



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LOCALIZACION Y ALTERACIONES BIOQUIMICAS
DE LA PROTEINA ASOCIADA A MICROTUBULOS TAU EN
TERMINALES SINAPTICAS DE LA NEOCORTEZA DE LA RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

ARMANDO ISRAEL GUTIERREZ LERMA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ANA BRIGIDA CLORINDA ARIAS ALVAREZ



2005

m. 344568



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



ANEXO Nº 1000
CIENTÍFICO Nº
11111

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

**"Localización y Alteraciones Bioquímicas de la Proteína Asociada a
Microtúbulos Tau en Terminales Sinápticas de la Neocorteza de la Rata"**

realizado por **Armando Israel Gutiérrez Lerma**

con número de cuenta **09650440-6** , quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Propietario

Dr. Julio Morán Andrade

Propietario

M. en IBB. Alette Ortega Gómez

Suplente

Dr. José Fernando Peña Ortega

Suplente

M. en C. Benito Ordaz Sánchez

Consejo Departamental de **Biología.**


M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



**DEDICO ESTE TRABAJO CON TODO MI
AMOR Y MI RESPETO A MI MADRE Y A
MI PADRE, YOLANDA LERMA ARAUJO
Y ARMANDO GUTIÉRREZ LÓPEZ.**

Agradecimientos.

Antes que nada, agradezco a mis padres por haberme dado el bien más preciado de todos, la educación, en todos sus sentidos; por su amor y comprensión y por haberme dado su apoyo en todos los momentos, buenos y malos.

Agradezco a mi hermana Taryn, cómplice de mil y una aventuras a lo largo de la vida, a la cual le agradezco así mismo su apoyo en todo, y a la que le deseo lo mejor.

Agradezco a mi familia, tanto paterna como materna, y en especial a mis tías Lourdes y Beatriz, por todo el cariño que me han dado a lo largo de mi vida.

Agradezco a Perla Leal, por todo el tiempo que hemos pasado juntos, y por ser una de las luces más brillantes en mi vida.

También agradezco a mis amigos y colegas, Iván, Pozzi y Sergio, por haber compartido conmigo el amor por la Biología, en sus distintas facetas.

Agradezco a mis maestros, a mis amigos y a mis conocidos de la Facultad de Ciencias, por haber recorrido conmigo el camino del aprendizaje de la Biología.

Un agradecimiento especial para la Doctora Arias (Clorinda), por ser una gran tutora, por haberme dado cabida en su laboratorio, y finalmente por mostrarme como se puede hacer ciencia en México, tener una familia y ser feliz, todo al mismo tiempo.

Agradezco de manera particular a la QFB Patricia Ferrera, por haberme enseñado las técnicas de laboratorio y a ser preciso en la realización de experimentos.

También agradezco a mis compañeros de laboratorio, pasados y presentes, pero en particular a Ricardo y a Karina, por mostrarme el verdadero espíritu de la Biomedicina.

Agradezco a todos los que me han precedido, por haber luchado en lo que creían, y haber buscado la Verdad, sin importar el peligro.

Agradezco de todo corazón a todos aquellos que hicieron posible y que siguen haciendo posible que nuestra Universidad sea Nacional, Autónoma y Gratuita.

A todos ustedes,

Muchas Gracias.

Resumen.

Uno de los dos marcadores histopatológicos principales de la Enfermedad de Alzheimer (EA) son las marañas neurofibrilares, compuestas por la Proteína Asociada a Microtúbulos tau. Esta proteína sufre procesos de hiperfosforilación o fosforilación anormal que promueven su autoensamblaje y agregación, lo que genera a los filamentos helicoidales apareados presentes en las neuronas de los pacientes. La hiperfosforilación y la agregación de tau interfieren con su función como estabilizador de microtúbulos, lo que daña el citoesqueleto y finalmente produce muerte celular. Hasta el momento, no existen modelos fisiológicos donde sea posible estudiar de manera precisa las alteraciones patológicas de esta proteína; la finalidad de este trabajo es evaluar si las terminales sinápticas purificadas (sinaptosomas) son un modelo adecuado para estudiar dichas alteraciones patológicas, mediante la adición de varios compuestos que simulan las condiciones patológicas que llevan *in vivo* a la agregación de tau, y presumiblemente al desarrollo de la EA. Además de que se desconocen los mecanismos precisos que operan para favorecer la agregación de tau, también se desconoce en que compartimiento neuronal ocurre predominantemente, y dado que un posible blanco de alteraciones bioquímicas que ocurren de manera temprana en la EA son las terminales nerviosas, también se estudio la localización de tau en las terminales sinápticas purificadas. Se encontró que la heparina, un glicosaminoglicano sulfatado involucrado en la enfermedad, induce la formación de agregados de tau, en particular de dímeros y trímeros, medido por la técnica de Western Blot. Se encontró así mismo que tau en su estado basal colocaliza con membranas, tanto sinaptosomal como de vesículas y de mitocondrias, y que bajo el tiempo de viabilidad máxima de la preparación de sinaptosomas, la adición simultánea de heparina y de un potente inhibidor de proteínas fosfatasa 1 y 2A, el ácido okadaico, produce también colocalización de tau con membranas, medido con el anticuerpo primario PHF-1, el cual reconoce un epítipo (serinas fosforiladas 396 y 404) característico de la enfermedad. En resumen, las terminales sinápticas purificadas son un sistema altamente fisiológico adecuado para estudiar algunos de los procesos de agregación de la proteína tau.

Índice

Resumen.....	7
I. Introducción.....	8
1. Enfermedad de Alzheimer.....	9
1.1 Enfermedad de Alzheimer: Definición e Historia.....	9
1.2 Características y Progresión del Cuadro Clínico.....	10
1.3 Diagnóstico, Patología y Protocolos Terapéuticos.....	10
1.4 Tipos de Enfermedad de Alzheimer: Aparición familiar temprana y aparición tardía esporádica.....	12
2. Proteopatías.....	15
3. El Citoesqueleto.....	16
3.1 Características Generales.....	16
3.2 Microtúbulos, Filamentos Intermedios y Microfilamentos.....	17
3.3 Proteínas Asociadas a Microtúbulos.....	19
4. Tau.	19
4.1 Estructura y Función de tau.....	19
4.2 Tipos de alteraciones patológicas de tau.....	21
4.3 Procesos de formación de Agregados Proteínicos.....	26
4.4 Transmisión Sináptica y Neurodegeneración.....	28
II. Hipótesis.....	29
III. Objetivos General y Particulares.....	29
IV. Materiales y Métodos.....	30
V. Resultados.....	34
VI. Discusión.....	43
VII. Conclusiones.....	52
Soluciones Empleadas.....	53
Referencias.....	54

I. Introducción.

El siglo XX fue un período de gran avance en todos los sentidos: científico, artístico y social. Gran parte del avance científico en el área de la biomedicina ha tenido como resultado un aumento significativo en el tiempo de vida promedio del ser humano en los países desarrollados industrialmente y muchos países en vías de desarrollo (Perls et al, 2002). Como consecuencia de esta expansión del tiempo de vida, se han descrito nuevas enfermedades que aparecen mayoritariamente cuando el individuo alcanza cierta edad a partir de la etapa madura. Estas enfermedades, y en particular las neurodegenerativas, que antes eran raras y que no eran más que notas curiosas en los tratados de medicina, han empezado a tener una gran importancia, en virtud de que una parte significativa de la población ha desarrollado estas enfermedades o se encuentra en riesgo de desarrollarlas. Esto trae consigo dos grandes consecuencias: en primer lugar la disminución de la calidad de vida ocasionada por la enfermedad en particular, y que finalmente va a desembocar en la muerte del paciente, y en segundo lugar el gran costo económico y social que significa cuidar y mantener a una población cada vez mayor de pacientes.

Hasta el momento, algunas de estas enfermedades de tipo neurodegenerativo pueden ser retrasadas o controladas hasta cierto punto, pero todos los tratamientos son de efectividad temporal y limitada, y no existe un conjunto de procedimientos quirúrgicos o drogas terapéuticas que puedan detener completamente el curso de la enfermedad o restaurar la salud del paciente. La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un ejemplo dramático y representativo de este tipo de padecimientos: daña inexorablemente los procesos cognitivos, en particular la memoria, disminuye de manera progresiva la calidad de vida de los pacientes, y hasta el momento no existen un tratamiento terapéutico que detenga o revierta la progresión del padecimiento. Para poder tener una idea de la magnitud del problema que representan las enfermedades de tipo neurodegenerativo, y en particular aquellas que causan déficits cognitivos, basta con ver los datos sobre la cantidad de casos de demencia en el mundo.

Un trabajo en residentes de casas para la tercera edad en México (Alvarado-Esquivel et al, 2004), encontró que la prevalencia de la demencia es menor a la reportada para países más industrializados: 16.1% de los individuos en el estudio fueron diagnosticados con demencia, y 11.6% con EA. En comparación, la frecuencia de la demencia en casas para la tercera edad en Estados Unidos fue de 26.4%, y en Japón se observó que las frecuencias de demencia y EA en este tipo de establecimientos fue del 39% y 34%, respectivamente. En el resto de los países con economías emergentes no existe información muy precisa o no es de fácil acceso; aún así, la población de estos países envejece rápidamente y por lo tanto se espera que se observe un incremento en la prevalencia de la demencia. Sin embargo, es factible hacer un estimado sobre la prevalencia de la EA para los países más desarrollados industrialmente; de acuerdo a datos de las Naciones Unidas, estos países presentaban 1,143 millones de habitantes en 1990, y de estos, 143 millones tenían más de 65 años de edad. Al aplicar las tasas de aparición de la demencia para cada cohorte de edad del estudio de Jorm y

colaboradores (1987), se encuentra que alrededor de 7.4 millones de personas presentan procesos demenciales. Dado que la EA causa al menos el 50% de los casos de demencia, es razonable suponer que al menos 3.7 millones de personas presentan déficits cognitivos originados por esta enfermedad, únicamente en los países más desarrollados industrialmente; por lo tanto, el número de personas que presentan esta enfermedad en todo el planeta en la actualidad debe de ser mucho más alto, y cada vez se incrementará más.

Basándose en los hechos anteriores, evidentemente es de suma importancia la investigación biomédica básica para estudiar los mecanismos etiológicos y patológicos de estas enfermedades, y en particular de la EA.

1. Enfermedad de Alzheimer.

1.1 Enfermedad de Alzheimer: Definición e Historia.

Esta enfermedad se define como un desorden neurodegenerativo de tipo progresivo de inicio tardío (en promedio, alrededor de los 65 años) caracterizado por un cuadro clínico de déficit cognitivo que incluye pérdida de memoria, demencia, desorientación en tiempo y espacio, alteraciones en el juicio e inestabilidad del comportamiento, y que culmina con la muerte del paciente (para ver una revisión completa consultar Arias y Mungarro, 2001; Murray et al, 1996; Nowotny et al, 2001).

Esta enfermedad fue reportado por primera vez por el médico alemán Alois Alzheimer en 1907 en un reporte titulado "Sobre una enfermedad característica de la corteza cerebral" (Alzheimer, 1907), en el cual describe el caso clínico de una paciente, Auguste D., que presentaba síntomas de demencia, desorientación y pérdida de memoria. Tal como lo describe Alzheimer, en los cortes histológicos se observan marañas neurofibrilares (descritas por primera vez) y placas amiloides, en particular en las capas corticales superiores del cerebro de la paciente. La importancia histórica de este reporte consiste en que marca el inicio de la investigación sobre la EA (Graeber y Mehraein, 1999). En un trabajo reciente, Graeber y colaboradores (1998) analizaron la histopatología y el genotipo de la apolipoproteína E (APOE) de la paciente original, Auguste D., y sus estudios histopatológicos confirmaron los resultados originales de Alzheimer, en cuanto a la localización y cantidad de placas seniles y marañas neurofibrilares. Adicionalmente, encontraron que el genotipo de la APOE de esta paciente fue e3/e3, mediante la técnica de análisis de restricción enzimática basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La relevancia del genotipo de la APOE con relación a la EA será explicada más adelante. Esta paciente, por lo tanto, representa un caso típico de la EA.

Alzheimer continuo trabajando con pacientes que padecían demencia, y en 1910 reportó un segundo caso, el de Johann F., que falleció en octubre del mismo año a la edad de 57 años. Este paciente presentaba una patología cerebral representativa de EA con presencia únicamente de placas seniles. Los registros genealógicos de la familia de Johann F., los cuales incluyen la causa de muerte de 1830 a 1900, muestran que varios de sus antepasados directos, hermanos y descendientes padecieron demencia. De los hechos anteriores, se puede concluir que Johann F. presentaba EA de tipo genético, con una predisposición familiar a

padecer demencia presenil con edad de aparición variable entre 30 y 60 años (Klunemann et al, 2002). El jefe y colega de Alzheimer, Emil Kraepelin, fue el que acuñó el término "Enfermedad de Alzheimer", muy probablemente basándose en su conocimiento personal de los datos histológicos de varios casos patológicos, incluyendo el de Auguste D., así como en los reportes de otros investigadores (Perusini, 1909; Simchowicz, 1910), que confirmaban la descripción inicial de Alzheimer (revisado por Graeber y Mehraein, 1999).

1.2 Características y Progresión del Cuadro Clínico.

Como se mencionó anteriormente, el cuadro clínico de la enfermedad incluye a la demencia como una de sus características principales. La demencia se define como la disminución, que puede ser progresiva o no, de las habilidades cognitivas del paciente. Esto acarrea la consecuente disminución de sus actividades sociales, económicas e intelectuales. La demencia es causada por una enfermedad del sistema nervioso, y no es una consecuencia normal del envejecimiento aunque este estrechamente asociado a él. El cuadro clínico de la demencia está caracterizado por un desempeño menor al normal en pruebas que evalúan la memoria, el conocimiento general, el lenguaje, la capacidad de razonamiento abstracto y la habilidad de llevar a cabo algunas pruebas de habilidad motora mínima. Algunos tipos de demencia son reversibles, por ejemplo aquellos originados por el hipotiroidismo o el síndrome de demencia por depresión aguda; sin embargo, la gran mayoría de los casos de demencia no son reversibles, como aquellos originados por la EA o por la demencia vascular (Dugué et al, 2003). La demencia no debe confundirse con el delirio. Este último es un estado de confusión mental junto con atención y conciencia disminuida, producido por infecciones, malnutrición o nutrición inadecuada, trauma cefálico o debido a otras causas potencialmente tratables. Los pacientes que presentan demencia están alertas y conscientes y no presentan alteraciones como el delirio excepto hasta las etapas tardías de la enfermedad. En términos epidemiológicos, la EA es la causa más común de demencia en la población (Nowotny et al, 2001).

La progresión del cuadro clínico de la EA en términos de síntomas externos sigue generalmente la siguiente secuencia de eventos; los pacientes presentan primero una pérdida mínima de la memoria a corto plazo, seguida de una pérdida extensa e irreversible de la memoria y finalmente termina con la incapacidad total de realizar incluso las funciones más básicas. Este cuadro culmina con la muerte del paciente en un período variable de 2 a 20 años (Murray et al, 1996; Nowotny et al, 2001; Dugué et al, 2003).

1.3 Diagnóstico, Patología y Protocolos Terapéuticos.

Hasta el momento, la única forma de diagnosticar con una confianza del cien por ciento si un paciente presentó la EA o no, es a través del estudio histopatológico post mortem del cerebro. A pesar de esto, se han establecido algunos criterios que pueden ayudar a diagnosticar la enfermedad con un grado aceptable de confianza. Estos criterios están basados en pruebas de tipo conductual, como por ejemplo la Mini Examinación del Estado Mental (MMSE, por sus siglas en inglés) (Lobo et al, 1999), aunado a la ausencia de desórdenes

sistémicos u otras enfermedades cerebrales que por si mismas pudieran explicar el déficit progresivo en memoria y otros procesos cognitivos (Nowotny et al, 2001). Más recientemente se han afinado pruebas de imagenología, como la Tomografía por Emisión de Positrones (PET, por sus siglas en inglés) o la Imagenología por Resonancia Magnética Funcional (fMRI, por sus siglas en inglés) que pueden brindar información muy temprana sobre alteraciones sutiles de las funciones neuronales normales, como la metabolización de glucosa.

La EA se caracteriza por dos marcadores histopatológicos principales: las placas neuríticas extracelulares compuestas por depósitos fibrilares de la Proteína β Amiloide (P β A) y por marañas neurofibrilares intracelulares compuestas mayoritariamente por filamentos helicoidales apareados (FHA), los cuales son agregados fibrilares de la proteína hiperfosforilada tau. También se observa una reducción en el número de sinapsis (Terry et al, 1991; Mucke et al, 2000; Selkoe DJ, 2002) y reducción en el número de neuronas en áreas límbicas y de corteza cerebral (Murray et al, 1996; Nowotny et al, 2001). Particularmente importante para las funciones de memoria, se han descrito procesos de muerte neuronal en las neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert (Murray et al, 1996; Klingner et al, 2003). Una pregunta importante es si las placas amiloideas y las marañas neurofibrilares son solamente marcadores histopatológicos o si son la causa de la alteración patológica de las funciones cognitivas normales. Intentar dilucidar la etiología de una enfermedad siempre es complicado, y más cuando esta es de origen multifactorial, pero aún así se puede afirmar que las placas seniles y las marañas neurofibrilares son tanto el resultado de procesos patológicos previos como la causa de otras vías patológicas, que unidas a los procesos primarios que formaron a los marcadores histopatológicos agravan el cuadro clínico de la enfermedad.

Dado que se desconoce la etiología precisa de la EA, es muy difícil desarrollar tratamientos y protocolos terapéuticos para combatir esta enfermedad. Las terapias actuales tratan los síntomas pero no modifican el curso de la enfermedad; el tratamiento más efectivo puede retrasar durante algún tiempo su progresión, pero es tan solo un paliativo y eventualmente se torna inefectivo. Estos tratamientos consisten en compuestos terapéuticos que se basan en la inhibición de la acetilcolinesterasa, la enzima que se encarga de inactivar al neurotransmisor acetilcolina, neurotransmisor producido por las neuronas colinérgicas de la parte basal de la corteza frontal. Por supuesto, esto funciona mientras existan neuronas que produzcan acetilcolina; una vez que ha muerto la mayoría de este tipo de células, el tratamiento se torna inútil. La inhibición producida por la acetilcolinesterasa permite una mayor permanencia del neurotransmisor en la hendidura sináptica, lo cual se ha observado disminuye la progresión de la enfermedad (Tariot et al, 2000). Actualmente existen cuatro drogas de este tipo: el hidrocloreuro de tacrina, el hidrocloreuro de donepezil, la galantamina y el tartrato de rivastigmina. En general, son compuestos con un amplio rango de efectividad y efectos secundarios; para ver una descripción detallada de los efectos de cada fármaco, consultar a Suh y Checler (2002).

Como los tratamientos arriba mencionados son temporales, actualmente se desarrollan nuevas estrategias terapéuticas para combatir esta enfermedad. Estas abarcan muy variadas líneas de investigación, pero principalmente se abocan a la

reducción de la concentración de la P β A y sus agregados. Concretamente, se ha intentado inhibir el procesamiento de la Proteína Precursora del Amiloide (APP, por sus siglas en inglés) hacia la P β A, así como la inhibición, el retroceso o la eliminación de la agregación de la P β A. Otros trabajos han abordado la inmunización contra esta proteína. La implementación de estas estrategias ha tenido resultados poco claros; las pruebas de inmunización contra la P β A tuvieron que ser detenidas debido a que algunos pacientes sufrieron de inflamación cerebral difusa, mientras que los experimentos para la remoción de agregados amiloides fueron muy exitosos, pero solo han sido probados a nivel sistémico, y no a nivel local cefálico (Pepys et al, 2002).

1.4 Tipos de Enfermedad de Alzheimer: Aparición familiar temprana y aparición tardía esporádica.

Se ha clasificado a la EA en dos tipos: de origen esporádico tardío y de origen familiar temprano, también llamado familiar presenil. El primer tipo es el más abundante y representa alrededor del 95% de todos los casos; dentro del tipo familiar temprano se reportan el 5% de los casos restantes (Murray et al, 1996; Nowotny et al, 2001). En la EA de tipo familiar el origen es claramente genético, en el cual mutaciones muy bien identificadas en el gen de la APP, o en los genes de las presenilinas 1 y 2, proteínas involucradas con el procesamiento de la APP, inducen un procesamiento anómalo de esta proteína, y su posterior acumulación extracelular (Murray et al, 1996; Dugué y Sewell, 2003). El nivel de perturbación del metabolismo normal de la APP dependerá del tipo de alteración y de la magnitud de ésta producida por la mutación en particular. Sin embargo, el efecto clínico común de la mayoría de las mutaciones en los genes de las presenilinas es alterar la capacidad de procesamiento de la γ (gamma) secretasa, la enzima que genera el residuo final de la P β A, lo que conlleva un aumento en la producción de esta proteína (LaFerla FM, 2002). En resumen, en este tipo de EA las alteraciones causadas por las mutaciones promueven que el paciente desarrolle la enfermedad a una edad más temprana (a partir de los 30 años) en comparación con los casos esporádicos.

Tabla 1. Factores genéticos que influyen mayoritariamente en el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer.

Inicio de la Enfermedad	Gen	Ejemplo de Mutaciones o de factores de riesgo	Cromosoma
Temprano	Proteína Precursora del Amiloide	V717F	21
Temprano	Presenilina 1	M146V	14
Temprano	Presenilina 2	M239V	1
Tardío	Apolipoproteína E	Genotipo Apoe4/Apoe4	19

Los casos de origen esporádico tardío son más complejos y muy posiblemente participan factores multigénicos y ambientales. En estos casos la etiología es todavía menos clara, pero se ha observado epidemiológicamente que



algunos factores favorecen la aparición de la enfermedad, como es el caso de los alelos de la apolipoproteína E, proteína del suero sanguíneo involucrada con el transporte de lípidos, en particular el colesterol (Corder et al, 1993; Murray et al, 1996; Herz y Beffert, 2000). Asimismo, ha sido propuesto que factores ambientales tales como la presencia de metales pesados, el aluminio, y otros factores con menor impacto (o cuyo impacto, si lo tienen, no se encuentra bien establecido) también pudieran contribuir de manera significativa al desarrollo de la enfermedad (Murray et al, 1996; Arias y Mungarro, 2001; Bush y Tanzi, 2002; Isacson et al, 2002; LaFerla FM, 2002).

Independientemente de cómo se genere, la acumulación de la P β A parece jugar un papel importante en la etiopatogenia del padecimiento. La teoría de "la cascada del amiloide" propone que el evento primario principal en la etiología de la enfermedad es la alteración patológica del sistema de producción y procesamiento de la P β A, y el consecuente aumento en la producción de la APP o de fragmentos amiloidogénicos (Hardy y Selkoe, 2002). Estos pueden producir daño a través de varias vías: de manera directa por exposición de sitios reactivos generados durante el proceso de pérdida de configuración tridimensional correcta, en el cual cualquier componente molecular se vería afectado al contacto con estos fragmentos altamente reactivos (Bucciantini et al, 2002). Una segunda vía la constituyen los agregados de la P β A, que presentan un grado de toxicidad de ligero a moderado dependiendo de la edad y de los efectos sinérgicos con otras condiciones de estrés metabólico (Arias et al, 1993; Arias et al, 2002; Dudas et al, 2002); aunque ha sido reportado que no existe correlación entre la cantidad de los agregados proteínicos y el nivel de la demencia (Lue et al, 1999). Al respecto, se ha propuesto que la P β A es más tóxica en términos de alteraciones funcionales patológicas al momento de formar oligómeros que en su estado de agregación final (Walsh et al, 2002; Gong et al, 2003).

También ha sido sugerido que la P β A puede producir daño de manera indirecta por activación de canales de calcio que incrementen las concentraciones de calcio intracelular, activando procesos apoptóticos (Etcheberrigaray et al, 1998; LaFerla FM, 2002). Además, la acumulación de agregados de esta proteína, que adquieren una conformación de β plegamiento, produce la formación de placas amiloides que adicionalmente pueden inducir fenómenos inflamatorios que agudizarían los procesos patológicos de esta enfermedad (Rogers et al, 1996; Stéphan et al, 2003).

Como ya se mencionó, se han descrito también mutaciones en el gen de la APP que incrementan la probabilidad de desarrollar la enfermedad y disminuyen la edad de aparición de la misma. Algunas evidencias en este sentido las aportan los pacientes que presentan trisomía 21, los cuales presentan triplicación del cromosoma 21 debido a errores durante la meiosis y posterior fecundación. Estos pacientes desarrollan un cuadro histopatológico muy similar al que se observa en la EA, antes de o alrededor de los 40 años de edad, lo cual sugiere que la sobre expresión de la APP, cuyo gen se localiza en el cromosoma 21, estaría asociada al inicio de los factores que llevan a desarrollar la EA. Sin embargo, hay que considerar que las otras alteraciones ocasionadas por la trisomía pudieran también producir una mayor vulnerabilidad neuronal al daño y la muerte celular, en

particular por la regulación a la baja de los mecanismos de protección del daño oxidante causado por radicales libres (Murray et al, 1996).

Otras condiciones que pueden alterar el número o el funcionamiento adecuado del cromosoma 21 son el quimerismo y el mosaicismo, aunque todavía no hay evidencias definitivas al respecto. El quimerismo es una condición genética extremadamente rara en la cual dentro de un organismo se encuentran células que se originaron a partir de la fusión de dos embriones distintos, mientras que el mosaicismo es relativamente más frecuente y se debe a una mutación o a una anomalía cromosomal que aparece en las primeras fases del desarrollo embrionario (Pearson H, 2002). En el primer caso, se propone que diferencias entre los dos genotipos pudiera dar origen a errores en el procesamiento de varias proteínas, entre ellas la APP. En el segundo caso, los pacientes tipo mosaico que contienen zonas de tejido que difieren genéticamente del resto del cuerpo, muy probablemente pueden contener zonas de tejido neuronal con una copia extra del cromosoma 21, de manera similar a la Trisomía 21, lo cual podría actuar como un factor que aumentara la probabilidad de desarrollar la EA (Geller y Potter, 1999; Migliore et al, 1999).

Otro factor genético de bastante importancia es el genotipo y la expresión fenotípica de la apolipoproteína E (APOE), la cual se encuentra relacionada con la susceptibilidad a desarrollar la EA, así como con el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares; hasta el momento se desconoce el mecanismo preciso que relaciona la expresión de los alelos de la APOE y la etiología de la EA (Herz y Beffert, 2000; Nowotny et al, 2001). Los estudios epidemiológicos indican que el genotipo que confiere mayor protección es el Apoe2/Apoe2, mientras que el Apoe3/Apoe3 es neutro y los individuos que presentan el fenotipo Apoe4/Apoe4 presentan el mayor riesgo a desarrollar la enfermedad. Estudios de mortandad muestran que conforme avanza la edad de una cohorte poblacional el genotipo Apoe4/Apoe4 prácticamente desaparece de esta, mientras que el genotipo Apoe2/Apoe2 se vuelve más prevalente (Corder et al, 1993; Schmechel et al, 1993). Es relevante mencionar que si bien este factor genético por si mismo tiene suficiente fuerza para aparecer en los estudios epidemiológicos, es muy probable que existan otros factores génicos de efectos muy sutiles pero que sin embargo impactan en la aparición y el curso de la enfermedad.

Existe otra teoría que propone que si el sistema nervioso experimenta condiciones de estrés metabólico que sean mayores a la capacidad de amortiguamiento fisiológico del sistema, las neuronas se dañan en alguna medida y como consecuencia de esto intentan reingresar al ciclo celular; como este proceso es incompatible en menor grado con el grado de diferenciación de la neurona misma y en mayor grado con el medio neuronal circundante (Fawcett y Asher, 1999; Arendt, 2001), en particular en el sistema nervioso central, la neurona entra a un proceso de apoptosis y muere (Arendt, 2001). La presencia de marcadores del ciclo celular como las ciclinas y las cinasas de ciclinas, en el cerebro de pacientes que padecieron la EA en las zonas donde se observa mayor pérdida neuronal y presencia de agregados proteínicos, apoyan la existencia de este tipo de mecanismo patológico (Bibb et al, 1999).

2. Proteopatías.

Las proteopatías se definen como un conjunto de enfermedades cuya etiología es la adquisición de una conformación espacial incorrecta en determinadas proteínas, lo cual se refleja en su funcionamiento anormal. Las consecuencias de este fenómeno pueden incluir la alteración o pérdida de la función normal o incluso el desarrollo de propiedades tóxicas o patológicas (Walker y LeVine III, 2000).

Las proteínas, al igual que el resto de los componentes de los seres vivos, han evolucionado para funcionar más eficientemente en medios con características físicas muy determinadas, y consecuentemente adoptan una estructura tridimensional adecuada para ese medio, la cual es biológicamente activa. A esta conformación se le llama conformación nativa y se establece físicamente mediante la formación de enlaces covalentes de tipo sulfhidrilo entre residuos de cisteína, y también por la formación de enlaces no covalentes como los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y las fuerzas de van der Waals que, de manera aislada, son débiles (en comparación con un enlace covalente) pero que colectivamente son lo suficientemente fuertes para aportar la energía necesaria para mantener la conformación espacial correcta. Sin embargo, cambios físicos, químicos o biológicos en el medio intra o extracelular pueden producir cambios en la estructura tridimensional de la proteína, llegando a ocasionar la pérdida de función de la misma, o la adquisición de propiedades patológicas (Nelson y Cox, 2000; Cozzone, 2002).

Ilustrando este último punto, uno de los principales efectos negativos de la adquisición de una conformación incorrecta es la agregación de estas proteínas en estructuras llamadas agregados proteínicos que muchas veces no pueden ser degradadas por la maquinaria intracelular encargada de esta función (McNaught et al, 2001). Estos agregados se forman a partir de procesos de nucleación de unas cuantas proteínas, que funcionan como atractores para otras proteínas del mismo tipo y que finalmente forman agregados intra o extracelulares de distintos tamaños, que por lo general son insolubles. En términos de estructura, los agregados son fibrillas de tipo β plegamiento, reconocidas por los compuestos Congo Rojo y por la adquisición de una tonalidad azul si son teñidos con yodo. Algunos investigadores han propuesto que algunas fibrillas pueden polimerizar y presentar una estructura de tipo alfa hélice, pero falta trabajar más en este sentido (Sadqi et al, 2002). Se ha postulado que en las enfermedades de agregación proteínica sistémicas, es el volumen y la ubicuidad de los agregados los causantes de los procesos patológicos, ejemplificado por la amiloidosis sistémica.

En algunas enfermedades (amiloidosis sistémicas, EA, diabetes tipo 2) se ha propuesto que es la alteración de los procesos fisiológicos normales causada tanto por las inclusiones de los agregados a nivel extracelular y la reacción inflamatoria crónica producida por estos, como la alteración causada por los agregados intracelulares, lo que origina la neurodegeneración (Murray et al, 1996; Pepys et al, 2002). El mecanismo de interacción molecular patológico preciso de los agregados se desconoce, pero estudios recientes sugieren que el efecto tóxico es consecuencia de la alta reactividad que pueden presentar algunas de estas proteínas en las distintas etapas de plegamiento o de agregación, principalmente

en las etapas tempranas de estos procesos (Bucciantini et al, 2002). En ese mismo trabajo se demostró que las fibras poliméricas no ramificadas no son particularmente tóxicas en comparación con el vehículo a los tiempos medidos, mientras que los agregados tempranos mostraron ser mucho más tóxicos. Este proceso se estudió en dos proteínas no relacionadas con enfermedades o con efectos patológicos normales, por lo que se podría teorizar que el fenómeno de adquisición de conformación incorrecta podría afectar virtualmente a todas las proteínas.

Dado que una de las dos proteínas principales que adquieren una conformación anormal en la EA es la proteína tau, y esta es una proteína asociada al funcionamiento del citoesqueleto, es adecuado mencionar algunos datos pertinentes con respecto a esta estructura subcelular en las neuronas.

3. El Citoesqueleto.

3.1 Características Generales.

El citoesqueleto es, como el resto de los organelos, fundamental para el funcionamiento de la célula. Podemos definir al citoesqueleto celular como una red tridimensional dinámica compuesta por varios tipos de filamentos proteínicos de distintos tamaños. En general, sus funciones principales son generar la forma, la polaridad y el movimiento celular. Lo primero lo logra proporcionándole estructura a la célula, esto es, diferentes gradientes de rigidez y longitud en todo el volumen intracelular, lo que a su vez se refleja externamente en la forma específica de la célula. Por lo tanto, la estructura del citoesqueleto tiene relación directa con el funcionamiento celular específico de cada tipo de tejido. En el caso del tejido neuronal, el arreglo del citoesqueleto permite la formación de elongaciones (neuritas) y le confiere polaridad (dendritas y axones), lo que le permite a la neurona funcionar como una unidad eficiente de transmisión y procesamiento de información.

Otra función del citoesqueleto es desarrollar vías de comunicación interna o de transporte intracelular formadas por microtúbulos y por motores moleculares, cuya función es transportar materiales (proteínas, organelos, compuestos sintetizados) de una parte de la célula a otra, ya sea en distancias cortas, como en una célula epitelial, o en distancias largas, como en el transporte axonal. Es muy importante resaltar que el citoesqueleto mantiene un orden espacio temporal muy bien definido en la localización espacial tanto de los organelos como de los otros componentes celulares, lo cual se refleja en el funcionamiento sumamente preciso de la célula. Otra evidencia de la relevancia de este organelo consiste en que alteraciones en el fino balance mantenido entre los componentes del citoesqueleto pueden desembocar en procesos patológicos, tales como los generados por las toxinas producidas por *Amanita phalloides* o por *Colchicum sp.* (Insall y Machesky, 2001). El citoesqueleto está compuesto estructuralmente por tres unidades poliméricas, principalmente: los microtúbulos, los filamentos intermedios y los microfilamentos (Ver Figura 1).

3.2 Microtúbulos, Filamentos Intermedios y Microfilamentos.

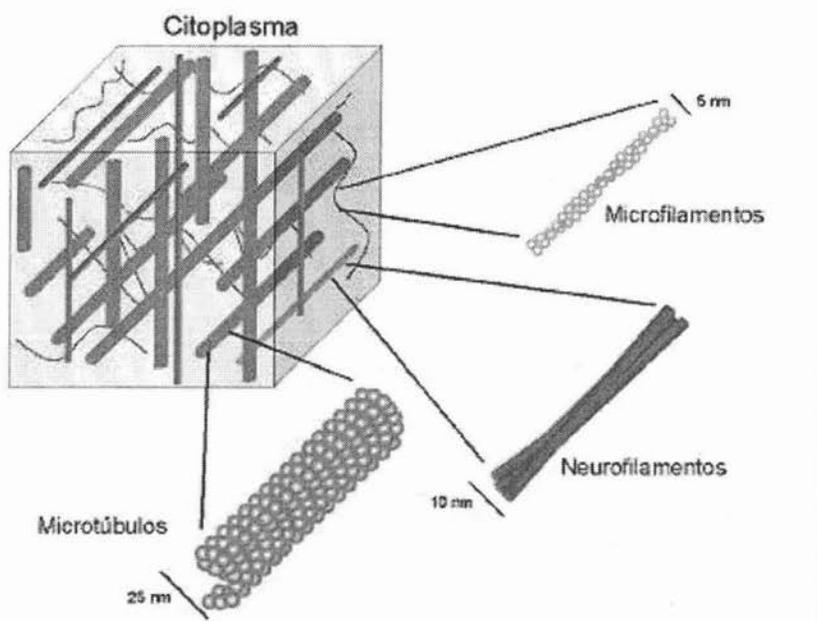
Los microfilamentos están constituidos por una hebra doble de polímeros de actina. La actina es una proteína globular bastante abundante en todos los tipos celulares, puesto que es parte esencial del tejido muscular (junto con la proteína miosina), además de estar implicada en el transporte molecular. En general, los microfilamentos se encuentran asociados a zonas de la célula como los bordes donde la forma celular cambia rápidamente, y por lo tanto están asociados a movimiento y tracción celular. Esta proteína presenta dos formas dependiendo de su estado de polimerización; la actina G, (esto es, actina globular), que es el monómero de actina y la actina F (filamentosa), la actina fibrilar. Cada uno de los monómeros de actina presenta aproximadamente 375 residuos aminopeptídicos y 42 kDa de peso molecular. Presentan un nucleótido de adenina, la adenina trifosfato (ATP), la cual cuando es hidrolizada regula el proceso de polimerización. La actina filamentosa es una hélice simple con un poco menos de dos subunidades por vuelta. Su polimerización es polar, esto es, los monómeros presentan una parte estructural inicial y una terminal diferentes entre si, las cuales se asocian siempre parte final de un monómero con la parte inicial del siguiente, característica fundamental para su funcionamiento. Los microfilamentos presentan procesos de polimerización y despolimerización, de acuerdo a la señalización intracelular y se encuentran anclados a la membrana a través de una red de proteínas fibrosas. Por lo general, miden 5 nanómetros de diámetro. Los sinaptosomas presentan un alto contenido de actina (Bear et al. 2001; Insall y Machesky, 2001).

Los filamentos intermedios están formados por la polimerización de unidades monoméricas de proteínas con un rango de tamaños que van de los 40 kDa a más de 100 kDa y generalmente miden alrededor de 10 nanómetros de diámetro (de ahí su nombre, pues su tamaño es intermedio entre los microtúbulos y los microfilamentos). Esta familia de proteínas se produce a partir de la transcripción y traducción de una familia grande de genes relacionados. Los filamentos intermedios se expresan de manera ubicua en el organismo, y aquellos que presentan expresión diferencial en el tejido nervioso se llaman neurofilamentos. La función principal de los filamentos intermedios en general parece ser otorgar fuerza estructural a los distintos tipos celulares en que se encuentran, como lo muestra el hecho de que las células que no presentan estas proteínas presentan deficiencias en la resistencia al estrés mecánico. Su estructura también apoya esta noción: consiste en la polimerización de monómeros en largas fibras proteínicas, las cuales se entrelazan en forma de cuerda, en trímeros o tetrámeros. Este arreglo es físicamente muy fuerte, y permite resistir fuerzas de estiramiento y compresión. A diferencia de los microtúbulos y los microfilamentos, la mayoría de los filamentos intermedios son bastante estables, y no se unen a nucleótidos ni hacen uso de motores moleculares (Insall y Machesky, 2001).

Los microtúbulos son tubos huecos compuestos por tubulina, de aproximadamente 25 nanómetros de diámetro, y son las unidades encargadas de mantener a los organelos celulares en sus posiciones relativas, de formar las vías de comunicación intracelular usadas por los motores moleculares y de formar el huso mitótico, un componente fundamental para la división celular.

Estructuralmente están formados por heterodímeros de α y β tubulina, proteínas globulares homólogas (aproximadamente 50 %) de 8 nanómetros de longitud, que se unen de manera polar formando protofilamentos, los cuales a su vez se unen por contactos laterales asociándose en hojas y microtúbulos. En general, estos últimos están constituidos por trece protofilamentos, pero el número puede variar de 9 a 17. Incidentalmente, los procariontes presentan una proteína homóloga a la tubulina, la FtsZ, la cual además de presentar una estructura atómica y un comportamiento muy similar a los de la tubulina, también se ensambla formando protofilamentos los cuales se asocian durante la división celular en un anillo que constriñe la división entre las células hijas, en un claro paralelismo a la función de los microtúbulos en la división celular en eucariontes.

Figura 1. Esquema del citoesqueleto y sus componentes característicos.



Adaptado de Bear, Connors y Paradiso, 2000.

De manera parecida a la actina, los monómeros de tubulina presentan un nucleótido, pero en este caso es guanosina trifosfato (GTP), el cual es hidrolizado en el caso de la β tubulina a guanosina difosfato (GDP) al unirse a la α tubulina, reacción que conlleva un pequeño cambio conformacional que pone al protofilamento en un estado menos estable. Este cambio conformacional es responsable del comportamiento de inestabilidad dinámica de los microtúbulos. Este fenómeno consiste en que, de manera similar a los microfilamentos, los microtúbulos se polimerizan mediante procesos de nucleación y elongación, pero

se despolimerizan por medio de procesos llamados catastróficos, en los cuales un microtúbulo deja de crecer abruptamente y además se desprenden secciones largas de protofilamentos en forma de espirales y anillos. Este proceso no ocurre en los polímeros de actina, los cuales son desensamblados por una familia de proteínas que los cortan directamente. Sin embargo, también sucede que un microtúbulo que se está despolimerizando se detenga y vuelva crecer, en un fenómeno llamado rescate.

La interacción de los procesos descritos le otorga a los microtúbulos un gran dinamismo y una gran variedad de funciones, lo que los hace ideales para servir como la unidad estructural de soporte y movimiento celular (Amos, 2001; Insall y Machesky, 2001).

3.3 Proteínas Asociadas a Microtúbulos.

Muchas de las características morfológicas y funcionales de los microtúbulos dependen en parte de una serie de proteínas estructurales llamadas en conjunto Proteínas Asociadas a Microtúbulos (llamadas MAP por sus siglas en inglés). Como su nombre lo indica, estas proteínas están físicamente asociadas a los microtúbulos y su función es proporcionarles estabilidad y mantener la integridad física de los mismos. Además, son capaces de disminuir la concentración crítica de tubulina necesaria para que esta polimerice y forme microtúbulos. También pueden determinar el espacio físico existente entre los microtúbulos, mediante las interacciones de sus dominios N terminal con otros componentes del citoplasma o con las proyecciones N terminal de otra MAP. Existen varias proteínas de este tipo clasificadas en distintas familias, pero para los intereses particulares de este trabajo es adecuado mencionar a tres: MAP2, tau y MAP1B. Se ha encontrado que MAP2 (~ 200 kDa) se asocia a microtúbulos de dendritas, mientras que tau y MAP1B están asociadas fundamentalmente a axones, y como se explicará en detalle más adelante, presentan redundancia funcional. Las MAPs presentan dominios de unión a microtúbulos en la parte C terminal de secuencia muy conservada entre ellas, mientras que las partes N terminal no presentan homología. Su actividad está en función de su grado de fosforilación; entre más fosforiladas estén, son más inactivas. Alteraciones en su funcionamiento pueden conllevar la aparición de procesos patológicos (Amos, 2001).

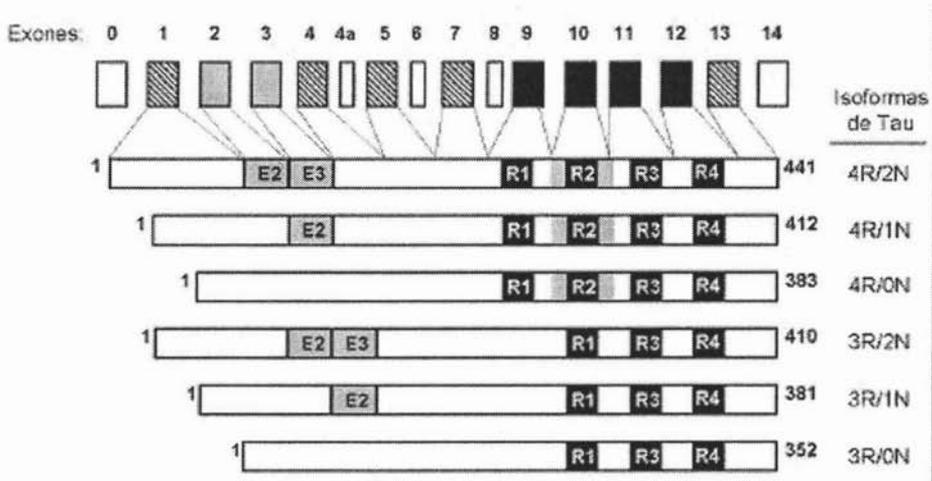
4. Tau.

4.1 Estructura y Función de tau.

En 1977 DW Cleveland purificó por primera vez a tau, una proteína que pertenece a la familia de las MAPs, anteriormente descritas. Originalmente tau fue determinada como un péptido que copurifica con tubulina *in vitro*, estimula el ensamblaje de microtúbulos a partir de tubulina y además estabiliza potentemente a los mismos, en concordancia con las funciones de las proteínas asociadas a microtúbulos. Se le encuentra principalmente en los axones, y también en el soma (García y Cleveland, 2001). En el Sistema Nervioso Central humano (SNC), esta proteína presenta seis isoformas, generadas por procesamiento alternativo del RNA mensajero de un mismo gen, el gen de tau. Este gen se localiza en el

cromosoma 17q21 (esto es, cromosoma número 17 brazo corto banda de Giemsa 21) y está conformado por 16 exones, incluyendo al exón 0 que es parte del promotor y al exón 4a. En todas las isoformas se incluyen los exones 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 y 13; los exones 6 y 8 no se transcriben en el SNC humano, así como el exón 4a, que si se transcribe en el Sistema Nervioso Periférico. El procesamiento alternativo, esto es, la inclusión o no de los exones 2, 3 y 10 genera las seis isoformas del SNC (Lee et al, 2001). Los exones 2 y 3 codifican para secuencias de 29 residuos aminopeptídicos cada uno, mientras que el exón 10 codifica para una secuencia de 31 residuos (ver Figura 2).

Figura 2. Representación de la estructura del gen humano de tau.



Los exones 1, 4, 5, 7 y 13 (rectángulos con rayas diagonales), así como los exones 9, 11 y 12, (rectángulos negros) se expresan en todas las isoformas; el procesamiento alternativo de los exones 2 y 3 (rectángulos grises) y del exón 10 generan las seis isoformas del gen humano de tau. Los tamaños relativos de los exones no están dibujados a escala. Adaptado de Lee et al, 2001.

En términos estructurales proteínicos, podemos dividir a tau en tres regiones funcionales: una región amino terminal, una región media y una región carboxilo terminal. En esta última región encontramos los motivos de unión a microtúbulos, que pueden ser tres si no se incluye el exón 10 (isoformas 3R) o cuatro si este se encuentra incluido (isoformas 4R). Estos dominios de unión a microtúbulos están constituidos por 18 residuos cada uno, en una secuencia altamente conservada y están flanqueados por 13 o 14 residuos en una secuencia menos conservada y más flexible. En el SNC del adulto, la proporción de 3R tau a 4R tau es de aproximadamente 1:1. Por otro lado, el procesamiento alternativo de los exones 2 y 3 generan las isoformas 1N si solo incluye al exón 2, 2N si incluye a los dos exones y 0N si no los incluye (Figura 2). Las proporciones de las isoformas 0N, 1N y 2N son de 37%, 54% y 9%, respectivamente. Se desconoce la función de

las secuencias peptídicas generadas por los exones incluidos. Cabe mencionar que en la EA, los agregados patológicos de tau están compuestos por las seis isoformas. En términos de desarrollo, todas las isoformas se expresan en el cerebro humano postnatal, mientras que solo la isoforma más corta (3R/0N) se expresa en el cerebro durante el período de desarrollo fetal (Lee et al, 2001). En el transcrito de tau que se expresa en el Sistema Nervioso Periférico se incluye el exón 4a en la parte amino terminal, lo que resulta en la formación de una proteína de mayor tamaño (entre 110 y 120 kDa). Curiosamente, esta tau de mayor longitud no presenta procesos de agregación, incluso en condiciones que promueven este proceso potentemente (Pérez et al, 2001).

Como fue descrito anteriormente, la función de tau consiste en estimular la formación de microtúbulos y estabilizar a los mismos. Para lograr esto, tau se une a los microtúbulos mediante su región C terminal, que como ya fue mencionado contiene los dominios de unión a microtúbulos. Estos presentan distintas afinidades de unión a los microtúbulos; se sabe que las isoformas de tipo 4R se unen a los microtúbulos con mayor avidez, probablemente debido a la región localizada entre los dominios de unión a microtúbulos 1 y 2, la cual es probablemente el segmento mínimo necesario de tau para formar agregados proteínicos (Pérez et al, 2001), y la cual presenta más del doble de afinidad de unión a microtúbulos que cualquiera de los otros dominios de unión (Goode y Feinstein, 1994). En términos de la interacción física entre tau y los microtúbulos, los resultados de algunos trabajos sugieren fuertemente que tanto tau como MAP2 se unen de manera longitudinal a los microtúbulos, probablemente uniendo las interfases de tubulina (Al-Bassam et al, 2002). Sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo preciso mediante el cual las MAP's estabilizan a los microtúbulos. Otro punto interesante es que tau presenta redundancia funcional con MAP1B, proteína anteriormente descrita, evidenciado por estudios en los cuales la desactivación del gen de tau en ratones no presenta efecto patológico alguno, ni tampoco la desactivación de MAP1B. Sin embargo la desactivación de ambos genes, y por lo tanto de ambas proteínas produce invariablemente la muerte alrededor de las cuatro semanas de edad, demostrando que una proteína es capaz de suplir la ausencia de la otra (Takei et al, 2000).

4.2 Tipos de alteraciones patológicas de tau.

Existe un conjunto de enfermedades cuyos elementos en común son la agregación de tau y la aparición de la demencia; a estas enfermedades se le ha dado el nombre genérico de tauopatías. Podemos clasificar a las tauopatías en dos clases: aquellas en que la agregación de tau es el proceso patológico principal (o el único), y aquellas en las que otras proteínas se ven involucradas en la etiología de la enfermedad. La EA se encuentra claramente dentro de la segunda clase, ya que es muy probable que alteraciones patológicas de la P β A originen la enfermedad (Mattson, 2004). Independientemente de las causas exactas de estas enfermedades, al final todas ellas desencadenan un proceso demencial asociado a la agregación de tau. Más formalmente, podemos definir a las tauopatías como un conjunto de enfermedades neurodegenerativas causadas por el funcionamiento y el plegamiento inadecuado de la MAP tau. Están conformadas por un amplio rango de modificaciones en la estructura y el funcionamiento de tau, y la expresión

fenotípica de la patología está igualmente conformada por un amplio rango de síntomas y signos, aunque la característica común a todas es la demencia. Entre la gran diversidad de tauopatías se encuentran la EA, el Síndrome de Down, la Enfermedad de Pick, la Demencia Frontotemporal y Parkinsonismo asociado al cromosoma 17, la Degeneración Corticobasal, y otras. Al ser enfermedades en las cuales como consecuencia de una conformación incorrecta de una proteína se originan procesos patológicos, las tauopatías están incluidas dentro del conjunto de las proteopatías, las cuales ya se discutieron anteriormente (Lee et al, 2001; Selkoe DJ, 2003).

En el caso particular de la EA uno de los dos marcadores histopatológicos principales son las marañas neurofibrilares (MN), agregados intracelulares compuestos principalmente por los filamentos helicoidales apareados (FHA), los cuales a su vez están compuestos de fibrillas insolubles de tau hiperfosforilada. ¿Cuáles son las alteraciones patológicas que cambian las propiedades de tau de tal manera que de ser una proteína altamente soluble con una función estructural muy importante se convierte en un agregado proteínico completamente insoluble y bastante tóxico? Para intentar contestar a esta pregunta, se han propuesto tres causas fundamentales: la primera son genéticas (las mutaciones) y la segunda y tercera son epigenéticas (procesos de hiperfosforilación e interacción con otras biomoléculas). A continuación serán descritos en detalle cada uno de estos factores.

Como todo el material genético, el gen de tau es susceptible de sufrir mutaciones. Estas mutaciones son predominantemente de dos tipos; mutaciones puntuales en la secuencia de algún exón cuyo efecto es el cambio de un aminoácido por otro en el transcrito final, lo que produce alteraciones en el funcionamiento y reducción en la afinidad de tau por la tubulina. Bastantes de estas mutaciones ocurren en residuos altamente conservados dentro de o cercanos a los dominios de unión a microtúbulos. Además, algunas de estas mutaciones estimulan la agregación de tau en filamentos insolubles a partir de una secuencia que adopta una conformación de tipo β plegamiento (von Bergen et al, 2000). Por lo tanto, los efectos de este tipo de mutaciones podrían ser dos: debido a que disminuye la afinidad de tau por los microtúbulos, potencialmente habría más tau soluble, y esta podría interactuar a nivel de la secuencia que promueve su autoagregación formando filamentos insolubles (Makrides et al, 2003; también ver Figura 3).

El segundo tipo de mutaciones son más sutiles puesto que ocurren al nivel del procesamiento alternativo del RNA mensajero; en este caso las mutaciones ocurren en el intrón 10 o son mutaciones silentes en el exón 10. En ambos casos, las mutaciones no afectan la secuencia de la proteína final, por lo que en principio no debería de haber efectos patológicos. Sin embargo, en los pacientes que presentaron este tipo de mutaciones se observa un incremento en la cantidad de 4R tau, tanto soluble como insoluble. Un modelo que intenta explicar este hecho postula que una estructura de tipo tallo-aro, formada por los codones finales del exón 10 y por la parte inicial del intrón 10 impide el acceso de los componentes de la maquinaria del procesamiento alternativo, y por lo tanto reduce la inclusión del exón 10. Las mutaciones reportadas para esta secuencia desestabilizarían la estructura tallo-aro, lo que permitiría el acceso de la maquinaria de procesamiento

alternativo y consecuentemente el aumento de la inclusión del exón 10. La resolución directa de la estabilidad termodinámica de esta estructura por Resonancia Nuclear Magnética (Varani et al, 1999) y recuperación del patrón de procesamiento alternativo por medio de sustituciones de bases de pares compensatorias a las mutaciones originales (D'Souza et al, 1999) indican que este modelo es probablemente correcto, y describe de manera adecuada la estructura del RNA mensajero de tau (García y Cleveland, 2001).

Por supuesto, la interrogante que surge al respecto es, ¿qué efectos patológicos pudiera tener la predominancia de las isoformas 4R sobre las 3R? Hasta el momento se desconoce la respuesta. Se ha especulado que las isoformas 4R al unirse con mayor avidez a los microtúbulos saturaría los sitios de unión a estos, y generaría una poza de isoformas 3R solubles que estarían en condiciones de agregarse. Sin embargo, la evidencia obtenida de las autopsias muestra que esto no es el caso, al menos para la EA. Otras teorías postulan que quizás las isoformas 3R se unen a los microtúbulos más eficientemente *in vivo* o que quizás la unión de las isoformas 4R a los microtúbulos aumenta la eficiencia de unión de las 3R, aumentando así la cantidad de isoformas 4R solubles. También es posible que las mutaciones descritas promuevan la agregación de las isoformas 4R sobre las 3R. Independientemente del mecanismo patológico preciso, lo cierto es que estas mutaciones promueven la neurodegeneración y el déficit cognitivo.

El segundo factor que se piensa contribuye al desarrollo de las alteraciones patológicas de tau es el proceso de hiperfosforilación. Tau es una fosfoproteína, por lo que su estado fisiológico de actividad depende de su grado de fosforilación, el cual es regulado de manera precisa por las enzimas proteínas cinasas y por las enzimas proteínas fosfatasas; las primeras adicionan grupos fosfato al sustrato y las segundas los remueven. En términos de funcionamiento, alteraciones en el fino balance que existe entre la actividad de estos dos tipos de enzimas pueden desembocar en procesos patológicos, e inclusive en la muerte del organismo (Nelson y Cox, 2000; Lee et al, 2001).

Independientemente de que varios residuos que son hiperfosforilados en la tau de pacientes con EA también se encuentran fosforilados hasta cierto grado en la tau humana normal, es claro que la tau que forma los filamentos helicoidales apareados se encuentra hiperfosforilada y anormalmente fosforilada, con respecto a la tau de individuos sanos (Morishima-Kawashima et al, 1995). En términos de cuales son los residuos específicos de tau que regulan la unión a microtúbulos cuando se encuentran fosforilados, existen al menos 79 residuos potenciales de serina y treonina en la isoforma más larga de tau capaces de aceptar grupos fosfato, y al menos 30 de estos se encuentran fosforilados en condiciones normales (revisión de Buée et al, 2000). Los residuos fosforilados se agrupan en regiones cercanas a los dominios de unión a microtúbulos, y es un hecho bien establecido que un aumento en la fosforilación de tau disminuye su capacidad de unirse a microtúbulos (Biernat et al, 1993); ver Figura 3. Hasta el momento no existe evidencia de que sitios individuales dentro de tau sean capaces de regular la eficiencia de unión a microtúbulos; lo más probable es que sea la fosforilación en múltiples residuos lo que regule esta función. Dada la importancia de las enzimas que regulan el estado de fosforilación de tau, se ha investigado

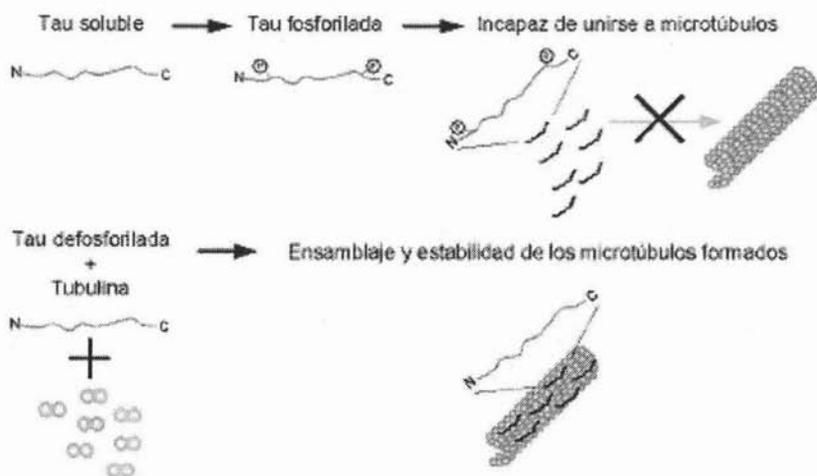
intensamente el papel que diversas proteínas cinasas pudieran tener en la regulación de la función de tau *in vivo*, aunque la atención se ha centrado principalmente en dos cinasas: la glicógeno sintetasa kinasa 3 β (GSK-3 β) y la cinasa dependiente de ciclina 5 (CDK-5, por sus siglas en inglés). GSK-3 β es una cinasa de serinas y treoninas que es abundante en el cerebro y que se asocia a microtúbulos; varios estudios han demostrado que esta cinasa es capaz de hiperfosforilar a tau, con una consecuente pérdida de unión de tau a microtúbulos (Lovestone et al, 1996). CDK-5 es una cinasa implicada en la regulación del ciclo celular, muy abundante en neuronas y que colocaliza con el citoesqueleto. Esta cinasa es activada por su interacción con las subunidades regulatorias p35, p25 y p39, y en particular con p35. Se sabe que a partir de p35 se genera p25, muy probablemente a través de la actividad de la proteasa calpaína (Lee et al, 2000), y también se sabe que p25 se acumula en las neuronas de los pacientes con EA; p25 activa constitutivamente a CDK-5, lo cual incrementa la fosforilación de tau, destruye la integridad del citoesqueleto y promueve la neurodegeneración (Patrick et al, 1999). En un trabajo reciente se demostró en un modelo de ratones transgénicos que CDK-5 es un factor clave en la agregación de tau y en la formación de marañas *in vivo* (Noble et al, 2003), por lo que adquiere mucha mayor relevancia el uso de fármacos inhibidores de esta cinasa como posible tratamiento para disminuir la patología de la EA.

El otro grupo de enzimas que han sido implicadas en la alteración del estado de fosforilación de tau son las proteínas fosfatasas, en particular las fosfatasas de proteínas 1 (PP1) y 2A (PP2A). Tanto la PP1 como la PP2A se encuentran en el cerebro humano, se unen a tau y remueven grupos fosfato de esta. La inhibición de ambas fosfatasas con ácido okadaico produce un incremento en la fosforilación de tau, un decremento en la unión de tau a microtúbulos, la destrucción de microtúbulos y la degeneración axonal (Arias et al, 1993; Merrick et al, 1997). Estos resultados muestran que deficiencias en la actividad de la proteínas fosfatasas potencialmente pueden originar procesos neurodegenerativos, aunque es imperante corroborar estos resultados *in vivo*. Sin embargo, es pertinente aclarar que todavía no se ha establecido experimentalmente una relación directa entre la hiperfosforilación de tau y sus procesos de agregación patológica.

El tercer factor que se ha visto involucrado en las alteraciones patológicas de tau es su interacción con otras biomoléculas, en particular con los glicosaminoglicanos sulfatados (GAGS), como el heparan sulfato y la heparina, con los ácidos ribonucleicos (RNAm, por sus siglas en inglés) y con cadenas de poliglutamato (Goedert et al, 1996; Ginsberg et al, 1998; Friedhoff et al, 1998). Todos estos elementos tienen en común que son polianiones, esto es, moléculas con más de una carga negativa, los cuales se ha propuesto interactúan con las cargas positivas de tau, y específicamente en el caso de la heparina con tres lisinas que le confieren una carga positiva neta de 3 a pH neutral. Esta interacción electrostática probablemente es responsable del ensamblaje de tau con la heparina en agregados insolubles (Pérez et al, 2001). Los marañas neurofibrilares se encuentran enriquecidas tanto en glicosaminoglicanos sulfatados como en RNAm, lo que hace probable su interacción con tau (Goedert, 1996; Ginsberg et al, 1997).

Figura 3. Esquema etiopatológico propuesto para la Enfermedad de Alzheimer que involucra alteraciones bioquímicas de tau, autoensamblaje y formación de filamentos helicoidales.

Funcionamiento Normal



Funcionamiento Patológico



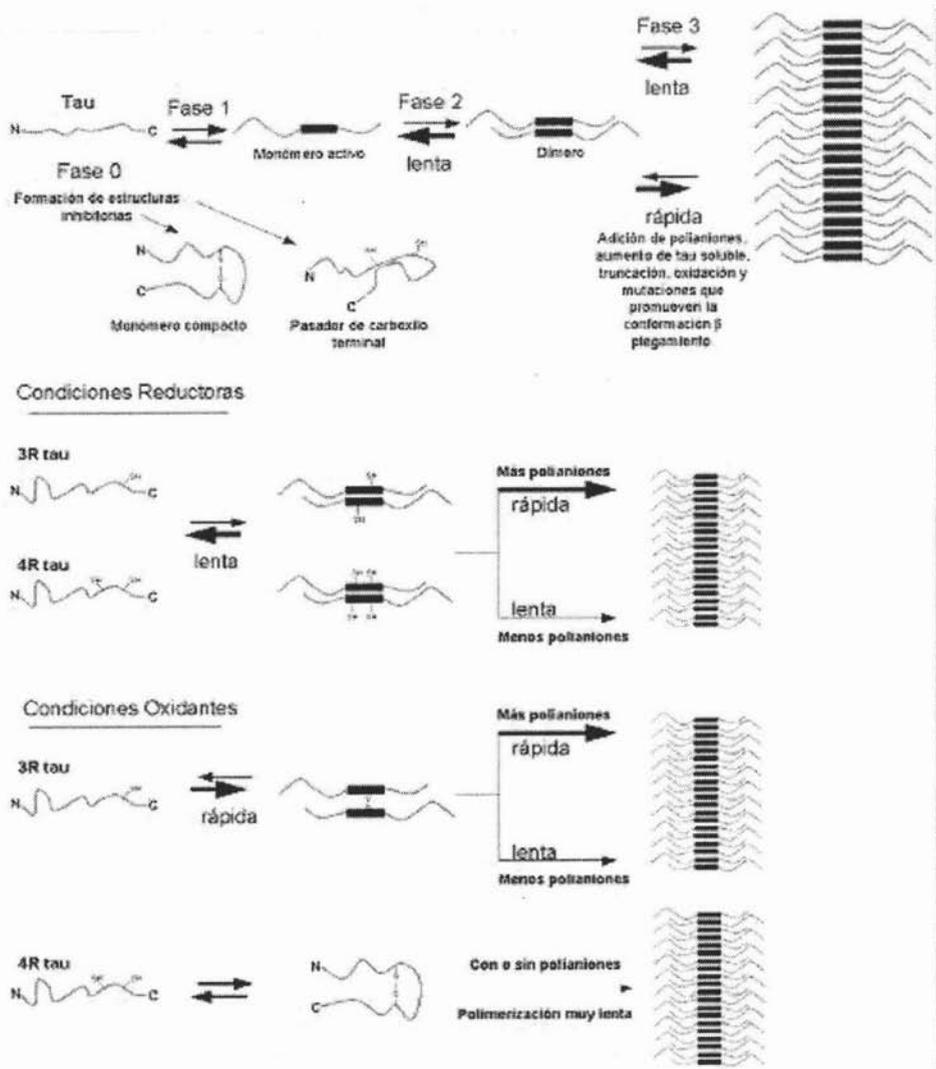
Adicionalmente, se sabe que los GAGS promueven un cambio conformacional y la posterior fosforilación de tau *in vitro* (Paudel y Li, 1999). Se ha postulado que los GAGS llegan a estar en contacto con tau al ser liberados de compartimientos de membrana bajo condiciones patológicas, como el estrés oxidante. Otros componentes de membranas, como los ácidos grasos, también pudieran ser liberados bajo estas condiciones (Pérez et al, 2001).

4.3 Procesos de formación de Agregados Proteínicos.

La cinética de la agregación de tau, así como la de muchas otras proteínas, se lleva a cabo en dos fases: primero en una etapa de formación de semillas de nucleación, y posteriormente una etapa de elongación por la adición de monómeros u oligómeros y la consecuente formación de fibrillas insolubles. De manera más precisa, la primera etapa es la formación de dímeros de tau, los cuales son las unidades mínimas de agregación de los filamentos helicoidales apareados, y que interaccionan entre sí hasta formar una semilla de nucleación, las cuales a su vez sirven como base para la adición de más dímeros en el proceso de elongación. Las fases de dimerización, nucleación y elongación pueden ser relativamente lentas o rápidas, dependiendo de que biomoléculas interaccionen con tau y de las condiciones del medio (ver Figura 4). En general, los polianiones previamente descritos estimulan la formación de dímeros y aceleran la formación de los filamentos helicoidales apareados; aunque con la limitante de que concentraciones muy bajas o muy altas de estos inhiben los procesos de agregación. Adicionalmente, se ha observado que el ácido araquidónico también induce la formación de agregados, presumiblemente mediante la interacción de micelas de este ácido con tau. Estas micelas expondrían en su superficie los grupos carboxilo cargados negativamente, los cuales pueden interaccionar con las cargas positivas de tau, de forma similar a como actúan los polianiones anteriormente descritos.

Por otro lado, las condiciones del medio afectan de manera global a todos los procesos intracelulares, incluyendo los procesos patológicos de agregación. En el caso particular de tau, se ha mostrado que bajo condiciones reductoras la reacción de dimerización es extremadamente lenta, y se requiere la presencia de polianiones para estimular los procesos de nucleación y elongación. Bajo condiciones oxidantes, se ha demostrado que los monómeros de las isoformas 3R de tau forman homodímeros debido a la oxidación y consecuente unión covalente de los grupos sulfidrilo de las cisteínas 322 de los monómeros, y la presencia de polianiones acelera aún más los procesos de agregación. En el caso de las isoformas 4R de tau, ocurre una unión intramolecular disulfuro entre las cisteínas 291 y 322, lo que genera una conformación de tipo monómero compacto, la cual inhibe la agregación. En general, se ha concluido a partir de varios estudios que las condiciones de oxidación son menos importantes cuando están presentes polianiones, y todavía menos relevantes en la presencia de ácidos grasos, como el ácido araquidónico (Friedhoff et al, 1998b; Barghorn y Mandelkow, 2002).

Figura 4. Vías de la agregación de tau.



Adaptado de Barghorn y Mandelkow, 2002.

Es oportuno mencionar que los filamentos helicoidales apareados, tanto los observados en pacientes como los producidos *in vitro*, cuando son generados a partir de isoformas 3R presentan regularmente una apariencia en forma de hélice, mientras que aquellos generados mayoritariamente a partir de isoformas 4R presentan una apariencia lisa y continua, sin torcimientos. Esto probablemente sea ocasionado por que las cinéticas y las vías de ensamblaje de los agregados son distintas, reflejando la gran diversidad de causas de la agregación patológica de tau (Lee et al, 2001).

4.4 Transmisión Sináptica y Neurodegeneración.

La transmisión sináptica es fundamental para el funcionamiento del Sistema Nervioso (SN); sin esta, no hay comunicación neuronal y por lo tanto no habría funciones motoras y cognitivas superiores; de hecho, actualmente se piensa que las funciones cognitivas superiores, incluyendo a la conciencia misma, surgen gracias a la conectividad neuronal, esto es, a que neurona o grupos neuronales se encuentran en contacto con que otra neurona o grupo neuronal, aunada a las propiedades intrínsecas de las neuronas (cuantos y que tipos de canales iónicos presentan) de las distintas zonas del SN.

Por lo tanto, es razonable suponer que alteraciones en la transmisión sináptica puedan interferir o inclusive dañar los procesos cognitivos. Una parte estructural fundamental para que se lleve a cabo adecuadamente la transmisión sináptica son las terminales sinápticas; estas son la parte terminal del axón o de las ramificaciones de los axones; las terminales sinápticas presentan mitocondrias, pero de manera indispensable para su función, también presentan vesículas rellenas con neurotransmisores y neuromoduladores, dependiendo del tipo neuronal específico del que se trate. Por lo tanto, es posible que alteraciones patológicas, ya sea funcionales o estructurales de las terminales nerviosas, inducidas por marañas neurofibrilares de tau, puedan interferir con la actividad normal de las terminales sinápticas. Esto podría provocar al corto plazo simplemente deficiencias en la comunicación interneuronal, pero al largo plazo podría provocar la retracción de las dendritas en la postsinapsis, y la degeneración de las terminales sinápticas en la presinapsis, lo que consecuentemente provocaría la degeneración del axón, y finalmente la muerte celular. Este proceso patológico a lo largo de los años podría provocar los déficits cognitivos observados en la EA.

Ahora bien, ¿qué podría producir la formación de marañas neurofibrilares de tau en sinaptosomas? Esto es, ¿qué mecanismos pueden llegar a inducir el cambio estructural patológico de esta proteína que en última instancia podría estar ocasionando la degeneración de las terminales sinápticas?

Para averiguarlo, se adicionaron a los sinaptosomas distintos fármacos que producen alteraciones en el balance entre los procesos de fosforilación y defosforilación de tau. En particular, se empleó el ácido okadaico, el cual es un potente inhibidor de proteínas fosfatasa 1 y 2A; también se empleó la Proteína β Amiloide, la cual se ha propuesto es capaz de inducir alteraciones en la regulación del metabolismo de calcio, lo que finalmente ocasionaría la hiperfosforilación de tau. La rianodina es un agonista de los canales de calcio del retículo endoplásmico, por lo que su adición también aumenta la concentración de calcio

intracelular, y consecuentemente podría producir también procesos de hiperfosforilación de tau. Por otro parte, también ha sido propuesto que la truncación anormal de tau puede producir su agregación patológica; este efecto podría estar mediado por la actividad de la caspasa 3, una proteína efectora involucrada en la apoptosis. Para observar si esto ocurre así en terminales sinápticas purificadas, también se adicionó el fármaco estaurosporina, es cual es capaz de inducir procesos apoptóticos. Finalmente, también se estudió el efecto de la heparina, anteriormente mencionada, dado que también ha sido propuesto que la heparina y algunos compuestos similares son capaces de inducir la agregación patológica de tau.

II. Hipótesis.

Si las terminales sinápticas son un sitio en donde se puedan producir fenómenos de agregación proteínica, entonces la proteína tau probablemente se agregue en presencia de compuestos que favorezcan su hiperfosforilación.

III. Objetivos General y Particulares.

El objetivo general de este trabajo es demostrar la presencia de tau en terminales nerviosas aisladas y estudiar algunas condiciones que produzcan fosforilación o autoagregación de la proteína asociada a microtúbulos tau.

Objetivos Particulares.

- 1.- Analizar la presencia de tau en terminales nerviosas aisladas por medio de Western-blot y comparar su contenido e isoformas con las que se observan en homogenados totales del cerebro.
- 2.- Localizar tau dentro del compartimiento sinaptosomal por medio de las técnicas de microscopia electrónica de transmisión e inmuno-oro.
- 3.- Estudiar varias modificaciones bioquímicas de tau que producen su hiperfosforilación tales como la inhibición de fosfatasas de proteínas 1 y 2A (ácido okadaico), PBA y alteraciones del calcio interno (rianodina) por medio de Western-blot y utilizando los anticuerpos Tau-1 (que reconoce un epitope no fosforilado), Fosfo-tau (que reconoce al residuo peptídico serina 404 fosforilado) y PHF1 (que reconoce la fosforilación de las serinas 396 y 404 que ocurre en la EA).
- 4.- Estudiar si la estaurosporina induce cambios bioquímicos en tau, mediados por su capacidad proapoptótica y consecuente activación de proteasas de cisteína (caspasas).



intracelular, y consecuentemente podría producir también procesos de hiperfosforilación de tau. Por otro parte, también ha sido propuesto que la truncación anormal de tau puede producir su agregación patológica; este efecto podría estar mediado por la actividad de la caspasa 3, una proteína efectora involucrada en la apoptosis. Para observar si esto ocurre así en terminales sinápticas purificadas, también se adicionó el fármaco estaurosporina, es cual es capaz de inducir procesos apoptóticos. Finalmente, también se estudió el efecto de la heparina, anteriormente mencionada, dado que también ha sido propuesto que la heparina y algunos compuestos similares son capaces de inducir la agregación patológica de tau.

II. Hipótesis.

Si las terminales sinápticas son un sitio en donde se puedan producir fenómenos de agregación proteínica, entonces la proteína tau probablemente se agregue en presencia de compuestos que favorezcan su hiperfosforilación.

III. Objetivos General y Particulares.

El objetivo general de este trabajo es demostrar la presencia de tau en terminales nerviosas aisladas y estudiar algunas condiciones que produzcan fosforilación o autoagregación de la proteína asociada a microtúbulos tau.

Objetivos Particulares.

- 1.- Analizar la presencia de tau en terminales nerviosas aisladas por medio de Western-blot y comparar su contenido e isoformas con las que se observan en homogenados totales del cerebro.
- 2.- Localizar tau dentro del compartimiento sinaptosomal por medio de las técnicas de microscopia electrónica de transmisión e inmuno-oro.
- 3.- Estudiar varias modificaciones bioquímicas de tau que producen su hiperfosforilación tales como la inhibición de fosfatasa de proteínas 1 y 2A (ácido okadaico), P₃A y alteraciones del calcio interno (rianodina) por medio de Western-blot y utilizando los anticuerpos Tau-1 (que reconoce un epitope no fosforilado), Fosfo-tau (que reconoce al residuo peptídico serina 404 fosforilado) y PHF1 (que reconoce la fosforilación de las serinas 396 y 404 que ocurre en la EA).
- 4.- Estudiar si la estaurosporina induce cambios bioquímicos en tau, mediados por su capacidad proapoptótica y consecuente activación de proteasas de cisteína (caspasas).



5.- Estudiar por medio de Western-blot si en condiciones de heparina intrasinaptosomal se favorece la formación de agregados de monómeros de tau.

IV. Materiales y Métodos.

Compuestos Empleados y Animales Experimentales.

1. Ácido Okadaico.

El ácido okadaico es una toxina insoluble en agua de tipo poliéter producida por *Hallicondria okadaei*, un dinoflagelado unicelular fotosintético, que junto con otras toxinas relacionadas ha sido implicado en los envenenamientos por mariscos tóxicos, comúnmente llamados "envenenamiento por ciguatera" o simplemente "ciguatera". Esta toxina es un potente inhibidor de las proteínas fosfatasa 1 y 2A y un promotor tumoral, entre otros efectos reportados. Su fórmula molecular es $C_{44}H_{68}O_{13}$ y su peso molecular es de 805.0 (base de datos de la librería técnica de Sigma Aldrich).

2. Proteína β Amiloide.

En este estudio se utilizó el fragmento 25 - 35 de la P β A, el cual es el dominio funcional de este péptido requerido para los efectos tanto neurotróficos como neurotóxicos. Su secuencia de aminoácidos es Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met, su peso molecular es de 1060 y su fórmula molecular es $C_{45}H_{81}N_{13}O_{14}S$ (base de datos de la librería técnica de Sigma Aldrich). Como ya se mencionó anteriormente la P β A agregada insoluble forma las placas amiloides en la EA y todavía no se conoce el mecanismo preciso que relacione a la P β A con la hiperfosforilación de tau.

3. Rianodina.

La rianodina, también conocida como Ryanodol 3-(1H-pyrrol-2-carboxylato), es un metabolito secundario de *Ryanania speciosa*. Este compuesto tiene un peso molecular de 494.6 y su fórmula molecular es $C_{25}H_{36}NO_9$; es soluble en DMSO y en etanol (base de datos de la librería técnica de Sigma Aldrich). La rianodina regula los niveles intracelulares de calcio por medio de canales de calcio unidos a receptores localizados tanto en el retículo sarcoplásmico de las células musculares estriadas y cardíacas como en retículo endoplásmico de neuronas, hepatocitos y otros tipos celulares. El calcio liberado al medio intracelular regula la excitación y la contracción muscular. Asimismo, receptores a rianodina localizados en las terminales nerviosas presinápticas posiblemente regulen la liberación de neurotransmisores. La liberación de calcio de pozas intracelulares se activa a concentraciones de rianodina de 10 a 100 nM, y se bloquea a concentraciones altas (alrededor de 10 μ M).

4. Estaurosporina.

La estaurosporina es un metabolito secundario que se obtiene del hongo *Streptomyces sp.*, cuya fórmula molecular es $C_{28}H_{26}N_4O_3$ y su peso molecular es

5.- Estudiar por medio de Western-blot si en condiciones de heparina intrasinaptosomal se favorece la formación de agregados de monómeros de tau.

IV. Materiales y Métodos.

Compuestos Empleados y Animales Experimentales.

1. Ácido Okadaico.

El ácido okadaico es una toxina insoluble en agua de tipo poliéter producida por *Hallicondria okadai*, un dinoflagelado unicelular fotosintético, que junto con otras toxinas relacionadas ha sido implicado en los envenenamientos por mariscos tóxicos, comúnmente llamados "envenenamiento por ciguatera" o simplemente "ciguatera". Esta toxina es un potente inhibidor de las proteínas fosfatasa 1 y 2A y un promotor tumoral, entre otros efectos reportados. Su fórmula molecular es $C_{44}H_{68}O_{13}$ y su peso molecular es de 805.0 (base de datos de la librería técnica de Sigma Aldrich).

2. Proteína β Amiloide.

En este estudio se utilizó el fragmento 25 - 35 de la P β A, el cual es el dominio funcional de este péptido requerido para los efectos tanto neurotróficos como neurotóxicos. Su secuencia de aminoácidos es Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met, su peso molecular es de 1060 y su fórmula molecular es $C_{45}H_{81}N_{13}O_{14}S$ (base de datos de la librería técnica de Sigma Aldrich). Como ya se mencionó anteriormente la P β A agregada insoluble forma las placas amiloideas en la EA y todavía no se conoce el mecanismo preciso que relacione a la P β A con la hiperfosforilación de tau.

3. Rianodina.

La rianodina, también conocida como Ryanodol 3-(1H-pyrrol-2-carboxylato), es un metabolito secundario de *Ryanania speciosa*. Este compuesto tiene un peso molecular de 494.6 y su fórmula molecular es $C_{25}H_{36}NO_9$; es soluble en DMSO y en etanol (base de datos de la librería técnica de Sigma Aldrich). La rianodina regula los niveles intracelulares de calcio por medio de canales de calcio unidos a receptores localizados tanto en el retículo sarcoplásmico de las células musculares estriadas y cardíacas como en retículo endoplásmico de neuronas, hepatocitos y otros tipos celulares. El calcio liberado al medio intracelular regula la excitación y la contracción muscular. Asimismo, receptores a rianodina localizados en las terminales nerviosas presinápticas posiblemente regulen la liberación de neurotransmisores. La liberación de calcio de pozas intracelulares se activa a concentraciones de rianodina de 10 a 100 nM, y se bloquea a concentraciones altas (alrededor de 10 μ M).

4. Estaurosporina.

La estaurosporina es un metabolito secundario que se obtiene del hongo *Streptomyces sp.*, cuya fórmula molecular es $C_{28}H_{26}N_4O_3$ y su peso molecular es

466.5. Presenta un color amarillo pálido y es soluble en DMSO, metanol y etanol, pero insoluble en agua (base de datos de la librería técnica de Sigma Aldrich). Se ha reportado que es un potente inhibidor de la cinasa de proteínas dependientes de fosfolípidos/calcio, y que también inhibe la regulación positiva de la expresión de VEGF en células tumorales. Entre otros efectos relevantes reportados, se ha demostrado que la estaurosporina es capaz de inducir la formación de neuritas en distintas células neuronales como las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, las células PC12 o las células de neuroblastoma de la línea SH-SY5Y. Sin embargo, la estaurosporina también ha sido caracterizada extensivamente como un poderoso inductor de la apoptosis en distintos tipos celulares, tales como el neuroblastoma humano y neuronas de distintas especies animales. En resumen, la estaurosporina induce la formación de neuritas en concentraciones de hasta 50 nM, pero si se aumenta la concentración el efecto es de muerte celular por un proceso clásico apoptótico (Yuste, 2002).

5. Heparina.

La heparina es un polímero clasificado como un mucopolisacárido o como un glucosaminoglicano. Se biosintetiza y se almacena en mastocitos de varios tejidos de mamífero, en particular hígado, pulmón y la mucosa. La heparina ha sido usada por años como anticoagulante, promoviendo un aumento de actividad de la antitrombina III. La heparina también es un componente de la lámina basal de la matriz extracelular. La estructura de la heparina está formada por monómeros de disacáridos que consisten en 1,4-L-ácido hialurónico y por D-glucosamina. Los residuos de ácido hialurónico están O-sulfatados en la posición 2, y los residuos glucosamina están N-sulfatados y O-sulfatados en la posición 6. La heparina es una mezcla de cadenas polianiónicas en un rango relativamente amplio de pesos moleculares. A pesar de que puede tener tan poca masa como 6 y tanta como 30 KDa, la heparina empleada en este trabajo (H-9399) presenta la mayoría de sus cadenas entre 17 y 19 KDa. Esta heparina en realidad es heparina de sodio, la sal del ácido heparínico, el cual es inestable (base de datos de la librería técnica de Sigma Aldrich).

6. Anticuerpos.

Se emplearon los siguientes tres anticuerpos primarios: anti tau-1, un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce a tau independientemente de su estado de fosforilación, anti P-tau, un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce al residuo peptídico serina 404 fosforilado, y anti PHF-1, un anticuerpo monoclonal que reconoce la fosforilación de las serinas 396 y 404 de tau que se observa en la EA. Se utilizaron anticuerpos secundarios policlonales de caballo para tau-1 y de cabra para fosfotau y PHF-1. Todos los anticuerpos fueron obtenidos de la compañía Chemicon, excepto el PHF-1 que fue donado por el Dr. Peter Davies.

7. Animales Experimentales.

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) de 250 ± 10 gr de peso, las cuales tuvieron libre acceso a comida y agua y fueron mantenidas en un ciclo de luz - oscuridad de 12 horas.

Técnicas.

1. Purificación de Sinaptosomas.

Para purificar los sinaptosomas (la fracción sinaptosomal) se siguió la siguiente técnica descrita por Löscher y colegas (1985). La rata fue decapitada, la piel de la cabeza fue separada y posteriormente el cráneo fue abierto mediante cuatro cortes: Uno a nivel maxilar superior, dos al nivel paralelo inferior del arco zigomático y otro siguiendo el bregma a lo largo de los huesos occipitales y parietales. Se extrajo el cerebro y se depositó en PBS (un amortiguador de pH de fosfatos). Como el objetivo es trabajar con la capa cerebral correspondiente a la neocorteza, se separaron los bulbos olfatorios, el hipocampo, el cerebelo y el tallo cerebral, y se cortaron las fibras de mielina y el cuerpo calloso dejando solo la neocorteza. Esta fue depositada en 3 ml de Sacarosa 320 mM y homogenizada usando un pistilo acoplado a un taladro con 6 episodios de alta velocidad de homogenizado en un minuto. El tubo donde se homogenizó fue lavado con 1 ml de Sacarosa 320 Mm y la solución obtenida se agregó al homogenizado de neocortezas en 3 ml para un volumen total de 4 ml. Todo el procedimiento anterior fue llevado a cabo a una temperatura de 4°C. A continuación se centrifugó a 4500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C, de donde se tomó el sobrenadante, el cual se colocó sobre un mililitro de Sacarosa 1.2 M. Luego se centrifugó a 50,000 r.p.m. durante 16 minutos a 4°C. A continuación se tomó la interfase que se forma entre las dos concentraciones de sacarosas y se llevó a 2 ml con sacarosa 0.32 M, y posteriormente fue cuidadosamente resuspendida. Luego se colocó sobre 1 ml de sacarosa 0.8 M, y se centrifugó nuevamente a 50,000 r.p.m. durante 16 minutos a 4° C. Se desechó el sobrenadante y el pellet constituye la fracción sinaptosomal. Esta fracción sinaptosomal fue cuidadosamente resuspendida en 1.5 ml de Buffer de Locke, y colocada en tubos plásticos en alícuotas de 200 µl.

A las alícuotas de sinaptosomas se les adicionaron las drogas de interés si se trataba de una condición experimental, o alternativamente, nada fue adicionado si se trataba de una condición control. Todas las muestras fueron resuspendidas brevemente (5 segundos) en el vortex. Luego se incubaron durante 3 horas a 37°C. Para los experimentos con heparina, se adicionó 1 mM de Heparina al medio de homogenización (Raiteri et al, 2000), con el fin de internalizar este compuesto durante el proceso de extracción y purificación de los sinaptosomas. Posterior a la incubación se centrifugaron los sinaptosomas a 10,000 r.p.m. durante dos minutos y medio a temperatura ambiente. El sobrenadante fue desechado y los sinaptosomas cuidadosamente resuspendidos en 50 µl de buffer de lisis y guardados en congelación para su uso posterior.

2. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry (modificado).

Se resuspendieron en el vortex los sinaptosomas por duplicado de cada condición, se tomaron alícuotas de 5 µl, y se les agregaron 15 µl de agua bidestilada. Después se agregaron 100 µl de solución A y a continuación y durante agitación continua en el vortex se le agregaron 800 µl de la solución B. Para establecer la concentración de proteínas se usaron como estándares alícuotas de 20 µl a una concentración de 1 µg/µl de albúmina a las cuales también se les

adicionaron 100 microlitros de solución A' y también en agitación continua 800 µl de solución B. Después de 15 minutos se midió la absorbancia de las muestras a 750 nanómetros de longitud de onda, y se promediaron los duplicados.

3. Electroforesis e Inmunomarcaje.

Para separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular, se utilizó la técnica de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida usando como agente desnaturizante Sulfato Dodecil de Sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). El protocolo consiste en lo siguiente: las muestras se resuspendieron en el vortex, se hirvieron en baño María con SDS al doble del volumen de las muestras durante 3 minutos y a continuación se colocaron 10 µg de proteína sinaptosomal en cada carril del gel concentrador. En un carril aparte se colocaron 5 µl de proteína estándar (Caleidoscópico, Sigma). Se realizó la electroforesis en geles de acrilamida al 8.5% y se utilizó una corriente de 25 mA durante 1 hora y 15 minutos aproximadamente. Los geles y las membranas de nitrocelulosa fueron equilibrados en buffer de transferencia durante 15 minutos y posteriormente las proteínas fueron transferidas a las membranas con una intensidad de corriente de 200 a 250 mA durante 3 horas aproximadamente. Posteriormente la membrana fue bloqueada por lo menos dos horas en refrigeración con BSA al 5% en PBS o alternativamente con leche en polvo descremada al 5% en PBS.

Después fue lavada con PBS durante cinco minutos, tres veces. Acto seguido se adicionó el anticuerpo primario durante 24 h en refrigeración a la concentración adecuada dependiendo del experimento en particular, diluido en BSA al 5% en PBS o alternativamente con leche descremada al 5% en PBS más 0.1% de Tween 20. Sobre la membrana se colocó una lámina de parafilm y una tapa de tubo rellena con agua para evitar la deshidratación (técnica de cámara húmeda). Después se lavó con PBS tres veces, por cinco minutos cada vez. A continuación se adicionó el anticuerpo secundario a la concentración adecuada dependiendo del experimento en particular, durante dos horas a temperatura ambiente, y se repitió la técnica de cámara húmeda arriba descrita. Después se lavó 3 veces con PBS durante cinco minutos. Posteriormente se adicionó la biotina y toda la cámara se mantuvo en agitación de 40 a 60 minutos; la biotina se preparó media hora antes de ser usada. Después se lavó con PBS durante cinco minutos por tres veces.

Finalmente se reveló la membrana con diaminobenzidina o con la técnica de Quimioluminiscencia Aumentada (ECL, por sus siglas en inglés). En el primer caso se adicionó directamente la mezcla de tris-HCl Ph 7.2 y diaminobenzidina como sustrato. En la segunda técnica se agregaron cantidades iguales de las soluciones para quimioluminiscencia (ver Abreviaturas y Soluciones Empleadas) y se mantuvieron en agitación durante 1 minuto; luego en condiciones de luz roja fue secada con cuidado la membrana por la parte inferior de la misma y fue colocada en la cámara de revelado junto con una placa fotográfica. Se reveló el tiempo adecuado (de un minuto a una hora, dependiendo del experimento) y a continuación la placa fotográfica fue sumergida en las soluciones reveladora, agua y fijadora, en ese orden.



4. Microscopia Electrónica.

Se obtuvieron sinaptosomas resuspendidos en Buffer de Locke y se procesaron a través de la técnica de fijación por cacodilatos. Posteriormente se bloquearon las rejillas en donde se colocan los cortes de los sinaptosomas con leche en polvo sin calcio al 5% en PBS (centrifugada una vez a 13,000 revoluciones por minuto y tomada del sobrenadante) durante cinco minutos, e inmediatamente después se adicionó el anticuerpo primario a los cortes en las rejillas durante 24 horas. Luego se adicionó el anticuerpo secundario durante dos horas y finalmente se fijaron las muestras para su análisis visual en el microscopio electrónico. Se usó un microscopio electrónico JEOL. Los anticuerpos empleados fueron: anticuerpos primarios, anti tau-1 y PHF-1. Los anticuerpos secundarios están acoplados a partículas de oro de 12 nanómetros de diámetro.

V. Resultados.

De acuerdo con los objetivos general y particulares, para conocer si los sinaptosomas son un sitio donde se pueden llevar a cabo procesos de hiperfosforilación y agregación patológica de la proteína tau, lo primero es saber si esta proteína existe en las terminales sinápticas aisladas. Consecuentemente, se realizó un inmunoblot (Figura 5) tanto de la fracción sinaptosomal (el pellet que contiene a la mayoría de los sinaptosomas) como de distintas fracciones: del homogenado total de la corteza, de la fracción mitocondrial cruda (la fracción que queda en la parte superior de la interfase en el segundo ciclo de centrifugación a 50,000 rpm) y de la fracción soluble (el sobrenadante de la fracción sinaptosomal). El blot muestra que existe muy poca proteína en la fracción mitocondrial cruda, y que la mayoría de la proteína se concentra en las fracciones solubles y sinaptosomales. Por lo tanto, la MAP tau existe en los sinaptosomas. En el recuadro negro indicado por la flecha se muestran varias bandas que corresponden a las isoformas de la proteína tau antes mencionadas (en rata, aparentemente hay solamente cuatro isoformas). Es de notar que una gran cantidad de esta proteína aparece en la fracción soluble, y presumiblemente corresponde a la tau liberada de los axones durante el proceso de centrifugación. La tau observada en la fracción mitocondrial cruda muy probablemente procede también de los microtúbulos axonales, liberada asimismo durante el proceso de centrifugación. Todos los inmunoblots son representativos de tres a seis experimentos para cada condición, y en todos los casos se indica el peso molecular de las bandas a los lados de los mismos.

A continuación, se estudió el efecto de varios compuestos que promueven la hiperfosforilación de tau (Figura 6a). Específicamente, se adicionó ácido okadaico a una concentración de 500 nM, rianodina a una concentración de 100 nM, la secuencia 25-35 de la P β A a una concentración de 10 μ M y para saber si existen efectos sinérgicos se adicionó tanto rianodina como P β A a las concentraciones arriba mencionadas.

4. Microscopia Electrónica.

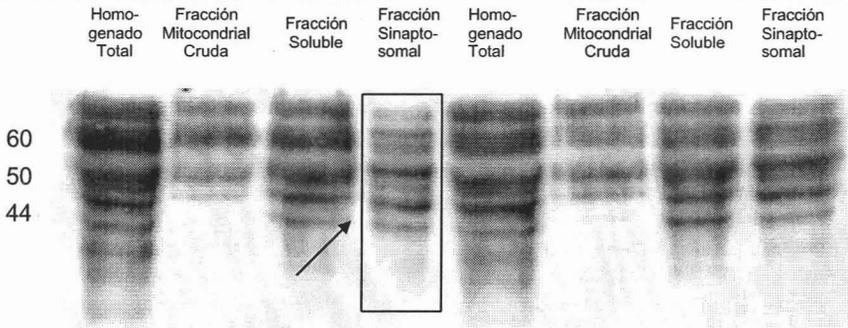
Se obtuvieron sinaptosomas resuspendidos en Buffer de Locke y se procesaron a través de la técnica de fijación por cacodilatos. Posteriormente se bloquearon las rejillas en donde se colocan los cortes de los sinaptosomas con leche en polvo sin calcio al 5% en PBS (centrifugada una vez a 13,000 revoluciones por minuto y tomada del sobrenadante) durante cinco minutos, e inmediatamente después se adicionó el anticuerpo primario a los cortes en las rejillas durante 24 horas. Luego se adicionó el anticuerpo secundario durante dos horas y finalmente se fijaron las muestras para su análisis visual en el microscopio electrónico. Se usó un microscopio electrónico JEOL. Los anticuerpos empleados fueron: anticuerpos primarios, anti tau-1 y PHF-1. Los anticuerpos secundarios están acoplados a partículas de oro de 12 nanómetros de diámetro.

V. Resultados.

De acuerdo con los objetivos general y particulares, para conocer si los sinaptosomas son un sitio donde se pueden llevar a cabo procesos de hiperfosforilación y agregación patológica de la proteína tau, lo primero es saber si esta proteína existe en las terminales sinápticas aisladas. Consecuentemente, se realizó un inmunoblot (Figura 5) tanto de la fracción sinaptosomal (el pellet que contiene a la mayoría de los sinaptosomas) como de distintas fracciones: del homogenado total de la corteza, de la fracción mitocondrial cruda (la fracción que queda en la parte superior de la interfase en el segundo ciclo de centrifugación a 50,000 rpm) y de la fracción soluble (el sobrenadante de la fracción sinaptosomal). El blot muestra que existe muy poca proteína en la fracción mitocondrial cruda, y que la mayoría de la proteína se concentra en las fracciones solubles y sinaptosomales. Por lo tanto, la MAP tau existe en los sinaptosomas. En el recuadro negro indicado por la flecha se muestran varias bandas que corresponden a las isoformas de la proteína tau antes mencionadas (en rata, aparentemente hay solamente cuatro isoformas). Es de notar que una gran cantidad de esta proteína aparece en la fracción soluble, y presumiblemente corresponde a la tau liberada de los axones durante el proceso de centrifugación. La tau observada en la fracción mitocondrial cruda muy probablemente procede también de los microtúbulos axonales, liberada asimismo durante el proceso de centrifugación. Todos los inmunoblots son representativos de tres a seis experimentos para cada condición, y en todos los casos se indica el peso molecular de las bandas a los lados de los mismos.

A continuación, se estudió el efecto de varios compuestos que promueven la hiperfosforilación de tau (Figura 6a). Específicamente, se adicionó ácido okadaico a una concentración de 500 nM, rianodina a una concentración de 100 nM, la secuencia 25-35 de la P β A a una concentración de 10 μ M y para saber si existen efectos sinérgicos se adicionó tanto rianodina como P β A a las concentraciones arriba mencionadas.

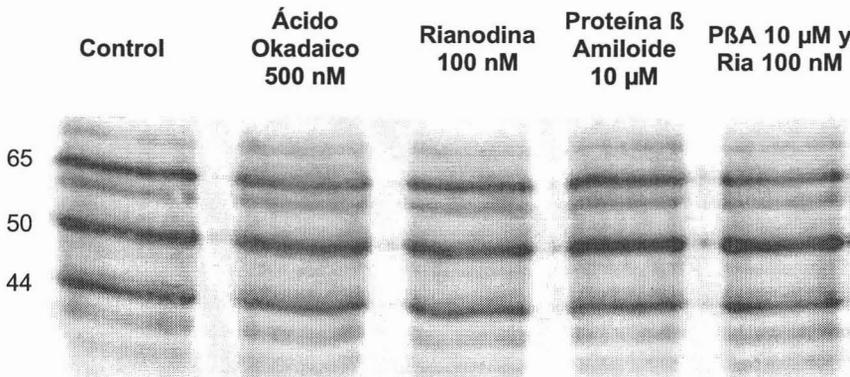
Figura 5. Existencia de tau en sinaptosomas y sus cantidades relativas en las distintas etapas de centrifugación.



Immunoblot. Los primeros cuatro carriles corresponden a una rata y los siguientes cuatro carriles corresponden a otra rata. Anticuerpo usado: tau-1; concentración 1:1000.

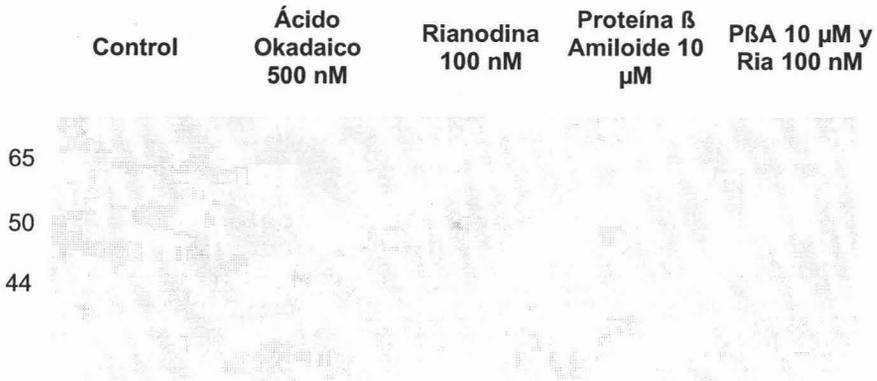
Prácticamente no hubo corrimiento electroforético de las bandas entre los distintos tratamientos y la condición control, lo que indica que en sinaptosomas tanto el tiempo como las concentraciones de las drogas empleadas no son suficientes para provocar procesos de fosforilación o hiperfosforilación anormal de tau.

Figura 6a. Alteraciones bioquímicas de tau en presencia de varias drogas que promueven su hiperfosforilación.



Immunoblot. Anticuerpo usado: tau-1; concentración 1:1000.

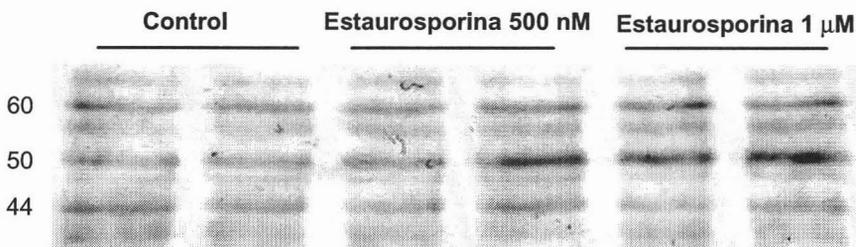
Figura 6b. Alteraciones bioquímicas de tau en presencia de varias drogas que promueven su hiperfosforilación medido a través de un anticuerpo fosforilación dependiente.



Immunoblot. Anticuerpo usado: fosfotau (serina fosforilada 404); concentración 1:500.

Como las drogas adicionadas teóricamente promueven la fosforilación y la hiperfosforilación de tau, se realizó un inmunoblot adicionando las mismas drogas que en el inmunoblot anterior, pero a diferencia de este se utilizó el anticuerpo primario fosfotau, el cual como ya se mencionó reconoce un epítipo de tau fosforilado en la serina 404, y por lo tanto se tendría que observar una mayor inmunoreactividad en las condiciones en las cuales se adicionaron las drogas. Sin embargo, esto no ocurrió así (Figura 6b) y el anticuerpo no reconoció ninguna banda que correspondiera a tau.

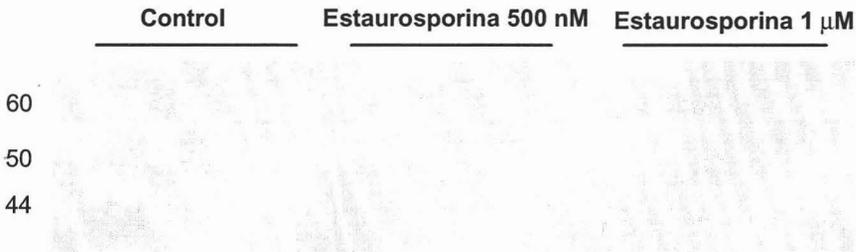
Figura 7a. Alteraciones bioquímicas de tau en presencia de Estaurosporina.



Immunoblot. Anticuerpo usado: tau-1; concentración 1:1000.

Otro compuesto que podría provocar alteraciones patológicas en la tau es la estaurosporina, por su capacidad de inducir la activación de proteasas de tipo caspasas. Este compuesto se adicionó a los sinaptosomas en dos concentraciones: 500 nM y 1 μ M. Nuevamente, hay un ligero corrimiento electroforético, en particular a la concentración de 1 μ M, que sin embargo no refleja procesos significativos de hiperfosforilación, proteólisis o agregación de tau (Figura 7a).

Figura 7b. Alteraciones bioquímicas de tau en presencia de Estaurosporina medido a través de un anticuerpo fosforilación dependiente.

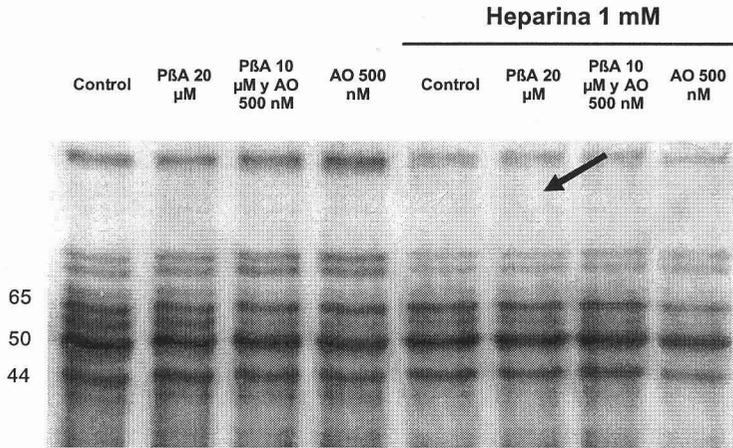


Inmunoblot. Anticuerpo usado: fosfotau (serina fosforilada 404); concentración 1:500.

Posteriormente, se realizó un inmunoblot bajo las mismas condiciones experimentales que las mostradas en la Figura 7a, pero en esta ocasión fue utilizado nuevamente el anticuerpo primario P-tau (Figura 7b), el cual al igual que en las condiciones mostradas en la Figura 7 no mostró marcaje alguno,

En una segunda serie de experimentos, y basándose en el trabajo de Goedert y colaboradores (1996), se incubaron sinaptosomas en presencia del glicosaminoglicano sulfatado heparina, además de algunos de los compuestos anteriormente empleados que promueven la fosforilación anormal y la hiperfosforilación de tau (Figuras 8a y 8b). En particular, los sinaptosomas fueron incubados con la secuencia 25-35 de la P β A a una concentración de 20 μ M, ácido okadaico a una concentración de 500 nM, y finalmente tanto ácido okadaico como P β A a las concentraciones arriba mencionadas; esto se realizó tanto en ausencia como en presencia de heparina a una concentración externa de homogenización de 1 mM, que de manera aproximada corresponde a una concentración dentro de los sinaptosomas de 50 μ M, de acuerdo a Raiteri y colaboradores (2000).

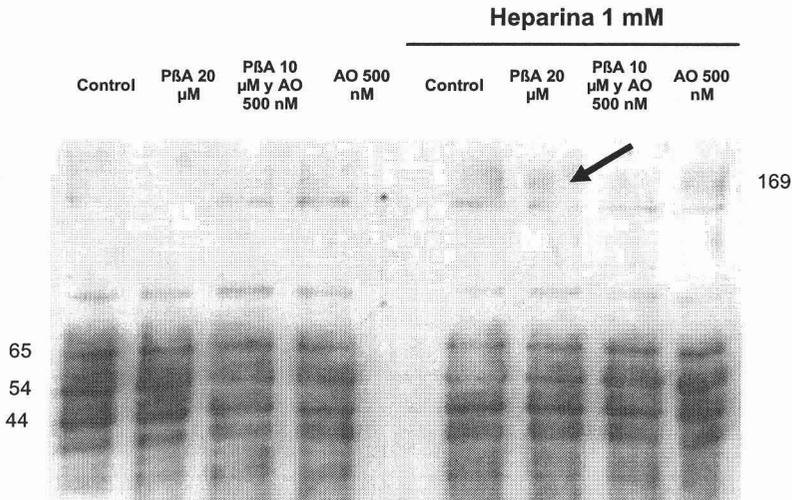
Figura 8a. Alteraciones bioquímicas de tau en presencia de heparina y de varias drogas que promueven su hiperfosforilación y su agregación.



Inmunoblot. Anticuerpo usado: tau-1; concentración 1:1000.

Las flechas indican posibles agregados (dímeros y trímeros) de tau.

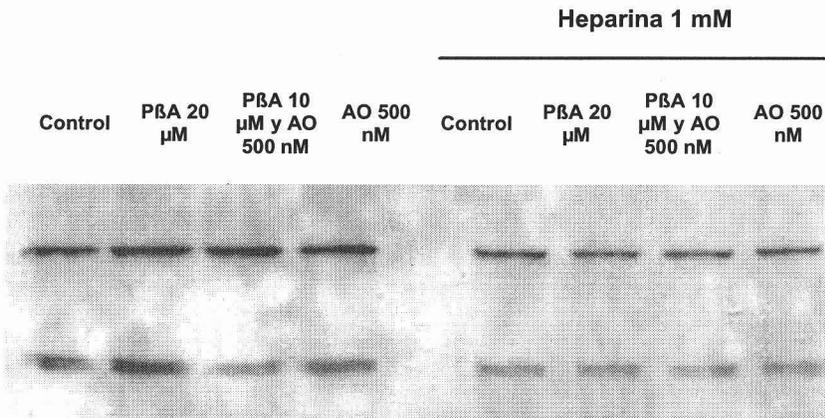
Figura 8b. Alteraciones bioquímicas de tau en presencia de heparina y de varias drogas que promueven su hiperfosforilación y su agregación.



Inmunoblot. Anticuerpo usado: tau-1; concentración 1:1000.

Ante la posibilidad de que el tratamiento conjunto de heparina y P&A fuera suficiente para causar la adquisición de una conformación patológica característica de la EA, se realizaron experimentos bajo las mismas condiciones que el ilustrado en la figuras 8a y 8b, pero en esta ocasión fueron incubados con el anticuerpo primario PHF-1, el cual como se mencionó en materiales y métodos es un anticuerpo monoclonal que reconoce la fosforilación de las serinas 396 y 404 de tau (Figura 8c). Sin embargo, exceptuando un marcaje inespecífico causado por el anticuerpo secundario, no hubo unión entre el anticuerpo y tau, lo que indica que o los tiempos o las concentraciones o la cantidad basal de tau no fueron suficientes para producir la hiperfosforilación de tau en este epítipo en particular, el cual corresponde a una tau altamente modificada patológicamente.

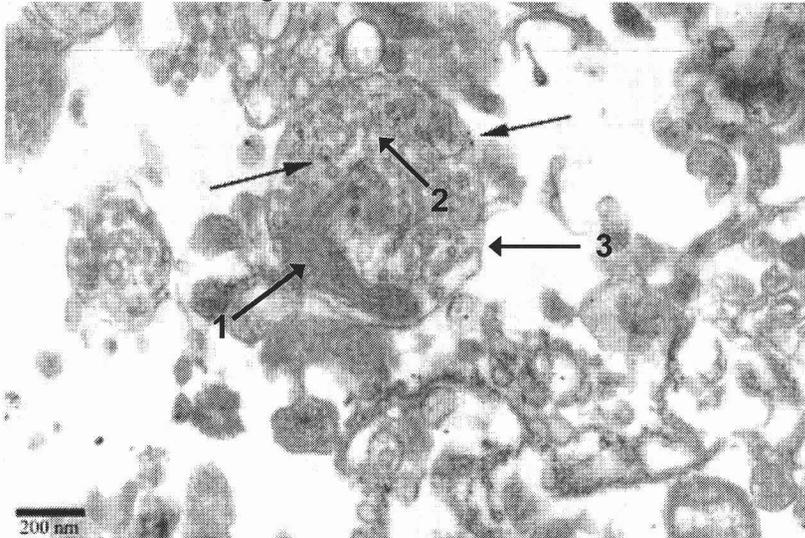
Figura 8c. Alteraciones bioquímicas de tau en presencia de heparina y de varias drogas que promueven su hiperfosforilación y su agregación medido a través de un anticuerpo fosforilación dependiente.



Inmunoblot. Anticuerpo usado: PHF-1 (serinas fosforiladas 396 y 404); concentración 1:1000.

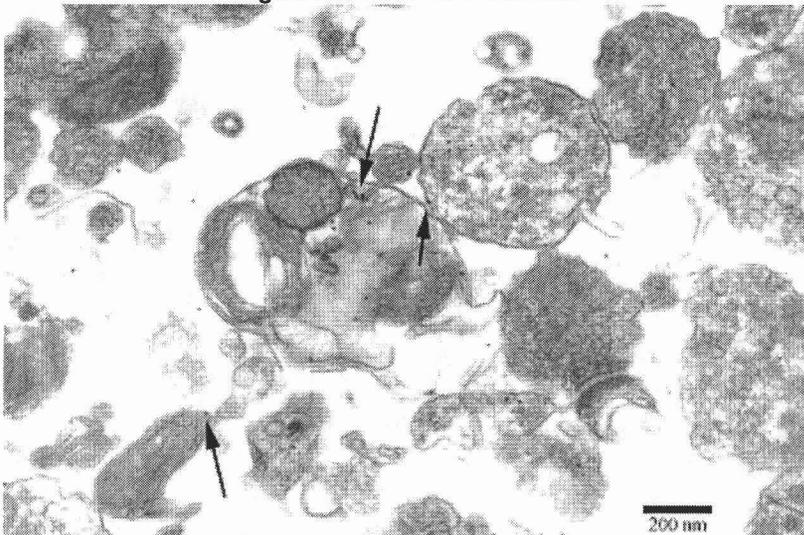
Uno de los objetivos de este trabajo es estudiar cual es la localización de tau dentro de los sinaptosomas; para poder llevar a cabo esto, se realizaron varios experimentos usando la técnica de inmuno-oro y microscopia electrónica. Para tal fin, terminales sinápticas de rata fueron incubadas en presencia de las drogas que promueven la hiperfosforilación de tau usadas en los experimentos anteriores. En las figuras 9a y 9b se incubaron sinaptosomas durante 3 horas en ausencia de drogas y después fueron procesados usando la técnica de cacodilatos para microscopia electrónica; las muestras resultantes fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-tau1 fosforilación independiente usado anteriormente, y posteriormente con un anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro de 12 nanómetros de diámetro.

Figura 9a. Condición Control.



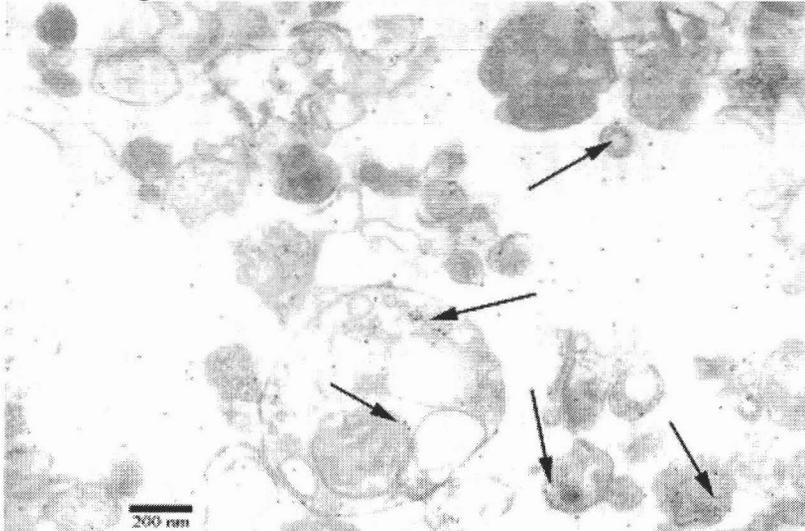
Sinaptosomas incubados durante tres horas en ausencia de compuestos. Anticuerpo Primario: Tau
1. Microfotografía electrónica. 30,000 x. Selección Representativa.

Figura 9b. Condición Control.



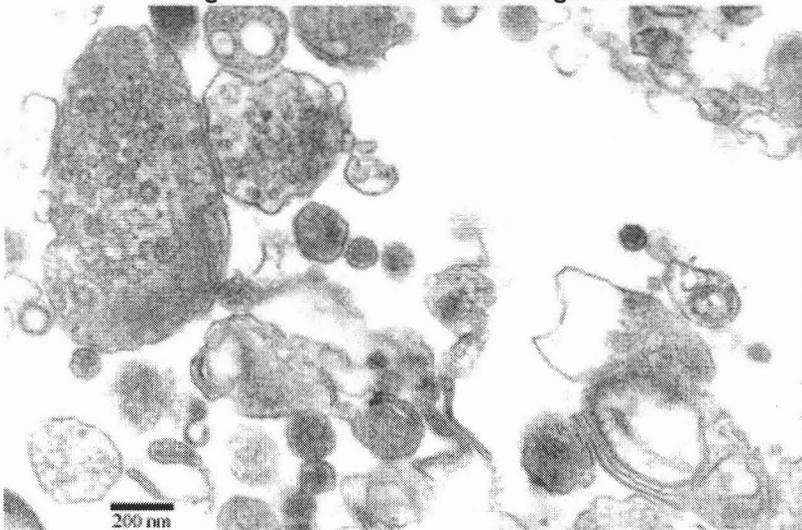
Sinaptosomas incubados durante tres horas en ausencia de compuestos. Anticuerpo Primario: Tau
1. Microfotografía electrónica. 30,000 x. Selección Representativa.

Figura 10. Incubación con Ácido Okadaico 500 nM.



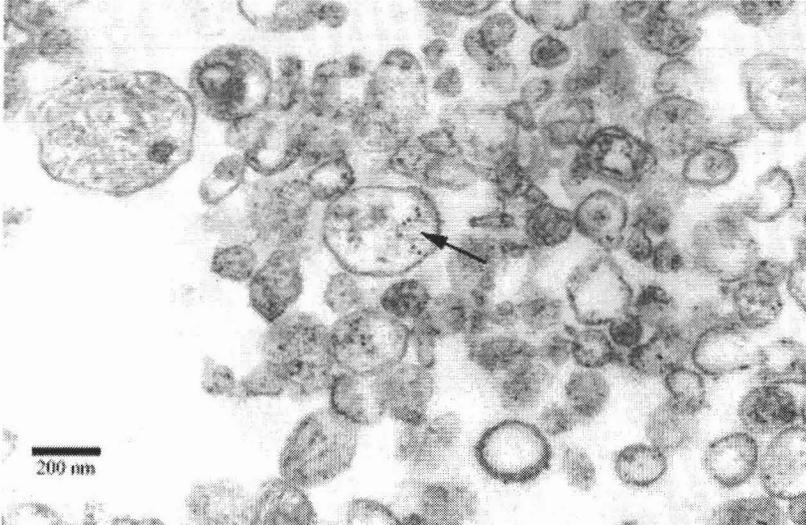
Sinaptosomas incubados durante tres horas con Ácido Okadaico 500 nM. Anticuerpo Primario: Tau 1. Microfotografía electrónica. 30,000 x. Selección Representativa.

Figura 11. Condición Control Negativo.



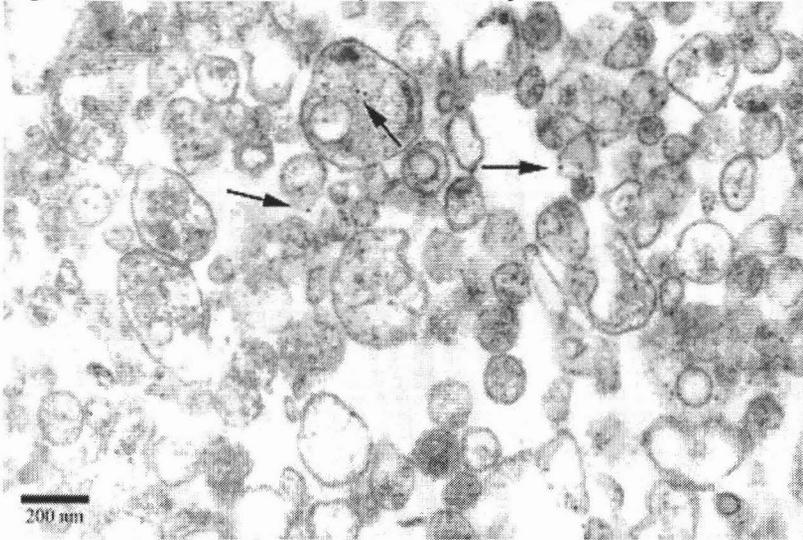
Sinaptosomas incubados durante tres horas en ausencia de anticuerpo primario. Microfotografía electrónica. 25,000 x. Selección Representativa.

Figura 12a. Incubación con Heparina 1 mM y Ácido Okadaico 500 nM.



Sinaptosomas incubados durante ocho horas en presencia de Heparina 1 mM y Ácido Okadaico 500 nM. Anticuerpo Primario: PHF-1. Microfotografía electrónica. 30,000 x. Selección Representativa.

Figura 12b. Incubación con Heparina 1 mM y Ácido Okadaico 500 nM.



Sinaptosomas incubados durante ocho horas en presencia de Heparina 1 mM y Ácido Okadaico 500 nM. Anticuerpo Primario: PHF-1. Microfotografía electrónica. 30,000 x. Selección Representativa.

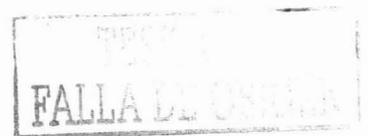
Todas las microfotografías electrónicas son selecciones representativas. Las flechas indican zonas donde hay mayor densidad de partículas de oro asociadas a membranas. En las microfotografías electrónicas se pueden apreciar sinaptosomas, esto es, terminales sinápticas aisladas, las cuales contienen mitocondrias (flecha marcada con un número uno), vesículas con neurotransmisores (flecha marcada con un número dos), y membrana sinaptosomal (flecha marcada con un número tres de la Figura 9a).

Subsecuentemente, se incubaron los sinaptosomas durante tres horas con ácido okadaico a una concentración de 500 nM (Figura 10). En la figura 11 se muestra una selección representativa de terminales sinápticas incubadas durante tres horas en ausencia de anticuerpo primario. Para finalizar, se incubaron sinaptosomas durante ocho horas en presencia de heparina a una concentración externa de homogenización de 1 mM y Ácido Okadaico a una concentración de 500 nM (Figuras 12a y 12b).

Corroborando la información de los inmunoblots, tau se encuentra en sinaptosomas, y de manera particular se encuentra asociado a membranas, tanto sinaptosomal como de vesículas y de mitocondrias (Figuras 9a y 9b). En presencia de ácido okadaico, aumenta el inmuno-marcaje de tau asociada a membranas, mientras que en ausencia de anticuerpo primario no hay marcaje alguno, lo cual demuestra que las partículas de oro en realidad están marcando a tau, y también demuestra que no hay marca debida al anticuerpo secundario. La incubación con heparina y ácido okadaico también potenció el inmuno-marcaje de tau asociada a membranas, con respecto al control.

VI. Discusión.

Las enfermedades neurodegenerativas se han caracterizado desde la antigüedad por ser particularmente intratables, y solamente se podía intentar mejorar en lo posible la calidad de vida del paciente. Afortunadamente, en tiempos recientes gracias a la convergencia de educación, recursos, tecnología y primordialmente de todo el cuerpo científico de conocimientos desarrollado previamente, ha sido posible empezar a dilucidar los mecanismos celulares y moleculares precisos que originan y desarrollan este tipo de enfermedades. Sin embargo, para poder estudiar las alteraciones patológicas de cualquier sistema biológico, es fundamental contar con un modelo que recreé hasta donde sea posible las condiciones del sistema original, o que nos permita estudiar un proceso biológico de forma aislada, y por lo tanto independiente de los efectos de otros procesos inherentes al sistema biológico completo. En el caso particular de la EA, se ha trabajado sobre el desarrollo de modelos que recreen la patología y la fisiopatología de la enfermedad; de manera concreta, se ha intentado reproducir los procesos patológicos ocasionados por la agregación de la P β A y de tau. Estos modelos incluyen el uso de cultivos de líneas celulares, la administración de manera directa de la P β A sobre el sistema nervioso y la creación de roedores transgénicos que expresan o sobre expresan ya sea la P β A o tau. Muchos de estos sistemas han tenido algún grado de éxito, pero hasta el momento no ha sido



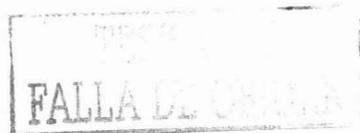
Todas las microfotografías electrónicas son selecciones representativas. Las flechas indican zonas donde hay mayor densidad de partículas de oro asociadas a membranas. En las microfotografías electrónicas se pueden apreciar sinaptosomas, esto es, terminales sinápticas aisladas, las cuales contienen mitocondrias (flecha marcada con un número uno), vesículas con neurotransmisores (flecha marcada con un número dos), y membrana sinaptosomal (flecha marcada con un número tres de la Figura 9a).

Subsecuentemente, se incubaron los sinaptosomas durante tres horas con ácido okadaico a una concentración de 500 nM (Figura 10). En la figura 11 se muestra una selección representativa de terminales sinápticas incubadas durante tres horas en ausencia de anticuerpo primario. Para finalizar, se incubaron sinaptosomas durante ocho horas en presencia de heparina a una concentración externa de homogenización de 1 mM y Ácido Okadaico a una concentración de 500 nM (Figuras 12a y 12b).

Corroborando la información de los inmunoblots, tau se encuentra en sinaptosomas, y de manera particular se encuentra asociado a membranas, tanto sinaptosomal como de vesículas y de mitocondrias (Figuras 9a y 9b). En presencia de ácido okadaico, aumenta el inmuno-marcaje de tau asociada a membranas, mientras que en ausencia de anticuerpo primario no hay marcaje alguno, lo cual demuestra que las partículas de oro en realidad están marcando a tau, y también demuestra que no hay marca debida al anticuerpo secundario. La incubación con heparina y ácido okadaico también potenció el inmuno-marcaje de tau asociada a membranas, con respecto al control.

VI. Discusión.

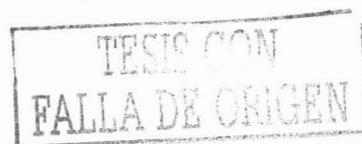
Las enfermedades neurodegenerativas se han caracterizado desde la antigüedad por ser particularmente intratables, y solamente se podía intentar mejorar en lo posible la calidad de vida del paciente. Afortunadamente, en tiempos recientes gracias a la convergencia de educación, recursos, tecnología y primordialmente de todo el cuerpo científico de conocimientos desarrollado previamente, ha sido posible empezar a dilucidar los mecanismos celulares y moleculares precisos que originan y desarrollan este tipo de enfermedades. Sin embargo, para poder estudiar las alteraciones patológicas de cualquier sistema biológico, es fundamental contar con un modelo que recreé hasta donde sea posible las condiciones del sistema original, o que nos permita estudiar un proceso biológico de forma aislada, y por lo tanto independiente de los efectos de otros procesos inherentes al sistema biológico completo. En el caso particular de la EA, se ha trabajado sobre el desarrollo de modelos que recreen la patología y la fisiopatología de la enfermedad; de manera concreta, se ha intentado reproducir los procesos patológicos ocasionados por la agregación de la P β A y de tau. Estos modelos incluyen el uso de cultivos de líneas celulares, la administración de manera directa de la P β A sobre el sistema nervioso y la creación de roedores transgénicos que expresan o sobre expresan ya sea la P β A o tau. Muchos de estos sistemas han tenido algún grado de éxito, pero hasta el momento no ha sido



posible generar un animal que recapitule tanto los síntomas conductuales, en particular la pérdida de memoria, como ambos marcadores histopatológicos. Por lo tanto, es de vital importancia perfeccionar los modelos de investigación que ya se tienen y buscar nuevos sistemas en los cuales se pueda investigar los procesos patológicos de interés, ya sea las alteraciones funcionales o la muerte celular causada por la P β A, o la hiperfosforilación y agregación de tau.

En este contexto, la idea principal de este trabajo es determinar si el modelo fisiológico de terminales sinápticas aisladas (sinaptosomas) es un modelo adecuado para estudiar los procesos de agregación patológica de la Proteína Asociada a Microtúbulos tau. En base a este planteamiento, la primera pregunta que habría que contestar es si en principio existe tau en las terminales sinápticas; como se aprecia en el carril de la fracción sinaptosomas de la figura 5, no solo se observa la proteína, sino que es posible identificar cuatro bandas que corresponden al peso molecular de las cuatro isoformas reportadas para esta proteína. El anticuerpo usado para este y la mayoría de los inmunoblots fue anti tau-1, el cual reconoce un epítipo de tau independientemente de su estado de fosforilación, y por lo tanto nos permitirá observar cambios en el peso molecular de tau independientemente de donde se encuentre fosforilada tau. Una consideración fundamental al trabajo es determinar si la proteína tau identificada en verdad proviene de las terminales sinápticas aisladas, y no de los axones donde es una de las dos MAPs principales. Para ello, y como se muestra en la figura 5, se analizó el contenido de tau de las distintas fracciones a lo largo del proceso de purificación, y se encontró que la mayor parte de esta proteína se concentra tanto en la fracción soluble sinaptosomal como en el pellet de esta misma fracción, por lo que es razonable afirmar que la tau identificada por medio del inmunoblot proviene de las terminales sinápticas aisladas de la rata.

Ahora bien, en este momento se podría cuestionar el uso de los sinaptosomas como sitios donde se puedan llevar a cabo procesos de agregación proteínica; se propone su uso fundamentados en el hecho de que las terminales sinápticas aisladas se han usado tradicionalmente en estudios de transmisión sináptica y metabolismo sinápticos, así como en estudios de toxicidad de la P β A. Los sinaptosomas contienen todos los elementos estructurales para que ocurra la transmisión sináptica y la maquinaria metabólica que permite mantener el contacto y la comunicación interneuronal. Un sinaptosoma es una terminal nerviosa aislada, que presenta una membrana externa, citosol, vesículas que contienen neurotransmisores, mitocondrias, y algunos elementos del citoesqueleto. Además, los sinaptosomas pueden ser un modelo particularmente adecuado para estudiar algunos eventos patológicos relacionados con la EA, puesto que las terminales nerviosas son un blanco inicial y muy sensible en este padecimiento (Terry et al, 1991). Otra objeción sería al trabajo es si en verdad necesitamos otro modelo *in vitro* de la agregación de tau, dado que ya existen varios. Sin embargo, exceptuando uno, todos ellos son modelos físicos que se encuentran muy alejados de la realidad biológica, esto es, en definitiva no ocurren en condiciones fisiológicas (Barghorn y Mandelkow, 2002). Aquí radica la importancia de este trabajo, puesto que la posible agregación de tau ocurriría en condiciones altamente fisiológicas, las cuales se aproximan más a lo que ocurre en el sistema nervioso de los pacientes.



Por otro lado, una pregunta importante es ¿cuál es la relevancia o qué significado biológico tiene el hecho de encontrar esta proteína en sinaptosomas? Si la sinapsis es más sensible a efectos tóxicos producidos directa o indirectamente por la P β A, o por otros compuestos en otros estados patológicos, entonces quizás los efectos de agregación de tau empiecen a partir de la terminal sináptica, se propaguen a lo largo del axón y terminen en el soma. Si el postulado anterior es cierto, entonces probablemente un curso terapéutico a tiempos tempranos de los efectos patológicos en las terminales sinápticas o en los axones quizás pueda prevenir el daño a las terminales sinápticas y aumente la probabilidad de supervivencia de la conectividad sináptica en primera instancia, y la de neurona posteriormente.

Una vez establecida la existencia de tau en sinaptosomas, el paso siguiente es intentar recapitular las distintas teorías sobre la etiología de la agregación de esta MAP usando distintos fármacos. De manera puntual, se puede concluir que la diversidad de compuestos empleados que en teoría podrían promover la agregación de tau (ácido okadaico, beta amiloide, rianodina) no tuvieron efecto alguno sobre su grado de fosforilación, medido en base al hecho de que no hubo diferencias en el corrimiento electroforético de las bandas entre los distintos tratamientos y la condición control. Este resultado se puede interpretar de dos maneras: el tiempo de agregación de tau no es suficiente, aún a pesar de que se empleó el tiempo de incubación en el cual hay una actividad metabólica óptima en los sinaptosomas de tres horas y el tiempo de incubación límite máximo (a las ocho horas de incubación, cerca del 40% de los sinaptosomas están vivos medidos por la prueba de la reducción del MTT (Arias C, comunicación personal). Otra posibilidad es que no haya suficiente concentración intrasinaptosomal de tau para llevar a cabo procesos de hiperfosforilación y autoagregación. Por otro lado, es posible que quizás los sinaptosomas carezcan de toda la maquinaria enzimática (quinasas y proteínas fosfatasa) para llevar a cabo los procesos de fosforilación anormal. Ya se ha mencionado en su apartado correspondiente de Materiales y Métodos los efectos particulares de cada compuesto, pero ahora cabe hacer un análisis más detallado de estos efectos sobre lo que pudiera estar sucediendo dentro de las terminales sinápticas.

Como ya se mencionó anteriormente, la actividad fisiológica de tau depende de su estado de fosforilación, el cual es regulado de manera precisa por las enzimas proteínas cinasas y proteínas fosfatasa. Dentro de estas últimas se encuentra la fosfatasa de proteínas 1 y 2A, la cual se ha reportado es potentemente inhibida por el ácido okadaico en sistemas *in vivo*. Este hecho consecuentemente tendría que aumentar la cantidad de grupos fosfato adheridos a tau en particular, y a otras fosfoproteínas susceptibles, en general. Probablemente existan otras enzimas capaces de remover grupos fosfato de tau, pero no tienen la afinidad ni la eficiencia de la PP1 y 2A; otra interrogante al respecto es si el sistema celular carece de mecanismos de retroalimentación para disminuir la actividad de las proteínas cinasas. En este sentido, una disminución en la actividad de las proteínas cinasas pudiera tener un efecto patológico estabilizando la red de microtúbulos, de manera similar a como actúa el taxol, un potente estabilizador de microtúbulos usado en el tratamiento contra el cáncer.

La alteración de la regulación de las proteínas fosfatasa también puede ocasionar la fosforilación anormal y la hiperfosforilación de tau, como lo demuestra el estudio de Kins y colegas (2001), en el cual ratones transgénicos que expresan una forma inactiva de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) muestran una hiperfosforilación de la tau endógena, en particular del epítotope característico de la enfermedad AT8, el cual reconoce a la serina 202 y a la treonina 205 en su estado fosforilado. Estos resultados en un primera aproximación podrían sugerirnos que la actividad de PP2A es crucial para la hiperfosforilación de tau, y posiblemente para su agregación; sin embargo esto depende de las características del tiempo de agregación de tau en el modelo empleado y falta probar que la disminución de actividad de esta enzima suceda en las condiciones patológicas *in vivo* en los pacientes. Otra prueba a favor de la relevancia de estas enzimas en la patología de la EA es la aparición del epítotope fosforilado reconocido por el anticuerpo PHF1 cuando se inhibe con ácido okadaico a la PP1 y 2A, en el modelo de cultivos primarios neuronales (Arias et al, 1993). Ciertamente, el ácido okadaico por si solo es capaz de producir la muerte, pero debido a un proceso rápido: envenenamiento, probablemente producido por la falla catastrófica de la red de microtúbulos en el organismo, mas que debido a la formación y acumulación de agregados de fosfoproteínas que puede tomar años y hasta décadas, como en la EA.

La rianodina modula el metabolismo del calcio, y a las concentraciones de 10 a 100 nM al unirse a su receptor libera calcio al medio intracelular, el cual regula procesos como la contracción muscular y la liberación de neurotransmisores; también se ha observado que activa varias proteínas cinasas, que probablemente pudieran impactar directamente en el estado de fosforilación de tau. Sin embargo, ni siquiera a la concentración más alta, 100 nM, fue posible estimular la fosforilación de tau en este modelo. La estaurosporina es un caso relativamente interesante; se sabe que su efecto es inhibir varias proteínas cinasas, como la Proteína Cinasa C (PKC por sus siglas en inglés) y la Proteína Cinasa dependiente de fosfolípidos/calcio. Sin embargo, y de manera relevante, se ha propuesto que la estaurosporina, a través de la activación de caspasas, es capaz de inducir la truncación anormal de tau, lo que permitiría su agregación patológica. Aunque existe evidencia de la existencia en sinaptosomas de varias caspasas, como la caspasa 3, en nuestro modelo la adición de estaurosporina no indujo un cambio significativo en tau que pudiera ser atribuido a un corte proteolítico producido por estas proteínas.

Quizás el compuesto que genera más interés es definitivamente la PBA, debido a la relevancia directa que tiene en la EA, al ser el constituyente principal de las placas seniles. Como ya se mencionó anteriormente, existen una serie de trabajos que proponen que el beta amiloide tiene cierto grado de toxicidad *per se*, dependiendo del modelo en que se estudie. En el modelo sinaptosomal empleado en este trabajo no se midió la viabilidad de los mismos, por lo que no se puede hablar acerca de su nivel de toxicidad. Otros trabajos si han abordado la cuestión, y han demostrado una toxicidad baja, pero patente (Arias et al, 2002). En este trabajo más que la toxicidad se deseaba saber si el beta amiloide afectaba o no el estado de fosforilación, y en caso de que la respuesta fuese afirmativa, en que grado. Como se aprecia en la figura 6a no hubo diferencias en el estado de

fosforilación de tau, como ya ha sido reportado en cultivos neuronales, lo cual indica dos posibilidades: la primera posibilidad es que la terminal sináptica carezca de la maquinaria molecular mediante la cual el beta amiloide pudiera efectuar la fosforilación de tau. Una segunda opción es que de nuevo el beta amiloide no este en las concentraciones adecuadas o más probablemente no tenga el tiempo suficiente para efectuar cambios patológicos significativos.

Dado que en presencia de los compuestos no hubo fosforilación de tau medido por el corrimiento electroforético de las bandas de proteína, es difícil esperar que se formara el epítotope reconocido por el anticuerpo primario fosfotau, que tiene afinidad por la serina fosforilada 404, y por lo tanto no es sorprendente que no haya habido inmunomarcaje en los inmunoblots (figuras 6b y 7b) incubados con este anticuerpo.

En una segunda serie de experimentos se trabajó con el compuesto heparina, un glicosaminoglicano sulfatado, el cual de manera normal se encuentra en la matriz extracelular como parte de la lámina basal, aunque en un estado patológico probablemente entre en contacto con los monómeros libres de tau, y pueda interactuar con ellos. Aparentemente, promueve la agregación de tau (esto es, debe de promover o la nucleación, o la polimerización, o ambas) debido a su estructura molecular rica en cargas negativas que neutralizan las abundantes cargas positivas de la estructura de tau, en particular de la parte amino terminal a la parte media. Esto aumenta de manera patente la capacidad de autoagregación de tau, como ha sido planteado en varios estudios (Goedert et al, 1996; Paudel y Li, 1999). El modelo experimental consistió en comparar los efectos de los compuestos que promueven la agregación de tau más 1 mM de heparina contra los efectos de las drogas sin heparina. Aquí cabe aclarar que 1 mM es la concentración externa de homogenización, puesto que Raiteri y colaboradores (2000) demostraron que la concentración efectiva interna es de alrededor de un veinteavo de la externa, esto es, del 5%, por lo que en realidad la concentración interna sería de 50 μ M de heparina.

Tomando en cuenta lo anterior, se pueden analizar los resultados de estos experimentos. En el inmunoblot mostrado en la Figura 8a se pueden observar dos efectos: el primero es una ligera disminución en el corrimiento electroforético de las bandas entre los distintos tratamientos y la condición control, el cual es más patente en el tratamiento con heparina. Dicho corrimiento pudiera corresponder a un incremento en el peso molecular debido posiblemente a una fosforilación. El segundo efecto es que disminuye el inmunomarcado de las bandas de las isoformas de la proteína tau, lo cual puede deberse a dos causas: la primera está basada en el hecho de que existe bastante afinidad entre la heparina y tau (Goedert et al, 1996), por lo que está última al unirse a la heparina perdería la conformación reconocida por el anticuerpo empleado. Sin embargo, esto es poco probable ya que se usan este tipo de anticuerpos para medir el nivel de agregación de tau, a pesar de que este proceso altera radicalmente la estructura de esta proteína. La segunda, y más probable causa, consiste en que la heparina promueve la hiperfosforilación y la agregación de tau, por lo que habría una disminución en la cantidad de tau en sus isoformas normales y tendría que observarse la aparición de nuevas bandas en el inmunoblot que corresponderían a agregados de tau, lo cual corroboraría trabajos anteriores de el efecto de la

heparina sobre la agregación de tau, aunque en modelos distintos (Paudel y Li, 1999). Esto aparentemente ocurrió así, aunque en menor grado al reportado en otros estudios; esto probablemente se deba tanto a la estequiometría de la interacción entre tau y la heparina (demasiado poca o mucha heparina interfiere negativamente con el proceso de agregación de tau), como al relativamente poco tiempo de interacción entre tau y la heparina (la preparación sinaptosomal no es funcional más allá de ocho horas).

De ser verdad, esto sería un evento muy interesante, puesto que es un hecho que al unirse a la heparina (o al heparan sulfato) tau ya no puede estabilizar microtúbulos, con todas las consecuencias patológicas que esto acarrea. Además, la heparina no sólo es capaz de estimular la hiperfosforilación de tau, sino que no bloquea la hiperfosforilación por medio de otras cinasas; por lo tanto, puede actuar sinérgicamente para disminuir aún más la funcionalidad estructural de tau.

Para terminar con esta parte de la discusión, hay que mencionar que una objeción técnica que se le puede hacer al marcaje de tau por medio de la técnica de inmunoblot es que quizás las diferencias observadas en la intensidad de las bandas estén reflejando la degradación de la proteína, en lugar de la disminución o el aumento en el marcaje del epitope que reconoce el anticuerpo. En este sentido, existe un argumento importante en contra la degradación de tau que consiste en el hecho de que las condiciones para promover la degradación de esta proteína son particularmente extremas, si tenemos en cuenta que ni el tratamiento por calor ni por acidez destruyen su actividad proteínica. Las condiciones de la técnica de purificación de sinaptosomas justamente buscan preservar la integridad y la vitalidad de las terminales sinápticas, por lo que se encuentran bastante cerca del rango fisiológico en cuanto al pH y temperatura, y por lo tanto muy alejadas de las condiciones del medio que pudieran degradar a la proteína tau.

Tres factores determinan el funcionamiento de cualquier componente de un sistema: la forma y/o la estructura, la localización espacial y el ordenamiento temporal. El segundo factor, la localización espacial, nos dice con que otras partes del sistema está en contacto físico directo e indirecto el componente que nos interesa, y por lo tanto nos habla de las interrelaciones que hay o que pueden haber entre ellos, lo cual está directamente conectado con la función y la eficiencia de la misma, del componente en particular y del sistema en general. Consecuentemente, es importante determinar la localización de tau en los sinaptosomas, para lo cual se recurrió a la técnica de inmuno-oro, que combina la especificidad de los anticuerpos con el poder de resolución de la microscopía electrónica, como ya se describió en Materiales y Métodos. Primero se llevaron a cabo pruebas para refinar la técnica y para encontrar las concentraciones adecuadas de anticuerpos para optimizar el proceso de marcaje. Una vez hecho esto, se usó la técnica para una preparación sinaptosomal en condiciones control, y ver la localización de tau en ausencia de fármacos. Los resultados de estos experimentos demuestran que efectivamente hay tau en los sinaptosomas (Figuras 9a y 9b); en estos experimentos se usó el anticuerpo tau-1, el cual como ya se mencionó es fosforilación independiente.

Aunque las condiciones de la técnica y la cantidad de tau en los sinaptosomas limitaron la claridad de los resultados, se encontró que tau está relativamente asociada a membranas. ¿Por qué relativamente? Por que la

mayoría de las partículas de oro se encontraban pegadas a la membrana, mayoritariamente por el lado intrasinaptosomal (citósólico), y unas pocas directamente sobre la membrana. Sin embargo, algunas partículas de oro se encontraban dentro de la terminal sináptica pero sin estar asociadas a ninguna membrana, y aún otras ni siquiera estaban asociadas a los sinaptosomas, como puede apreciarse en las figuras 9a y 9b. Esto puede deberse a dos causas: primero, la cantidad de tau en sinaptosomas probablemente no sea tan grande como para producir un marcado muy fuerte. Segundo, cuando se trabaja con microscopia no confocal siempre hay que tomar en cuenta que lo observado son cortes en dos dimensiones de muestras tridimensionales, por lo que debido al ángulo de corte uno no sabe que hay antes y después de un corte en particular, y consecuentemente reconocer la posible asociación entre las partículas de oro y algún componente celular es más problemático. A pesar de esto, es bastante claro que las partículas de oro colocalizan con las membranas. Esto probablemente se deba a que la tau que se encuentra en sinaptosomas sea la cantidad de proteína asociada a los microtúbulos restantes de la conexión entre axones y terminales nerviosas, pero principalmente provenga de los microtúbulos que se encuentran anclados a las membranas, tanto sinaptosomal como de organelos dentro de la misma terminal sináptica. En el mismo diseño experimental con los mismos fármacos pero incubado durante ocho horas no hubo diferencias en la cantidad y en la localización del marcaje; esto seguramente se debe a que existe una cantidad relativamente fija de tau y por lo tanto no aumenta de manera significativa el marcaje.

Posteriormente, para conocer si la fosforilación anormal y la agregación de tau se podían observar directamente en las terminales sinápticas, medido por un aumento en la densidad de partículas de oro en un lugar específico, los sinaptosomas fueron incubados durante tres horas con ácido okadaico a una concentración de 500 nM. Sin embargo, y como se puede apreciar en la Figura 10, no hubo diferencias con respecto al control en el nivel de densidad de las partículas de oro; un período de incubación de ocho horas tampoco aumentó el nivel de densidad de partículas de oro con respecto al control. Específicamente, la densidad relativa de partículas de oro unidas al anticuerpo Tau 1, que reconoce a tau independientemente de su estado de fosforilación es en promedio de 2.375 partículas de oro por cada 16900 nanómetros cuadrados cuando colocaliza con membranas, comparado contra 0.051 de la señal de fondo (atribuido al pegado inespecífico), mientras que la de los sinaptosomas incubados con ácido okadaico es en promedio de 2.652, contra 0.083 de la señal de fondo. Una vez normalizada la proporción entre la señal de localización y la señal de fondo, de hecho hay una reducción del 22.4% del inmunomarcaje de tau incubada con ácido okadaico en comparación con la condición control.

Para asegurar que el marcaje de las partículas de oro se debe exclusivamente a la especificidad del anticuerpo Tau 1, terminales sinápticas purificadas fueron incubadas durante tres horas en ausencia de anticuerpo primario, y como se muestra en la Figura 11 prácticamente no hubo pegado de las partículas de oro a la preparación sinaptosomal.

Finalmente, y recapitulando la idea usada en los inmunoblots, se incubaron sinaptosomas en presencia de heparina a una concentración externa de

homogenización de 1 mM y Ácido Okadaico a una concentración de 500 nM durante ocho horas bajo el razonamiento de que quizá estas condiciones fueran suficientes para inducir la fosforilación de tau en epítopes que son característicos de la enfermedad, los cuales serían revelados mediante el reconocimiento con el anticuerpo primario PHF-1. El análisis de densidad del inmunomarcaje mostrado en las Figuras 12a y 12b es en promedio de 3.166 (con una señal de fondo de 0) comparado contra 2.375 del control. Por lo tanto, y en base a la proporción entre la señal de localización y la señal de fondo, que es prácticamente infinita debido a que no hubo señal de fondo, estas condiciones si promovieron la fosforilación de tau en zonas específicas que están altamente relacionadas con la enfermedad, aunque en el límite del tiempo de viabilidad de la preparación sinaptosomal.

Tau es una proteína que carece de estructura secundaria, y no pierde actividad fisiológica después de tratamientos con altas temperaturas y pH bajo; es altamente hidrofílica, características que no hacen suponer que se pueda agregar fácilmente, y bastantes estudios en varios sistemas han demostrado que en efecto no es fácil lograr que esta proteína forme agregados proteínicos (Barghorn y Mandelkow, 2002). Y sin embargo, justamente la agregación de esta proteína en marañas neurofibrilares es uno de los dos marcadores histopatológicos principales de la EA, y el único marcador histopatológico de las tauopatías. Por consiguiente, se ha postulado que la presencia de algunos factores externos quizá induzcan o aceleren la agregación de tau. De estos factores externos, se ha propuesto que son los polianiones los que pudieran presentar un mayor efecto en su interacción con tau, al cancelar las cargas positivas de la parte media de la proteína y por lo tanto promover su agregación. Trabajos sobre este tema demuestran que los polianiones más potentes son los glicosaminoglicanos sulfatados (Goedert et al, 1996), como la heparina o el heparan sulfato, seguidos en efectividad por la poliglutamina y finalmente por el RNA. La interacción entre tau y los polianiones se encuentra sustentada por el hecho de que en el análisis cuantitativo de las marañas neurofibrilares además de tau se han encontrado cantidades traza de otros compuestos, entre ellos el heparan sulfato. Al respecto de la interacción entre la heparina y tau, se sabe que tiene que existir una estequiometría adecuada entre estas dos moléculas, puesto que si hay demasiada heparina o demasiado poca con respecto a tau, los procesos de fosforilación y agregación de esta última se verán mermados. Además, y como se mencionó anteriormente, la concentración efectiva interna de heparina es de 50 μ M, y se desconoce como interactúa esta concentración con la tau de los sinaptosomas, en cuanto a su agregación.

En términos de la eficiencia de la preparación sinaptosomal, y en base a la técnica de Western Blot, en los inmunoblots mostrados en las Figuras 8a y 8c es posible apreciar una banda muy tenue alrededor de los 169 KDa que probablemente corresponde a la formación de agregados proteicos de tau, los cuales como ya se mencionó corresponden a un estado de agregación bastante avanzado y prácticamente insoluble por los sistemas de degradación proteica celulares. La proteína presentó este estado de agregación después de ocho horas de incubación, en comparación a las 96 horas que tomó llegar a un estado de agregación similar usando otro modelo (Paudel y Li, 1999). Varios grupos en trabajos anteriores han logrado iniciar el proceso de nucleación de tau, o aumentar

el ritmo del mismo, o incluso producir agregados, pero en modelos *in vitro* que se encuentran muy por fuera del rango fisiológico donde se llevan a cabo los procesos patológicos en los pacientes, modelos como el de la gota colgante o el de la producción directa de tau recombinante expresada en bacterias. Los sinaptosomas, en contraposición, son un modelo altamente fisiológico, aunque carecen de la capacidad de mantenerse viables durante el tiempo suficiente para producir agregados proteínicos comparables a los producidos de manera patológica por un paciente, o por los otros modelos mencionados. Por otro lado, la cantidad de sinaptosomas que permanecen vivos al final del período de incubación es mínima, debido a las condiciones dañinas creadas por los fármacos y debido también al tiempo de vida media inherente a la preparación sinaptosomal. En base a lo anterior, se puede afirmar que esta técnica es adecuada para estudiar procesos de agregación que se lleven a cabo en un tiempo relativamente corto, de manera adicional a estudios en técnicas que requieran más tiempo, aunque se encuentren fuera de los parámetros fisiológicos en los cuales se llevan a cabo normalmente los procesos patológicos.

En resumen, los resultados de la agregación con heparina validan el uso de las terminales sinápticas purificadas como modelo de agregación proteínica, siempre y cuando se estudien más a fondo los parámetros que optimicen el modelo (esto es, tiempo y temperatura de incubación, y la estequiometría entre tau y la heparina, principalmente). También sería interesante purificar sinaptosomas de animales transgénicos que sobre expresan tau o tau y P β A, puesto que en principio deberían de presentar mayor cantidad de tau, lo cual facilitaría la formación de oligómeros y fibrillas proteínicas. Otra manera de estudiar si las alteraciones patológicas y la subsiguiente agregación de tau empiezan en las terminales sinápticas, sería mediante la aplicación sistémica o local (cefálica) de los compuestos empleados, y posteriormente analizar mediante la técnica de inmunohistoquímica la presencia o ausencia de marcadores patológicos bien definidos, tales como anticuerpos que reconozcan epítopes de tau característicos de la enfermedad, así como marcadores de terminales sinápticas patológicamente alteradas, tales como los niveles de la proteína sinaptofisina.

VII. Conclusiones.

1. Se ha demostrado la existencia de la Proteína Asociada a Microtúbulos tau en las terminales sinápticas de rata, medido tanto por lo técnica de inmunoblot como por la técnica de inmuno-oro.
2. Probablemente debido a la falta de tiempo de acción de los compuestos y de viabilidad de la preparación de terminales sinápticas, no se observaron alteraciones significativas en el estado de fosforilación de tau producidas por ácido okadaico, rianodina y P β A, al menos medido con los anticuerpos empleados.
3. Se observó que la MAP tau colocaliza con la membrana, tanto sinaptosomal como vesicular, medido por la técnica de inmuno-oro. También se observó inmunomarcado usando anticuerpos específicos que reconocen a tau fosforilada patológicamente, lo cual demuestra que es posible inducir hasta cierto grado este tipo de alteraciones en la preparación de terminales sinápticas.
4. Las terminales sinápticas en tanto que modelo de fosforilación y agregación de la MAP tau es adecuado para el estudio de compuestos que o son muy potentes (como la heparina) y/o actúan muy rápido (de minutos a horas), y aumentan la cantidad de tau fosforilada considerablemente en poco tiempo. Si fuera posible aumentar el período que permanecen viables los sinaptosomas, o la cantidad de tau, ya sea por su adición directa a las terminales sinápticas o por el uso de animales transgénicos, este modelo sería mucho más útil para los estudios de los procesos de agregación.

Abreviaturas y Soluciones Empleadas.

Gradientes de sacarosa para extracción de sinaptosomas.

Sacarosa 320 mM	10.95 gramos / 100 ml agua desionizada.
Sacarosa 800 mM	27.3 gramos / 100 ml agua desionizada.
Sacarosa 1.2 M	41 gramos / 100 ml agua desionizada.

Peso molecular de la sacarosa: 342.30

Buffer de Locke.

Componente	gramos / litro	Concentración Final
NaCl (58.44)	8.99	154 mM
KCl (74.55)	0.41	5.6 mM
CaCl ₂ (110.99)	0.25	2.3 mM
MgCl ₂ (203.33)	0.20	1.0 mM
NaHCO ₃ (84.01)	0.30	3.6 mM
Glucosa (180.16)	0.90	5.0 mM
Hepes (238.3)	1.19	5.0 mM

Ajustar pH a 7.2.

Electroforesis.

Solución A'.

980 µl de la solución A más 20 µl de la solución S.

Acrilamida / bis (30% T, 2.67°C)	
Acrilamida	(29.2 g / 100 ml)
N'N'-bis-methylene acrylamide	(0.8 g / 100 ml)
Agua destilada	

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	
Tris base	(18.15 g / 100 ml)
Ajustar el pH 8.8 con 1N HCl.	

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	
Tris base	(6 g / 100 ml)
Ajustar el pH 6.8 con 1N HCl.	

10% SDS	
SDS	(10 g / 100 ml)
Agua destilada	

Buffer de Muestra (SDS reducing buffer)	
Agua destilada	4.0 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.0 ml
Glycerol	0.8 ml
10% (w/v) SDS	1.6 ml
2-b-mercaptoethanol	0.4 ml
0.05% (w/v) bromophenol blue	0.2 ml

Buffer de Corrida 5X, pH 8.3	
Tris base	(15 g / l)
Glicina	(72 g / l)
SDS	(5 g / l)
Agua destilada	

Laemmli, U.K., Nature, 227, 680 (1970).

Componentes para los gels de Acrilamida.

Gel Superior (Concentrador)	
Agua bidestilada	1.725 ml
Poliacrilamida	0.5 ml
Buffer SDS - Tris 0.4% pH 6.8	0.75 ml
Persulfato de Amonio (APS)	15 µl
Temed	5 µl

Gel Inferior (Separador) al 8.5%	
Agua bidestilada	2.62 ml
Acrilamida	1.345 ml
Buffer SDS - Tris 0.4% pH 8.8	1.02 ml
Persulfato de Amonio (APS)	13.6 µl
Temed	3.4 µl

Revelado.

Revelado con diaminobenzidina	
Tris 100 mM	96.125 mg / 6.25 ml de agua
Diaminobenzidina	3.75 mg
H ₂ O ₂	3.75 µl

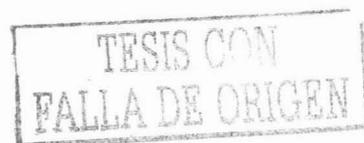
Revelado con ECL	
Solución 1	2.5 ml
Solución 2	2.5 ml

Amortiguador de pH de Fosfatos.

PBS 10X	
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	16.5 g
KH ₂ PO ₄	15 g
H ₂ O cbp	1 litro

Abreviaciones usadas.

EA, Enfermedad de Alzheimer; FHA, Filamentos Helicoidales Apareados; Proteína β Amiloide (PBA); Ria, Rianodina; AO, Ácido Okadaico.



Referencias.

Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA. 2002. **MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments.** J Cell Biol. 157:1187-96.

Alvarado-Esquivel C, Hernandez-Alvarado AB, Tapia-Rodriguez RO, Guerrero-Iturbe A, Rodriguez-Corral K, Martinez SE. 2004. **Prevalence of dementia and Alzheimer's disease in elders of nursing homes and a senior center of Durango City, Mexico.** BMC Psychiatry. 4:3.

Alzheimer A. 1907. **Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.** Allg Zeitschr Psychiatr. 64:146-148.

Amos LA. 2000. **Tubulin and Microtubules.** In: Nature Encyclopedia of Life Sciences. London: Nature Publishing Group. <http://www.els.net/doi:10.1038/npg.els.0000676>

Arendt T. 2001. **Alzheimer's disease as a disorder of mechanisms underlying structural brain self-organization.** Neuroscience. 102:723-65.

Arias C, Sharma N, Davies P, Shafit-Zagardo B. 1993. **Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons.** J Neurochem. 61:673-82.

Arias C, Mungarro X. 2001. **Alteraciones Bioquímicas en la Enfermedad de Alzheimer.** Mensaje Bioquímico, Volumen XXV. Primera Edición. Publicado por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Arias C, Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L. 2002. **beta-Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease.** Exp Neurol. 176:163-74.

Barghorn S, Mandelkow E. 2002. **Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments.** Biochemistry. 41:14885-96.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. 2001. **Neuroscience: Exploring the Brain.** Second Edition. Publisher: Lippincott Williams & Wilkins.

Bibb JA, Snyder GL, Nishi A, Yan Z, Meijer L, Fienberg AA, Tsai LH, Kwon YT, Girault JA, Czernik AJ, Haganir RL, Hemmings HC Jr, Nairn AC, Greengard P. 1999. **Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons.** Nature. 402:669-71.



Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1993. **Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding.** *Neuron*. 11:153-63.

Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM, Stefani M. 2002. **Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases.** *Nature*. 416:507-11.

Buée L, Bussiere T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. 2000. **Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders.** *Brain Res Brain Res Rev*. 33:95-130.

Bush AI, Tanzi RE. 2002. **The galvanization of beta-amyloid in Alzheimer's disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:7317-9.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. 1993. **Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.** *Science*. 261:921-3.

Cozzone AJ. 2000. **Proteins: Fundamental Chemical Properties.** In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group. <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0001330]

D'Souza I, Poorkaj P, Hong M, Nochlin D, Lee VM, Bird TD, Schellenberg GD. 1999. **Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:5598-603.

Dudas B, Cornelli U, Lee JM, Hejna MJ, Walzer M, Lorens SA, Mervis RF, Fareed J, Hanin I. 2002. **Oral and subcutaneous administration of the glycosaminoglycan C3 attenuates Abeta(25-35)-induced abnormal tau protein immunoreactivity in rat brain.** *Neurobiol Aging*. 23:97-104.

Dugué M, Neugroschl J, Sewell M, Marin D. 2003. **Review of dementia.** *Mt Sinai J Med*. 70:45-53.

Etcheberrigaray R, Hirashima N, Nee L, Prince J, Govoni S, Racchi M, Tanzi RE, Alkon DL. 1998. **Calcium responses in fibroblasts from asymptomatic members of Alzheimer's disease families.** *Neurobiol Dis*. 5:37-45.

Fawcett JW, Asher RA. 1999. **The glial scar and central nervous system repair.** *Brain Res Bull*. 49:377-91.



Friedhoff P, Schneider A, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1998. **Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution.** *Biochemistry*. 37:10223-30.

Friedhoff P, von Bergen M, Mandelkow EM, Davies P, Mandelkow E. 1998 (b). **A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:15712-7.

Garcia ML, Cleveland DW. 2001. **Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease.** *Curr Opin Cell Biol*. 13:41-8.

Geller LN, Potter H. 1999. **Chromosome missegregation and trisomy 21 mosaicism in Alzheimer's disease.** *Neurobiol Dis*. 6:167-79.

Ginsberg SD, Crino PB, Lee VM, Eberwine JH, Trojanowski JQ. 1997. **Sequestration of RNA in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles and senile plaques.** *Ann Neurol*. 41:200-9.

Ginsberg SD, Galvin JE, Chiu TS, Lee VM, Masliah E, Trojanowski JQ. 1998. **RNA sequestration to pathological lesions of neurodegenerative diseases.** *Acta Neuropathol (Berl)*. 96:487-94.

Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA. 1996. **Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans.** *Nature*. 383:550-3.

Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. 2003. **Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10417-22.

Goode BL, Feinstein SC. 1994. **Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau.** *J Cell Biol*. 124:769-82.

Graeber MB, Kosel S, Grasbon-Frodl E, Moller HJ, Mehraein P. 1998. **Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D.** *Neurogenetics*. 1:223-8.

Graeber MB, Mehraein P. 1999. **Reanalysis of the first case of Alzheimer's disease.** *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 249 Suppl 3:10-3.

Hardy J, Selkoe DJ. 2002. **The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.** *Science*. 297:353-6.



Herz J, Beffert U. 2000. **Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease.** Nat Rev Neurosci. 1:51-8.

Insall R y Machesky L. 1999. **Cytoskeleton.** In: Nature Encyclopedia of Life Sciences. London: Nature Publishing Group. <http://www.els.net/doi:10.1038/npg.els.0001252>

Isacson O, Seo H, Lin L, Albeck D, Granholm AC. 2002. **Alzheimer's disease and Down's syndrome: roles of APP, trophic factors and ACh.** Trends Neurosci. 25:79-84.

Jorm AF, Korten AE y Henderson AS. 1987. **The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature.** Acta Psychiatr Scand. 76:465-79.

J Biol Chem. 276:38193-200.

Kins S, Crameri A, Evans DR, Hemmings BA, Nitsch RM, Gotz J. 2001. **Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice.**

Klingner M, Apelt J, Kumar A, Sorger D, Sabri O, Steinbach J, Scheunemann M y Schliebs R. 2003. **Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with beta-amyloid plaque pathology.** Int J Dev Neurosci. 21:357-69.

Klunemann HH, Fronhofer W, Wurster H, Fischer W, Ibach B, Klein HE. 2002. **Alzheimer's second patient: Johann F. and his family.** Ann Neurol. 52:520-3.

LaFerla FM. 2002. **Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease.** Nat Rev Neurosci. 3:862-72.

Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. 2000. **Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain.** Nature. 405:360-4.

Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. 2001. **Neurodegenerative tauopathies.** Annu Rev Neurosci. 24:1121-59.

Lobo A, Saz P, Marcos G, Dia JL, de la Camara C, Ventura T, Morales Asin F, Fernando Pascual L, Montanes JA y Aznar S. 1999. **Revalidación y estandarización del mini examen de cognición (primera versión en español del MMSE) en la población geriátrica en general.** Med Clin (Barc). 112:767-774.

Löscher W, Bohme G, Muller F, Pagliusi S. 1985. **Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain: electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal gamma-aminobutyric acid in vivo.** J Neurochem. 45:879-89.



Lovestone S, Hartley CL, Pearce J, Anderton BH. 1996. **Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules.** *Neuroscience*. 73:1145-57.

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J. 1999. **Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease.** *Am J Pathol*. 155:853-62.

Mattson MP. 2004. **Pathways towards and away from Alzheimer's disease.** *Nature*. 430:631-9.

Makrides V, Shen TE, Bhatia R, Smith BL, Thimm J, Lal R, Feinstein SC. 2003. **Microtubule-dependent oligomerization of tau. Implications for physiological tau function and tauopathies.** *J Biol Chem*. 278:33298-304.

McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P. 2001. **Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease.** *Nat Rev Neurosci*. 2:589-94.

Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. 1997. **Selective destruction of stable microtubules and axons by inhibitors of protein serine/threonine phosphatases in cultured human neurons.** *J Neurosci*. 7:5726-37.

Migliore L, Botto N, Scarpato R, Petrozzi L, Cipriani G, Bonuccelli U. 1999. **Preferential occurrence of chromosome 21 malsegregation in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer disease patients.** *Cytogenet Cell Genet*. 87:41-6.

Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Watanabe A, Titani K, Ihara Y. 1995. **Hyperphosphorylation of tau in PHF.** *Neurobiol Aging*. 16:365-71.

Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L. 2000. **High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation.** *J Neurosci*. 20:4050-8.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. 1996. **Harper's Biochemistry.** Twenty fourth Edition. Publisher: Appleton & Lange.

Nelson DL, Cox MM. 2000. **Lehninger Principles of Biochemistry.** Third Edition. Worth Publishers. New York, New York.

Noble W, Olm V, Takata K, Casey E, Mary O, Meyerson J, Gaynor K, LaFrancois J, Wang L, Kondo T, Davies P, Burns M, Veeranna, Nixon R, Dickson D, Matsuoka



Y, Ahljianian M, Lau LF, Duff K. 2003. **Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo.** *Neuron*. 38:555-65.

Nowotny P, Kwon JM, Goate AM. 1999. **Alzheimer Disease.** In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group. <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0000228]

Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. 1999. **Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration.** *Nature*. 402:615-22.

Paudel HK, Li W. 1999. **Heparin-induced conformational change in microtubule-associated protein Tau as detected by chemical cross-linking and phosphopeptide mapping.** *J Biol Chem*. 274:8029-38.

Pearson H. 2002. **Dual identities.** *Nature*. 417:10-1.

Pepys MB, Herbert J, Hutchinson WL, Tennent GA, Lachmann HJ, Gallimore JR, Lovat LB, Bartfai T, Alanine A, Hertel C, Hoffmann T, Jakob-Roetne R, Norcross RD, Kemp JA, Yamamura K, Suzuki M, Taylor GW, Murray S, Thompson D, Purvis A, Kolstoe S, Wood SP, Hawkins PN. 2002. **Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis.** *Nature*. 417:254-9.

Pérez M, Arrasate M, Montejo De Garcini E, Munoz V, Avila J. 2001. **In vitro assembly of tau protein: mapping the regions involved in filament formation.** *Biochemistry*. 40:5983-91.

Perls T, Levenson R, Regan M, Puca A. 2002. **What does it take to live to 100?** *Mech Ageing Dev*. 123:231-42.

Perusini G. 1909. **Über klinisch und histologisch eigenartige psychische Erkrankungen des späteren Lebensalters.** In: Nissl F, Alzheimer A (eds) *Histologische und Histopathologische Arbeiten über die Großhirnrinde*, Vol. 3, Gustav Fischer, Jena, pp 297–358.

Raiteri M, Sala R, Fassio A, Rossetto O, Bonanno G. 2000. **Entrapping of impermeant probes of different size into nonpermeabilized synaptosomes as a method to study presynaptic mechanisms.** *J Neurochem*. 74:423-31.

Rogers J, Webster S, Lue LF, Brachova L, Civin WH, Emmerling M, Shivers B, Walker D, McGeer P. 1996. **Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis.** *Neurobiol Aging*. 17:681-6.

Sadqi M, Hernandez F, Pan U, Perez M, Schaeberle MD, Avila J, Munoz V. 2002. **Alpha-helix structure in Alzheimer's disease aggregates of tau-protein.** *Biochemistry*. 41:7150-5.

Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. 1993. **Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease.** Proc Natl Acad Sci U S A. 90:9649-53.

Selkoe DJ. 2001. **Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease.** Proc Natl Acad Sci U S A. 98:11039-41.

Selkoe DJ. 2002. **Alzheimer's disease is a synaptic failure.** Science. 298:789-91.

Selkoe DJ. 2003. **Folding proteins in fatal ways.** Nature. 426:900-4.

Simchowicz T. 1910. **Histologische Studien über die senile Demenz.** In: Nissl F, Alzheimer A (eds) Histologische und Histopathologische Arbeiten über die Großhirnrinde, Vol. 4, Gustav Fischer, Jena, pp 267-444.

Stephan A, Laroche S, Davis S. 2003. **Learning deficits and dysfunctional synaptic plasticity induced by aggregated amyloid deposits in the dentate gyrus are rescued by chronic treatment with indomethacin.** Eur J Neurosci. 17:1921-7.

Suh YH, Checler F. 2002. **Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease.** Pharmacol Rev. 54:469-525.

Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N. 2000. **Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes.** J Cell Biol. 150:989-1000.

Tariot PN, Solomon PR, Morris JC, Kershaw P, Lilienfeld S, Ding C. 2000. **A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD. The Galantamine USA-10 Study Group.** Neurology. 54:2269-76.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. 1991. **Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment.** Ann Neurol. 30:572-80.

Varani L, Hasegawa M, Spillantini MG, Smith MJ, Murrell JR, Ghetti B, Klug A, Goedert M, Varani G. 1999. **Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17.** Proc Natl Acad Sci U S A. 96:8229-34.



von Bergen M, Barghorn S, Li L, Marx A, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. 2001. **Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure.** J Biol Chem. 276:48165-74.

Walker LC, LeVine H 3rd. 2000. **The cerebral proteopathies.** Neurobiol Aging. 21:559-61.

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. 2002. **Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo.** Nature. 416:535-9.

Yuste VJ, Sanchez-Lopez I, Sole C, Encinas M, Bayascas JR, Boix J, Comella JX. 2002. **The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-X(L), but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells.** J Neurochem. 80:126-39.

Para consultar la base de datos de la librería técnica de Sigma Aldrich, escriba el nombre del fármaco empleado en el sitio: www.sigmaaldrich.com

