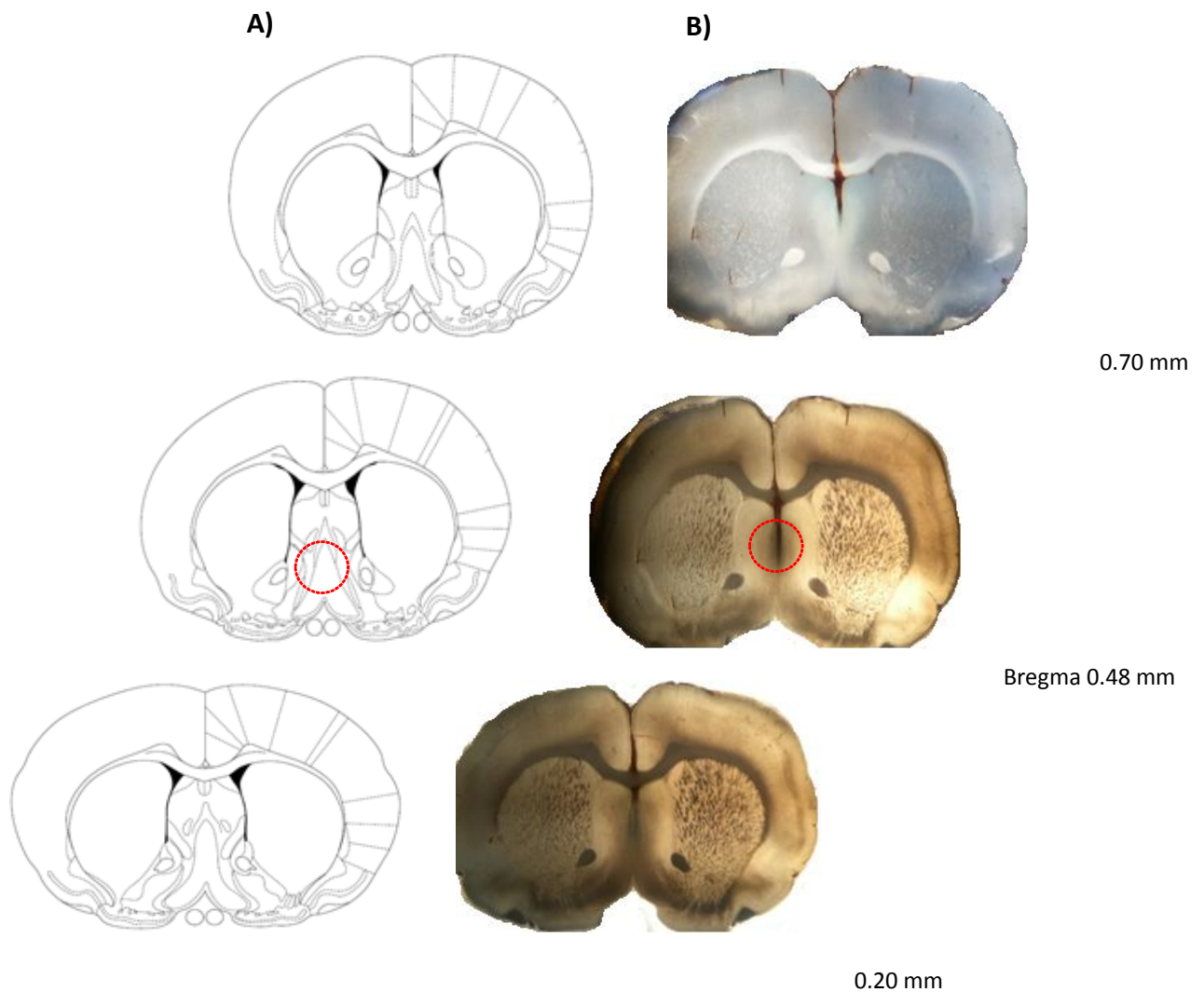


Figura 17. Localización del sitio de lesión. En el panel B) se puede observar la trayectoria de la cánula, mediante una microinyección con azul de metileno. En el panel A) se muestran las regiones donde se localiza la lesión conforme al atlas de Paxinos y Wattson (1998).

8.2 Efecto de diferentes concentraciones del péptido A β ₂₅₋₃₅ en el *septum medial* sobre el aprendizaje y memoria

La prueba de aprendizaje espacial se realizó en el laberinto acuático de Morris 15 días después de la administración del A β ₂₅₋₃₅ (a diferentes concentraciones) en el *septum medial*, la prueba tuvo una duración de cinco días, con 4 ensayos por día, con el objetivo de que los animales aprendieran a localizar la plataforma de escape, que se localizaba en el cuadrante 4 durante toda la prueba, en un tiempo no mayor a 90 segundos.

El primer parámetro analizado fue el tiempo de latencia al escape. Durante la prueba de aprendizaje los sujetos de experimentación de todos los grupos muestran una reducción de sus tiempos de latencia al pasar de los días y los ensayos, lo cual nos indica que el proceso de aprendizaje se llevaba a cabo correctamente, sin embargo, en el primer día de prueba se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos A β ₃₅₋₂₅ [1 mM] vs A β ₂₅₋₃₅ [100 μ M] (* p <0.05), y entre los grupos A β ₂₅₋₃₅ [1mM] y A β ₂₅₋₃₅ [100 μ M] (## p <0.01). En el segundo día de aprendizaje se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos A β ₃₅₋₂₅ [500 μ M] vs A β ₃₅₋₂₅ [100 μ M] (\$ p <0.05), A β ₂₅₋₃₅ [500 μ M] vs A β ₂₅₋₃₅ [100 μ M] (&& p <0.01) y entre los grupos A β ₃₅₋₂₅ [500 μ M] vs A β ₂₅₋₃₅ [100 μ M] (%% p <0.001) (figura 18 A).

La evaluación de la memoria se realizó diez días posteriores a la prueba de aprendizaje, que consistió en realizar cuatro ensayos en un solo día. El objetivo de la prueba fue evaluar la capacidad de los sujetos de experimentación para localizar la plataforma de escape, la cual fue retirada previamente. En la prueba de memoria se cuantificó y comparó el tiempo de latencia al primer cruce por el punto donde se localizaba la plataforma de los diferentes grupos experimentales, observando que el grupo administrado con A β ₂₅₋₃₅ [1 mM] presentó un incremento en el tiempo de latencia, en un 202% respecto de su grupo control (A β ₃₅₋₂₅[1mM]), para cruzar por el punto donde se localizaba la plataforma de escape, encontrando diferencia estadísticamente significativa entre dichos grupos (* p <0.05) (figura 18 B).

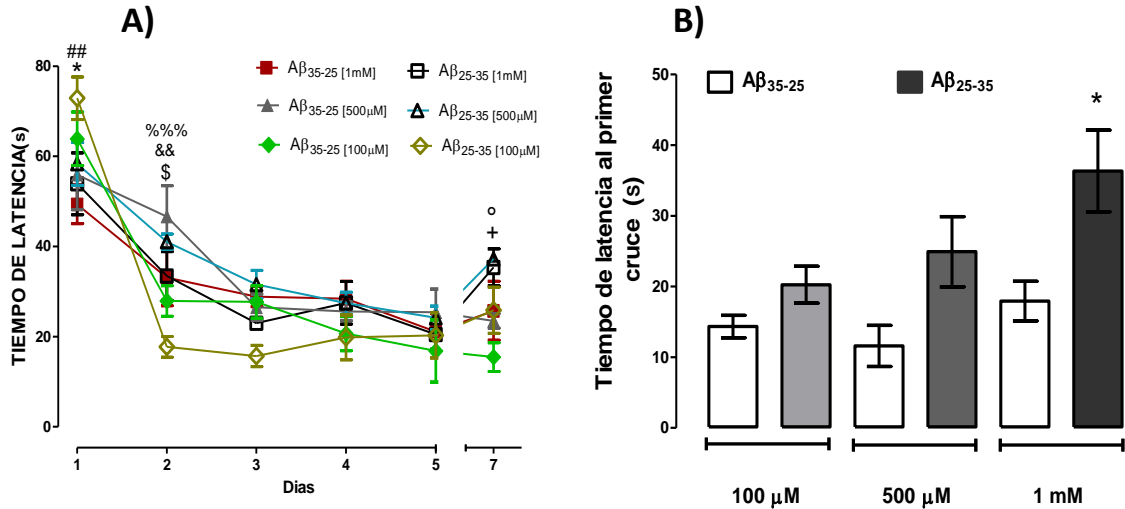


Figura 18. Prueba de aprendizaje evaluada en el laberinto acuático de Morris. En la figura A) se muestra el tiempo de latencia al escape, durante el aprendizaje y la memoria, de los grupos administrados con la fracción reversa del Amiloide beta a diferentes concentraciones $A\beta_{35-25}$ y de los grupos administrados con la fracción $A\beta_{25-35}$ también a diferentes concentraciones. Los datos fueron analizados con una ANOVA de dos vías con una post-test Bonferroni. * $p < 0.05$ ($A\beta_{25-35}$ [1mM] vs $A\beta_{25-35}$ [100μM]), ## $p < 0.01$ ($A\beta_{35-25}$ [1mM] vs $A\beta_{25-35}$ [100μM]), \$ $p < 0.05$ ($A\beta_{35-25}$ [500μM] vs $A\beta_{35-25}$ [100μM]), && $p < 0.01$ ($A\beta_{25-35}$ [500μM] vs $A\beta_{25-35}$ [100μM]), %%% $p < 0.001$ ($A\beta_{35-25}$ [500μM] vs $A\beta_{25-35}$ [100μM]), + $p < 0.05$ ($A\beta_{25-35}$ [1mM] vs $A\beta_{35-25}$ [100μM]), ° $p < 0.01$ ($A\beta_{25-35}$ [500μM] vs $A\beta_{35-25}$ [100μM]). La figura B) muestra el tiempo de latencia al primer cruce en la prueba de memoria. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía con una post-test Bonferroni. * $p < 0.05$.

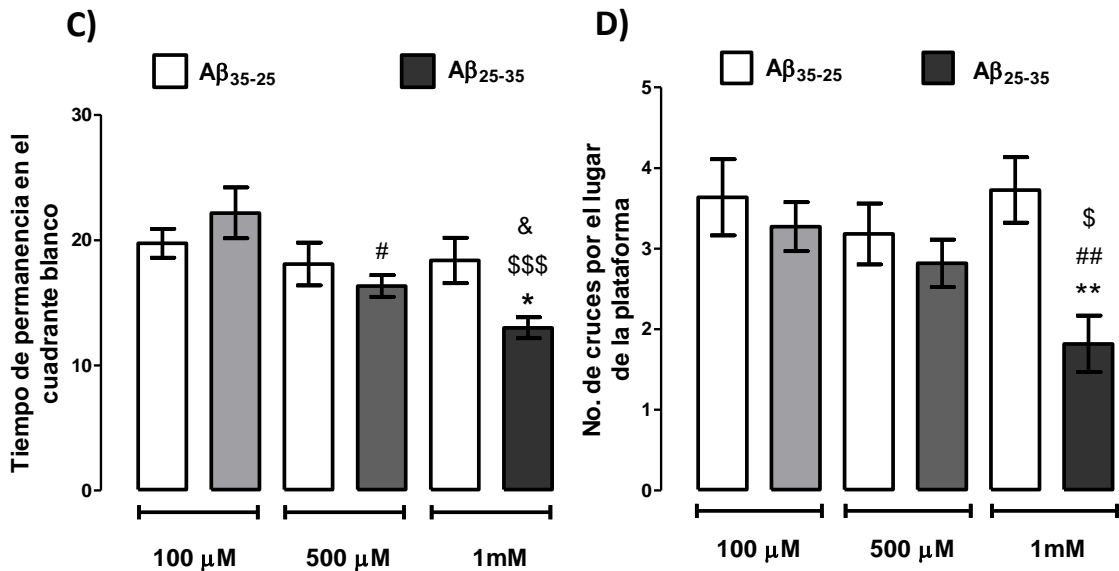


Figura 18.1 Registro del tiempo de permanencia en el cuadrante blanco y número de cruces por el punto de la plataforma. En C) se muestra el tiempo de permanencia en el cuadrante blanco para cada grupo. Los datos fueron analizados con una t-student. * $p < 0.05$ ($A\beta_{35-25}$ [1mM] vs $A\beta_{25-35}$ [1mM]), # $p < 0.05$ ($A\beta_{25-35}$ [100μM] vs $A\beta_{25-35}$ [500μM]), \$\$\$ $p < 0.001$ ($A\beta_{25-35}$ [100μM] vs $A\beta_{25-35}$ [1mM]), & $p < 0,05$ ($A\beta_{25-35}$ [500μM] vs $A\beta_{25-35}$ [1mM]). D) presenta el número de cruces por el lugar de la plataforma. ** $p < 0.01$ ($A\beta_{35-25}$ [1mM] vs $A\beta_{25-35}$ [1mM]), ## $p < 0.01$ ($A\beta_{25-35}$ [100μM] vs $A\beta_{25-35}$ [500μM]), \$ $p < 0.05$ ($A\beta_{25-35}$ [500μM] vs $A\beta_{25-35}$ [1mM]).

8.3 Efecto de la administración de $A\beta_{25-35}$ en el septum medial sobre la trayectoria de navegación

La trayectoria de navegación que realizan los animales durante el desarrollo de la prueba conductual, es un punto de referencia que nos da evidencia del nado y la asociación que estos tienen con las señales extralaberínticas, que utilizan para la ubicación de plataforma. La trayectoria que siguen los animales durante la prueba de aprendizaje y memoria en el laberinto acuático de Morris, fue grabada y analizada, por medio de las videgrabaciones y trasladadas a una pantalla para dibujar la trayectoria en un acetato, que posteriormente fue escaneado.

En la figura 19 se muestra la trayectoria de navegación que presentan los grupos administrados con la fracción reversa $A\beta_{35-25}$ a diferentes concentraciones y los grupos administrados con la fracción $A\beta_{25-35}$ a diferentes concentraciones. Este análisis permite evaluar el proceso de la consolidación de la información adquirida durante a evaluación, puesto que el modelo cuenta con señales extra e intralaberínticas, que les sirven como punto de referencia para localizar la plataforma de escape.

Al evaluar la trayectoria de navegación se observa que el recorrido que realizan los animales al inicio de la prueba solo nadan sobre la periferia de la tina, demostrando una conducta exploratoria, en el primer día de aprendizaje, al trazar las trayectorias de navegación en el último día de aprendizaje se puede observar como los animales administrados con la fracción reversa del $A\beta$ han adquirido la información para situarse espacialmente y localizar la plataforma de escape, mientras que los animales administrados con $A\beta_{25-35}$ presentan una trayectoria de navegación más periférica y aleatoria. Durante la prueba de memoria los grupos controles presentan una trayectoria de navegación más enfocada hacia el punto donde se localizaba la plataforma con respecto a los grupos administrados con $A\beta_{25-35}$ que presentan una trayectoria menor enfocada hacia la plataforma y con un número menor de cruces.

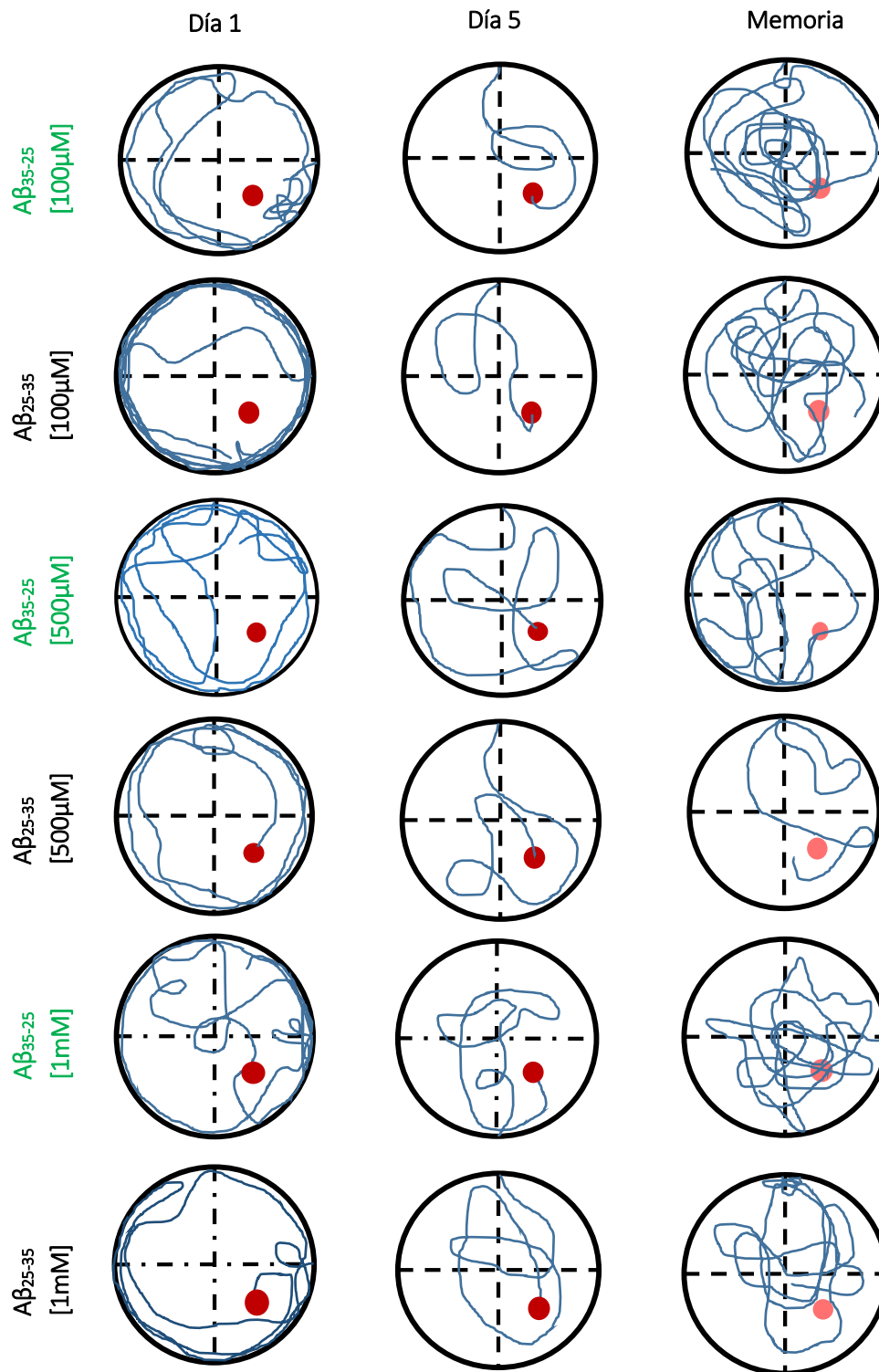


Figura 19. Representación de las trayectorias de navegación. El panel de imágenes muestra las trayectorias de navegación de los diferentes grupos experimentales, las cuales se obtuvieron de la fase de aprendizaje (día 1 y 5) y fase de memoria (10 días después de la prueba de aprendizaje) evaluadas en el laberinto acuático de Morris.

8.4 La administración de $A\beta_{25-35}$ en el septum medial, aumenta la concentración de nitritos de manera concentración dependiente

Al día 31 post cirugía y al finalizar la prueba de memoria, se determinaron las concentraciones de nitritos, los cuales son metabolitos estables del óxido nítrico, en tres regiones cerebrales diferentes: el septum medial (figura 20A), el hipocampo (figura 20B) y corteza frontal (figura 20C). Las concentraciones de nitritos fueron determinadas por el método de Griess, las cuales posteriormente fueron normalizadas por miligramo de proteína contenidas en cada muestra.

Al comparar los grupos problema administrados con el $A\beta_{25-35}$ en el SM a diferentes concentraciones ([100 μ M], [500 μ M] y [1mM]) respecto a sus controles administrados con la fracción reversa del $A\beta$ ($A\beta_{35-25}$) se encontraron diferencias estadísticamente significativas, en el septum medial (figura 20 A). El grupo administrado con $A\beta_{25-35}$ [100 μ M] incremento los niveles de nitritos en un 247% respecto de su grupo control ($A\beta_{35-25}$ [100 μ M]), el grupo administrado con $A\beta_{25-35}$ [500 μ M] incremento los nitritos un 276% respecto a su grupo control ($A\beta_{35-25}$ [500 μ M]) y el grupo administrado con la concentración más alta, $A\beta_{25-35}$ [1mM], incremento los niveles de nitritos en un 368% con respecto a su grupo control. También se encontró diferencias entre los grupos administrados con $A\beta_{25-35}$ a las diferentes concentraciones, [100 μ M] vs [500 μ M] ## p <0.01 y [500 μ M] vs [1mM] && p <0.01. En hipocampo (figura 20B) se observó que a partir de una concentración de $A\beta_{25-35}$ [500 μ M] los niveles de nitritos se incrementan 270% respecto a su grupo control ($A\beta_{35-25}$ [500 μ M]) ** p <0.01. A una concentración de $A\beta_{25-35}$ [1mM] el incremento de nitritos fue de 360% respecto de su grupo control ($A\beta_{35-25}$ [1mM]) ** p <0.01. Por otra parte al comparar entre los grupos problema se encontró diferencias significativas entre $A\beta_{25-35}$ [100 μ M] vs [500 μ M] ### p <0.001, y $A\beta_{25-35}$ [100 μ M] vs [1mM] && p <0.01.

Mientras que en corteza frontal (figura 20C) solo se observaron diferencias significativas en el grupo administrado con $A\beta_{25-35}$ [1mM] respecto de su control, incrementándose los niveles de nitritos 400% (** p <0.01), al realizar el análisis entre los grupos problema

administrados con $A\beta_{25-35}$, en esta región se encontraron diferencias significativas entre $A\beta_{25-35}[100\mu M]$ y $A\beta_{25-35}[500\mu M]$ $###p<0.001$, $A\beta_{25-35}[500\mu M]$ y $A\beta_{25-35}[1mM]$ $\&\&p<0.01$.

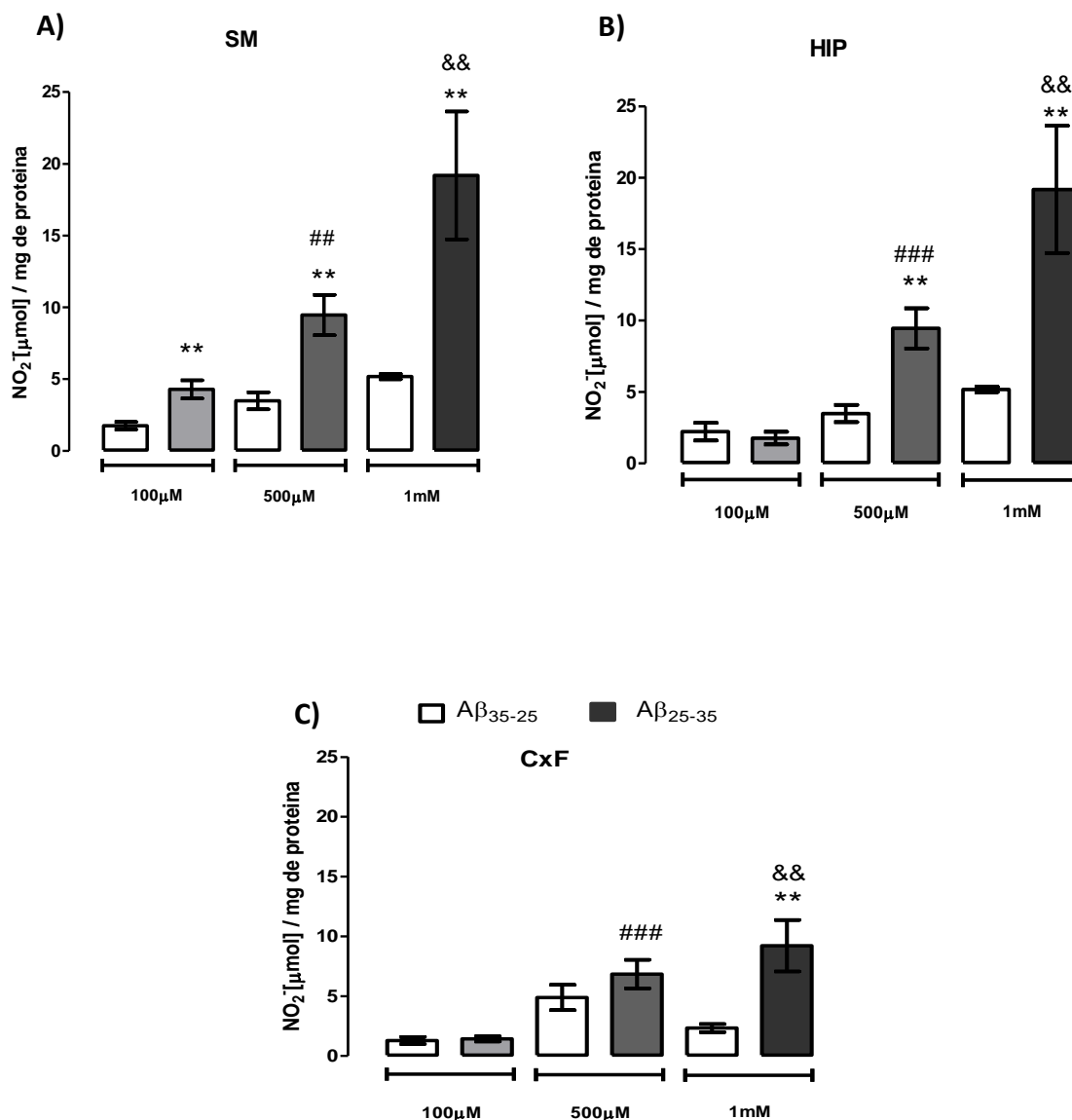


Figura 20. Determinación de nitritos por el método de Griess en ratas lesionadas en el septum medialis. En **A)** se muestran las concentraciones de nitritos determinados en el septum medialis, en **B)** nitritos determinados en hipocampo y en **C)** nitritos determinados en corteza frontal, con una n=8 por cada grupo. Las barras corresponden a la media \pm EEM, los datos fueron analizados con una *t-studet*. En **A)** $A\beta_{25-35}$ vs $A\beta_{35-25}$ comparados con su respectivo grupo control a las diferentes concentraciones (** $p<0.01$), $A\beta_{25-35}[100\mu M]$ vs $A\beta_{25-35}[500\mu M]$ (## $p<0.01$) y $A\beta_{25-35}[100\mu M]$ vs $A\beta_{25-35}[1mM]$ (&& $p<0.01$). En **B)** $A\beta_{25-35}[500\mu M]$ y $A\beta_{25-35}[1mM]$ vs sus grupos controles administrados con la fracción reversa ($A\beta_{35-25}$) (** $p<0.01$), $A\beta_{25-35}[100\mu M]$ vs $A\beta_{25-35}[500\mu M]$ (### $p<0.001$), $A\beta_{25-35}[100\mu M]$ vs $A\beta_{25-35}[1mM]$ (&& $p<0.01$). En **C)** $A\beta_{35-25}[500\mu M]$ vs $A\beta_{25-35}[1mM]$ (** $p<0.01$), $A\beta_{25-35}[100\mu M]$ vs $A\beta_{25-35}[500\mu M]$ (### $p<0.001$), $A\beta_{25-35}[100\mu M]$ vs $A\beta_{25-35}[1mM]$ (&& $p<0.01$).

8.5 La administración de $A\beta_{25-35}$ en el septum medial, aumenta la concentración de Malondialdehído de manera concentración dependiente

Otro marcador de daño que se evaluó después de haber finalizado la prueba de memoria fue los niveles de Malondialdehído (MDA), el cual es un metabolito de la ruptura de ácidos grasos polinsaturados, un indicador de peroxidación de lípidos, en tres regiones cerebrales diferentes: el septum medial (figura 21 A), el hipocampo (figura 21B) y corteza frontal (figura 21C). Las concentraciones de MDA fueron determinadas por el método de Gerard-Monier, normalizadas posteriormente por miligramo de proteína.

En la figura 21 A), se observa que solo los grupos administrados con $A\beta_{25-35}$ a [500 μ M] y [1mM] presentan incremento de los niveles de MDA 900% y 275% respectivamente respecto de su grupo control (** $p < 0.01$), al analizar estadísticamente entre los grupos problema se encontraron diferencias significativas entre el grupo con $A\beta_{25-35}$ [500 μ M] y [1mM] (## $p < 0.01$). Otra región de interés donde se evaluaron los niveles de MDA fue el hipocampo (figura 21B) observando un aumento de los niveles de MDA en los grupos con $A\beta_{25-35}$ [500 μ M] 166% (* $p < 0,05$), $A\beta_{25-35}$ [1mM] 265% (** $p < 0.01$), respecto de sus grupos controles, así también se encontraron diferencias significativas entre los grupos problema, $A\beta_{25-35}$ [100 μ M] vs [1mM] ### $p < 0.001$, $A\beta_{25-35}$ [500 μ M] vs [1mM] &&& $p < 0.001$. Al evaluar los niveles de MDA en corteza frontal (figura 21C) se observa un aumento en el grupo $A\beta_{25-35}$ [500 μ M] de un 380% respecto de su grupo control ($A\beta_{35-25}$ [500 μ M]) (** $p < 0.001$), y en el grupo $A\beta_{25-35}$ [1mM] un incremento de 151% respecto de su grupo control ($A\beta_{25-35}$ [100 μ M]) (# $p < 0.05$).

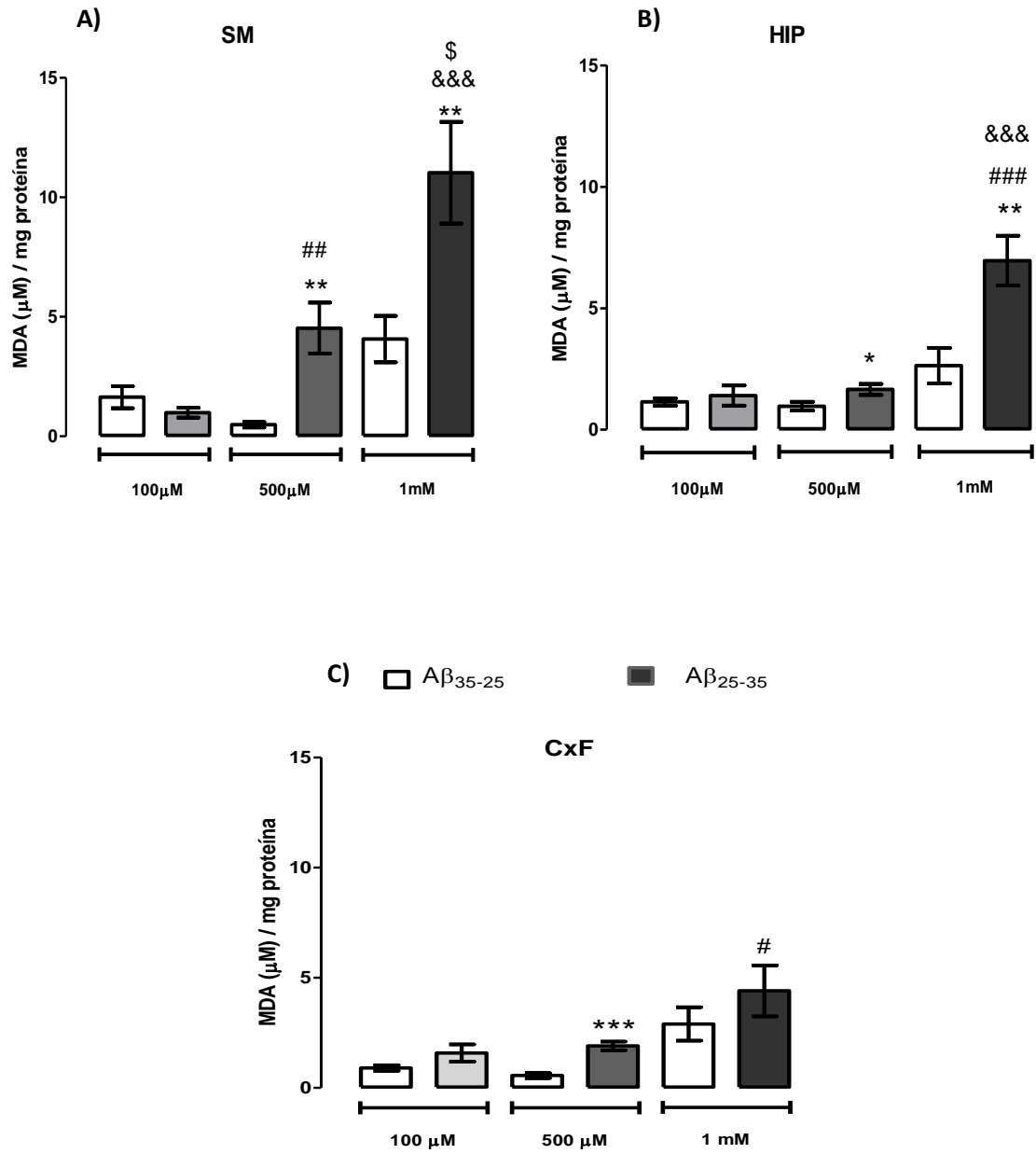


Figura 21. Determinación de MDA por el método de Gerard-Monier en ratas lesionadas en el septum medial. En **A)** se muestran las concentraciones de MDA determinados en el septum medial, en **B)** se muestran las concentraciones de MDA determinados en hipocampo y en **C)** se muestran los niveles de MDA determinados en corteza frontal, con una n=8 por cada grupo. Las barras corresponden a la media ± EEM, los datos fueron analizados con una t-de student. *p<0.05, **p<0.01 (Aβ₃₅₋₂₅ vs Aβ₂₅₋₃₅ a las diferentes concentraciones). En A) Aβ₂₅₋₃₅ [100μM] vs Aβ₂₅₋₃₅ [500μM] ##p<0.01, Aβ₂₅₋₃₅ [100μM] vs Aβ₂₅₋₃₅ [1mM] \$\$\$p<0.001, Aβ₂₅₋₃₅ [500μM] vs Aβ₂₅₋₃₅ [1mM] \$p<0.05. En B) Aβ₂₅₋₃₅ [100μM] vs Aβ₂₅₋₃₅ [1mM] ###p<0.001, Aβ₂₅₋₃₅ [500μM] vs Aβ₂₅₋₃₅ [1mM] \$\$\$p<0.001. En C) Aβ₂₅₋₃₅[500μM] vs Aβ₃₅₋₂₅[500μM], Aβ₂₅₋₃₅ [100μM] vs Aβ₂₅₋₃₅ [1mM] #p<0.05.

8.6 Efecto de la administración de $A\beta_{25-35}$ en el septum medial sobre la inmunorreactividad a 3-NT

La inmunorreactividad para 3-NT fue medida en los mismos grupos de ratas, 24 horas después de finalizada la prueba de memoria. El análisis por inmunofluorescencia fue realizado para estimar el efecto de la administración de diferentes concentraciones de $A\beta_{25-35}$ sobre la formación de especies reactivas de nitrógeno (3-NT, color rojo) y los núcleos marcados con DAPI (color azul), como un marcador de daño a las neuronas 30 días después de la administración de $A\beta_{25-35}$ en el septum medial (figura 22, A-L). En los grupos administrados con $A\beta_{25-35}$ a [500 μ M] y [1mM] la inmunorreactividad a 3-NT se incrementó respecto de su grupo control administrado con la fracción reversa, como lo muestran las microfotografías (figura 23, H y L). Al cuantificar el porcentaje de área teñida para la marca contra 3-NT en el septum medial se encontró diferencias estadísticamente significativas del grupo $A\beta_{25-35}$ [100 μ M] y $A\beta_{25-35}$ [1mM] respecto a su grupo control. Debido a que el septum medial envía proyecciones hacia el hipocampo, específicamente la región CA1, se evaluó la marca contra 3-NT en la CA1 del hipocampo (figura 23, D, H y L) donde se puede observar que la inmunorreactividad de la marca para 3-NT se incrementa en función de la concentración administrada del $A\beta_{25-35}$. Al realizar la cuantificación del porcentaje de área teñida, se puede observar el incremento de la inmunorreactividad para 3-NT en cada una de las concentraciones utilizadas del $A\beta_{25-35}$, encontrando diferencias estadísticamente significativas de cada uno de los grupos administrados con el $A\beta_{25-35}$, a las diferentes concentraciones respecto de su grupo control.

La inyección de $A\beta_{25-35}$ [500 μ M] y [1mM] en el septum medial aumenta el número de células reactivas a 3-NT

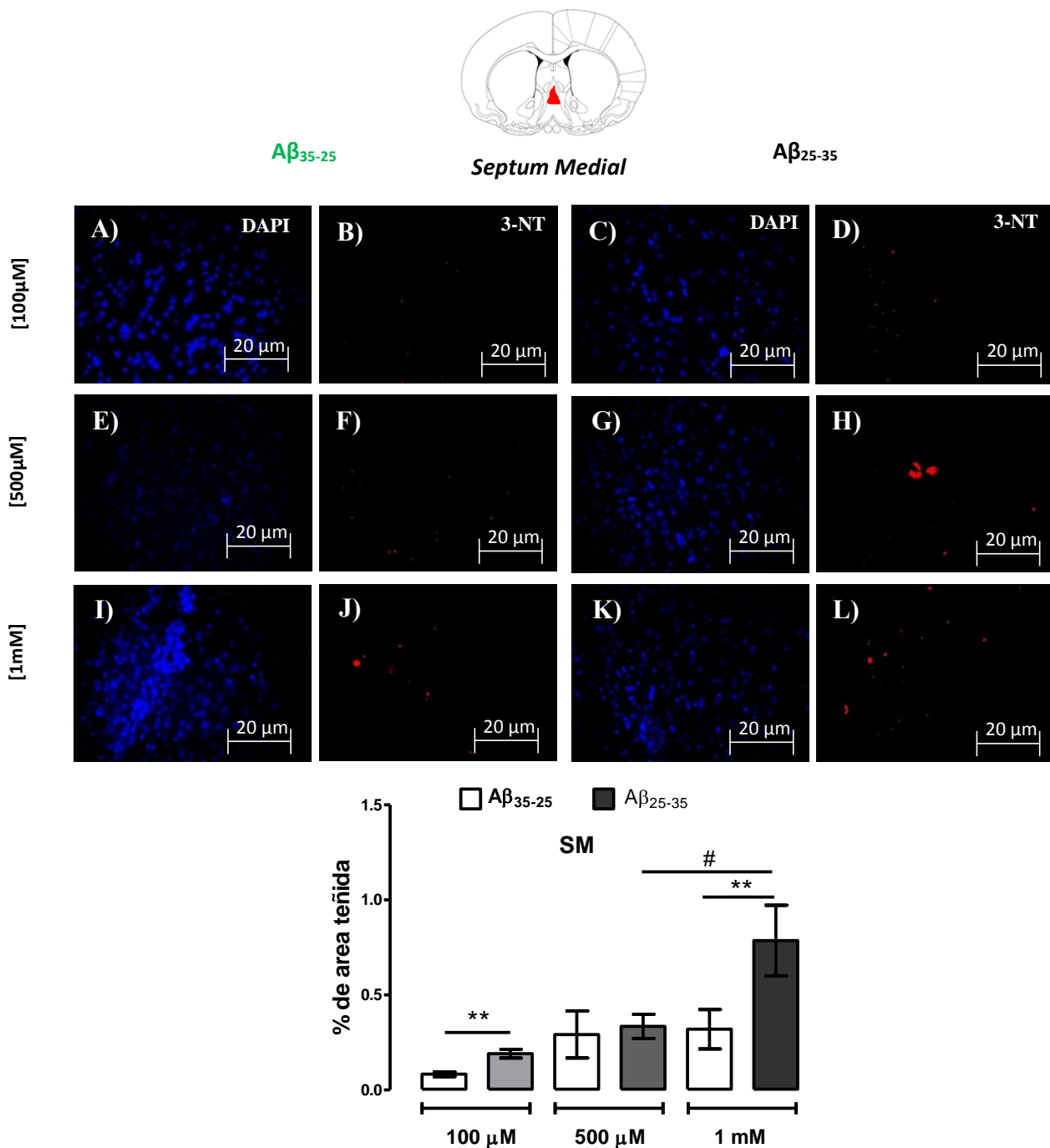


Figura 22. Se muestra la cuantificación de células inmunorreactivas a 3-NT en el septum medial. En azul los núcleos celulares marcados con DAPI, en rojo se muestran la inmunoreactividad a 3-NT en el septum medial. Las fotomicrografías del septum medial tienen un magnificación de 40x. La grafica muestra los valores del porcentaje de área teñida \pm ESM de cada grupo experimental. La cuantificación se realizó por medio del software Imaje J. (t-student, # $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$).

El $A\beta_{25-35}$ [100 μ M], [500 μ M] y [1mM] en el septum aumenta el número de células reactivas a 3-NT en la CA1 de hipocampo

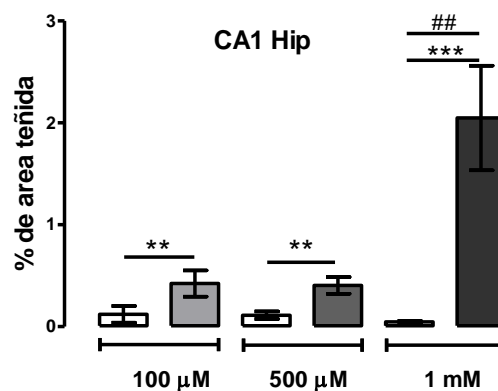
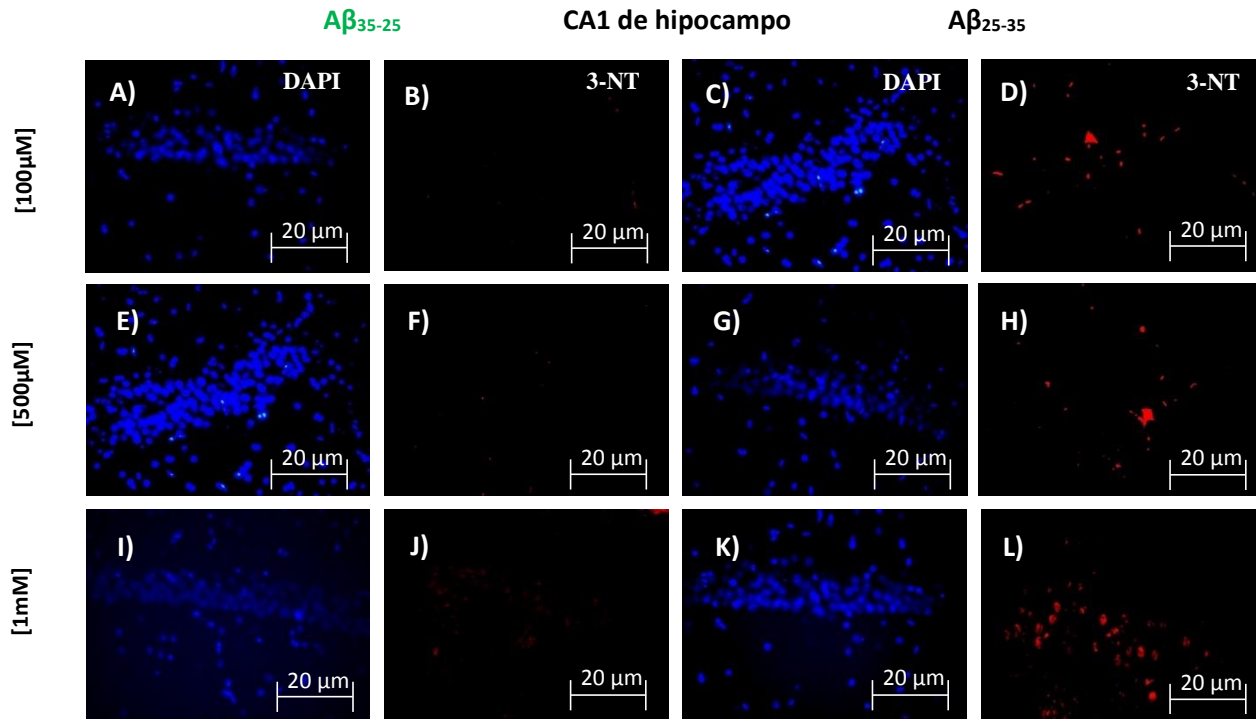
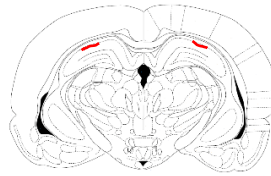


Figura 23. Se muestra la cuantificación de células inmunorreactivas a 3-NT en la CA1 de hipocampo. En azul los núcleos celulares marcados con DAPI, en rojo se muestra la inmunoreactividad a 3-NT en la región CA1 del hipocampo. Las fotomicrografías de la CA1 tienen un magnificación de 40x. La grafica muestra los valores del porcentaje de área teñida \pm ESM de cada grupo experimental. La cuantificación se realizó por medio del software Image J. (t-student, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$).

IX DISCUSIÓN

El $A\beta_{1-42}$ tiene la capacidad de agregarse y producir efectos citotóxicos como son incremento de las especies reactivas de oxígeno, nitración de proteínas, tiene la capacidad de liberar mediadores de la inflamación, peroxidación de lípidos (Bayer y cols., 2001, Neve y cols., 2000) además de inducir efectos apoptóticos que se asocian a un deterioro cognitivo. El $A\beta_{25-35}$ es un fragmento de 11 aminoácidos, que presenta efectos tóxicos más severos y en menor tiempo para ejercer un daño citotóxico, en comparación al péptido completo $A\beta_{1-42}$ (Varadarajam y cols., 2001). El $A\beta_{25-35}$ tiene propiedades neurotóxicas a altas concentraciones y neurotróficas a bajas concentraciones, ya que tiene la capacidad de ayudar a la diferenciación celular cuando es administrado en cultivos celulares de hipocampo de rata (Yanquer y cols., 1990). En modelos in-vitro el $A\beta_{25-35}$ genera muerte neuronal dependiente de la concentración administrada (Resende y cols., 2007).

Nos enfocamos a estudiar el efecto de la administración de diferentes concentraciones del $A\beta_{25-35}$ y su correspondiente fracción reversa $A\beta_{35-25}$ ([100 μ M], [500 μ M] y [1mM]), en el septum medial de ratas, sobre la memoria espacial, los niveles de nitritos y la lipoperoxidación.

Se ha mostrado que la inyección de fragmentos del $A\beta$, cuando es administrado en el *septum medial* de ratas, puede dañar la memoria a corto plazo (Terranova y cols., 1996). Por otra parte la administración de diferentes péptidos del $A\beta$, en el septum medial de ratas puede causar una hipofunción del sistema colinérgico en la vía septo-hipocampal, a concentraciones nano molares (Abe y cols., 1994). Debido a ello decidimos evaluar la administración del $A\beta_{25-35}$ en el *septum medial* de ratas.

El presente trabajo demuestra que la administración de $A\beta_{25-35}$ en el septum medial, daña la memoria espacial, puesto que el $A\beta_{25-35}$ tiene la capacidad de generar un desequilibrio en la homeostasis de calcio, estrés oxidativo y un proceso inflamatorio, en conjunto estos mecanismos tóxicos generan un daño en neuronas del septum medial e hipocampo. El septum medial es una estructura del cerebro basal anterior que regula la

excitabilidad de amplias zonas de la neocorteza e hipocampo, también participa en la modulación de algunos estados funcionales, como es el ritmo theta hipocámpico, el cual está implicado directamente en algunos procesos cognitivos cerebrales, como es el aprendizaje y la memoria (Xu y cols., 2004).

El *septum medial* también se ha considerado como marcapaso del ritmo theta del hipocampo, puesto que lesiones en el septum medial eliminan completamente el ritmo theta en animales, aun no se conoce la participación directa del ritmo theta en la función del sistema septo-hipocámpico, pero se sugiere que agiliza el procesamiento de la información por parte del hipocampo, mejorando procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria, por lo cual resulta importante evaluar el papel de la vía septo-hipocámpica sobre procesos de aprendizaje y memoria. Para evaluar el daño en el aprendizaje y la memoria se utilizó una tarea en el laberinto acuático de Morris.

Hay datos que dan la pauta a pensar que el deterioro que podría tener el $A\beta_{25-35}$ en la adquisición y la memoria espacial podrían ser dependientes de la concentración, como los que se reportan en modelos *in-vitro*, sin embargo, en nuestros resultados no se observa estrictamente un daño que sea dependiente de la concentración, esto posiblemente se debe a que en los experimentos *in-vitro* solo se evalúan parámetros en forma unitaria, sin embargo el proceso de memoria espacial depende de muchos factores, además de que en los modelos *in-vitro* las condiciones son constantes.

Si bien no se observó un efecto que fuera dependiente de la concentración sobre el aprendizaje, se observa que el $A\beta_{25-35}$ no genera disminución del proceso de adquisición durante la prueba de aprendizaje, a ninguna de las tres concentraciones administradas ([100 μ M], [500 μ M] y [1mM]), lo que indica que los diferentes grupos experimentales adquieren de manera correcta la información (figura 18A). Sin embargo durante la recuperación de la información, el $A\beta_{25-35}$, generó un aumento en el tiempo de latencia al primer cruce durante la prueba de memoria conforme aumenta la concentración del péptido, $A\beta_{25-35}$ [100 μ M] 141%, $A\beta_{25-35}$ [500 μ M] 216% y $A\beta_{25-35}$ [1mM] 202% cada uno respecto de su grupo control (figura 18B), encontrando diferencia estadísticamente

significativa entre los grupos $A\beta_{35-25}[1mM]$ vs $A\beta_{25-35} [1mM]$, lo cual indica que el grupo administrado con $A\beta_{25-35} [1mM]$ invierte más tiempo en cruzar por donde se encontraba la plataforma de escape (figura 18B). Se puede observar que los grupos administrados con $A\beta_{25-35}[100\mu M]$ y $[500\mu M]$ tienen un mayor tiempo de latencia, respecto a su control administrados con la fracción reversa, lo que nos da clara evidencia del daño bioquímico y retardo cognitivo.

Otros parámetros que apoyan al mencionar que existe un daño en la recuperación de la información, son el tiempo de permanencia en el cuadrante blanco y el número de cruces por el lugar de la plataforma, donde se puede observar que los animales que fueron administrados con $A\beta_{25-35}$ reducen su tiempo de permanencia conforme aumenta la concentración del péptido administrada, así también para el número de cruces por el lugar de la plataforma (figura 18.1 C) y D)). Tal daño no es total puesto que los animales tienden a disminuir sus tiempos de latencia conforme avanzan los ensayos, este hecho puede deberse a que no solamente una estructura está implicada en procesos de aprendizaje y memoria, los animales hacen uso de otras estructuras cerebrales para compensar el daño. El $A\beta_{25-35}$ ocasiona que los animales sean incapaces para ubicarse espacialmente en el laberinto acuático y al mismo tiempo asociar las señales tanto intra como extralaberínticas para localizar la plataforma de escape, es decir los animales pierden la habilidad de recordar atributos o características del espacio.

El daño observado en los sujetos de experimentación, durante la recuperación de la información, pudiese explicarse en base al mecanismo de toxicidad del $A\beta_{25-35}$ y al sitio de lesión. Dicho péptido, puede interactuar directamente con los receptores a glutamato de tipo ionotrópico NMDA, lo que promueve la entrada masiva de calcio, además de insertarse en la membrana lipídica celular y ocasionar poros permeables a Ca^{2+} . Debido a la entrada masiva de Ca^{2+} , la célula entra en un proceso de excitotoxicidad, tal evento es acompañado de un incremento de ERO, la disfunción mitocondrial y la disminución de sistema antioxidante (Guo LL y cols., 2013). Por otra parte el calcio activa proteínas dependientes de él, como la calcio calmodulina II que al unirse a la nNOS promueve síntesis de óxido nítrico (NO), la síntesis de NO se incrementa por la activación de la iNOS, manteniendo los

niveles de óxido nítrico aumentados y favoreciendo la formación de ERN. La interacción entre ERO (O_2^-) y ERN (NO) resultan en la formación del peroxinitrito (ONOO-) una especie sumamente reactiva capaz de provocar la nitración de proteínas y provocar la oxidación lipídica (Moncada y Bolaños, 2006). Todos estos eventos tóxicos conllevan a una neurodegeneración que finalmente concluye con la muerte neuronal.

Otro de los parámetros que aportan información sobre la prueba de retención de la información, fue trazar las trayectorias de navegación que presentaron los sujetos de experimentación, que aportan información de cómo los animales de experimentación adquieren el conocimiento sobre la localización de la plataforma de escape, del tal manera que forman una trayectoria de nado cada vez más localizada y corta (figura 19). Al iniciar la prueba de aprendizaje (día 1), el comportamiento de todos los animales de experimentación de todos los grupos fue muy parecido ya que al encontrarse en un entorno novedoso, su instinto los hace explorarlo, por lo que su nado fue totalmente periférico, en el quinto día de aprendizaje, se puede observar que los animales administrados con las diferentes concentraciones de la fracción reversa del $A\beta$ ($A\beta_{35-25}$) [100 μ M], [500 μ M] y [1mM], adquirieron la información que se les presentaba a través de los ensayos dando como resultado trayectorias de navegación más cortas y localizadas hacia el punto donde se localizaba la plataforma de escape (figura 19, punto rojo). Por otra parte, los animales que fueron administrados con el $A\beta_{25-35}$ a las diferentes concentraciones, [100 μ M], [500 μ M] y [1mM], aun que de igual forma en estos grupos estaban teniendo una integración de la información, dicho proceso se estaba llevando de forma diferente, pues aunque localizaban la plataforma de escape, su trayectoria de nado era dispersa, en el ultimo de día de aprendizaje (día 5).

Al analizar la trayectoria de nado que representa el día de la evaluación de la memoria, se puede observar como los grupos administrados con $A\beta_{25-35}$ a las diferentes concentraciones, [100 μ M], [500 μ M] y [1mM], presentan una trayectoria de nado errónea, respecto de los grupos administrados con la fracción reversa del $A\beta$ ($A\beta_{35-25}$), los grupos administrados con el $A\beta_{25-35}$ exploran con mayor frecuencia los cuadrantes opuestos al

cuadrante donde se localizaba la plataforma de escape, lo cual evidencia un déficit para recuperar la información adquirida en días previos.

Se sabe que el $A\beta_{25-35}$ incrementa las concentraciones de glutamato a nivel sináptico, por la inhibición de las proteínas de recaptura localizadas en la pre-sinapsis y en los astrocitos, además sobre estimula a los receptores NMDA, lo cual ocasiona excitotoxicidad al incrementar las concentraciones de calcio intracelular, activando diversa enzimas como la sintasa de óxido nítrico neuronal e inducible (Stepanichev y cols., 2008), la sobre activación de estas enzimas llevan a una sobre producción de óxido nítrico. Por otra parte, el NO a concentraciones menor a $1\mu\text{M}$, tiene efectos tróficos en muchos organismos, a nivel del sistema nervioso central participa en diversos procesos como la neurotransmisión, proliferación, diferenciación y sinaptogénesis (Ciani y cols., 2006). Por lo contrario concentraciones mayores a $1\mu\text{M}$ tiene efectos toxicos, ya que tiene la capacidad de inhibir al complejo I y IV mitocondrial e incrementar los niveles especies reactivas de oxígeno (Perez-Severiano y cols., 2004, Limón y cols., 2009, Diaz y cols., 2011). Tomando en cuenta estos antecedentes, el siguiente paso en este estudio, fue evaluar los niveles de óxido nítrico mediante la cuantificación de los niveles de nitritos, esta medición nos permite predecir los niveles de óxido nítrico, puesto que los nitritos son un metabolito del NO. Las determinaciones de los niveles de nitritos se realizaron en tres áreas, *septum medial*, hipocampo y corteza frontal. En las cuales se encontró un incremento de los grupos administrados con el $A\beta_{25-35}$, se puede observar que dicho incremento es dependiente de la concentración de $A\beta_{25-35}$ con respecto a los grupos controles, que fueron administrados con la fracción reversa del $A\beta$ (figura 20).

El $A\beta_{25-35}$ puede aumentar la concentración de especies reactivas de oxígeno, en especial al ion superóxido, el cual puede interaccionar con el NO y formar peroxinitrito (ONOO^-) una de las moléculas con mayor reactividad en el proceso pro-oxidante (Shen y cols., 2002). El peroxinitrito es un radical libre altamente tóxico, aún en fracción de segundos puede aumentar el proceso de nitración de proteínas y enzimas (Halliwell, 2006), así como incrementar la peroxidación de lípidos y en consecuencia activa procesos pro-

apoptóticos que llevan a la muerte neuronal, la cual se refleja en un daño en la memoria de corto y largo plazo (Stepanichev, 2003).

Otro objetivo a cumplir en este trabajo fue analizar si las alteraciones que encontramos hasta el momento podían deberse a un incremento del estrés oxidativo, de esta manera se cuantifico un marcador importante, los niveles de MDA que es el metabolito más representativo de un evento de lipoperoxidación, los núcleos empleados fueron septum medial, hipocampo y corteza frontal, todos ellos, asociados a procesos de aprendizaje y memoria. El $A\beta_{25-35}$ fue administrado en el septum medial, observando que dichos niveles se incrementan conforme incrementa la concentración del péptido administrado en los animales con $A\beta_{25-35}$ con respecto a sus grupos controles administrados con la fracción reversa del péptido (figura 21 A). El septum medial envía sus proyecciones al hipocampo, principalmente a la región CA1, por ello también se cuantificaron los niveles de MDA en hipocampo, observando un incremento solo con la más alta concentración de $A\beta_{25-35}$ ([1mM]) respecto de los grupos controles (figura 21B), también se encontró un incremento en la corteza frontal, sin embargo en menor medida (figura 21C). Estos resultados concuerdan con lo realizado por Ortega y cols., 2014, donde tras al administrar al $A\beta_{25-35}$, en la región CA1 del hipocampo, puede incrementar la concentración de especies reactivas de oxígeno y la lipoperoxidación con respecto al tiempo. Un incremento de las especies reactivas de oxígeno altera la doble membrana lipídica, es decir, los radicales libres interaccionan con los lípidos, por lo que se modifica su estructura y en consecuencia existe un desacople de la membrana, resultado que da origen a una discontinuidad y un aumento de la susceptibilidad de la célula.

La disfunción en el metabolismo del NO, la oxidación de lípidos y los eventos de toxicidad que estas moléculas pueden desencadenar, se han vinculado con procesos de neurodegeneración (Stack y cols., 2008). Diversos autores han estudiado los efectos del NO en modelos de neurodegeneración, puesto que altas cantidades de nitritos pueden ser una fuente de daño que promueve estrés nitrosativo favoreciendo la nitración de proteínas y daño neuronal repercutiendo en un déficit en la memoria. Evaluamos la presencia de 3-nitrotirosina encontrando un incremento de la inmunorreactividad para la marca contra

proteínas nitradas en cada uno de los grupos administrados con las diferentes concentraciones de $A\beta_{25-35}$ respecto de sus grupos controles, tanto en el sitio de lesión, que fue el septum medial como en la región CA1 del hipocampo, observando el mayor incremento de 3-NT en el grupo administrado con $A\beta_{25-35}$ [1 mM], sin embargo en hipocampo los niveles de nitración de proteínas son más elevados que en el sitio de lesión. Es importante mencionar que la lesión con $A\beta_{25-35}$ en el septum medial ocasiono un incremento de los niveles de NO_2 y MDA en el hipocampo y corteza frontal (figura 20 y 21), debido probablemente a la difusión del $A\beta_{25-35}$ (300 micras) (Triulzi y cols., 2008) y del NO (540 micras), los cuales al difundirse activarían probablemente cascadas de daño que conducen a la muerte neuronal (Markesbery, 1997).

En trabajos anteriores en el laboratorio de Neurofarmacología, al realizar un escaneo de diferentes concentraciones de $A\beta_{25-35}$ administrada en la región CA1 del hipocampo y evaluar aprendizaje y memoria, se demostró que el $A\beta_{25-35}$ es capaz de disminuir el proceso de recuperación de la información, sin embargo dicha disminución no es dependiente de la concentración administrada de $A\beta_{25-35}$, sin embargo al administrar la fracción $A\beta_{25-35}$ en el septum medial, encontramos que existe un daño en la recuperación de la información y que dicho daño se correlaciona con la concentración de $A\beta_{25-35}$ administrada. Se ha descrito que el hipocampo es una región altamente susceptible a los efectos citotóxicos del $A\beta$, sin embargo el septum medial expresa proteínas como parvalbúmina que tienen la capacidad de secuestrar calcio, por lo tanto dichas proteínas pueden estar jugando un papel importante al proteger de los efectos tóxicos del $A\beta$ (Harkany y cols., 1995).

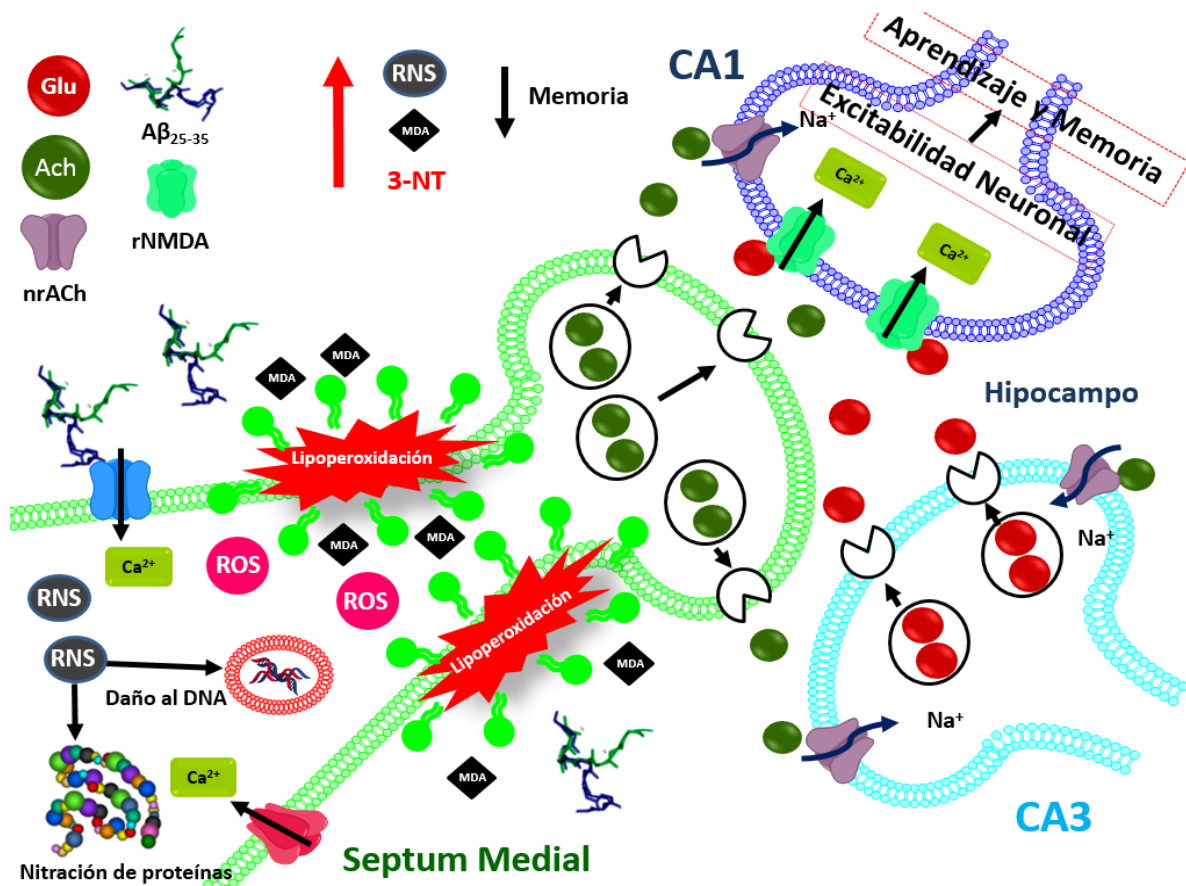


Figura 24. Mecanismo hipotético de la toxicidad del $A\beta_{25-35}$. El péptido $A\beta_{25-35}$ es capaz de interactuar y activar al receptor NMDA, insertarse a la membrana y formar poros, eventos que traen como consecuencia la entrada descontrolada de calcio, el calcio activa enzimas como la sintasa de óxido nítrico, incrementando la síntesis de NO . El NO puede interactuar con el ion O_2^- para formar $ONOO^-$; este radical puede nitrar proteínas, oxidar lípidos a nivel de membrana y causar estrés oxidativo. Estos mecanismos tóxicos llevan a la muerte neuronal, lo cual repercute en un deterioro de los procesos cognitivos. Al incrementar la concentración del $A\beta_{25-35}$ todos estos efectos tóxicos se incrementan ocasionando un mayor daño neuronal y un mayor deterioro cognitivo.

X CONCLUSIONES

- La administración del $A\beta_{25-35}$ en el *septum medial* daña la memoria de tipo espacial, de manera concentración dependiente.
- La administración del $A\beta_{25-35}$ a concentración de 1 mM provocó el mayor deterioro de la memoria espacial.
- El $A\beta_{25-35}$ provocó un aumento de los niveles de NO_2 de manera concentración dependiente en SM, Hip y CTF, 30 días después de la lesión.
- El $A\beta_{25-35}$ incrementó los niveles de MDA de manera concentración dependiente en SM, Hip y CTF, 30 días después de la lesión.
- La administración de $A\beta_{25-35}$ incrementa la nitración de proteínas en septum e hipocampo con respecto a la concentración.

XI REFERENCIAS

- Abe E., Casamenti F., Giovannelli L., Scali C. and Pepeu G. 1994. Administration of β -peptides into the medial septum of rats decreases acetylcholine release from hippocampus in vivo. *Brain Research* 636. 162-164.
- Amaral D.G. and Witter MP. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of the anatomical data. *Neuroscience* 31. 571-91.
- Bayer T. A., Wirths O., Majtenyi K., Hartmann T., Multhaup G. and Beyreuther K. 2001. Key factors in Alzheimer's disease: beta-amiloid *Brain Pathol*; 11.1-11.
- Bermúdez R., Quirarte G. y Prado Alcalá. 2001. Pavlov y sus perros. En. *Memoria: donde reside y como se forma*. Bermudez R. y Prado Alcalá (Ed.), Primera edición. Trillas. 71-84.
- Bird and Burgess N. 2009. Spatial Memory. Assessment in Animals. *Encyclopedia of neuroscience*. Larry Squire (Ed.) Academic press. 187-194.
- Bradford MM. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72. 248-254.
- Butterfield D.A. and Kanski. 2002. Methionine residue 35 is critical for the oxidative estress and neurotoxic properties of Alzheimer's amyloid beta peptide 1-42 peptides. 23.1299-1309.
- Carrilo-Mora Paul, Giordano Magda and Santamaria Abel. 2009. Spatial memory: theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research* 203.151-164.
- Ciani E., Calvenese V., Crochemore C., bartesagui R. and Contestabile A. 2006. Proliferation of cerebellar precursor cells is negatively regulated by nitric oxide in newborn rat. *J Cell Sci*. 3161-3170.
- Chrobak JJ, LÖrincz A. and Buzsáki G. 2000. Physiological patterns in the hippocampo-entorhinal cortex system. *Hippocampus* 10. 457-65.
- Colom LV, Castaneda MT, Hernandez S, Perry G, Jaime S. and Touhami A. 2011. Intrahippocampal amyloid-b1-40 injections injure medial septal neurons in rats. *Curr Alzheimer Res*. 8. 832-40.
- Colom LV., Castaneda MT., Reyna T., Hernandez S. and Garrido-Sanabria E. 2005. Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse*. 58. 151-164.
- Colom LV. 2006. Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 96. 609-623.
- Cowburn R., Wiehager B., Trief E., Li-Li M. and Sundstrom E. 1997. Effects of beta-amyloid 25-35 on radioligand binding to excitatory amino acid receptors and voltage-dependent calcium channels: evidence for a selective affinity for tha

- glutamate and glycine recognition sites of the NMDA receptor. *Neurochem Res.* 22. 1437- 1442.
- Crystal J. 2009. Elements of episodic-like memory in animals models. *Behav, Process.* 80. 769-277.
 - Diaz A., Mendieta L., Zenteno E., Guevara J. and Limón I.D. 2011. The role of NOS in the impairment of spatial memory and damaged neurons in rats injected with amyloid beta 25-35 into the temporal cortex. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 98. 67-75.
 - De Felice F.G., Velasco P.T., Lambert M.P., Viola K., Fernandez S.J., Ferreira S.T. and Klein WL. 2007. A beta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor dependent mechanism that is blocked by Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem.* 282. 11590-11601
 - De Sevilla D.F., Cabezas C., de Prada A.N., Sanchez-Jimenez A. and Buno W. 2002. Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *The Journal Physiol.* 545. 51-63.
 - Esch F.S., Keim P.S. and Beattie EC. 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science.* 248.1122-1124.
 - Etchepareborda M.C. and Abad-Mas L. 2005. Memoria de trabajo en los procesos básicos del aprendizaje. *Rev. Neurol.* 40. 79-S83.
 - Fernández R. y Bermúdez R. 2001. Clasificación de la memoria. En: *Memoria. Donde reside y como se forma.* Bermúdez Rattonni y Prado Alcalá (Ed.), 11-25. Primera edición. Trillas.
 - Fernández-Tomé P., Brera B., Arévalo M. and Ceballos M. 2004. Beta-amyloid 25-35 inhibits glutamate uptake in cultured neurons and astrocytes: modulation of uptake as a survival mechanism. *Neurobiol Dis.* 15: 580-589.
 - Frautschy S.A., Yang F., Calderon L. and Cole GM. 1996. Rodent models of Alzheimer's disease: rat A_β infusion approaches to amyloid deposits. *Neurobiol Aging.* 17:311-21.
 - Guo LL., Guan ZZ., Huan Y., Wang YI. and Shi JS. 2013. The neurotoxicity of β-amyloid peptide toward rat brain is associated with enhanced oxidative stress, inflammation and apoptosis, all of which can be scutellarin. *Exp. Toxicol Pathol.* 65.579-584.
 - Guzmán Grenfell Alberto M., Vazquez Gonzales Angelica y Sierra Vargas Martha Patricia. 2006. Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial. *Revista de endocrinología y nutrición.* 4: 227-237.
 - Halliwell B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now?. *J Neurochem.* 97: 1634-1658.

- Harkany T., De Jong G.I., Soós K., Penke B., Luiten P.G.M. and Gulua K. 1995. B-amiloid affects cholinergics but not parvalbumin- containig neurons i tha septal complex of the rat. *Brain research*. 698. 270-274.
- Hedreen J. C., Struble R. G., Whitehouse P. J. and Price D. L. 1984. Topography of the magnocellular basal forebrain system in human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 43, 1–21.
- Holscher C., Gengler S., Gault V., Harriot P., and Mallot H. 2007. Soluble beta-amyloid(25-35) reversibly impairs hippocampal synaptic plasticity and spatial learning. *Eur.J. Pharmacol.* 56:85-90.
- Juan de J., Llibre Rodriguez. Y Milagros Guerra Hernandez. 2002. Actualización sobre la enfermedad de Alzheimer. *Revista cubana de medicina integral.* 1561-1570.
- Kimura H., McGeer P. L., Peng F. and McGeer E. G. 1980. Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. *Science.* 208. 1057–1059.
- Kesner R. Neurobiological views of memory. *Neurobiology of learning and memory.* Kesner R. and Martinez J. (Ed.) Second edition. 721-304. Academic press.
- Leung LS, Martin LA, Stewart DJ (1994) Hippocampal theta rhythm in Behaving rats following of the lesion of the septum. *Hippocampus* Apr; 4(2): 136-47.
- Limón I, Díaz A, Mendieta L, Chamorro G, Espinoza B, Zenteno E, Guevara J (2009). Amyloid-beta (25-35) impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats. *Neurosci Res.* 63: 129-137.
- Maki M, Matsukawa N, Yuasa H, Otsuka Y, Yamamoto T, Akatsu H, Okamoto T, Euda R, Ojika K. 2002. Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in thehipocampus in Alzheimer disease. *Journal Neuropathol Exp Neurol.* 61:176-185.
- Mann, D. M. A. 1988. Neuropathological and neurochemical aspect of Alzheimer’s disease. In *Psychopharmacology of the Aging Nervous System* (Iversen, L. L., Iversen, S. D., and Snyder, S. H., eds) pp. 1-67, Plenum, New York
- Manns I. D., Mainville L. and Jones B. E. 2001. Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex. *Neuroscience.* 107. 249–263.
- Markesbery W. 1997. Neiropathological criteria for the diagnosis of Alzheimer’s Disease. *Neurobiol Aging.* 18:13-19.
- Maurer k, Volk S, Gerbaldo H. 1997. Auguste D and Alzheimer’s disease. 349: 1546-1549.
- Mesulam MM. 1990. Human brain cholinergic pathways. *Progr Brain Res.*84: 231-241.

- Meunier EL, Fossier P, Bauz G, Amar M. 2003. Cholinergic modulation of the cortical neuronal Network. *Eur J Physiol.* 446: 17-29.
- Mikhail Stepanichev, Natalia Lazareva, Gulnur Tukhbatova, Sergey Salozhin, Natalia Gulyaeva. 2013. Transient disturbances in contextual fear memory induced by Aβ(25–35) in rats are accompanied by cholinergic dysfunction. *Behavioural Brain Research.* 259. 152– 157
- Moncada S. and Bolaños J. 2006. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem.* 97:1676-1689.
- Morgado I. 2005. Psicobiología del aprendizaje y memoria: fundamentos y avances recientes. *Rev. Neurol.* 40: 289-297.
- Morris R. 2001. Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 356. 1453-1465.
- Muñoz Muñoz R.M., Vargas Vorácková F. and Bobadilla NA. (2003). Valoración de un método para determinar nitritos y nitratos en muestras biológicas. *Rev Invest Clin* 55: 232-248
- Neve R. L., McPhie D. L. and Chen Y. 2000. Alzheimer's disease: a dysfunction of the myloid precursor protein. *Brain Res.* 886:54-56.
- Olton D., Markowska A., Voytko M. L., Givens B., Gorman L. and Wenk G. 1991. Basal forebrain cholinergic system: a functional analysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 295, 353–372.
- O'keefe J. and Dostrovsky J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brain Res.* 34. 171-175.
- O'keefe J. and Nadel L. 1979. *The hippocampus as a spatial map.* Oxford University Press.
- Olariu A., Tran M., Yamada K., Mizuno M., Hefco V., and Mabeshima T. 2001. Memory deficits and increased emotionality induced by β-amyloid (25-35) are correlated with the reduced acetylcholine release and altered phorbol dibutyrate binding in the hippocampus. *J. Neural. Transm.* 108: 1064-1079.
- Paxinos G and Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press. USA.
- Pérez-Severiano F., Savatierra-Sánchez R., Rodríguez-Pérez M., Cuevas-Martínez E., Guevara J, Limón D., Maldonado P. Medina-Campos O., Pedraza-Chaverri J and Santamaria A. 2004. S-Allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *Eur J Pharmacol.* 489:197-202.

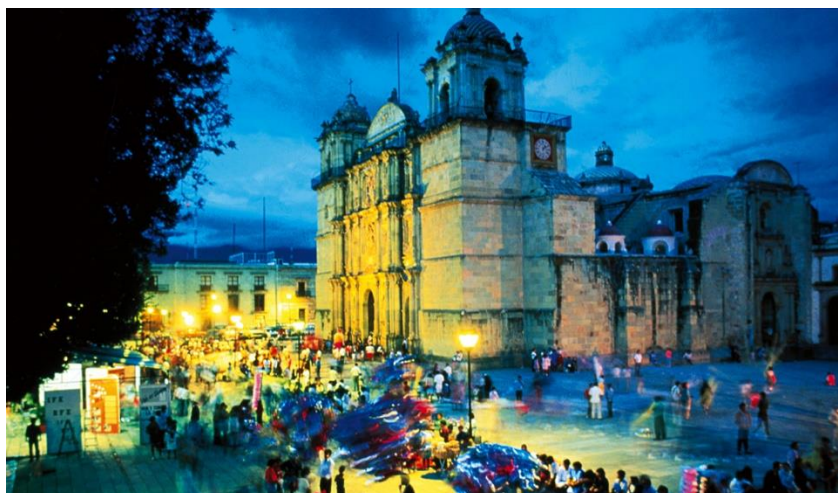
- Pike CJ, Walecewicz-Wasserman AJ, Komoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. 1995. Structure-activity analyses of β -amyloid peptides: contributions of the β 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem.* 64: 253-265.
- Prado, M.A.; Reis, R.A.; Prado, V.F.; de Mello, M.C.; Gomez, M.V. & de Mello, F.G. 2002. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochemistry International*, Vol.41, No. 5, (November 2002), pp. 291-299, ISSN 1872-9754
- Resende R., Pereira C., Agostinho P., Vieira A., Malva J., R. and Oliveira C. 2007. Susceptibility of hippocampal neurons to $A\beta$ peptide toxicity is associated with perturbation of Ca^{2+} homeostasis. *Brain Res.* 1143: 11-21.
- Shen ZY., Shen WY., Chen MH., Shen J., Cai WJ. And Zeng Y. 2002. Mitochondria, Calcium and nitric oxide in the apoptotic pathway of esophageal carcinoma cells induced by As203. *Int Mol Med.* 9: 879-887.
- Shoji M., Golde T.E. and Ghiso J. 1992. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science.* 258: 126-129.
- Smith M. L., Deadwyler S. A. and Booze R. M. 1993. 3-D reconstruction of the cholinergic basal forebrain system in young and aged rats. *Neurobiol. Aging* 14, 389–392.
- Stepanichev M, Moiseeva Y, Lazareva N, Onufriev M, Gulyaeva N. 2003. Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta25-35 peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats. *Brain Res Bull.* 61: 197-205.
- Stepanichev M., Lazareva N., Tukhbatova G., Salozhin S. and Gulyaeva N. 2013. Transient disturbances in contextual fear memory induced by $A\beta$ (25-35) in rats are accompanied by cholinergic dysfunction. *Behavioural Brain Research.* 259: 152-157.
- Stepanichev M., Onufriev M., Ykovlev A., Peregud D., Vorontsova O., Lacareva N and Gulyaeva N. 2008. Amyloid-beta (25-35) increases activity of neuronal NO-synthase in rat brain. *Neurochem Int.* 52: 1114-1124.
- Stepanichev M, Zdobnova I, Zarubenco I, Moiseeva Y, Lazareva N, Onufriev M, and Gulyaeva V. 2004 Amyloid beta(25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physio. Behav.* 80: 647-55
- Stewart V, Heslegrave A, Brown G, Clrak J, Heales S. 2002. Nitric oxide-dependent damage to neuronal mitochondria involves the NMDA receptor. *Eur J Neurosci.* 15:458-464.
- Squire L. S. y Kandel E. R. 2000. *Memory and Brain.* Scientific American Library. Nueva York.
- Summers WK, Majosvki LV, March GM, Tachiki K, Kling A. 1986. Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *New England J Med.* 315: 1241-1245.

- Swanson L. W. and Cowan W. M. 1979. The connections of the septal region in the rat. *J. Comp. Neurol.* 186, 621–655.
- Terranova j.p., Kan J.P., Storme J:J., Perraut P., Fur G.L. and Soubrié P. 1996. Administration of amyloid β -peptides in the rat medial septum causes memory deficits: reversal by SR 57746A, a non-peptide neurotrophic compound. *Neuroscience Letters.* 213. 79-82.
- Torreilles F, Tabcheh S, Guérin M, torreilles J. 1999. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res Rev.* 30: 153-163.
- Tombol, T. and Petsche, H. 1969. The histological organization of the pacemaker for the hippocampal theta rhythm in the rabbit. *Brain Res.* 12, 414-426.
- Townsed M, Mehta T, Selkoe DJ. 2007. Soluble A beta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulinmreceptor pathway. *J Biol chem.* 282 : 33305-33312.
- Triulzi R., Dai Q., Leblanc R., Gu Q., Orbeluscu J and Huo Q. 2008.. 63: 200-208.
- Tulving E. Schacter DL. 1990. Priming and human memory system. *Science*; 247: 376-9.
- Varadarajan S., Kanski J., Aksenova M., Lauderback C., and Butterfield. 2001. Different mechanism of stress and neurotoxicity for Alzheimer's $A\beta(1-42)$ and (25-35). *J. Am. Chem. Soc.* 123:5625-5631.
- Woolf N.J. and Butcher L.L. 2010. Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behavioural Brain Research.* 1872-7549.
- Wevers A, Witter B, Moser N, Busghaus L, Banerjee C, Steinlein OK, Schutz U, de Vos RA, Steur EN, Lindstrom J, Schroder H. 2000. Classical Alzheimer features and cholinergic disfunction: towards a unifying hypothesis? *Acta Neurol Scand Suppl* 176: 42-48.
- Xu C, Aatta S, Wu M, Alreja M. 2004. Hippocampal theta rhythm is reducer by suppression of the H-current in septohippocampal GABAergic neurons. *Eur J Neurosci.* Apr; 19(8): 2299-309.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reserval by tachykinin neuropeptides. 250: 279-282.

XII CONGRESOS



SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS



El sustentante del presente proyecto presento en el LVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas que tuvo lugar en la ciudad de Oaxaca, del 31 de agosto al 4 de septiembre del 2014.

“Incremento de la neurotoxicidad del $A\beta_{25-35}$ inducida por cobre”

Sánchez Cano Fredy, Ortega Hernández Laura, Rubio-Osornio Moises, Limón Pérez de león Ilhuicamina Daniel.



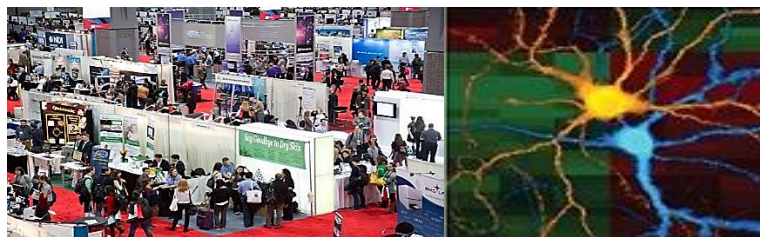
SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS



Parte de los resultados fueron presentados en el LVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas que tuvo lugar en San Miguel de Allende, Guanajuato, del 6 de septiembre al 1° de septiembre del 2015.

“Efecto del $A\beta_{25-35}$ sobre el estrés oxidativo en la vía septo-hipocampal de ratas”

Sánchez Cano Fredy, Báez Cordero Ana Silvia, Patricio Martínez Aleidy, Martínez Mendieta Liliana, Limón Pérez de León Ilhuicamina Daniel



Parte del presente proyecto fueron presentados en el 54th Anual Meeting de la sociedad de Neurociencias que se llevó a cabo en la ciudad de Chicago del 17 de octubre al 21 de octubre 2015.

Dependently concentration effects of Amyloid-beta (25-35) peptide on oxidative stress in septal-hippocampal pathway of rats

Limón ID¹., Báez Cordero A¹, Patricio Martínez A¹, Martínez Mendieta L^{1,2} **Sánchez Cano F¹**.

¹Laboratorio of Neuropharmacology, School of Chemistry BUAP. ²Inst. Cajal, Ctr. De investigación biomédica en red sobre enfermedades neurodegenerativas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain.

Astrac:

The amyloid-beta (25-35) fraction ($A\beta_{(25-35)}$) impairs short and long-term memory in rats, similarly to full length amyloid-beta peptide. Moreover, $A\beta_{(25-35)}$ causes a loss of the cholinergic phenotype of septal neurons without neuronal cell death in medial septum (MS). Therefore the functionality of the septal-hippocampal regions may be crucial for memory process. In this study, we have investigated the effects of three different $A\beta_{25-35}$ concentrations administered into the medial septum (MS) of rats on spatial memory and nitrosative stress in MS, hippocampus (Hp) and frontal cortex (FCx). For this purpose, male Wistar rats were administered unilaterally with $A\beta_{25-35}$ at one of the following concentrations [100 μ M], [500 μ M] and [1 mM] by stereotaxic surgery. Fourteen days after spatial learning was tested in Water maze for 5 consecutive days, and one week later spatial memory was tested during one day of evaluation. At the end of behavioral testing, animals were sacrificed to get the brain and dissect MS, Hp and FCx. In these areas of the brain the following oxidative markers was investigated: Nitric oxide (NO), lipoperoxidation (LPO) by colorimetric methods and nitration of proteins (3-NT) by immunohistochemistry. We found that spatial memory impairments in $A\beta_{25-35}$ - treated group was concentration dependent, where the higher concentration of $A\beta_{25-35}$ [1mM] causes a significant deficit in the spatial memory respect to control group. Meanwhile [100 μ M] $A\beta_{25-35}$ did not impairs the spatial memory of rats. These effect could be due to of that $A\beta_{25-35}$ [1mM] increases NO and LPO levels, accompanied of higher 3-NT immunoreactivity in MS and Hp respect to animals that received lower doses of $A\beta_{25-35}$ or control group. These results indicate that $A\beta_{25-35}$ causes nitrosative stress and impairs spatial memory of rats in a concentration-dependent manner.