

BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICO- MATEMÁTICAS

TESIS PROFESIONAL

ESTUDIO TEORICO-PRÁCTICO DE LA INTERACCIÓN DE UNA SERIE
DE ANTIINFLAMATORIOS-ANTIOXIDANTES CON EL $A\beta_{25-35}$ EN LA
PREVENCCION DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

p.QFB. REINA LÓPEZ CARPINTERO

DIRECTOR DE TESIS

DR. RAMSÉS E. RAMÍREZ GUTIÉRREZ
Departamento de Fisicomatemáticas-FCQ-BUAP

ASESOR DE TESIS

DR. ALFONSO D. DÍAZ FONSECA
Departamento de Farmacia-FCQ-BUAP

H. Puebla de Zaragoza .Enero 2015



BUAP

C.P. JOSÉ JUAN MORALES RODRIGUEZ
DIRECCION DE ADMINISTRACION ESCOLAR
PRESENTE

En relacion al oficio de fecha 20 de Enero de 2015, signado por el Coordinador del Departamento de Físico-Matemáticas de la Facultad de Ciencias Químicas, me permito comunicar a Ud. el nombre de los Catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO que sustentará:

LOPEZ CARPINTERO REINA

JURADO

DRA. MARIA LUISA ROXANA LICONA IBARRA
MC. SAMUEL TREVIÑO MORA
M.C. ESTHER LARA GONZALEZ

Examen que se realizará el día 30 de Enero de 2015, a las 12:00 horas en Auditorio de Biología.

Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideracion

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Z. a 20 de Enero de dos mil quince

M.C. JOSE DE GPE. QUIROZ OROPEZA

DIRECTOR

C.c.p. Archivo

Facultad
de Ciencias
Químicas

Av. San Claudio y 14 sur,
edif. 179, Col. San Manuel,
Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72592
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 7391

“La experiencia más hermosa que tenemos a nuestro alcance es el misterio. Es la emoción fundamental que está en la causa del verdadero arte y la ciencia“

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

En este momento, siento que finaliza una etapa de mi vida. A la mente me viene el recuerdo de todas las vivencias, emociones y sentimientos vividos en la universidad. Esta tesis es el resultado de la ilusión, el esfuerzo, la paciencia y la confianza que han volcado sobre mí las personas que desinteresadamente han cooperado y contribuido en mi educación, tanto en el ámbito profesional como en el personal a todas ellas gracias, en especial:

A mi director de tesis: El Dr. Ramsés E. Ramírez Gutiérrez, maestro y sobre todo amigo, nunca podré agradecerle todo lo que me ha ayudado y enseñado a lo largo de este tiempo. Le agradezco haberme transmitido su pasión por la investigación, su forma de ver las cosas y su comprensión. Gracias por tener siempre un momento para escuchar y especialmente por su paciencia y sacrificio.

A mi asesor de tesis: El Dr. Alfonso D. Díaz Fonseca, quisiera agradecerle profundamente que me abriera las puertas de su laboratorio y me permitiera formar parte de su proyecto de investigación. Gracias por dirigirme a lo largo de este camino y ofrecerme siempre su ayuda.

A mi comisión revisora de tesis: A la Dra. María Luisa Roxana Liconá Ibarra, al M.C. Samuel Mora Treviño y a la M.C. Esther Lara González, cuyas observaciones y aportaciones han sido de gran ayuda para la evaluación y mejoramiento de este trabajo.

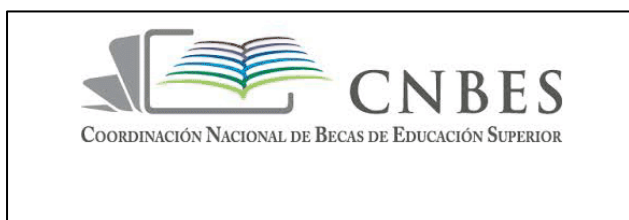
A mis amigas: A. Angélica Martínez, Martha Jiménez, y S. Monserrat García, por compartir conmigo tanto los éxitos como los fracasos que he obtenido a lo largo de este camino y, sobretodo, por hacerme siempre alguna broma para reír y levantarme el ánimo en los momentos difíciles. Son verdaderamente unas magníficas amigas.

A mis padres: Salomón López Hernández y Ramona Carpintero Ruiz, gracias por animarme en todo momento a seguir luchando para alcanzar mis objetivos, dándome todo su amor, cariño y ternura incondicional además por compartir conmigo este día tan esperado, sin vosotros nunca hubiera llegado hasta aquí.

A mis hermanas: Carmen López Carpintero y Patricia López Carpintero, gracias por brindarme su amor, confianza y apoyo para lograr este objetivo.

A todas aquellas personas involucradas que de una u otra manera fueron participes en la realización de este trabajo, familiares, amigos, compañeros y conocidos gracias!!!

Durante la realización del presente trabajo se conto con el apoyo económico de la beca otorgada por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) y de la Coordinación Nacional de Becas de Educación Superior (CNBES)



ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas

1. Introducción	1
2. Antecedentes	
2.1 Antecedentes teóricos	3
2.1.1 ¿Qué se puede obtener de la QC?	3
2.1.2 ¿Cuáles son las principales herramientas de la QC?	4
2.1.3 Ecuación de Schrödinger	5
2.1.4 Aproximación Born-Oppenheimer	7
2.1.5 Método Hartree-Fock	9
2.1.6 Funciones de base	10
2.2.6.1 Tipos de funciones de base	10
2.2.6.2 Bases polarizadas	11
2.2.6.3 Bases difusas	11
2.2.7 Teoría de funcionales de la densidad	11
2.2.8 Superficie de potencial electrostático	14
2.2.9 Potencial electrostático molecular	15
2.2 Antecedentes experimentales	16
2.2.1 Fisiopatología de la EA.	16
2.2.2 Marcadores histopatológicos de la EA	17
2.2.3 El cerebro y la inflamación	17
2.2.4 La neuroinflamación como un factor detonante de la neurodegeneración	19
2.2.5 La neuroinflamación en la EA	20
2.2.6 El péptido amiloide- β	22
2.2.7 Estructura y función del amiloide- β_{25-35}	23
2.2.8 Mecanismo de toxicidad del amiloide- β	24
2.2.9 La inflamación como un mecanismo de toxicidad del amiloide- β	24
2.2.10 los antiinflamatorios y antioxidantes en la EA	25
2.2.11 El amiloide- β_{25-35} un modelo para estudiar la EA <i>in vivo</i>	25
3. Justificación	26

4. Hipótesis	27
5. Objetivo general	27
6. Objetivo particulares	27
7. Diagrama general del trabajo	28
7.1 Diagrama teórico	28
7.2 Diagrama experimental	30
7.2.1 Animales de experimentación	31
7.2.2 Preparación de sustancias empleadas en los tratamientos	31
7.2.3 Tratamientos experimentales	31
7.2.4 Cirugía estereotáxica	31
7.2.5 Preparación de los tejidos cerebrales para las técnicas histológicas	32
7.2.6 Tinción de hematoxilina y eosina	32
8. Resultados	33
8.1 Resultados teóricos	33
8.1.1 Optimización y frecuencias	33
8.1.2 Potencial electrostático molecular (MEP)	39
8.1.3 Complejos $\alpha\beta_{25-35}$ y los antiinflamatorios-antioxidante	41
8.2 Resultados experimentales	45
8.2.1 La inyección del amiloide- β_{25-35} incrementa la inmunorreactividad de GFAP y GD en el hipocampo de rata	46
9. Conclusiones	49
10. Perspectivas	50
11. Bibliografía	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los métodos teóricos de la QC -----	5
Tabla 2. Comparación de energía de diferentes métodos -----	35
Tabla 3. Distancia de enlace (Å) de los antiinflamatorios –antioxidante -----	37
Tabla 4. Distancia (Å) de ángulo (°) de los antiinflamatorios –antioxidante -----	37
Tabla 5. Distancia (Å) del ángulo (°) diedro de los antiinflamatorios –antioxidante -----	38
Tabla 6. Distancias obtenidas en el método PM3 y RHF/STO-3G entre los extremos HO- de cada antiinflamatorio-antioxidante y el péptido A β ₂₅₋₃₅ -----	44
Tabla 7. Clasificación de las interacciones de puentes de hidrogeno según Jeffrey -----	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación grafica de la superficie de energía potencial -----	15
Figura 2. Esquema que ilustra la barrera hematoencefalica -----	18
Figura 3. Marcadores histopatológicos de la enfermedad del Alzheimer -----	21
Figura 4. Procesamiento del péptido amiloide- β -----	22
Figura 5. Modelo 3D del amiloide- β_{25-35} -----	23
Figura 6. Estructuras obtenidas por los diferentes métodos de estructura electrónica -----	34
Figura 7. Estructura general de los antiinflamatorios-antioxidante -----	36
Figura 8. MEP de las estructuras de los antiinflamatorios-antioxidante -----	39
Figura 9. MEP del $A\beta_{25-35}$ -----	40
Figura 10. Complejos con el método PM3 y HF -----	41
Figura 11. Micrografías representativas de la Tinción histoquímica de hematoxilina y eosina de la región CA1 del Hp y GD de rata -----	46
Figura 12. Fotomicrografías muestran la inmunorreactividad para GFAP-----	47
Figura 13. Cuantificación del número de células reactivas a GFAP -----	48

ABREVIATURAS

a. a	Aminoácido
a. u	Unidades Atómicas
apoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína Precursora Del Amiloide
Aβ	Amiloide Beta
Aβ₂₅₋₃₅	Amiloide Beta Fracción 25-35
BHE	Barrera Hematoencefalica
DFT	Métodos del funcional de densidad
DSTA	Demencia Senil De Tipo Alzheimer
EA	Enfermedad del Alzheimer
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
GD	Giro Dentado
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GGA	Aproximación de gradiente generalizada
HF	Hartree Fock
Hp	Hipocampo
iNOS	Sintetasa de Oxido Nítrico Inducible
IR	Infrarrojo
LDA	Aproximación local de la densidad
LDSA	Aproximación local de la densidad de espín
LTP	Potenciación de Largo Plazo
MEP	Potencial Electroestático Molecular
MM	Mecánica Molecular
MNFs	Marañas Neurofibrilares
NO	Oxido Nítrico
NOS	Sintetasa de Oxido Nítrico
OMS	Organización mundial de la salud
PNs	Placas Neuríticas
QC	Química Computacional
RL	Radical Libre
RMN	Resonancia Magnética Molecular
SCF	Método de campo auto consistente
SE	Métodos Semi-empíricos y empíricos
SEP	Superficie Del Potencial Electroestático
SNC	Sistema Nervioso Central
SSI	Solución Salina Isotónica
UV	Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

Con el desarrollo eficiente de la tecnología computacional, los algoritmos implementados en el software para el cálculo de estructuras moleculares, en la actualidad es una de las opciones más utilizadas que se han conseguido implementar en la investigación de tipo farmacológico y biológico. [1]. La química computacional (QC) ayuda a resolver problemas químicos y utiliza los resultados de la química teórica incorporados en modernos programas que sirven para calcular propiedades fisicoquímicas como son: energía de enlace, energía libre de Gibbs, entalpías de formación, espectroscopia de infrarrojo (IR), ultravioleta (UV), resonancia magnética nuclear (RMN), etc. en moléculas orgánicas, inorgánicas, biológicas y cuerpos sólidos.

Los métodos empleados cubren situaciones estáticas y dinámicas, en todos los casos el tiempo de cálculo aumenta rápidamente a medida que el tamaño del sistema estudiado crece. Las formas de determinar la energía total para predecir la estructura molecular son: Métodos *ab initio* (son empleados para pequeños sistemas moleculares), Métodos del funcional de densidad (DFT), Métodos semi-empíricos (SE) (se aplican a grandes sistemas moleculares). Mecánica molecular (MM), Métodos para cuerpos sólidos, Dinámica química, etc. La elección del método depende de la particularidad del problema [2].

En el contexto de estos métodos teóricos, se han desarrollado a su vez varios métodos computacionales complementarios llamados también métodos químicos-cuánticos que permiten estudiar los modelos de las moléculas de interés extrayendo así sus diversas propiedades físicas y químicas [3].

Es así como con ayuda de la QC se estudia el comportamiento molecular del Amiloide beta ($A\beta$) fracción 25-35 en la enfermedad del Alzheimer (EA). Las últimas décadas han sido históricamente importantes en el desarrollo del conocimiento sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), en especial, en el entendimiento de la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas y en la búsqueda de nuevas vías terapéuticas para su tratamiento. Se han realizado avances significativos en el conocimiento del papel biológico de estos factores, su caracterización molecular y regulación, así como sus mecanismos de señalización.

La evidencia disponible sugiere que el Amiloide-beta ($A\beta_{25-35}$) constituye una de las principales causas importantes de las enfermedades neurodegenerativas [4]. En la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas para esta enfermedad, se ha sugerido el uso de

antiinflamatorios-antioxidantes ya que tienen la capacidad de interaccionar con $A\beta_{25-35}$ (secuencia neurotóxica) y disminuir su excesiva expresión dando como resultado un tratamiento profiláctico más apropiado en la EA. El mecanismo que impulsa el progreso crónico de las enfermedades neurodegenerativas continúa sin conocerse por completo. Por lo tanto, se convierte en fundamental y urgente la investigación que identifique el origen del progreso crónico de esta enfermedad.

Durante la elaboración de esta tesis se realiza el análisis Químico-teórico--experimental de una serie de antiinflamatorios (*Aspirina, Diclofenaco, Ibuprofeno, Meloxicam, Naproxen*) y un antioxidante (*Vitamina E*). Utilizando métodos *ab initio* y semi-empíricos con la finalidad de obtener sus características electrónicas, así como conocer las posibles interacciones que pueden formar con el $A\beta_{25-35}$ que es la secuencia neurotóxica responsable de causar el estrés oxidativo, inflamación y la muerte neuronal. Todo esto con la finalidad de obtener un mayor conocimiento respecto a la EA, enfocado a la investigación de nuevas alternativas que ayuden a la prevención y/o cura de dicha enfermedad.

2. ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES TEÓRICOS

2.1.1 ¿QUÉ SE PUEDE OBTENER DE LA QC?

El objetivo principal de la QC es predecir todo tipo de propiedades moleculares de sistemas químicos. Adicionalmente, la QC ofrece información útil para racionalizar o interpretar tendencias y enunciar relaciones de estructura-actividad. Para ello, la QC emplea una amplia gama de técnicas teóricas en constante desarrollo y mejora. La naturaleza del modelo molecular de interés y la del problema o propiedad a estudiar condicionan la selección del método(s) a utilizar. Muchas de las herramientas de la QC pueden ser aplicadas por todo tipo de científicos, no sólo por especialistas.

Históricamente, la QC surge como una evolución de la Química Teórica con el objetivo de investigar el comportamiento de la materia a nivel molecular mediante ordenadores; en otras palabras, la QC es sinónimo de modelización molecular[5]. Más concretamente, la implementación y aplicación de las técnicas de la QC nos permite investigar múltiples propiedades y comportamientos moleculares como son:

- *La geometría molecular* en un sentido amplio: además de distancias y ángulos de enlace, es posible caracterizar la forma y tamaños relativos de todo tipo de moléculas y macromoléculas, haciéndolo además para conjuntos de conformeros representativos.
- *La energía* de todo tipo de especies químicas, incluyendo intermedios, estados de transición, estados excitados, etc. Es posible, además, estimar distintos tipos de magnitudes termodinámicas tanto en fase gas como en fases condensadas.
- *La reactividad química*. La reactividad de una especie es un ejemplo de propiedad genuinamente química que puede cuantificarse en forma de índices de reactividad con la ayuda de la QC. Además, la QC es capaz de determinar la geometría y estabilidad relativa de intermedios y estados de transición de reacción, es decir, caracteriza los mecanismos de reacción. Más aún, la QC dispone de herramientas sofisticadas para el cálculo de todo tipo de magnitudes cinéticas como constantes de velocidad, efectos cinéticos isotópicos, secciones eficaces de reacción, factores de efecto túnel, etc.
- *Las propiedades espectroscópicas*, pero también todo tipo de propiedades eléctricas y magnéticas de moléculas individuales. La QC predice de modo rutinario los espectros IR, UV y RMN, siendo en muchos casos una herramienta indispensable para la correcta interpretación/asignación de los datos experimentales.

- *Las propiedades físicas* de las fases condensadas y materiales. La descripción correcta de las interacciones intermoleculares es un desafío que, en muchos casos, es posible afrontar con éxito con la ayuda de varios métodos. Así, por ejemplo, la QC puede caracterizar la estructura de polímeros complejos y sus propiedades mecánicas y térmicas.

2.1.2 ¿CUÁLES SON LAS PRINCIPALES HERRAMIENTAS DE LA QC?

La clasificación sistemática de los métodos de la QC no es tarea fácil, debido a la gran variedad de métodos existentes y a la diversidad de sus implementaciones en forma de software. Esta profusión de metodología y software se refleja en la gran cantidad de acrónimos incluidos en cualquier libro o artículo dedicado a la Química Computacional. Sin embargo, para avanzar en el conocimiento y aplicación de la QC es conveniente partir de una primera clasificación de los métodos teóricos como la que se resume en la tabla 1.

Método	Fundamento	Rango de aplicación	Ventajas	Desventajas	Ejemplos
Mecánica molecular (MM)	Potencial de interacción	1-10 ⁵ átomos	Gran rapidez, muy eficaces en fases condensadas	Aplicabilidad limitada por el potencial MM seleccionado	AMBER, REBO, ReaxFF
AB initio	Ecuación de Schrödinger y función de onda	1- 10 ² átomos (todo tipo de propiedades)	Exactitud y precisión controlable	Lentos, los métodos mas avanzados son muy complicados en usar	HF, MP2, CCSD, CCSD(T)
Teoría del funcional de densidad (DFT)	Teorema de KohnSham y densidad electrónica	1-10 ³ átomos (todo tipo de propiedades)	En general que ab initio pero su aplicación es mas limitada	Exceso de métodos DFT disponibles , no hay pautas para mejorar sistemáticamente los resultados	B3LYP BLYP PWP1 PBE
Semiempíricos (SE)	Ecuación de Schrödinger y función de onda o Teorema de KohnSham y densidad electrónica (como forma de ajuste)	1-10 ⁴ átomos (muchas, pero no todas las propiedades moleculares)	Gran rapidez fáciles de usar, bastantes fiables en moléculas orgánicas	Errores no sistemáticos, escasa fiabilidad en moléculas con metales y especies inestables	PM3 PM6 SCC-DFTB

Tabla 1. Cuadro resumen de las características de los principales métodos teóricos de la QC. En la mayoría de las aplicaciones se asume que la aproximación de Born-Oppenheimer para la separación del movimiento electrónico y nuclear es válida. De esta manera, los métodos de la QC se utilizan para explorar las superficies de energía potencial (repulsión internuclear + energía electrónica) en función de la geometría molecular [6].

2.1.3 ECUACIÓN DE SCHRÖDINGER

La ecuación de Schrödinger es la base de la química cuántica, por que predice la energía de un sistema tomando en cuenta a los electrones de cada partícula incluso si esta es polielectrónica.

Hay dos tipos de ecuación de Schrödinger; la dependiente del tiempo que se expresa:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{8\pi^2m} \nabla^2 + V \right] \Psi(\vec{r}, t) = \frac{i\hbar}{2\pi} \frac{\partial \Psi(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad \text{Ec.1}$$

En donde Ψ es la función de onda, m es la masa de la partícula \hbar es la constante de Planck, V es el campo potencial donde se mueve la partícula, ∇^2 el operador Laplaciano que pretende describir la energía cinética del sistema.

La otra ecuación es la independiente del tiempo y es la utilizada en los modelos computacionales. Aplicando el método de separación de variables, esta ecuación se deriva de la ecuación 1, en la que se considera que la función de energía potencial, es dependiente de la posición pero no del tiempo, simplificándose la ecuación de Schrödinger como lo muestra la ecuación 2:

$$\mathbf{H}\Psi(\vec{r},) = \mathbf{E}\Psi(\vec{r},) \quad \text{Ec.2}$$

Aunque aparenta ser una ecuación muy sencilla en realidad es muy compleja, en donde el término \mathbf{E} corresponde a la energía y \mathbf{H} corresponde a un operador diferencial que incluye la energía cinética y potencial de núcleos y electrones, conocido como operador Hamiltoniano que tiene la siguiente representación :

$$\begin{aligned} \hat{H} = & -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{elec} \left(\frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2} \right) \\ & - \frac{1}{2} \sum_{\mu=1}^{nucl} \left(\frac{\partial^2}{\partial x_{\mu}^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_{\mu}^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_{\mu}^2} \right) \\ & + \sum_{\mu=1}^{nucl} \sum_{v>\mu} \frac{z_{\mu}z_v}{|\vec{R}_{\mu} - \vec{R}_v|} - \sum_{\mu=1}^{nucl} \sum_{i=1}^{elec} \frac{z_{\mu}}{|\vec{r}_i - \vec{R}_{\mu}|} + \sum_{i=1}^{elec} \sum_{j>i} \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} \end{aligned} \quad \text{Ec.3}$$

En donde μ y ν representan a los núcleos, mientras que i y j a los electrones, siendo el primer término correspondiente a la energía cinética de los electrones, el segundo es la energía cinética de los núcleos, el tercero corresponde a las repulsiones entre los núcleos y el cuarto término corresponde a la energía potencial de las atracciones entre los electrones y el núcleo, por lo que la ecuación de Schrödinger adquiere la siguiente forma:

$$\hat{H}\psi(\vec{r}, \vec{R}) = E\psi(\vec{r}, \vec{R}) \quad \text{Ec.4}$$

Donde ψ es la función de onda que depende de un conjunto de componentes de vectores que describen la posición de cada partícula, \vec{r} la de los electrones y \vec{R} la de los núcleos. El objetivo de la química cuántica es resolver esta ecuación para un sistema molecular [7].

2.1.4 APROXIMACIÓN DE BORN Y OPPENHEIMER

En 1927 Born y Oppenheimer encontraron una manera de simplificar la resolución del Hamiltoniano, la cual se basa en el hecho de que los núcleos son mucho más pesados que los electrones, por lo que éstos últimos se mueven mucho más rápido, lo que permite despreciar el movimiento de los núcleos, considerándolos en un estado estacionario, dependiendo entonces la distribución electrónica esencialmente de la posición de los núcleos y no de su velocidad [8]. Reordenando la ecuación de Schrödinger se expresa de la siguiente manera:

$$\hat{H} = \hat{H}_{el}(\vec{r}, \vec{R}) + \hat{T}_N(\vec{R}) \quad \text{Ec.5}$$

En donde $\hat{T}_N(\vec{R})$ es la energía cinética del núcleo que queda separada de $\hat{H}_{el}(\vec{r}, \vec{R})$ que es el Hamiltoniano puramente electrónico como lo muestra la ecuación 6:

$$\hat{H}_{el}(\vec{r}, \vec{R}) = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{elec} \left(\frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2} \right) - \sum_{\mu=1}^{nucl} \sum_{i=1}^{elec} \frac{Z_{\mu}}{|\vec{r}_i - \vec{R}_{\mu}|} + \sum_{i=1}^{elec} \sum_{j>i} \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} + \sum_{\mu=1}^{nucl} \sum_{\nu>\mu} \frac{Z_{\mu}Z_{\nu}}{|\vec{R}_{\mu} - \vec{R}_{\nu}|} \quad \text{Ec.6}$$

y

$$\psi(\vec{r}, \vec{R}) = \psi_{el}(\vec{r}, \vec{R}) \cdot \psi_N(\vec{R}) \quad \text{Ec.7}$$

En las que las coordenadas de los electrones están referidos al centro de la masa de la molécula, por lo que sustituyendo la ecuación 5 y 7 en 4 obtenemos la ecuación de Schrödinger siguiente:

$$[\hat{H}_{el}(\vec{r}, \vec{R}) + \hat{T}(\vec{R})]\psi_{el}(\vec{r}, \vec{R}) \cdot \psi_N(\vec{R}) = E\psi_{el}(\vec{r}, \vec{R}) \cdot \psi_N(\vec{R}) \quad \text{Ec.8}$$

Si consideramos la configuración nuclear fija, \vec{R} será \mathbf{R}_0 , quitando los términos de la energía cinética nuclear, así la ecuación de Schrödinger para el hamiltoniano electrónico se escribe:

$$\hat{H}_{el}(\vec{r}, \vec{R}_0)\psi_{el}^n(\vec{r}, \vec{R}_0) = E_{el}^n\psi_{el}^n(\vec{r}, \vec{R}_0) \quad \text{Ec.9}$$

Acorde con la idea de que los electrones se mueven más rápido que los núcleos, cuando éstos cambian su configuración un poco, los electrones inmediatamente se ajustan, la energía electrónica varía ligeramente como una función de los parámetros que definen la configuración nuclear y se genera una red de puntos de energía para cada estado electrónico que constituye la superficie de energía potencial $\hat{U}_N^n(\vec{R})$ (energía electrónica incluyendo la repulsión nuclear).

Se puede definir el Hamiltoniano nuclear efectivo como:

$$\hat{H}_N^n(\vec{R}) = \hat{U}_N^n(\vec{R}) - \frac{1}{2} \sum_{\mu=1}^{nucl} \left(\frac{\partial^2}{\partial^2 x_\mu} + \frac{\partial^2}{\partial^2 y_\mu} + \frac{\partial^2}{\partial^2 z_\mu} \right) \quad \text{Ec.10}$$

En esta ecuación se puede apreciar que el operador Hamiltoniano incluye a los operadores que representan las energías electrónicas y nucleares, por lo que la ecuación de Schrödinger se escribe como:

$$\hat{H}_N^n(\vec{R})\varphi_N(\vec{R}) = E_T\varphi_N(\vec{R}) \quad \text{Ec.11}$$

donde E_T representa las energías totales de la molécula.

A pesar de la simplificación de la ecuación de Shrödinger, ésta solo puede resolverse exactamente para sistemas monoelectrónicos, así que para poder resolverla para sistemas polielectrónicos se recurre a soluciones aproximadas, ya que la función de onda contiene toda la información necesaria para calcular las propiedades del sistema.

2.1.5 MÉTODO HARTREE FOCK

El método Hartree-Fock (HF), se obtiene al sustituir en la ecuación de Schrödinger un determinante de Slater, seguida de algunas transformaciones algebraicas [9]. La aproximación principal es llamada aproximación de campo central. Este método no incluye las repulsiones coulombicas electrón-electrón en el cálculo, pero su efecto neto está incluido [10,11].

El método HF es un cálculo variacional, lo cual significa que las energías aproximadas calculadas son iguales o más grandes a la energía exacta [12]. Este método consiste en buscar orbitales Ψ_a (espín-orbitales) que minimicen la energía del sistema según la ecuación:

$$\mathcal{F}|\Psi_a\rangle = \varepsilon_a|\Psi_a\rangle \quad \text{Ec.12}$$

Donde ε_a es la energía del orbital y \mathcal{F} es el operador Fock el cual se define como:

$$\mathcal{F}(r_1) = h(r_1) + \sum_b j_b(r_1) - k_b(r_1) \quad \text{Ec.13}$$

Este operador consiste en tres términos, el primero es la suma de la energía cinética para un electrón más la energía potencial de la atracción del electrón 1 y los núcleos:

$$h(r_1) = -\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_{1A}} \quad \text{Ec.14}$$

El segundo y tercer término corresponden al operador coulombico y el operador de intercambio j_b y k_b respectivamente:

$$j_b(r_1)\Psi_a(r_1) = \langle \Psi_b(r_2) | r_{12}^{-1} | \Psi_b(r_2) \rangle \Psi_a(r_1) \quad \text{Ec.15}$$

$$k_b(r_1)\Psi_a(r_1) = \langle \Psi_b(r_2) | r_{12}^{-1} | \Psi_a(r_2) \rangle \Psi_b(r_1) \quad \text{Ec.16}$$

Para obtener la expresión del operador coulombico que describe el promedio de las interacciones entre los electrones, se considera una función que es producto de funciones de onda Ψ_a normalizada para cada electrón.

El operador Fock depende de funciones propias que no son conocidas inicialmente, por lo que las ecuaciones HF deben ser resueltas iterativamente mediante el procedimiento llamado método del campo autoconsistente (SCF, por sus siglas en inglés) proceso que termina cuando la diferencia entre dos interacciones consecutivas es menor que el límite establecido en el parámetro de convergencia [13,17].

2.1.6 FUNCIONES DE BASE

El conjunto de funciones de base son descripciones matemáticas utilizadas para describir la forma de los orbitales en el átomo. La mayor parte de los métodos mecanocuánticos moleculares, comienzan el cálculo con la elección de las funciones de base. El menor número de funciones posibles es conocido como función de bases mínimas. El uso de una base adecuada es un requerimiento esencial para el éxito del cálculo. [14,15]

2.1.6.1 TIPOS DE FUNCIONES DE BASE

Los dos tipos de funciones de base más utilizados, llamados también orbitales atómicos (aunque en general no resuelven la ecuación de Schrödinger) son los orbitales de tipo Slater (STO) y los de tipo gaussiano (GTO).

Los orbitales de tipo Slater tienen la forma:

$$X^{sto} = N r^{n-1} e^{-\zeta r} Y_{lm}(\theta, \varphi) \quad \text{Ec.17}$$

Donde N es la constante de normalización, Y_{lm} son las funciones conocidas como armónicos esféricos, mientras que ζ es el exponente orbital de Slater, r es la distancia electrón-núcleo y n es el numero cuántico principal.

Los orbitales de tipo gaussiano pueden escribirse en término de coordenadas polares o cartesianas, ecuaciones 18a y 18b respectivamente:

$$X^{GTO} = N r^{(2n-2-l)} e^{-\zeta r} Y_{lm}(\theta, \varphi) \quad \text{Ec.18a}$$

$$X^{GTO} = N x^l y^m z^n e^{-ar^2} \quad \text{Ec.18b}$$

Donde la suma de l, m, n determinan el tipo de orbital, así para un orbital s $l+n+m=0$, para un orbital p la suma será 1, etc. y α es el exponente del orbital gaussiano. Los programas para realizar cálculos de estructura electrónica transforman las coordenadas cartesianas en funciones esféricas.

2.1.6.2 BASES POLARIZADAS

La división de valencia permite cambiar el tamaño de los orbitales pero no su forma. Las bases con polarización evitan esta limitación al adicionar orbitales con mayor momento angular respecto al requerido para la descripción basal de cada átomo. La base 6-31G (d) también conocida como 6-31g*, le suma funciones de base tipo d a los átomos pesados. Otra base polarizada conocida es la 6-31G (d, p) o 6-31G**, la cual suma funciones base tipo p al átomo de hidrógeno y funciones base tipo d sobre átomos pesados [15].

2.1.6.3 BASES DIFUSAS

La incorporación de funciones difusas permite a los orbitales ocupar un espacio mayor, esto extiende las regiones de valencia y representan muy bien las regiones donde los enlaces son débiles como es el caso de enlaces por puente de hidrógeno. Las funciones difusas se representa por un signo + en la función [45]. La base 6-31+G**, incorpora una base doble de valencia dividida con polarización y funciones difusas en átomos pesados y ligeros [15].

2.1.7 TEORÍA FUNCIONALES DE LA DENSIDAD

La Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT, por sus siglas en inglés), aplicada a sistemas electrónicos, es un procedimiento variacional alternativo a la solución de la ecuación de Schrödinger. En 1964, Hohenberg y Kohn demostraron que el estado basal de la energía electrónica, la función de onda y las demás propiedades electrónicas, están determinadas completamente por la densidad electrónica ρ . Por lo que se puede decir que la energía del estado basal E_0 es funcional de la densidad electrónica:

$$E_0 = E_0[\rho_0] \quad \text{Ec.19}$$

La ecuación 19 es el primer teorema de Hohenberg y Kohn [18]

El segundo teorema de Hohenberg y Kohn establece que el funcional de la densidad $E_0[\rho_0]$ toma un mínimo valor para $\rho=\rho_0$ es decir $E_0[\rho']$ en la que la función de onda normalizada del estado fundamental minimiza la integral variacional:

$$E_0[\rho'] \geq E_0[\rho_0] \quad \text{Si } \rho' \neq \rho_0 \quad \text{Ec.20}$$

Dado que la energía en estado fundamental es la suma promedio de la energía cinética electrónica, atracciones electrón-núcleo y repulsiones electrón-electrón:

$$E = T + V_{NE} + V_{ee} \quad \text{Ec.21}$$

Y puesto que la energía es un funcional de la densidad, cada uno de estos promedios es un funcional de ρ_0 :

$$E_0 = T[\rho_0] + V_{NE}[\rho_0] + V_{ee}[\rho_0] \quad \text{Ec.22}$$

En la ecuación 22 se pueden observar dos términos: la parte dependiente del sistema $V_{NE}[\rho_0]$ y la independiente con validez universal que se representa como \mathcal{F}_{HK} llamado funcional de Hohenberg-Kohn:

$$\mathcal{F}_{HK}[\rho_0] = T[\rho_0] + V_{ee}[\rho_0] \quad \text{Ec.23}$$

Sin embargo este funcional no nos dice como obtener E_0 ni ρ_0 por lo que Kohn y Sham en 1965 idearon un método para obtener ρ_0 y a partir de éste E_0 . De manera simplificada la ecuación de Kohn y Sham es[19]

$$E[\rho] = T_s[\rho] + V_{ne}[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + E_{xc}[\rho] \quad \text{Ec.24}$$

En donde el método será exacto siempre y cuando se conozca el término de intercambio y correlación E_{xc} , el cual está dado por la expresión:

$$E_{xc}[\rho_0] = E_x[\rho_0] + E_c[\rho_0] \quad \text{Ec.25}$$

Donde E_x es la energía de intercambio y E_c de correlación. Sin embargo, como la dependencia funcional de E_{xc} con la densidad $[\rho_0]$ es desconocida, estará íntimamente relacionada con la aproximación utilizada para darle forma al funcional de intercambio y correlación. Algunas formas de obtener el término $[\rho_0]$ se clasifican en [12]

- Aproximación local de la densidad (LDA)

Este método conocido como LDA por sus siglas en inglés, considera que si la densidad ρ varía de forma extremadamente lenta con la posición, la energía $[\rho_0]$ está dada por:

$$E_{xc}^{LDA}[\rho] = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{xc}(\rho) d\mathbf{r} \quad \text{Ec.26}$$

Donde la integral corre sobre todo el espacio y (ρ) es la energía interna de intercambio y correlación por electrón en un gas de electrones homogéneos y con densidad ρ .

Dentro de éste método existe la denominada aproximación de la densidad de espín (LSDA por sus siglas en ingles) en donde se separa la densidad electrónica según el espín en $\rho^a(\mathbf{r})$, originada por lo electrones de espín α , y en $\rho^b(\mathbf{r})$, debida a los electrones con espín β . Con esta idea, E_{xc} se convierte en un funcional que depende de las dos densidades:

$$E_{xc} = E[\rho^a, \rho^b] \quad \text{Ec.27}$$

- Corrección por gradiente

Las aproximaciones LDA y LSDA dependen de ρ que varía lentamente con la posición. Ambas aproximaciones se pueden mejorar si se corrigen mediante la variación de la densidad electrónica con la posición. Esto se hace incluyendo un gradiente de ρ^a y ρ^b en el integrando de la ecuación 26:

$$E_{xc}^{GGA}[\rho^a, \rho^b] = \int f(\rho^a, \rho^b, \nabla\rho^a, \nabla\rho^b) d\mathbf{r} \quad \text{Ec.28}$$

Donde f es una función de la densidad de espín y sus gradientes. Las letras GGA se refieren a la aproximación de gradiente generalizado (GGA por sus siglas en inglés).

- Métodos híbridos

Estos métodos son ampliamente usados, mezclan los funcionales de intercambio de Hartree-Fock con intercambio-correlación DFT. Uno de los funcionales híbridos más utilizados es el B3LYP [48,49] que se define como[20,21]

$$E_{ci}^{B3LYP} = (1-a)E_i^{LSD} + aE_i^{HF} + bE_i^{B88} + cE_c^{LYP} + (1-c)E_c^{LSD} \quad \text{Ec.29}$$

(3 coeficient es) $a = .20$; $b = 0.72$; $c = 0.81$

Donde E_i^{HF} es la energía de intercambio Hartree-Fock y los parámetros a , b y c fueron elegidos de tal manera que los cálculos concordaran con los datos experimentales. El número 3 del funcional híbrido (B3LYP) se debe a que hay tres coeficientes que definen el tipo de combinación.

2.1.8 SUPERFICIE DE LA ENERGÍA POTENCIAL

Debido a que los electrones son, por mucho, más ligeros que los núcleos, la parte electrónica de la función de onda puede responder en forma instantánea a cualquier movimiento nuclear. En la aproximación de Born-Oppenheimer es posible tener una superficie de energías potenciales obteniendo la energía electrónica para cada conjunto de arreglos nucleares.

La superficie de la energía potencial (SEP), también llamada superficie de potencial o más correctamente superficie de energías potenciales, describe la energía de la molécula en función de su geometría: longitudes de enlace, ángulos de valencia, ángulos torsionales o cualquier otro parámetro para definir la geometría. Dado que las moléculas por lo general contienen varios átomos y se requieren muchos parámetros para describir la geometría, es difícil calcular y dibujar este tipo de superficie de tres dimensiones, puede visualizarse como una sábana con crestas y valles, que son puntos estacionarios (Figura 1).

Los puntos críticos de una Superficie de Energía Potencial son:

- Mínimo global: Es la energía más baja y nos indica la conformación más estable. Solo existe un mínimo global para cada molécula.
- Mínimo local: son conformaciones estables aunque menos que la global.
- Punto de silla o de inflexión: representan conformaciones de transición entre mínimos.

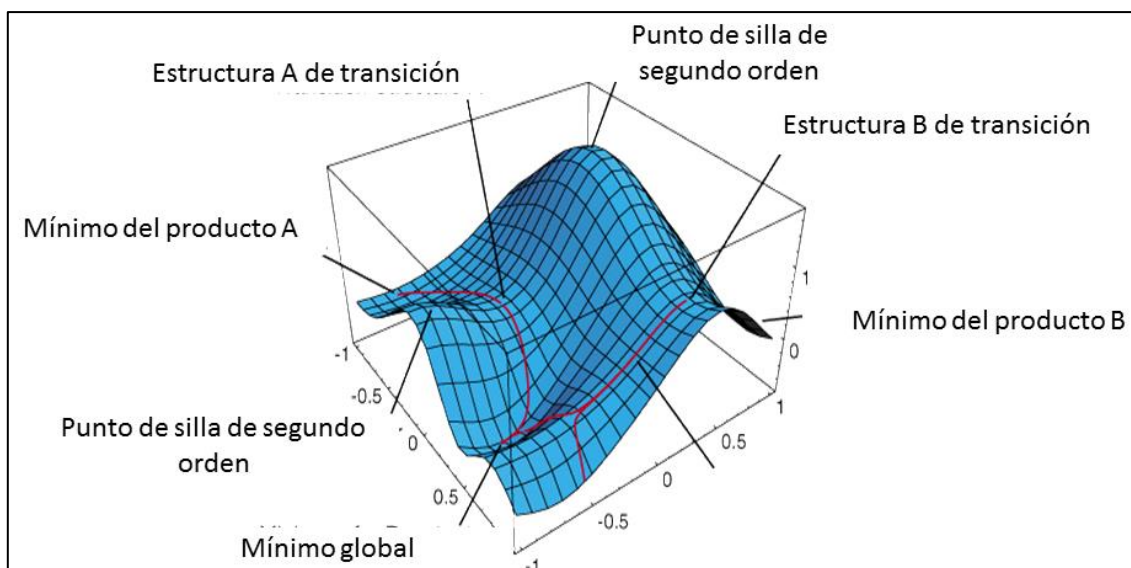


Figura1. Representación gráfica de la superficie de energía potencial

2.1.9 POTENCIAL ELECTROSTÁTICO MOLECULAR

Conocidos como MEPs, por sus siglas en inglés, son usados para el análisis de procesos basados en el reconocimiento de las propiedades físicas entre ellas la densidad electrónicas de una molécula. Su representación es usada para predecir reacciones, sectores de la molécula que actúan como receptores de un medicamento, y la interacción enzima-substrato, son usadas ampliamente para interpretar y predecir el comportamiento reactivo de una variedad de sistemas químicos en reacciones nucleofílicas o electrofílicas.

Los MEPs también permiten el estudio de procesos biológicos y las interacciones de enlaces o puentes de hidrogeno; son consideradas como una herramienta muy útil en el estudio de la reactividad molecular. Los cálculos de propiedades fisicoquímicas sobre las superficies moleculares y la visualización codificada de color proveen una nueva mirada al comportamiento químico y biológico de las moléculas.

El MEP es fundamental para describir y entender el fenómeno de la reactividad, debido a que es la fuerza motriz de las interacciones a larga distancia. El potencial electrostático creado por los núcleos y los electrones de un sistema en el espacio circundante está dado por la siguiente ecuación [22,24]

$$V(\mathbf{r}) = \sum_A \left(\frac{Z_A}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{r}|} - \int \frac{\rho(\mathbf{r}') d\mathbf{r}'}{|\mathbf{r}' - \mathbf{r}|} \right) \quad \text{Ec.30}$$

Donde Z_A es la carga del núcleo A , localizado en \mathbf{R}_A y $\rho(\mathbf{r})$ es la función de densidad electrónica. El signo de $V(\mathbf{r})$ en cualquier punto depende de donde los efectos de los núcleos o de los electrones son dominantes. En el caso del MEP, la inexistencia de máximos locales permite explicar la diferencia entre reacciones electrofílicas y nucleofílicas. El nucleófilo se dirige hacia los átomos debido a que tiende a atacar regiones positivas del MEP. Para un electrófilo la situación es diferente, ya que al tender a atacar mínimos locales, se dirige hacia los pares electrónicos no compartidos de los átomos o hacia los enlaces.

El potencial electrostático, ha sido aplicado como una aproximación para conocer la reactividad de las moléculas, de esta forma, los valores más negativos del $V(\mathbf{r})$ se interpretan como sitios para un ataque electrofílico, mientras que valores positivos del $V(\mathbf{r})$ se interpretan como sitios para un ataque nucleofílico, y esto se ha utilizado como base para el análisis cualitativo de reconocimiento de las interacciones biológicas enzima-sustrato.

2.2 ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

2.2.1 LA FISIOPATOLOGÍA DE LA EA

La EA es un trastorno degenerativo de inicio gradual, progresivo e irreversible. A nivel clínico en humanos se caracteriza por la pérdida de memoria, a la que se le añaden otros problemas, como la afasia, apraxia, desorientación, e incapacidad para el razonamiento [25]. La etiología de la enfermedad es desconocida, de acuerdo a los datos epidemiológicos, constituye el 50% al 60% de los síndromes demenciales y se prevalencia aumenta después de los 65 años [26].

La organización mundial de la salud (OMS), ha reportado que existe alrededor de 20 millones de personas detectadas con esta enfermedad en el mundo. En México se ha estimado que existen alrededor de 2 millones de casos, de los cuales 700 mil corresponden a personas menores de 70 años.

La EA es una alteración del sistema nervioso central que da lugar a una atrofia cerebral generalizada. Los cambios patológicos observados en los cerebros de estos pacientes no se distribuyen de manera uniforme a lo largo de la corteza cerebral; estos se localizan en áreas corticales específicas [27]. Se sugiere que existe una relación entre el progreso de la enfermedad y la conectividad de las áreas afectadas.

2.2.2 MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS DE LA EA

El diagnóstico definitivo de la EA se basa en el examen del tejido cerebral obtenido por autopsia. A nivel histopatológico, la EA es un proceso neurodegenerativo que se caracteriza por la selectiva y progresiva muerte de las células neuronales en áreas cerebrales específicas, principalmente de la neocorteza y el hipocampo, lo que se refleja clínicamente en un estado de demencia [28].

El cuadro clínico de la demencia tipo Alzheimer se acompaña de la acumulación masiva de filamentos insolubles que tienen la conformación β -plegada [29]. Estas definen dos tipos principales de lesiones las placas neuríticas (PNs) formadas por el péptido amiloide beta ($A\beta$) y las marañas neurofibrilares (MNFs) formada por la proteína de unión a microtubulos (tau) que inducen una marcada activación de la respuesta inflamatoria debido al daño neuronal que ocurre [30].

2.2.3 EL CEREBRO Y LA INFLAMACIÓN

Hasta hace pocos años, el cerebro se consideró inmunológicamente privilegiado, debido a su limitada capacidad inflamatoria y a la escasa infiltración linfática. Más tarde, se explicó que el cerebro está protegido por la barrera hematoencefálica (BHE), una barrera física localizada entre los vasos sanguíneos y el tejido cerebral (Figura 2) [31]. La BHE limita el acceso de casi todas las moléculas para proteger al cerebro de cualquier tipo de patógeno o

sustancia tóxica. Por estudios neuropatológicos y neuroradiológicos se demostró que el cerebro es inmunológicamente especializado por la acción de las células de la glía, las cuales, son las células residentes en el SNC que regulan la inmunidad innata, y constituyen la primera línea de defensa cada vez que ocurre una lesión [32,33]

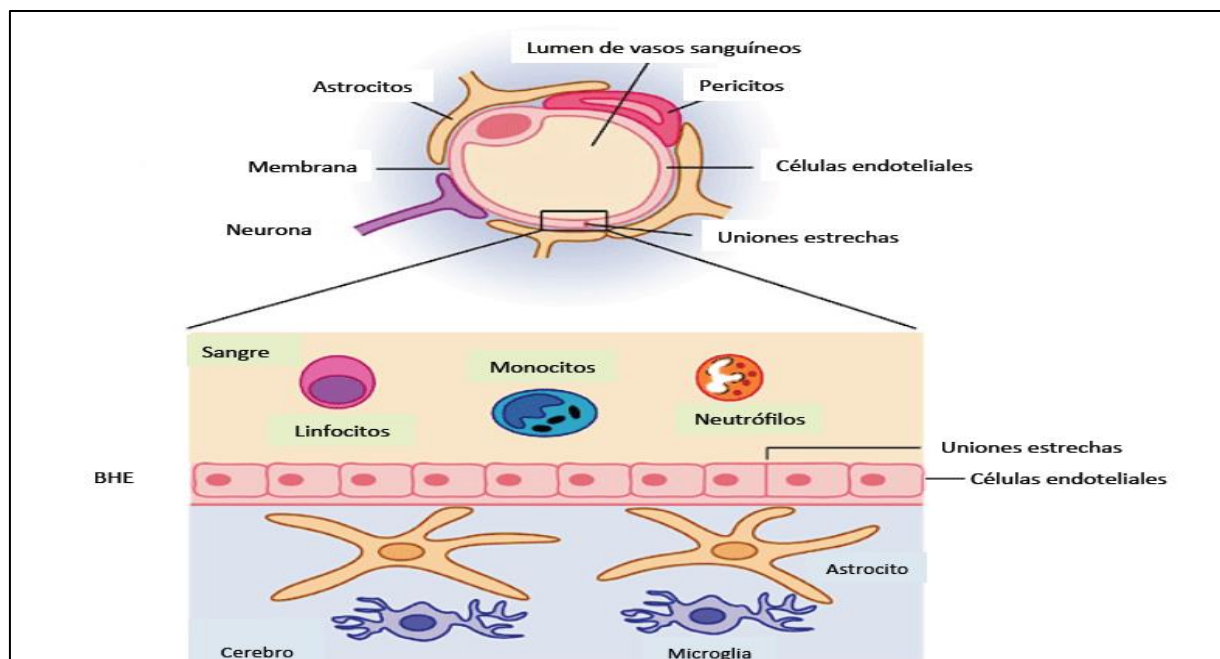


Figura 2. Esquema que ilustra la barrera hematoencefálica. Compuesta por una red intrincada de astrocitos, microglia, células endoteliales y neuronas que forman uniones estrechas impermeables con la finalidad de excluir a células grandes, macromoléculas y líquidos en exceso. La BHE protege al cerebro ya que previene la infiltración de patógenos o sustancias tóxicas que puedan poner en riesgo la organización y funcionamiento neuronal. [31].

Las células de la glía difieren de las neuronas ya que no poseen contactos sinápticos y se dividen durante toda la vida. Se clasifican generalmente en dos grupos: la microglia y la macroglia, que incluye a los astrocitos y oligodendrocitos [34]. La microglia tiene un origen mesodérmico y pertenecen al linaje de los macrófagos monocíticos, generalmente se localiza en todo el SNC. Estas células son especialmente importantes para preservar la integridad y la homeostasis del cerebro [35]. La microglia constituye aproximadamente el 20% de la población total de la glía [36-37]. Un número mayor de células de la microglia se han encontrado en el hipocampo, el telencéfalo olfativo, los ganglios basales y la *sustancia nigra* [35]. En condiciones normales se encuentran inactivas, pero son capaces de migrar por el entorno circundante, para examinar y detectar cualquier cambio bioquímico y celular que afecte la integridad funcional y estructural del SNC [38].

La inflamación presente en el SNC se denomina “neuroinflamación”, ocurre como respuesta a una lesión o alteración en el SNC (los traumatismos cráneo encefálicos, la isquemia, neurotoxinas y las enfermedades neurodegenerativas) [39,40]. La neuroinflamación, consiste principalmente en una respuesta inmune innata que activa a las células de la glía (astrocitos y microglia), para sintetizar y liberar citocinas, CXC, PG, proteínas de la cascada del complemento y especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) [41]. Todos estos eventos ocurren bajo un proceso bien regulado, con la finalidad de proteger la integridad estructural y funcional de las células. Sin embargo, cuando el estímulo persiste, la respuesta inflamatoria resulta perjudicial para las neuronas, debido a que la gran cantidad de sustancias que se producen (citocinas pro-inflamatorias y el óxido nítrico) resultan tóxicas para las neuronas [42]. Por lo tanto, la neuroinflamación se considera un arma de doble filo, debido a que es un mecanismo que limita, protege y repara a las neuronas de infecciones o lesiones. Sin embargo, cuando se torna crónica surgen diversos factores que pueden estimular el progreso de las enfermedades crónico neurodegenerativas resultando peligrosa y muchas veces mortal.

2.2.4 LA NEUROINFLAMACIÓN COMO UN FACTOR DETONANTE DE LA NEURODEGENERACIÓN

Diversos estudios postulan que las neuronas dañadas, activan una señal descontrolada en la glía que favorece el desarrollo de la gliosis reactiva (acumulación de las células de la microglia como respuesta a una lesión en el SNC [16]. Está demostrado que la gliosis reactiva agrava aún más el daño neuronal ya que promueve la liberación de factores pro-inflamatorios y neurotóxicos como la interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) [43]. Sin embargo, no queda claro como la inflamación participa en la exacerbación de las enfermedades crónico neurodegenerativas.

Recientes trabajos experimentales sugieren que como resultado del daño celular, las neuronas producen de forma constante compuestos nocivos que son liberados al medio extracelular, como citocinas, CXC, ERO y ERN, además de cambios en la liberación de aminoácidos excitadores (glutamato) y caspasas pro-apoptóticas (caspasa 3 y 9), con el fin de ocasionar daño neuronal. Además de productos de degradación anormales de la membrana, agregados proteicos (α -sinucleína o amiloide- β) que favorecen la gliosis reactiva [44].

En este sentido, el control estricto de la inflamación se pierde y sus características defensivas se inhiben, para generar una respuesta inmune que se auto-amplifica para ser crónica, persistente y destructiva. En consecuencia, se genera un círculo vicioso entre las neuronas lesionadas y la inflamación persistente que conduce a la neurodegeneración progresiva que desencadena la sintomatología clínica propia de cada enfermedad neurodegenerativa, como por ejemplo la disfunción motora o cognitiva.

2.2.5 LA NEUROINFLAMACIÓN EN LA EA

La EA es el trastorno neurodegenerativo más común en el mundo, aproximadamente el 10 % de todas las personas mayores de 65 años y hasta el 50 % de mayores de 85 años padecen esta enfermedad. El diagnóstico definitivo de la EA se basa en el examen del tejido cerebral obtenido por autopsia. La EA se caracteriza por una marcada neurodegeneración, que afecta a ciertos circuitos, sistemas de neurotransmisión y estructuras cerebrales. Los sistemas de neurotransmisión típicamente afectados en la EA son el sistema colinérgico y glutamatérgico. Múltiples estudios muestran una alteración en la actividad colinérgica a nivel cortical [45] y a nivel del Hp, así como en el sistema colinérgico septo hipocampal [46]. De igual forma, los reportes indican la disminución de las terminales nerviosas glutamatérgicas en el Hp y la corteza cerebral de pacientes con la EA. La reducción considerable de los niveles de acetilcolina y glutamato, se relaciona con la muerte de este tipo de neuronas, las cuales se localizan en el Hp, la corteza temporal y frontal de los pacientes con EA, regiones del cerebro implicadas en los procesos de memoria. Por tal motivo, los pacientes manifiestan un estado demencial progresivo [47,49].

El cuadro clínico de la demencia tipo Alzheimer se acompaña de la acumulación masiva de filamentos insolubles que tienen la conformación β -plegada [50]. Existen dos tipos principales de lesiones: las placas neuríticas (PNs) formadas por el péptido amiloide- β ($A\beta$) y las marañas neurofibrilares (MNFs) formadas por una proteína de unión a microtúbulos llamada tau, que se encuentra hiperfosforilada [47] (Figura 3). Estudios recientes, sugieren que el $A\beta$ participa en la fisiopatología de la EA, debido a que la conformación β -plegada y su estado de agregación le confieren propiedades neurotóxicas que conducen a la neurodegeneración, inclusive estos hallazgos están correlacionados con la demencia que presentan los pacientes [45].

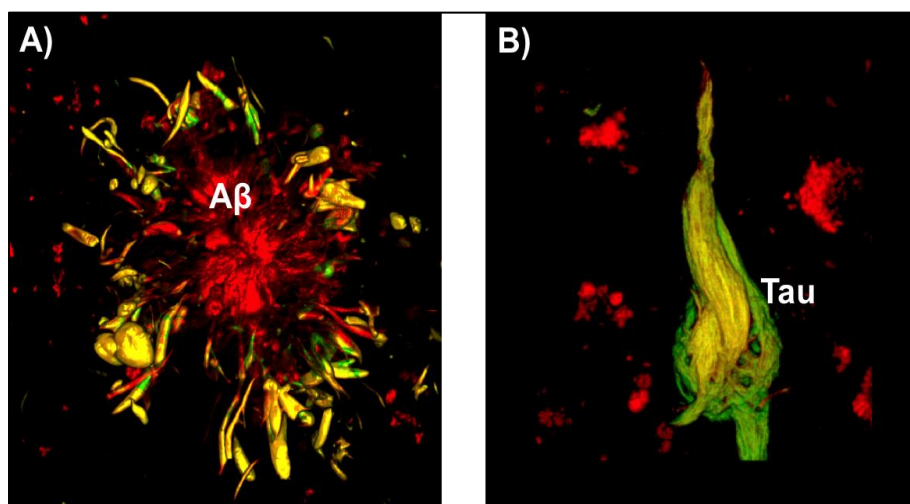


Figura 3. Los marcadores histopatológicos de la enfermedad de Alzheimer. Fotomicrograffías de un corte coronal del cerebro de un paciente *post-mortem* con EA. Los cortes fueron tratados con técnicas de inmunofluorescencia para evidenciar las PNs (rojo) (A) y las MNFs (verde) (B). Las fotomicrograffías fueron capturadas con el objetivo 40X. [52].

En los últimos años, se reporta que en los cerebros de los pacientes con la EA también existe un proceso inflamatorio de tipo crónico. Los estudios clínico-patológicos y de neuroimagen revelan la intensa actividad de los astrocitos y la microglia cerca de las PNs [53,54], además de observar el aumento de los mediadores pro-inflamatorios. En particular, la IL-1 β , una de la principales citocinas pro-inflamatorias y la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS), una isoforma de las sintasas de óxido nítrico (NOS), se encuentran elevadas en el cerebro de los pacientes con la EA. Esto ocurre desde las primeras etapas de la enfermedad y perduran hasta la muerte del paciente [55,57]. La IL-1 β y la iNOS se expresan tanto en los astrocitos como en la microglia y su participación se considera un factor clave para promover la respuesta inflamatoria y la muerte neuronal en la EA [58]. Actualmente la respuesta inflamatoria se considera un tercer marcador histopatológico para el diagnóstico de la EA [59]. Se sugiere que contribuye junto con la toxicidad del A β a causar la degeneración neuronal y probablemente el progreso en el deterioro cognitivo. Las investigaciones en los últimos años tratan de explicar cómo la respuesta inflamatoria está relacionada con la pérdida de la memoria en los pacientes con la EA, sin embargo, aún falta conocer con precisión como participan en la degeneración neuronal y el deterioro cognitivo observado en esta enfermedad.

2.2.6 EL PÉPTIDO AMILOIDE- β

El A β es un péptido de 39 a 42 aminoácidos, fue secuenciado por Glenner y Wong en 19984. Tiene un peso molecular de 4 kilodaltons, se deriva por proteólisis de la proteína precursora del amiloide (APP) conformada por 695 aminoácidos [60]. La beta y gamma-secretasas son las responsables de romper el dominio extracelular y el dominio transmembranal de la APP respectivamente para formar el A β soluble [61]. (Figura 4).

El termino amiloide hace referencia al almidón, debido a que su estructura 3D, tiene gran parecido con esta molécula, [62]. Por razones hasta ahora desconocidas, el péptido presenta una transición en su estructura secundaria de α -hélice a β -plegada fibrilar insoluble que esta implicada con el origen de su toxicidad [63].

El A β normalmente se libera de la APP como un monómero soluble, circula a concentraciones nanomolares en el líquido cefalorraquídeo y en la sangre [64]. Con el envejecimiento y sobre todo con la EA cambia a una conformación fibrilar insoluble que favorece su oligomeración para formar los agregados fibrilares característicos de las PNs [65]. Se reportado que los monómeros y dímeros del A β no son tóxicos para las células, mientras que los oligómeros de bajo peso molecular llamados protofibrillas si lo son [66]. Por lo tanto, la relación entre la formación de fibrillas y la toxicidad del péptido es importante para provocar la degeneración de las neuronas [62].

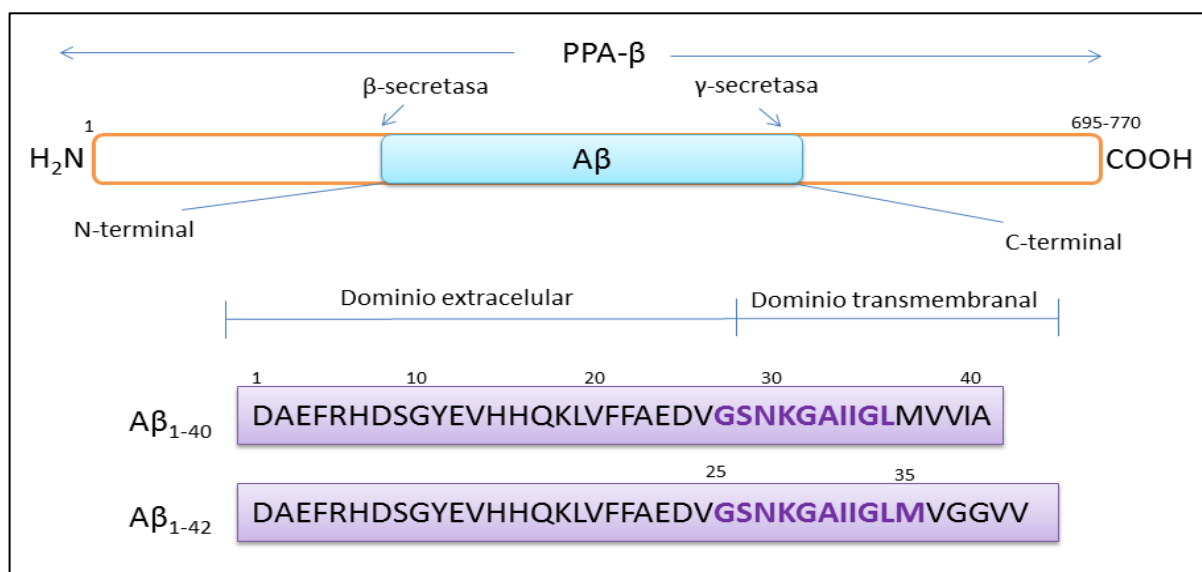


Figura 4. Procesamiento Del Péptido Amiloide- β . La APP es una proteína anclada a la membrana celular, que se somete a procesos de proteólisis por acción de la β y γ secretasa para formar el péptido amiloide- β de 42 aminoácidos [60]. La secuencia marcada de color morado señala la fracción 25-35 del amiloide- β .

2.2.7 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL AMILOIDE- β_{25-35}

El $A\beta_{25-35}$ esta formado por 11 aminoácidos (GSNKGAIIGLM) tiene un peso molecular de 1060 Daltons, se localiza en el extremo C-terminal. El $A\beta_{25-35}$ genera los efectos neurotóxicos del péptido completo [67].bajo condiciones fisiológicas el péptido presenta una estructura de α -hélice localizada a nivel transmembranal, (Figura 5). Estudios in silico demuestran que la secuencia de aminoácidos de la posición 25 a la 27 son una zona clave para generar la agregación de $A\beta$ [68]. De ahí que este se agregue fácilmente. Por otra parte los residuos de aminoácidos del 31 al 35 están expuestos a la superficie, esto permite interactuar con la membrana celular y formar una estructura β -plegada capaz de desencadenar una respuesta toxica [69].

El $A\beta_{25-35}$ es modelo adecuado para reproducir la toxicidad del $A\beta$ como ocurre en la EA [70]. Presenta un residuo de metionina en la posición 35 (met35) implicado en la formación de radicales libres los cuales son pieza importante en el estrés oxidativo.

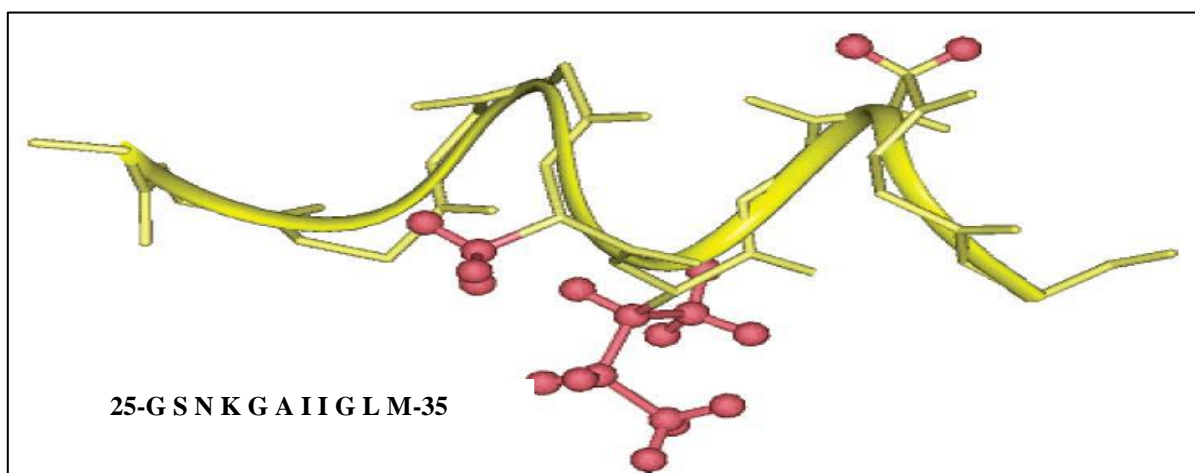


Figura 5. Modelo 3D del amiloide- β_{25-35} . Es la parte mas toxica del péptido amiloide- β se emplea como un modelo de toxicidad en la EA [69].

2.2.8 MECANISMO DE TOXICIDAD DEL AMILOIDE- β

Los mecanismos de toxicidad que el A β emplea aun no son claros. Se sugiere que el A β incrementa la concentración de radicales libres por medio de la desestabilización de la homeostasis del calcio y por la activación de la glía los cuales conducen al estrés oxidativo. Por otra parte se ha visto que la agregación del A β en su forma oligomérica activa mecanismos de apoptosis que generan la muerte neuronal en consecuencia se afectan los contactos sinápticos y se produce una disfunción asociada con la alteración de los procesos de aprendizaje y memoria. Existen diferentes fracciones del A β , algunas de las cuales son tóxicas. La fracción 25-35 del A β (A β_{25-35}) se ha propuesto como la parte más tóxica de todo el péptido ya que es capaz de agregarse rápidamente e inducir su neurotoxicidad de forma inmediata [71].

2.2.9 LA INFLAMACIÓN COMO UN MECANISMO DE TOXICIDAD DEL AMILOIDE- β

El A β es una combinación heterogénea de péptidos conformados desde 20 a 43 aminoácidos (a.a) de longitud, sin embargo, los de 42 y 43 a.a son los más abundantes en las PNs. El A β se forma por la escisión secuencial de la proteína precursora del amiloide (APP) (695-770 a.a), una glicoproteína transmembranal, concentrada en la sinapsis entre neuronas. Su función aún no está elucidada, aunque se ha implicado como regulador de la formación de la sinapsis, plasticidad neuronal y exportación de hierro [72,74]. La expresión de la APP incrementa durante la diferenciación celular y después de una lesión neuronal. Se propone que también participa en la LTP y en la adhesión celular, pero esto aún no es claro. En la EA la APP se incrementa para ser procesada por la α -, β - y γ -secretasas. En primera instancia, el A β se forma por la acción sucesiva de la β -secretasa para generar el segmento C99 y posteriormente la γ -secretasa actúa para generar el dominio intracelular carboxílico del amiloide (AICD) y el A β [75]. (Figura 7). La presencia del A β en altas concentraciones y su estado de agregación son factores detonantes de su toxicidad. El papel del A β es fundamental en el progreso de la EA. La disfunción sináptica y la pérdida neuronal que causa el A β en los modelos *in vivo* repercuten en la disfunción cognitiva [51]. Diversos mecanismos son propuestos para explicar el efecto neurotóxico del A β : 1) producción de ERO, 2) acumulación intracelular de Ca⁺², 3) alteración en la fluidez de la membrana, 4) procesos inflamatorios [76,79].

Diversos investigadores sugieren que el A β es un factor clave en el progreso de la respuesta inflamatoria y el daño neuronal presente en los pacientes con la EA [80-71]. La evidencia experimental muestra que el A β , activa a las células de la glía de forma exacerbada para liberar moléculas pro-inflamatorias, como citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF- α), CXC y eicosanoides. Moléculas que favorecen la neurodegeneración al aumentar la vulnerabilidad neuronal hacia los radicales libres como el NO, el cual es inducido por la vía de la iNOS.

2.2.10 LOS ANTIINFLAMATORIOS Y ANTIOXIDANTES EN LA EA

Dado que el proceso inflamatorio puede desempeñar un papel en la EA, están estudiándose varios medicamentos antiinflamatorios como aspirina e ibuprofeno entre otros ya que estos disminuyen la probabilidad de padecer la EA. .

Algunos reportes también han indicado que las propiedades antioxidantes encontradas en las sustancias, como la vitamina C, E y el selenio pueden servir de protección contra el deterioro mental, pero se necesita evidencia para confirmar esto. La vitamina E es de particular interés. La mayoría de los alimentos no son ricos en esta vitamina, pero se encuentra en aceites vegetales.

2.2.11 EL AMILOIDE- β_{25-35} UN MODELO PARA ESTUDIAR LA EA *In Vivo*

Los agregados de A β observados en los pacientes con la EA contienen A β en sus secuencias más predominantes: A β_{1-40} y A β_{1-42} [82]. Sin embargo, estos agregados también contienen péptidos con secuencias de oligómeros truncados como el A β_{25-35} o el A $\beta_{25-35/40}$ [83]. El A β_{25-35} (GSNKGAIIGLM) se puede producir en pacientes con la EA por escisión enzimática del A β_{1-40} [83,84]. El A β_{25-35} presenta residuos extracelulares y transmembranales, los cuales representan la región biológicamente activa del A β [85,86]. Además, contiene una región altamente hidrofóbica que favorece la formación de agregados estables [85]. El interés por este un decapeptido, el cual muestra una estructura de hojas- β [86,87], ha crecido en la última década, debido a que induce atrofia neuronal, muerte celular, pérdida sináptica, así como déficit en la memoria espacial, efectos similares a los que genera el A β_{1-40} y A β_{1-42} [88], pero con una mejor solubilidad y eficiencia [89-90], de ahí que la comunidad científica en el área lo considera un modelo adecuado para estudiar la EA [86,90].

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que es una incidencia creciente la enfermedad de Alzheimer, en próximos años será la causa de un grave problema de salud pública a nivel mundial.

La terapéutica actual EA es de tipo paliativa, con la finalidad de retrasar y mermar la sintomatología de la enfermedad. En general, los distintos tratamientos farmacológicos han brindado y mejorado la calidad de vida en los pacientes, sin embargo presentan ciertas desventajas, por la presencia de efectos secundarios que a largo plazo resultan nocivos para la salud de los pacientes. Recientemente se ha propuesto el uso de los fármacos antiinflamatorios-antioxidantes, como alternativa o cotramiento farmacológico. En este sentido se justifica la búsqueda de mejores fármacos para el manejo terapéutico de la enfermedad, con un enfoque meramente molecular, cuyos blancos farmacológicos estén bien definidos e identificados para poder realizar su diseño de una manera sistemática y racional; con el fin de obtener fármacos más selectivos y menos tóxicos.

Todo esto con ayuda de la QC que cada vez es mas utilizada debido al desarrollo tecnológico de los diversos sistemas computacionales de alto rendimiento que han permitido que se estudien sistemas cada vez mas complejos y con mayor grado de exactitud y así conocer de las moléculas sus propiedades físicas, químicas y biológicas y para poder identificar los sitios reactivos de cada una y saber que parte de estas pueden interaccionar con el $A\beta_{25-35}$ formando complejos que tengan la capacidad de revertir los efectos de la EA.

En este trabajo se realizo un estudio teórico –practico de la interacción de una serie de antiinflamatorios (*Aspirina, Diclofenaco, Ibuprofeno, Meloxicam, Naproxen*) y un antioxidante (*Vitamina E*). Con el $A\beta_{25-35}$ ya que estos nos ayudan en la prevención de enfermedades neurodegenerativas.

4. HIPÓTESIS

Los antiinflamatorios (*Aspirina, Diclofenaco, Ibuprofeno, Meloxicam, Naproxen*) y un antioxidante (*Vitamina E*). Interaccionaran con el péptido $A\beta_{25-35}$ en el aminoácido Metionina posición 35 (met 35) lo cual nos permitirá formar complejos para que posteriormente nos ayuden en la prevención el estrés oxidativo y la neurodegeneración en un modelo animal de la enfermedad del Alzheimer.

5. OBJETIVO GENERAL

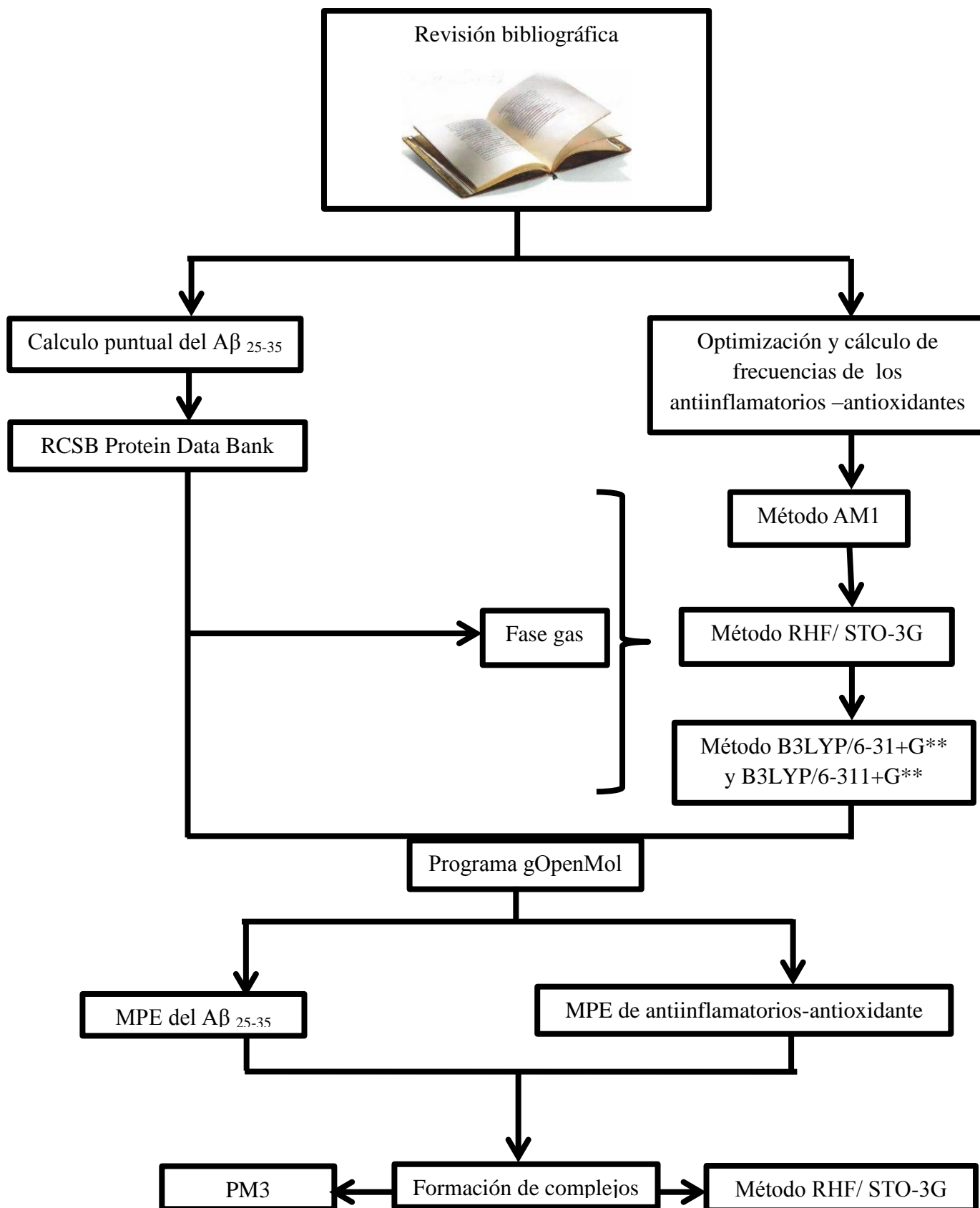
Realizar un estudio teórico-práctico de los sitios reactivos de una serie de antiinflamatorios-antioxidantes para una posible interacción intermolecular con la fracción del $A\beta_{25-35}$ y formar un complejo que ayude a entender el mecanismo de reacción y así evaluar el efecto neurodegenerativo en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Investigar el comportamiento de los antiinflamatorios –antioxidantes y la fracción $A\beta_{25-35}$ a nivel molecular mediante el cálculo del potencial electrostático molecular.
- Analizar el efecto neuroprotector de la administración crónica de antiinflamatorios-antioxidantes por medio de marcadores bioquímicos e histológicos de estrés oxidativo en el modelo animal de la enfermedad del Alzheimer.
- Evaluar el efecto neuroprotector de la administración crónica de antiinflamatorios-antioxidantes por medio de marcadores de morfología neuronal en el modelo animal de enfermedad de Alzheimer.

7. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

7.1 DIAGRAMA TEÓRICO



En este trabajo se inició realizando las matrices de las estructuras de los antiinflamatorios y el antioxidante: Aspirina, Diclofenaco, Ibuprofeno, Meloxicam, Naproxen y Vitamina E en el programa Gaussian View 5.0.

Subsiguientemente se realizó la optimización de las geometrías moleculares, así como el cálculo de frecuencias para asegurar que las geometrías obtenidas correspondieron a un mínimo de energía (frecuencias positivas), los métodos/base utilizados fueron:

AM1, HF/STO-3G, B3LYP/6-31+G** y B3LYP/6-311+G**.

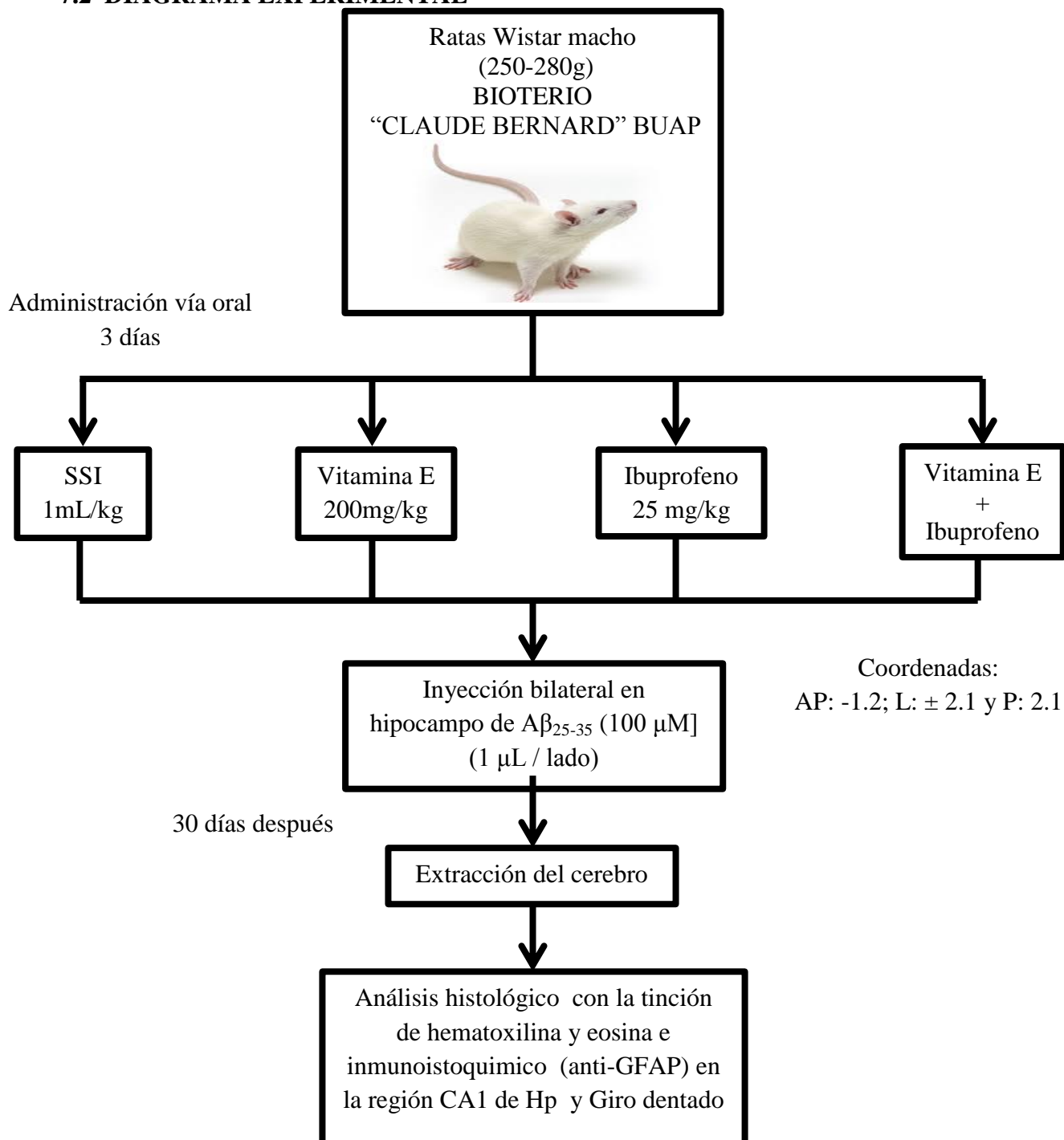
El péptido A β ₂₅₋₃₅ no fue optimizado, solo se le hizo un cálculo puntual con el método/base HF/3-21G ya que proviene de la base de datos RCSB Protein Data Bank, adicionalmente se realizó el cálculo del potencial electrostático con el método/base B3LYP/6-31+G**.

De los diferentes métodos empleados, a partir de las estructuras optimizadas de los Antiinflamatorios-antioxidante en B3LYP/6-31+G** se realizó el cálculo del potencial electrostático molecular. Esto permitió conocer los puntos más reactivos de dichas moléculas, por lo tanto, a partir de este punto se prosiguió a construir los complejos entre cada una de las moléculas y el péptido A β ₂₅₋₃₅.

Una vez construidos los complejos a partir de las geometrías optimizadas de cada antiinflamatorio-antioxidante fueron optimizados con los métodos PM3 y HF/STO-3G.

Finalmente para la visualización de las estructuras optimizadas se utilizó el programa Gaussian View 5.0 para visualizar el potencial electrostático se utilizó el programa gOpenMol 3.0 que se encuentra disponible en la red de forma gratuita.

7.2 DIAGRAMA EXPERIMENTAL



7.2.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar del Bioterio “CLAUDE BERNARD” de la BUAP. Los animales, se colocaron en cajas de acrílico, se mantuvieron con un ciclo de luz – oscuridad 12 h / 12 h a una temperatura de 22 ± 2 °C y con alimentación (agua y alimento) *ad libitum*. El manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos del comité para el cuidado de los animales de laboratorio, el cual contempla satisfactoriamente los criterios establecidos por la Norma Oficial Mexicana “Especificaciones técnicas para la producción, uso y cuidado de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999.

7.2.2 PREPARACIÓN DE SUSTANCIAS EMPLEADAS EN LOS TRATAMIENTOS

El A β_{25-35} se diluyó en solución salina isotónica (SSI) para obtener una concentración de [100 μ M]. Previo a su administración el péptido se incubó a 37 °C por 36 horas.

7.2.3 TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES

Se formaron cuatro grupos experimentales (n= 4 por grupo); A los cuales se les administro por vía oral durante 3 días: Vehículo SSI (1mL/kg); 2) Ibuprofeno (200mg/kg); 3) Vitamina E (25 mg/kg); 4) Ibuprofeno y vitamina E, después se les realizo una Inyección bilateral en hipocampo del A β_{25-35} (100 μ M] (1 μ L / lado) con coordenadas: AP: -1.2; L: \pm 2.1 y P: 2.1.

Al término de 30 días se realizó la Extracción del cerebro para hacer un análisis histológico con la tinción de hematoxilina y eosina e inmunoistoquímico (anti-GFAP) en la región CA1 de Hp y Giro dentado de los animales de experimentación.

7.2.4 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

La mesa quirúrgica y el equipo de cirugía estereotáxica fueron desinfectados con soluciones alcohólicas y acuosas de benzal. Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (13 mg / kg) y xilacina (100 mg / kg) por vía ip. Se procedió a colocar a los animales en el aparato estereotáxico para roedores pequeños.

7.2.5 PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS CEREBRALES PARA LAS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Finalizados los tiempos establecidos los animales se decapitaron. Los cerebros fueron extraídos y se colocaron en paraformaldehído al 4 % en PBS durante cuarenta y ocho horas para después iniciar el proceso de deshidratación, aclaración, infiltración e inclusión en parafina. y con ayuda de un micrótopo se realizaron cortes coronales de 5 µm de grosor, los cuales fueron montados en portaobjetos.

7.2.6 TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA

El método de hematoxilina y eosina (H - E) es el procedimiento de tinción más comúnmente usado tanto en el estudio histológico como en el patológico; consiste en la aplicación de hematoxilina de Mayer que tiene un carácter básico y tiñe a los núcleos (carácter ácido) y la eosina que es un colorante ácido y tiñe el citoplasma y las fibras colágenas que tiene un carácter básico.

El protocolo consistió en desparafinar e hidratar los tejidos hasta llegar al agua destilada. Teñirlos durante quince minutos en hematoxilina de Mayer, para después lavarlos en agua corriente durante cinco minutos. Posteriormente los tejidos fueron colocados en etanol al 80 % durante dos minutos, para después ser contrastados en solución eosina durante dos minutos. Finalmente los tejidos fueron deshidratados, aclarados a través de etanol 96 %, etanol 100 % y xilol, con dos cambios de dos minutos cada uno y montados con resina.

La tinción de H-E fue usada para analizar y cuantificar el número de células no dañadas en el GD y la región CA1 del Hp. El daño en las células fue reconocido por las alteraciones nucleares que se presentan como picnosis, cariorrexis y cariólisis. Así como cambios en el citoplasma como la eosinofilia o pérdida de afinidad a la hematoxilina.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 RESULTADOS TEÓRICOS

En este trabajo se utilizaron las herramientas de la QC y sus aplicaciones a modelos biológicos. Lo anterior permitió obtener resultados del estudio teórico-practico realizados a los antiinflamatorios-antioxidante para observar la interacción con el péptido $A\beta_{25-35}$.

8.1.1 OPTIMIZACIÓN Y FRECUENCIAS

A los antiinflamatorios-antioxidante se les realizo la optimización y calculo de frecuencias para asegurar que se encontraban en una conformación estable (frecuencias positivas).

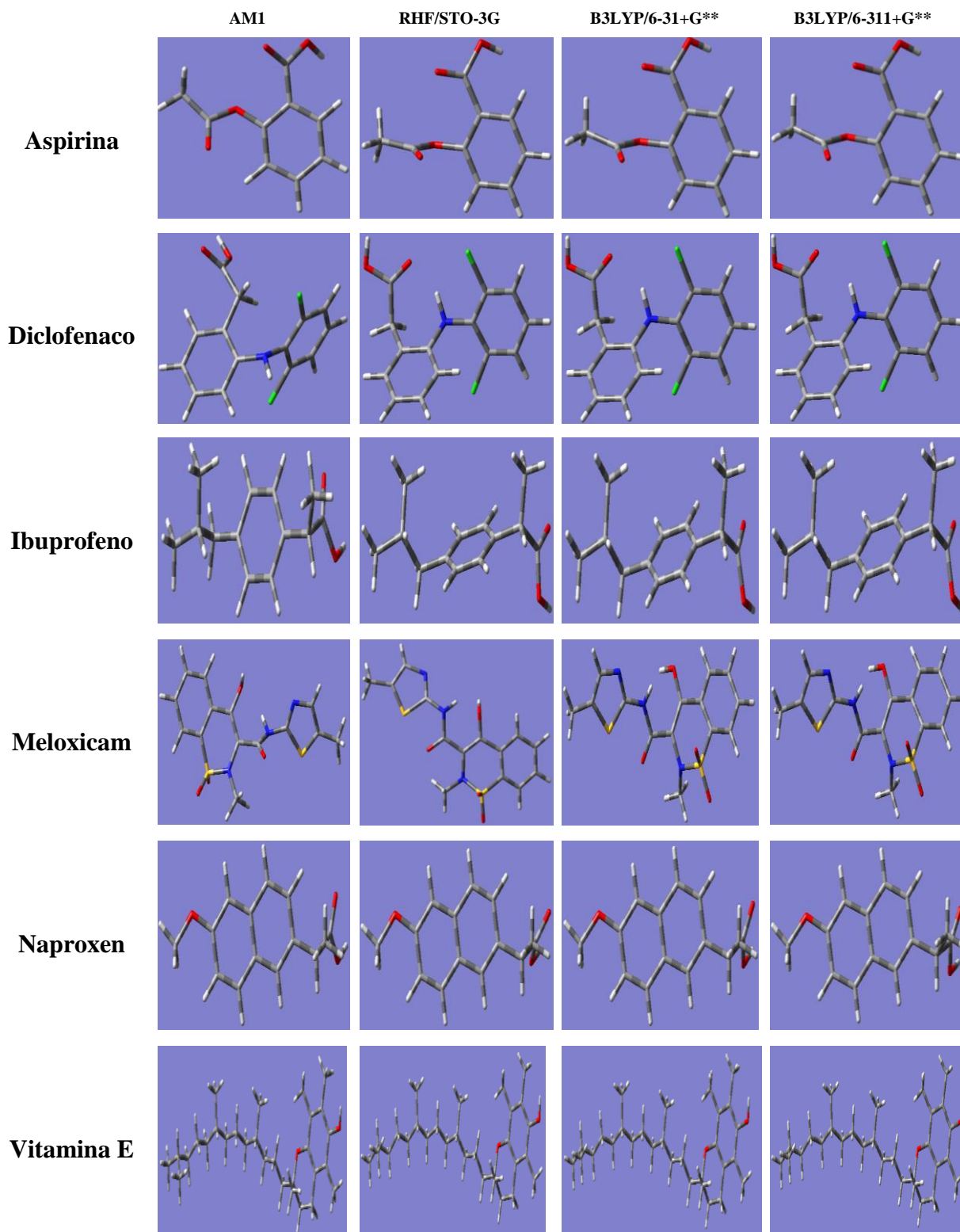


Figura 6. Estructuras obtenidas por los diferentes métodos de estructura electrónica

Los métodos/base utilizados mantienen la estructura de los antiinflamatorios-antioxidante, de acuerdo a las estructuras anteriores se puede hacer una comparación de energía de diferentes métodos/base. Tabla 2.

Métodos				
Fase gaseosa(Kcal/mol)				
Fármaco	AM1	RHF/ STO-3G	B3LYp/ 6-31+G**	B3LYp/6-311+G**
Aspirina	-137.60	-399501.84	-407065.40	- 407177.07
Diclofenaco	-474.58	-1029514.86	-1045271.01	- 1045422.98
Ibuprofeno	-103.50	-40446.74	-4121069.91	-412206.87
Meloxicam	-429.84	-1113114.72	-1131268.78	- 1131461.80
Naproxen	-97.79	-472736.63	-481886.53	-481817.91
Vitamina E	-183.09	-791778.21	-806834.61	-807007.95

1 Hartree= 627.5095 kcal/mol

Tabla 2. Comparación de energía de diferentes métodos.

En la tabla 2 se observa que el método AM1 varía mucho en comparación con los métodos RHF/STO-3G, B3LYp/6-31+G** y B3LYp/6-311+G**. Ya que este es empleado para grandes sistemas moleculares y las estructuras moleculares de los antiinflamatorios-antioxidantes son pequeñas por lo tanto los 3 últimos métodos/base son más eficientes ya que estos se utilizan para pequeños sistemas moleculares.

A partir de la figura 6 se obtienen los valores estructurales de los antiinflamatorios antioxidantes los cuales aparecen en la tabla 3,5 en donde se muestran algunas distancias de enlace y ángulo haciendo referencia en la figura 7.

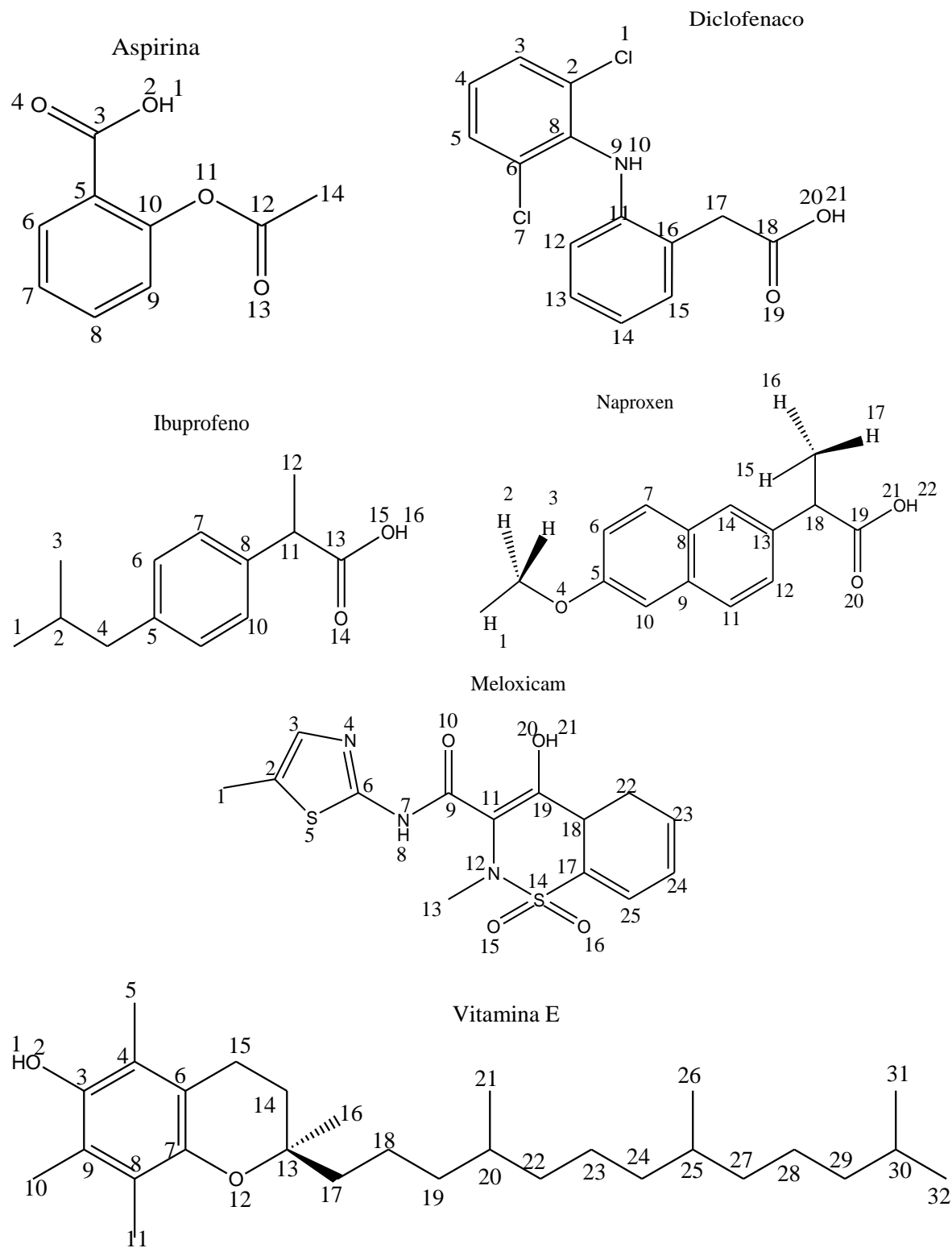


Figura 7. Estructura general de los antiinflamatorios –antioxidante

Molécula	Enlace	AM1	RHF/ STO-3G	B3LYp/ 6-31+G**	B3LYp/6-311+G**
Aspirina	O4- C3	1.23	1.21	1.21	1.20
	H1-O2	0.97	0.99	0.97	0.96
	O2-C3	1.37	1.39	1.36	1.36
	C3-C5	1.47	1.52	1.50	1.50
Diclofenaco	H21-O20	0.97	0.99	0.97	0.97
	O20-C18	1.36	1.38	1.35	1.35
	C18-O19	1.23	1.22	1.22	1.21
Ibuprofeno	H16-O15	0.97	0.99	0.97	0.97
	O15-C13	1.36	1.39	1.35	1.35
	C13-O14	1.23	1.21	1.21	1.21
Meloxicam	H21-O20	0.97	0.99	0.97	0.97
	O20-C11	2.38	2.39	2.41	2.41
	O10-C9	1.24	1.22	1.22	1.22
Naproxen	H20-O19	0.97	0.99	0.97	0.97
	O19-C17	1.36	1.39	1.35	1.35
	C17-O18	1.23	1.21	1.21	1.21
Vitamina E	H1-O2	0.97	0.98	0.96	0.96
	O2-C3	1.38	1.40	1.38	1.38

Tabla 3. Distancia de enlace (Å) de los antiinflamatorios –antioxidante

En la tabla 3 se observan los valores de enlace obtenidos de los antiinflamatorios –antioxidante en los diferentes métodos/bases casi no difieren entre sí.

Molécula	Enlace	AM1	RHF/ STO-3G	B3LYp/ 6-31+G**	B3LYp/6-311+G**
Aspirina	H1-O2-C3	109.97	106.26	109.87	110.36
	O2-C3-O4	113.45	118.99	119.74	119.85
	O4-C3-C5	127.87	123.87	124.75	124.67
Diclofenaco	H21-O20-C18	109.72	104.83	106.39	107.32
	O20-C18-O19	116.11	121.53	122.08	122.15
	O20-C18-O17	113.47	112.48	112.93	112.86
Ibuprofeno	H16-O15-C13	109.70	104.61	106.07	107.14
	O15-C13-O14	116.57	121.77	122.44	122.35
	C13-C11-C12	109.14	110.26	110.37	110.80
Meloxicam	H21-O20-C19	106.66	106.25	110.06	110.81
	O20-C19-C11	119.41	120.79	124.45	124.59
	C11-C9- O10	121.31	123.80	123.50	123.47
Naproxen	H20-O19-C17	109.70	104.61	106.07	107.13
	O19-C17-O18	116.61	121.80	122.45	122.35
Vitamina E	H1-O2-C3	107.82	105.89	109.05	109.63
	O2-C3-C4	121.92	122.64	121.04	120.91
	O2-C3-C9	116.14	116.14	117.04	117.01

Tabla 4. Distancia (Å) de Angulo (°) de los antiinflamatorios –antioxidante

Por otro lado en la tabla 4, se muestran los datos de los ángulos obtenidos de los antiinflamatorios –antioxidante se puede ver que los valores entre los métodos varían entre sí muy poco.

Molécula	Enlace	AM1	RHF/ STO-3G	B3LYp/ 6-31+G**	B3LYp/6-311+G**
Aspirina	H1-O2-C3-O4	-176.50	-168.25	-169.88	-171.61
	O4-C3-C5-C6	46.38	32.51	33.15	37.51
Diclofenaco	H21-O20-C18-O19	-0.27	-0.05	-0.26	-0.56
	O20-C18-O19-C17	-177.24	-179.81	-179.85	-179.76
Ibuprofeno	H16-O15-C13-O14	-1.32	-0.63	-1.47	-2.08
	O15-C13-C11-C12	125.99	162.64	147.83	147.99
Meloxicam	H21-O20- C19-C11	-95.30	-117.99	-12.70	-8.08
	O20-C19-C11-C9	9.53	8.18	1.30	1.02
	C19-C11-C9-O10	121.59	148.82	142.86	137.83
Naproxen	H20-O19-C17-O18	-1.42	-0.61	-1.46	-2.08
	O19-C17-C14-C15	127.07	163.14	147.48	147.67
Vitamina E	H1-O2-C3-C4	25.75	-4.77	7.85	4.68
	H1-O2-C3-C9	-156.11	175.61	-172.80	-175.66

Tabla 5. Distancia (Å) del ángulo (°) diedro de los antiinflamatorios –antioxidante

En la tabla 5, cuyos valores corresponden distancia del ángulo diedro de los antiinflamatorios –antioxidante se puede notar que las diferencias entre los valores de la distancia en los diferentes métodos son mínimas.

En general existen diferencias mínimas entre los valores obtenidos en los distintos métodos, lo cual demuestra que los cálculos químico-computacionales son similares.

8.1.2 POTENCIAL ELECTROSTÁTICO MOLECULAR (MEP)

Se grafico el MEP de las diferentes estructuras moleculares con el objetivo de conocer su distribución electrónica.

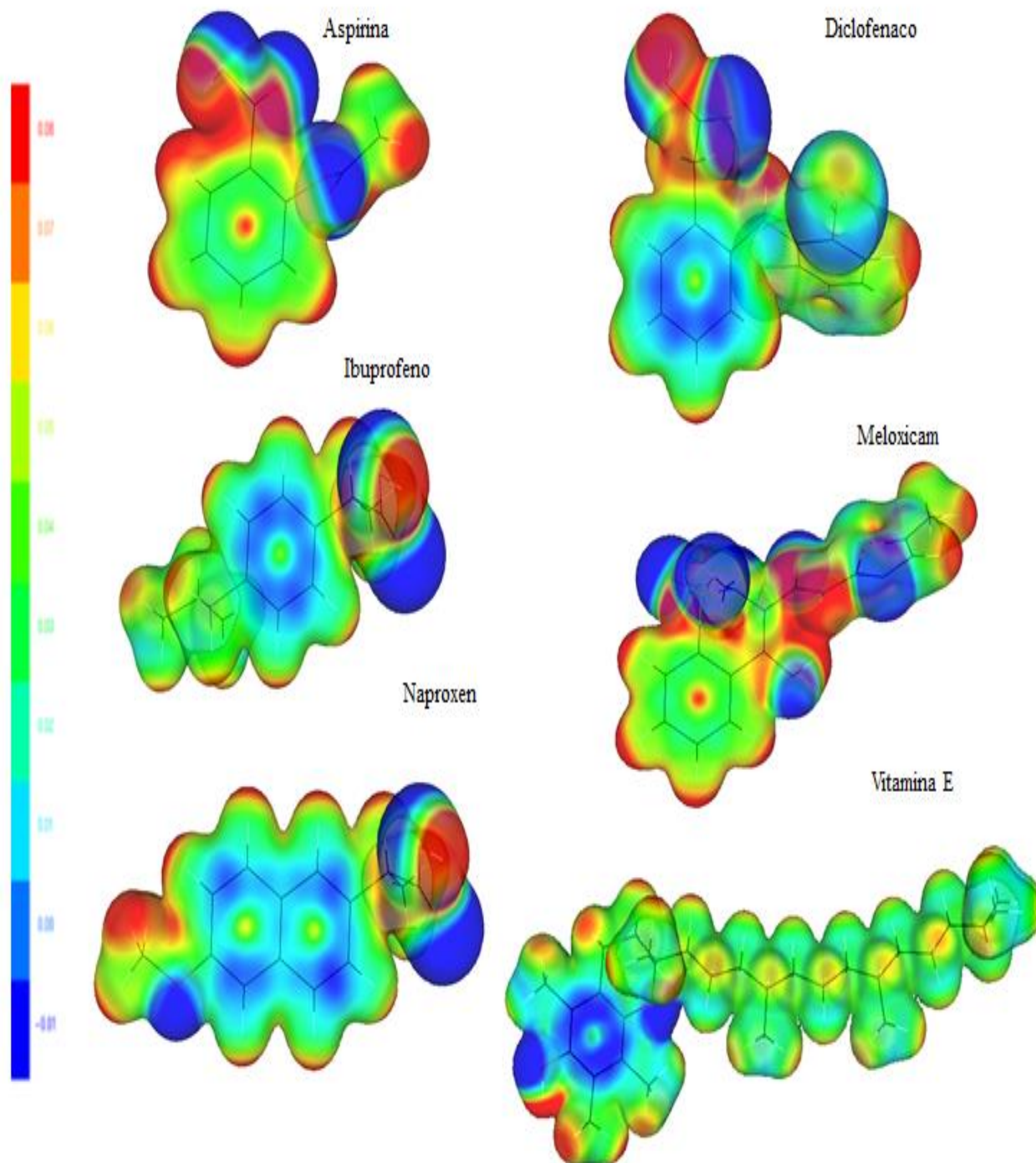


Figura 8. MEP de las estructuras de isosuperficies de -0.01 a 0.8 u.a de los antiinflamatorios-antioxidante

El péptido amiloide $A\beta_{25-35}$ se observa que sus puntos más reactivos corresponden a los aminoácidos metionina (Met) y lisina (Lys).

Estos aminoácidos promueven la formación de radicales libres y modulan las propiedades neurotóxicas de este péptido debido al azufre de la metionina y al nitrógeno de la lisina, induciendo al estrés oxidativo y a la muerte neuronal en la EA.

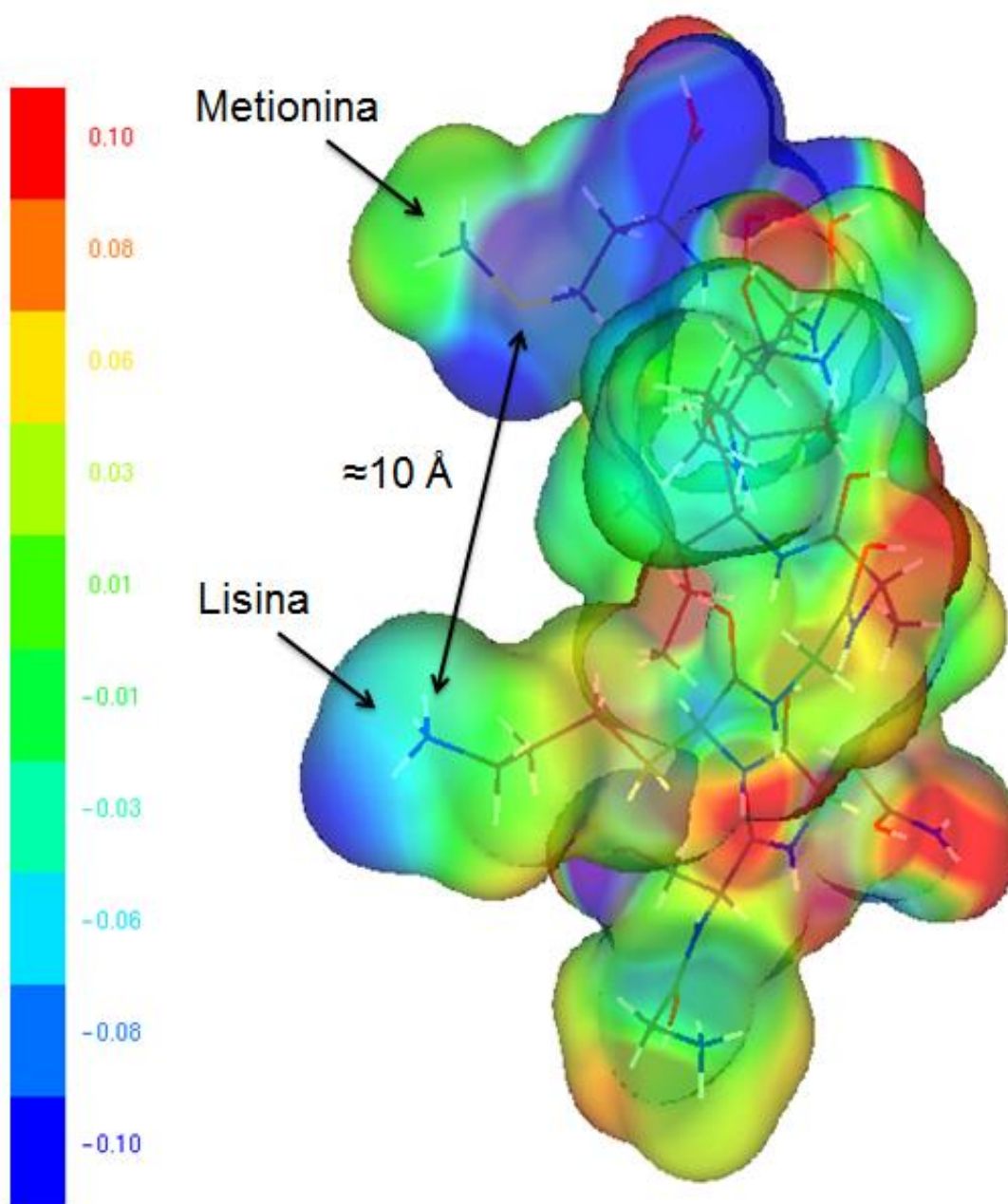
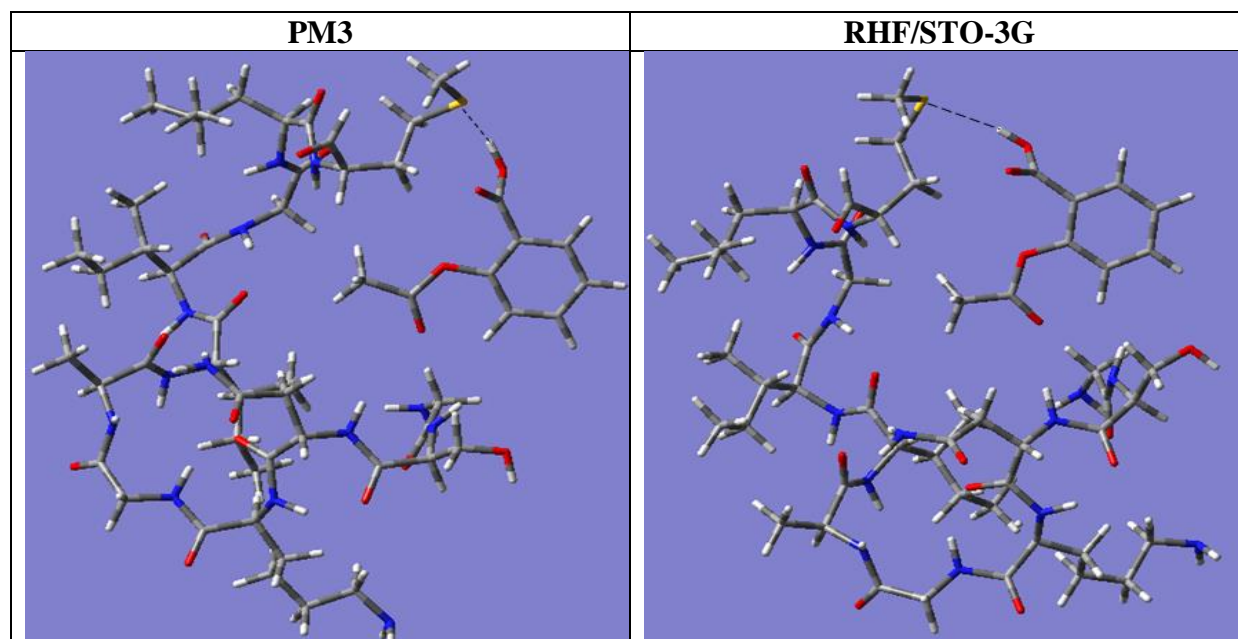


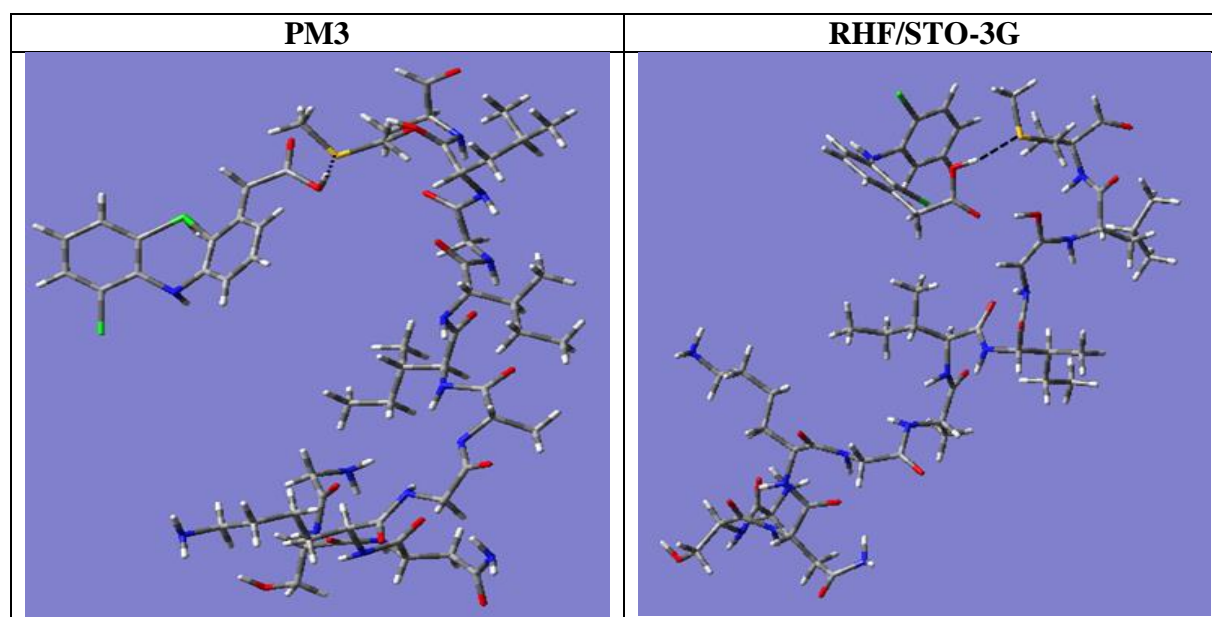
Figura 9. MEP del $A\beta_{25-35}$. La escala de colores representa del más electronegativo (azul) alta densidad, hasta el más electropositivo (rojo) baja densidad.

8.1.3 COMPLEJOS $A\beta_{25-35}$ Y LOS ANTIINFLAMATORIOS-ANTIOXIDANTE

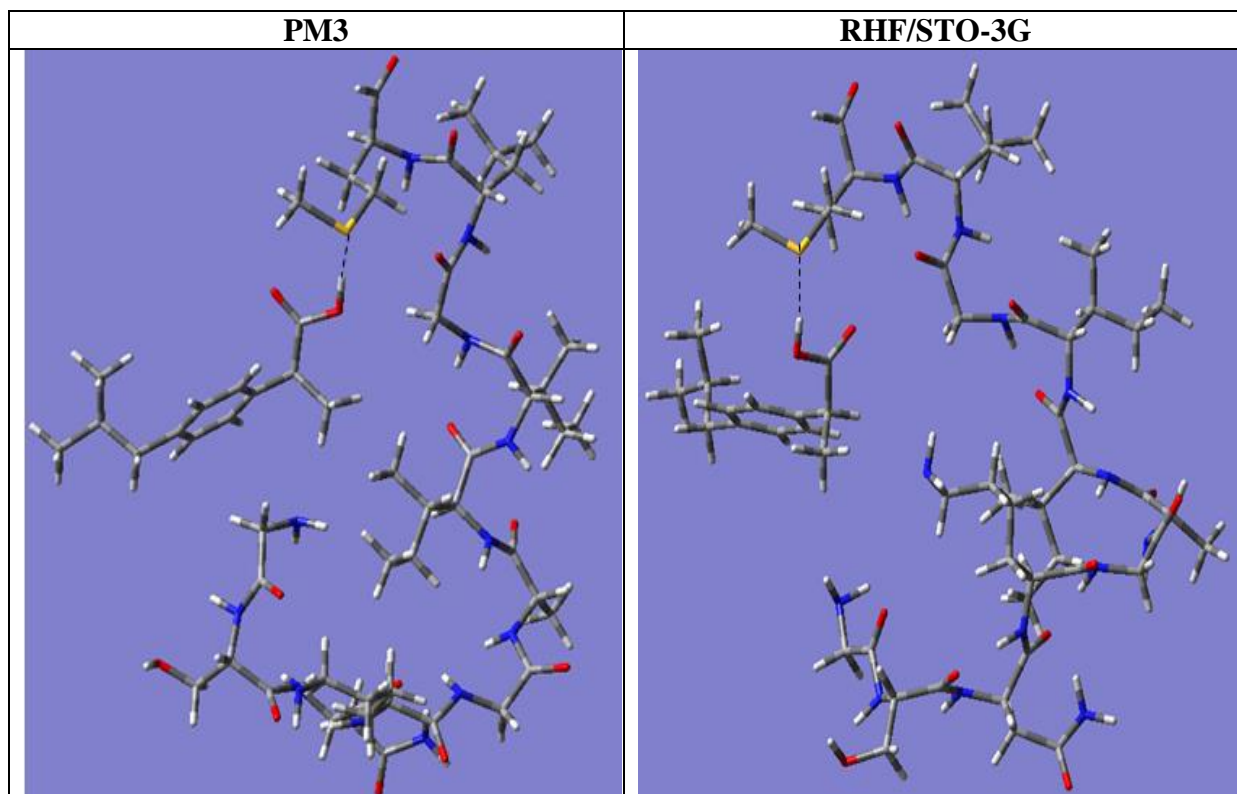
Después de haber obtenido los resultados de MEP. Se concluyó que podría haber una interacción entre del péptido $A\beta_{25-35}$ y los antiinflamatorios antioxidante sobre todo con el aminoácido de la metionina el cual actúa como un sitio electrofílico que podría aceptar electrones provenientes de los antiinflamatorios-antioxidantes. Como se muestra en la figura 10.



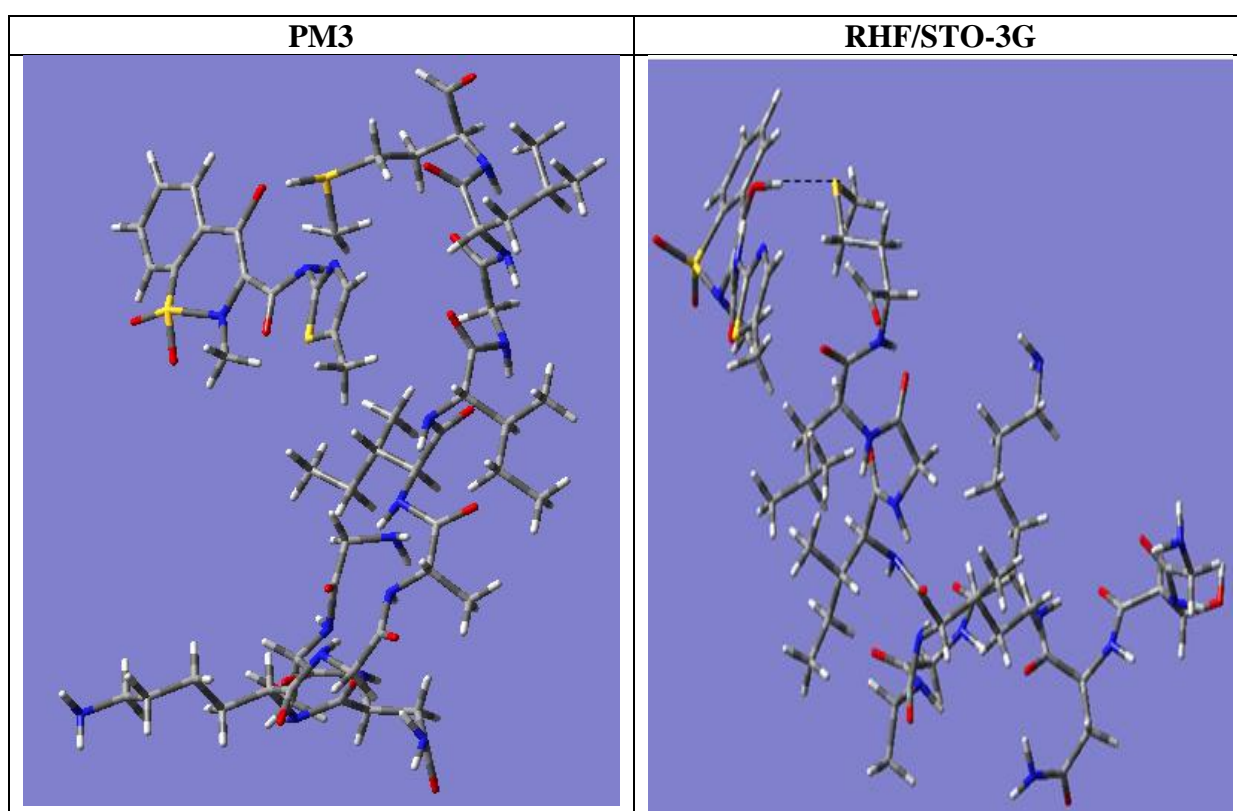
Aspirina- $A\beta_{25-35}$



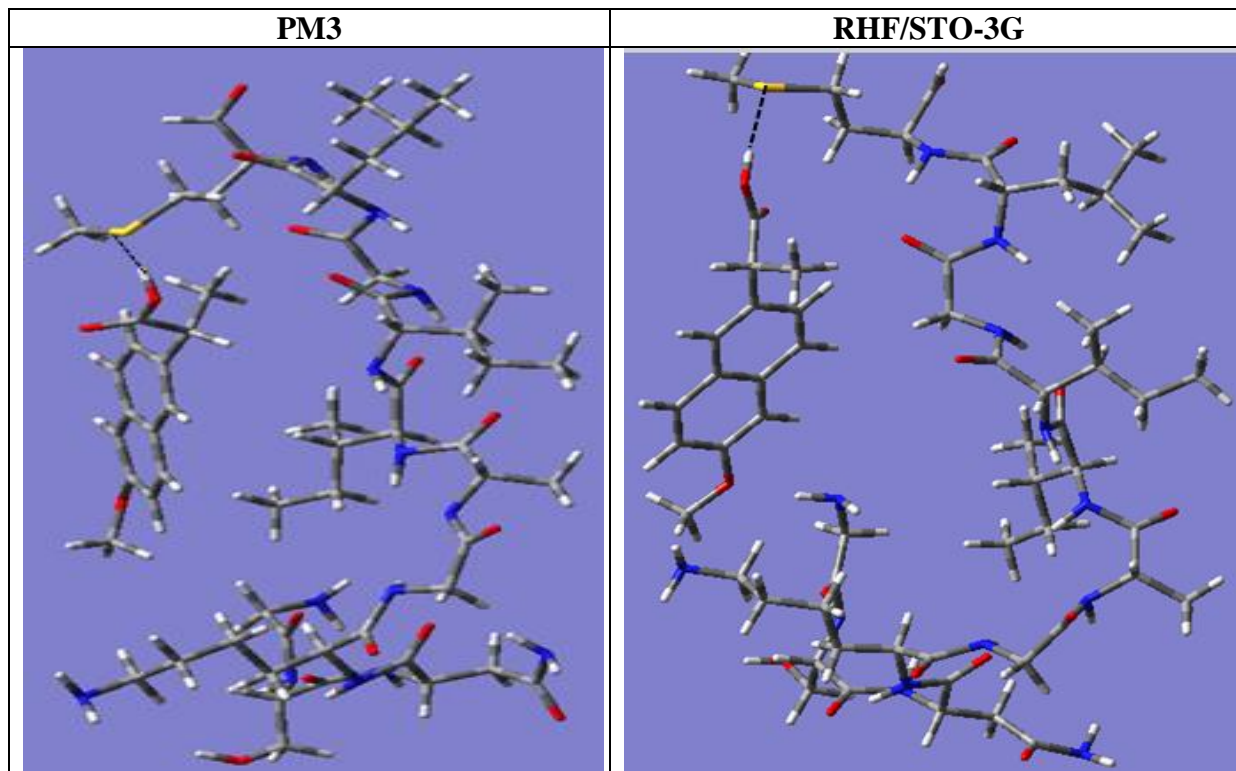
Diclofenaco- $A\beta_{25-35}$



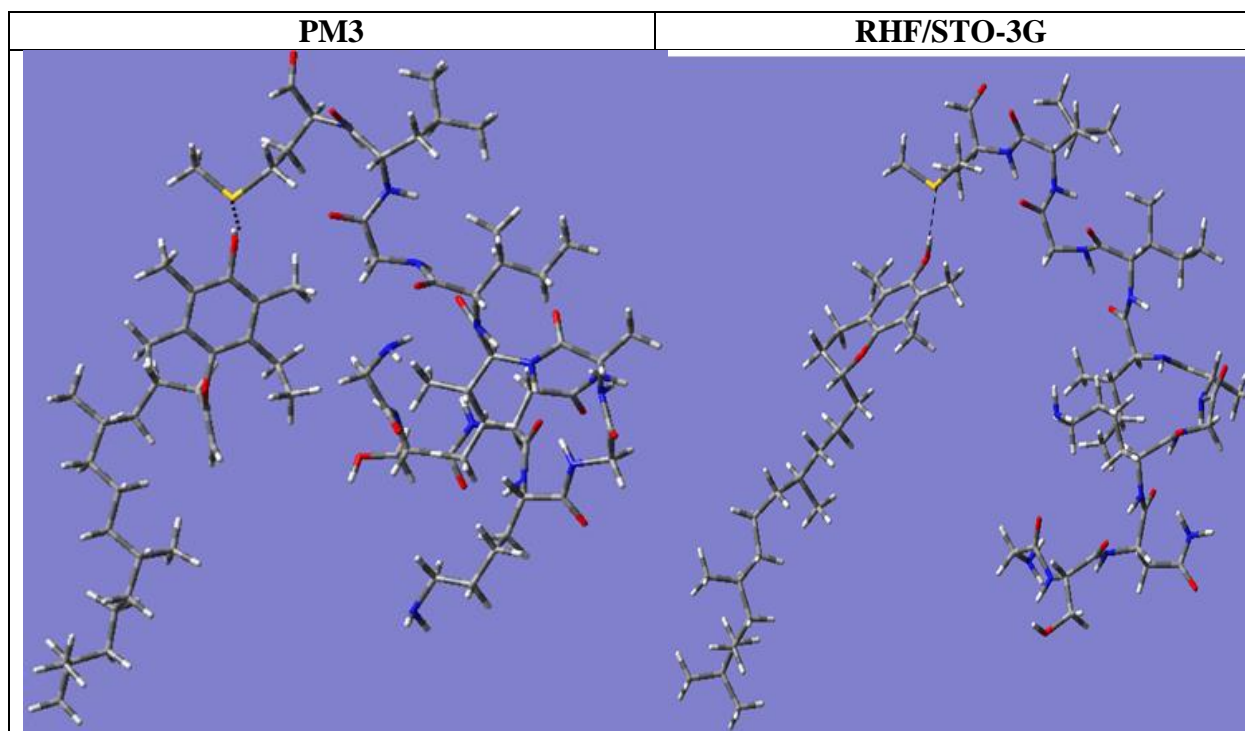
Ibuprofeno- $A\beta_{25-35}$



Meloxicam- $A\beta_{25-35}$



Naproxen- A β ₂₅₋₃₅



Vitamina E-A β ₂₅₋₃₅

	PM3		RHF/STO-3G	
	ENLACE(Å)	ANGULO O-H---B(°)	ENLACE(Å)	ANGULO O-H---B(°)
Smet-HOaspirina	1.5	121.0	2.5	160.9
Smet-HOdiclofenaco	1.3	180.0	2.1	165.8
Smet-HOibuprofeno	1.6	180.0	2.2	171.9
Smet-HOMeloxicam	-----	-----	2.1	170.2
Smet-HONaproxen	1.3	180.0	2.2	172.4
Smet-HOvitaminaE	2.2	171.1	2.2	170.8

Tabla 6. Se muestran las distancias obtenidas en el método PM3 y RHF/STO-3G entre los extremos HO- de cada antiinflamatorio-antioxidante y el péptido A β ₂₅₋₃₅ y el ángulo entre O-H---B, en donde B es el átomo del aminoácido del péptido interaccionando con el antiinflamatorio-antioxidante

Para poder evaluar si una interacción es posible por puentes de hidrogeno se toma en cuenta la modificación estructural del complejo A-H---B es decir el enlace covalente que existe entre A-H en donde a se caracteriza por ser mas electronegativo que H (hidrogeno) y la interacción H-B en la que B deberá de contener un par de electrones libres. Con base a esto se pueden clasificar los puentes de hidrogeno en tres categorías: fuertes moderados y débiles, Tabla 7:

Clasificación de las interacciones de puentes de hidrogeno

	Fuerte	Moderado	Leve
Longitud del enlace B---H (A°)	~1.2-1.5	~1.5-2.2	2.2-3.2
Longitud del enlace A---B (A°)	2.2-2.5	2.5-3.2	3.2-4.0
Angulo (A-H---B) (°)	175-180	130-180	90-150

Tabla 7. Clasificación de las interacciones de puentes de hidrogeno según Jeffrey

Con base a esta clasificación y tomando en cuenta la distancia de enlace B---H y la distancia del ángulo O-H---B se observa que todos los antiinflamatorios-antioxidante pueden formar complejos por enlace de puentes de hidrogeno con el péptido A β ₂₅₋₃₅, siendo este enlace de naturaleza moderada.

8.2 RESULTADOS EXPERIMENTALES

La consecuencia final de la toxicidad del $A\beta_{25-35}$ es la degeneración neuronal. Para demostrar esto, empleamos una técnica de tinción histoquímica (Tinción de hematoxilina y eosina).

La técnica de hematoxilina y eosina (H - E) es el procedimiento de tinción más comúnmente usado tanto en el estudio histológico como en el patológico; consiste en la aplicación de hematoxilina de Mayer que tiene un carácter básico y tiñe a los núcleos (carácter ácido) y la eosina que es un colorante ácido y tiñe el citoplasma y las fibras colágenas que tiene un carácter básico.

En esta evaluamos las células no dañadas la región CA1 del Hp y GD el daño en las células fue reconocido por las alteraciones nucleares que se presentan como picnosis, cariorrexis y cariolisis. Así como cambios en el citoplasma como la eosinofilia o pérdida de afinidad a la hematoxilina

Los tejidos de los diferentes grupos tratados con la administración de antiinflamatorio-antioxidante mostraron células de tamaño homogéneo con su núcleo y citoplasma bien definido lo que indica la ausencia de daño o alteración celular.

Mientras que el grupo tratado con el $A\beta_{25-35}$ se observa un desorden en la forma y organización de las células de la región CA1 del Hp y GD lo cual se relaciona con un estado de degeneración celular.

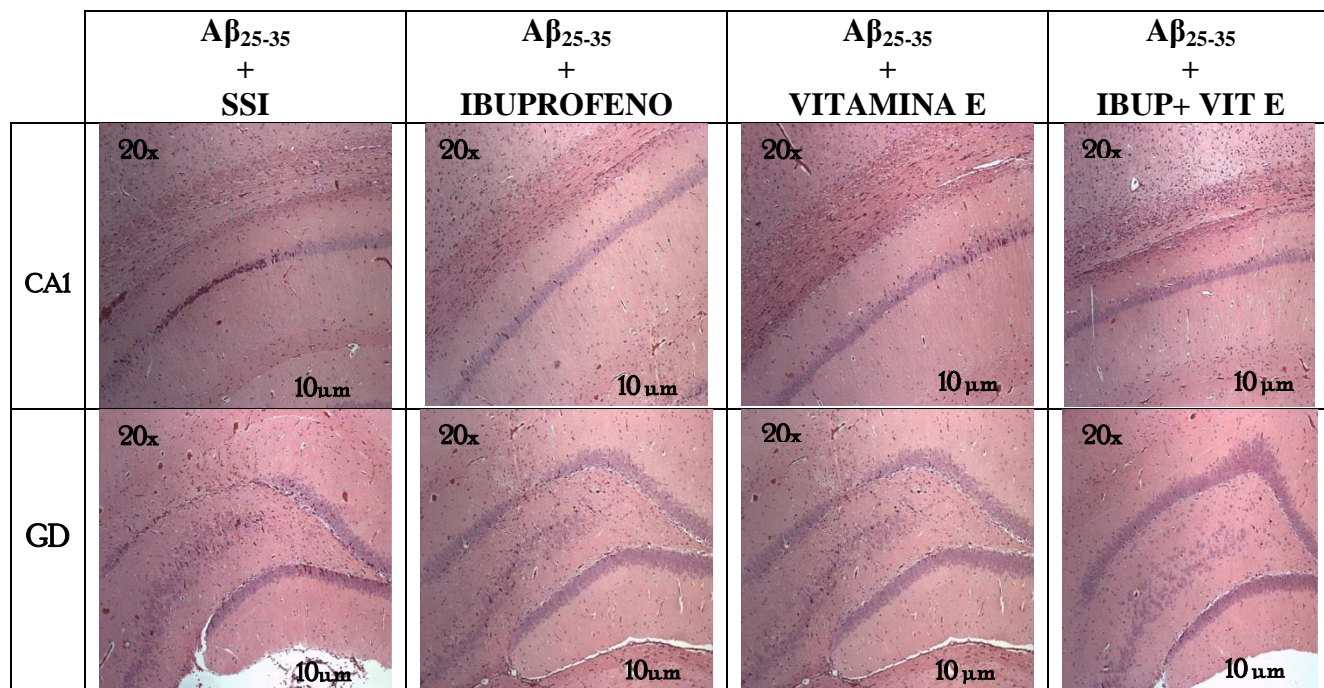


Figura 11. Micrografías representativas de la Tinción histoquímica de hematoxilina y eosina de la región CA1 del Hp y GD de rata.

8.2.1 LA INYECCIÓN DEL AMILOIDE- β_{25-35} INCREMENTA LA INMUNORREACTIVIDAD DE GFAP Y GD EN EL HIPOCAMPO DE RATA

Para comprender el curso temporal de la respuesta inflamatoria en la toxicidad inducida por el $A\beta_{25-35}$, se estudió la inmunorreactividad para GFAP en la región CA1 del Hp y GD de rata, como indicadores de la activación de astrocitos. En la figura 10 se muestra que la inmunorreactividad para GFAP (color rojo) del grupo tratado con el $A\beta_{25-35}$ aumenta durante el curso temporal de la inyección. Las fotomicrografías revelan como la inmunorreactividad se distribuyó de forma intensa en la región CA1 del Hp y GD. Posteriormente, se cuantificó el número de células reactivas a GFAP. El número de células reactivas a GFAP de los diferentes grupos se compararon entre si y la diferencia se expresó en porcentajes.

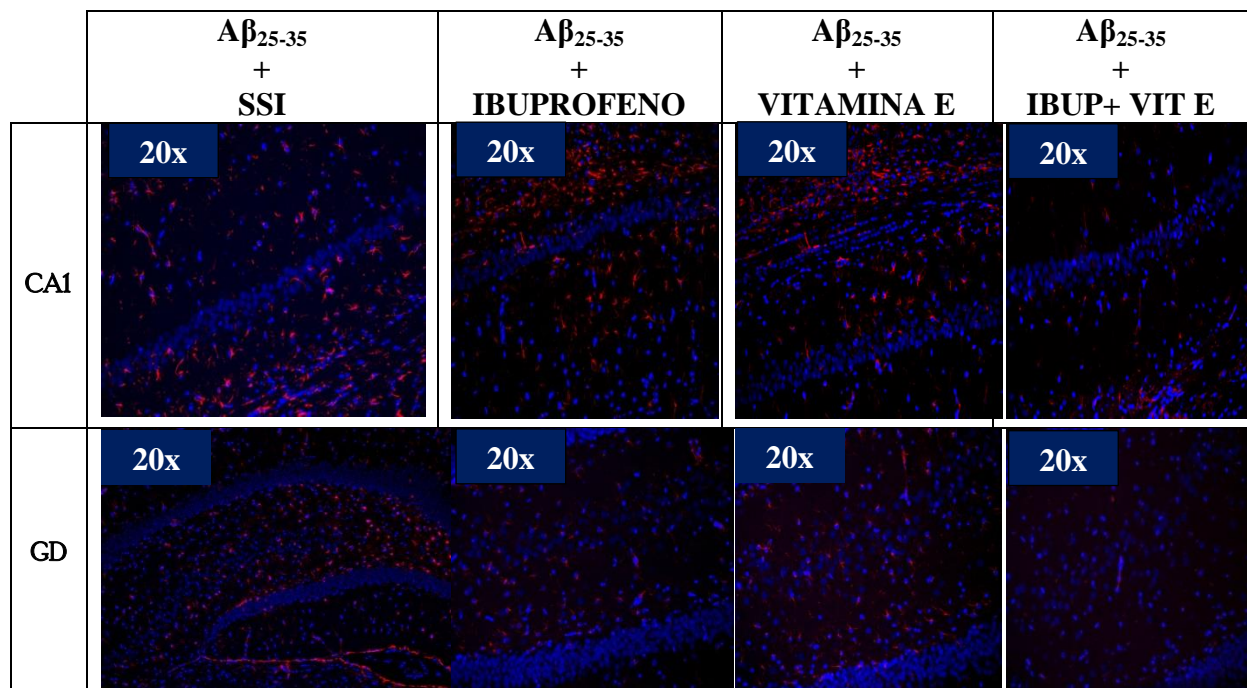


Figura 12. La administración de antiinflamatorio-antioxidante disminuye el número de astrocitos reactivos en la región CA1 del hipocampo y GD de rata. Las fotomicrografías muestran la inmunorreactividad para GFAP (rojo).

Los resultados indican que el grupo tratado con $A\beta_{25-35}$ muestra un incremento significativo mientras que en los grupos tratados con ibuprofeno y vitamina E esta distribución de astrocitos reactivos comienza a disminuir y en el grupo en el que se administro el co-tratamiento de ibuprofeno mas vitamina E la disminución de los astrocitos reactivos es muy viable pues estos antiinflamatorios nos ayudan en la protección de células neuronales evitando la neurodegeneracion.

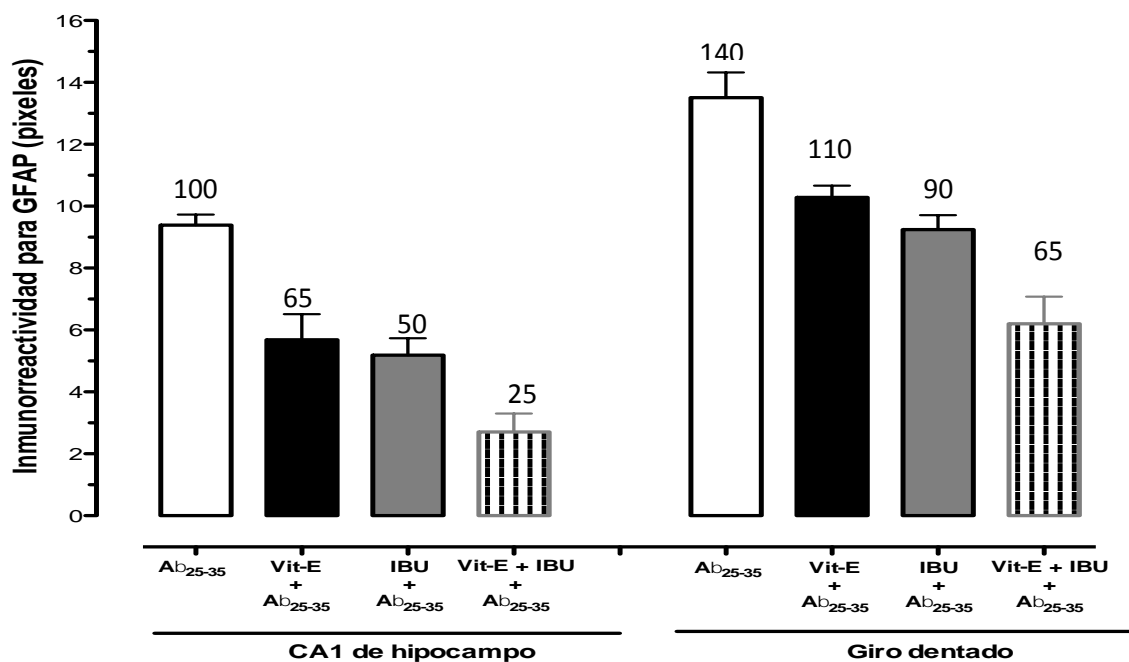


Figura 13. Cuantificación del número de células reactivas a GFAP.

La EA es un desorden degenerativo, siendo la pérdida de la memoria su principal característica, asociada con el proceso que afecta a las diferentes regiones del cerebro como la de la región CA1 del Hp y GD. Un evento esencial para desarrollar la EA es la agregación del péptido A β responsable de ejercer efectos neurotóxicos que se asocian a la muerte de las neuronas. Es la secuencia neurotóxica del A β ₁₋₄₂ la cual es empleada como un modelo que permite reproducir una parte importante en la patología de la EA.

En el presente trabajo realizamos un estudio teórico práctico de las estructuras de 5 antiinflamatorios y un antioxidante con A β ₂₅₋₃₅ para observar las interacciones que estos podrían formar y así elegir el mejor fármaco que nos ayude a la prevención de las enfermedades neurodegenerativas. Gracias a la química computacional se logro estudiar las propiedades físico, químicas y biológicas para así observar que fármaco interacciona mejor con el péptido y para corroborar lo teórico se hizo la parte experimental en la cual solo se utilizo un antiinflamatorio (ibuprofeno) y un antioxidante (vitamina E) por falta de infraestructura y tiempo.

9. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se lograron buenas correlaciones entre los resultados teóricos y experimentales. Con el fin de entender con mayor claridad los resultados obtenidos, se presenta una serie de conclusiones de forma desglosada:

1. Se logró hacer un estudio computacional de las estructuras moleculares para conocer sus puntos mas reactivos, observándose características especiales para cada una. Los resultados obtenidos, mostraron la importancia y contribución para poder dilucidar la formación de los complejos de los diferentes antiinflamatorios-antioxidante con el amiloide $A\beta_{25-35}$ en el que la interacción entre éstos es por enlaces de puentes de hidrógenos.
2. El cálculo del potencial electrostático, permitió observar que los extremos de los antiinflamatorios-antioxidante son los sitios que mejor interaccionan con el péptido $A\beta_{25-35}$ al tener grupos HO- con una carga electrónica deficiente en sus hidrógenos que permiten la interacción en zonas con una alta densidad electrónica, dichas zonas en el péptido corresponde a los aminoácidos Metionina y Lisina.
3. El antiinflamatorio que mejor podrían interaccionar con el $A\beta_{25-35}$ es el naproxen al presentar en las interacciones distancias y ángulo de enlace correspondientes al enlace por puente de hidrógeno.
4. En la parte experimental se concluye que los grupos a los cuales se les administro el cotratamiento del antiinflamatorio-antioxidante (ibuprofeno-vitamina E) se observo una disminución considerable de los astrocitos reactivos los cuales son considerados como un factor importante en la muerte neuronal.

10. PERSPECTIVAS

1. Realizar un estudio químico-computacional-experimental más detallado que permitirá tener un mayor conocimiento de las distancias de enlace y de las interacciones de éstas, para confirmar que la interacción por puentes de hidrogeno entre el péptido $A\beta_{25-35}$ y los antiinflamatorios- antioxidante es posible.
2. Al contar con las evidencias es necesario hacer los ensayos pertinentes experimentales con todas las moléculas empleadas en la parte teórica con el empleo del $A\beta_{25-35}$ para demostrar con mayor contundencia que la secuencia 25-35 es la parte toxica del péptido completo.
3. Finalmente queda la posibilidad de ampliar las investigaciones en torno al proceso de inflamación implicado en los mecanismos de protección celular. Pues como ya se observo los antiinflamatorios –antioxidantes juegan un papel importante que contribuye a mantener la concentración normal del péptido $A\beta_{25-35}$ y disminuyen el daño neuronal.

11. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Smith, S. J.; Sutcliffe B. T., (1997). "The development of Computational Chemistry in the United Kingdom". *Reviews in Computational Chemistry* 70: 271 - 316.
- [2] Schaefer, Henry F. III (1972). *The electronic structure of atoms and molecules*. Reading, Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Co., 146
- [3] Boys, S. F.; Cook G. B., Reeves C. M., Shavitt, I. (1956). "Automatic fundamental calculations of molecular structure". *Nature* 178 (2): 1207.
- [4] Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Med* 2004; 10:S2-S9
- [5] Lewars, E. Computational chemistry. Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics, 2nd ed., Springer, 2011.
- [6] Leach, A. R. Molecular modelling. Principles and applications., Pearson Education Ltd., 2001.
- [7] Hans Kuhn. **2012**. Principios de fisicoquímica. Segunda edición. México: Cengage Learning.
- [8] Born, M., & Oppenheimer, R. **1927**. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Annalen der Physik*. 389:457-484.
- [9] Slater, J.C. **1929**. The theory of complex spectra. *Physical Review*., Vol. 34:10, 1293-1322.
- [10] Hartree, D.R. **1928**. The wave mechanics of an atom with a non-coulomb central field. Part I. Theory and methods. *Proc. Cambridge Phil. Soc.* 24:1, 89-110.
- [11] Hartree, D.R. **1928**. The wave mechanics of an atom with a non-coulomb central field. Part II. Some results and discussion. *Proc. Cambridge Phil. Soc.* 24:1, 111-132.
- [12] Jensen Frank. **2007**. Introduction to computational Chemistry. 2da Edición. Odense, Denmark. Wiley.
- [13] Blinder, S.M. **1965**. Basic concepts of self-consistent-field theory. *American Journal of Physics*; 33:6, 431-443.
- [14] Levine Ira N. **2001**. Química cuántica. 5° ed. New York-Usa: Prentice Hall;
- [15] Cuevas G., Cortés F. **2003**. Introducción a la química computacional. FCE, 1ra. Edición México.
- [16] James B Foresman. **1996**. Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods. Segunda Edición. Gaussian incorporated.
- [17] Szabo, A.; Ostlund, N.S. **1996**. Modern Quantum Chemistry. Introduction to Advanced Electronic Structure Theory; Dover: New York.
- [18] Hohenberg P.; Kohn W. **1964**. Inhomogeneous electron gas. *Physical Review*; 136:3B, B864-B871.
- [19] W. Kohn y L. J. Sham. **1965**. *Phys. Rev. A.* 140:1133.
- [20] Becke, A.D. **1992**. Density-functional thermochemistry. *J. Chem. Phys*; 98:7, 5648-5652.
- [21] Parr, R. G.; Yang, W. **1989**. Density Functional Theory of Atoms and Molecules; Oxford Univ. Press: Oxford.
- [22] Politzer Peter. Truhlar Donald G. **1981**. Chemical Applications of atomic and molecular electrostatic potentials. 1st edition. Nueva York, Plenum press.
- [23] Murray, J.S.; Sen, K. **1966**. Molecular electrostatic potentials, concepts and applications. Amsterdam. Elsevier Science B.V. Vol 3.
- [24] Z. P. Inga, J. S. Murray, M. E. Grice, S. Boyd, C. J. O'Connor, P. Politzer. **2001**. Computational characterization of surfaces of model grapheme systems. *J. Mol. Struc. (Theochem)*. 549:147-158.

- [25] Galvez-vargas .2000. Medicina Preventiva y Salud Publica .10^a ed.Barcelona
- [26]GaggelliE, Kozlowski H., Valensin D and Valensin G. 2006. Homeostasis and Neurodegenerative Disorders (Alzheimer, prion and Parkinsons Diseases and Amyotrophic Lateral Sclerosis). *Cheminfor.* 37:178-181.
- [27] Braak, H. and Braak E. 1991 Neuropathological stageing [sic] of Alzheimer –related changes. *Acta Neuropathologica.* 82:239-259.
- [28] Terry E.1999 Alzheimer Disease.(2nd ed. Lippincontt, Williams y Wikins, Philadelphia.
- [29]Roberts GW, Nash M, Ince PG, Rosyton MC, Gentleman SM. 1993. On the origin of Alzheimer´s disease a: hypothesis. *Neurorepot;* 4: 7-9.
- [30] Graeber MB, Kosel S, Egensperger R, Banati RB, Muller U, Bise K, Hoff P, Moller HJ, Fujisawa K, Mehraein P. 1997. Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical histological and molecular genetic analysis_ *Neurogenetics.*1:73-80
- [31]Webb AA, Muir GD. The blood-brain barrier and its role in inflammation. *J Vet Intern Med.* (2000). 14 (4): 399 - 411.
- [32] Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* (1996). 19: 312 - 318.
- [33] Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* (2007). 10: 1387 – 1394.
- [34] Streit WJ. *Microglia in the Regenerating and Degenerating Central Nervous System.* Springer-Verlag, New York. (2002). 4: 54 - 65.
- [35] Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* (2007). 8: 57 – 69.
- [36] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* (2010). 119: 7 - 35.
- [37] Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, Stout RF Jr, Spray DC, Reichenbach A, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R, Verkhratsky A. Glial cells in patho-physiology. *J Neurochem.* (2012). 121 (1): 4-27.
- [38] Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol.* (2008). 29: 357 - 365.
- [39] Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci.* (2002). 3: 216 – 227.
- [40] Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology.* (2010). 129 (2): 154 - 169.
- [41] Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease-a double-edged sword. *Neuron.* (2002). 35: 419 – 432.
- [42] Schwartz M, Ziv Y. Immunity to self and self-maintenance: what can tumor immunology teach us about ALS and Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci.* (2008). 29 (6): 287 - 293.
- [43]Swanson RA, Ying W, Kauppinen T M. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med.* (2004). 4: 193 - 205.
- [44] Zhang, W. Neuroprotective effect of dextromethorphan in the MPTP Parkinson's disease model: role of NADPH oxidase. *FASEB J.* (2005). 18: 589 – 591

- [45] Wevers A, Witter B, Moser N, Burghaus L, Banerjee C, Steinlein OK, Schutz U, de Vos RA, Steur EN, Lindstrom J, Schroder H. Classical Alzheimer features and cholinergic dysfunction: towards a unifying hypothesis? *Acta Neurol Scand Suppl* (2000). 176: 42–48.
- [46] Maki M, Matsukawa N, Yuasa H, Otsuka Y, Yamamoto T, Akatsu H, Okamoto T, Ueda R, Ojika K. Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. (2002). 61: 176 – 185.
- [47] Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. (2001). 81 (2): 741 - 766.
- [48] Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. (2004). 430 (7000): 631 - 639
- [49] Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*. (2005). 120 (4): 545 - 555.
- [50] Roberts JS, LaRusse SA, Katzen H, Whitehouse PJ, Barber M, Post SG, Relkin N, Quaid K, Pietrzak RH, Cupples LA, Farrer LA, Brown T, Green RC. Reasons for seeking genetic susceptibility testing among first-degree relatives of people with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. (2003). 17 (2): 86 - 93.
- [51] Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*. (2004). 30; 44 (1): 181 - 193.
- [52] Guevara J, Dilhuydy H, Espinosa B, Delacourte A, Quirion R, Mena R, Joannette Y, Zenteno E, Robitaille Y. Coexistence of reactive plasticity and neurodegeneration in Alzheimer diseased brains. *Histol Histopathol*. (2004). 19 (4): 1075 – 1084.
- [53] McGeer EG, McGeer PL. Innate immunity in Alzheimer's disease: a model for local inflammatory reactions. *Mol Interv*. (2001). 1 (1): 22 - 29.
- [54] Eikelenboom P, Van Gool WA. Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. (2004). 111 (3): 281 - 294.
- [55] Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL, Araoz C. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1989). 86 (19): 7611 - 7615.
- [56] Fernández-Vizarra P, Fernández AP, Castro-Blanco S, Encinas JM, Serrano J, Bentura ML, Muñoz P, Martínez-Murillo R, Rodrigo J. Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. (2004). 15 (2): 287 - 305.
- [57] Griffin WS, Barger SW. Neuroinflammatory Cytokines-The Common Thread in Alzheimer's Pathogenesis. *US Neurol*. (2010). 6 (2): 19 - 27.
- [58] Mark RE. Neuropathology and the neuroinflammation idea. *J Alzheimers Dis*. (2009). 18 (3): 473 – 481
- [59] Heneka MT, Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev*. (2010). 63 (1-2): 189 - 211.
- [60] Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci*. (2000). 924: 17 - 25.
- [61] Busciglio J., Gabuzda DH, Matsudaira P and Yankner BA. 1993. Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 90:2092-2096
- [62] Xing Y., and Higuchi K. 2002. Amyloid fibril proteins, *Mech Ageing Dev*; 123:1625-1636.
- [63] Simmons L., May P., Tomaselli K., Rydel R., Fuson K and Brigham E. 1994. Secondary structure of

amyloid β peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol.* 45: 373-379

[64] Ramsden M., Plant L., Webster N., Vaughan P., Henderson Z. and Pearson H. 2000 Differential effects of unaggregated amyloid β protein (1-40) on K⁺ Channel currents in primary cultures of rat cerebellar granule and cortical neurons. *J Neurochem.* 79:699-712

[65] Yanker B. 1996. Mechanisms of neuronal degeneration Alzheimer's disease. *Neuron.* 16: 921-932

[66] Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron.* (2004). 30; 44 (1): 181 - 193.

[67] Maurice T, Lockhart BP, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res.* (1996). 706(2): 181-193.

[68] Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci.* (2001). 924: 17 - 25.

[69] D'Ursi M., Armenante R., Guerreni R., Salvadori S., Sorrentino., Picote D. 2004. Solution Structure of Amyloid-Peptide (25-35) in Different Media. *J. Med. Chem.* 47:4231-4238.

[70] McDonald P and Overnier B. 2000. Present imperfect: A critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev.*, 22:99-120

[71] Maurice T, Lockhart BP, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res.* (1996). 706(2): 181-193.

[72] Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* (2006). 26 : 7212 – 7221.

[73] Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory". *Prog. Neurobiol.* (2003). 70 (1): 1 – 32.

[74] Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA, James SA, Robb E, Wikke K, Leong SL, Perez K, Johanssen T, Greenough MA, Cho HH, Galatis D, Moir RD, Masters CL, McLean C, Tanzi RE, Cappai R, Barnham KJ, Ciccotosto GD, Rogers JT, Bush AI. Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell.* (2010). 142 (6): 857 – 867.

[76] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* (2002). 297 (5580): 353 - 356.

[77] Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci.* (2000). 924: 17 - 25.

[78] Zheng WH, Bastianetto S, Mennicken F, Ma W, Kar S. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience.* (2002). 115 (1): 201 - 211.

[79] Limón ID, Díaz A, Mendieta L, Chamorro G, Espinosa B, Zenteno E, Guevara J. Amyloid-beta(25-35) impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats. *Neurosci Res.* (2009). 63 (2): 129 - 137.

[80] Maccioni F. Double-contrast magnetic resonance imaging of the small and large bowel: effectiveness in the evaluation of inflammatory bowel disease. *Abdom Imaging.* (2010). 35 (1): 31 - 40.

[81] Heneka MT, Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev.* (2010). 63 (1-2): 189 – 211

- [82] Tekirian TL. Commentary: Abeta N- Terminal Isoforms: Critical contributors in the course of AD pathophysiology. *J Alzheimers Dis.* (2001). 3 (2): 241 - 248.
- [83] Kubo T, Nishimura S, Kumagai Y, Kaneko I. In vivo conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26]A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J Neurosci Res.* (2002). 70 (3): 474 - 483.
- [84] Gruden MA, Davidova TB, Malisauskas M, Sewell RD., Voskresenskaya NI., Wilhelm K., Elistratova EI, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. Differential neuroimmune markers to the onset of Alzheimer's disease neurodegeneration and dementia: autoantibodies to Abeta((25-35)) oligomers, S100b and neurotransmitters. *J Neuroimmunol.* (2007). 186 (1-2): 181 - 192.
- [85] Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci.* (1993). 13 (4): 1676 - 1687.
- [86] Zussy C, Brureau A, Keller E, Marchal S, Blayo C, Delair B, Ixart G, Maurice T, Givalois L. Alzheimer's disease related markers, cellular toxicity and behavioral deficits induced six weeks after oligomeric amyloid- β peptide injection in rats. *PLoS One.* (2013). 8 (1): e53117.
- [87] Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther.* (2000). 88 (2): 93 - 113.
- [88] Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA. Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1--42) and A beta(25--35). *J Am Chem Soc.* (2001). 123 (24): 5625 - 5631.
- [89] Arancibia S, Silhol M, Moulière F, Meffre J, Höllinger I, Maurice T, Tapia-Arancibia L. Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. *Neurobiol Dis.* (2008). 31 (3): 316 - 326.
- [90] Gulyaeva NV, Stepanichev MY. Abeta(25-35) as proxyholder for amyloidogenic peptides: in vivo evidence. *Exp Neurol.* (2010). 222 (1): 6 - 9.