



*UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO*

FACULTAD DE QUÍMICA



**PAPEL DE LA NCAM-PSA EN LA
PROLIFERACIÓN CELULAR TUMORAL
METASTÁSICA EN EL CEREBRO HUMANO Y SU
RELACIÓN CON LA PLASTICIDAD REACTIVA EN
LA DEGENERACIÓN DE TIPO ALZHEIMER.**

TESIS

Que para obtener el grado académico de:
Química Farmacéutica Bióloga

PRESENTA:

Natllely García Carreño



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Homero Hernández Montes

Vocal: Prof. Rogelio Rodríguez Sotres

Secretario: Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca

1er. Suplente: Profra. Vanesa Rebeca Maya Ampudia

2do. Suplente: Profra. Diana Barrera Oviedo

El presente trabajo fue desarrollado en el Instituto Nacional de Neurología, en el laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas.

Asesor: Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca _____

Sustentante: Natllely García Carreño _____

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	5
II.	INTRODUCCIÓN	
	1. Sistema nervioso.....	7
	1.1. Composición anatómica.....	7
	1.1.1. Hipocampo.....	7
	1.2. Composición celular.....	8
	1.2.1. Glia.....	9
	2. Enfermedad de Alzheimer.....	10
	2.1. Amiloide-Beta.....	11
	2.2. Estrés oxidativo.....	13
	2.3. Glisilación.....	14
	2.4. Plasticidad	15
	3. Molécula de Adhesión Celular Neural.....	19
	3.1. NCAM-PSA.....	22
	3.1.1. La NCAM-PSA y la organogénesis.....	22
	3.1.2. La NCAM-PSA y dirección del crecimiento axonal sitios de inervación.....	24
	3.1.3. La NCAM-PSA y cáncer.....	25
	4. Cáncer.....	26
	4.1. Metástasis.....	27
III.	HIPÓTESIS.....	32
IV.	OBJETIVOS.....	32
V.	METODOLOGÍA.....	33
VI.	RESULTADOS.....	40
VII.	DISCUSIÓN.....	53
VIII.	CONCLUSIONES.....	60
IX.	PERSPECTIVAS.....	61
X.	REFERENCIAS.....	62
XI.	ANEXOS.....	73

ABREVIATURAS

A β . Amiloide beta.

A β (25-35). Amiloide beta fracción 25-35.

AP. Anteroposterior.

BSA. Albúmina Sérica Bovina.

CAMs. Moléculas de Adhesión Celular.

EA. Enfermedad de Alzheimer.

Fuc. Fucosa.

Gal. Galactosa.

GalNAc. *N*-acetilgalactosamina.

GFAP. Proteína Glial Fibrilar Ácida.

Ig. Inmunoglobulina

L. Lateralidad.

LH. Linfoma no Hodgkin.

MAcP. Metástasis de Adenocarcinoma Pulmonar.

MAcR. Metástasis de Adenocarcinoma Renal.

MCM. Metástasis de Cáncer de Mama de tipo canalicular.

MCT. Metástasis de Cáncer de Tiroides de tipo folicular.

MMM. Metástasis de Melanoma Maligno

Man. Manosa.

MCEP. Metástasis de Carcinoma Epidérmoide Pulmonar

NCAM. Molécula de Adhesión Celular Neural.

NCAM-PSA. Molécula de Adhesión Celular Neural Polisialilada.

NeuNAc. Ácido *N*-acetilneuramínico.

PB. Buffer de Fosfatos.

PSA. Ácido polisiálico.

P. Profundidad.

PPA. Proteína Precursora de Amiloide-beta.

SN. Sistema Nervioso.

SNC. Sistema Nervioso Central.

SSI. Solución Salina Isotónica.

1. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la más frecuente de las enfermedades neurodegenerativas. Está caracterizada por la pérdida progresiva de la memoria que culmina con la demencia total. Estudios anteriores han demostrado que después de la administración intracerebroventricular de la fracción 25-35 del péptido amiloide-beta ($A\beta$) en ratas adultas se observa muerte neuronal, alteraciones en la expresión de marcadores de estrés oxidativo y pérdida de la memoria. Una de las moléculas implicadas en la neurogénesis y eventos de plasticidad postraumáticos es la cadherina de adhesión neural unida a ácido polisiálico (NCAM-PSA). Por otra parte, la principal complicación y causa de muerte en el cáncer es la metástasis. Además, se ha demostrado que algunos tumores primarios de cerebro, se ven favorecidos también de la expresión de NCAM-PSA para invadir y proliferar. El objetivo de nuestro trabajo, fue identificar la presencia de NCAM-PSA en el cerebro de rata con neurotoxicidad inducida por $A\beta$ (25-35) y en tejido cerebral humano con metástasis de diverso origen primario. Se utilizaron 36 ratas machos de la cepa Wistar a las que se les dividió en tres grupos: un grupo de ratas, que llamamos “intactas”, sin ningún tratamiento previo, fue sacrificado bajo anestesia; el segundo grupo de ratas, nombrado “control”, recibió una inyección de solución salina isotónica (SSI) de manera intrahipocampal; y por último, el tercer grupo, llamado “tratado $A\beta$ ”, recibió una inyección de la fracción 25-35 del amiloide-beta [$1\mu\text{M}$], de manera intrahipocampal. Las inyecciones intrahipocampales se aplicaron en las siguientes coordenadas: anteroposterior (AP)= -4.2 ; lateralidad (L)= ± 3.0 y profundidad (P)= -2.9 . Se sacrificaron a diferentes tiempos: 8 y 24 horas, 15 y 30 días. Los experimentos con tejido metastásico se realizaron en 19 muestras humanas de metástasis de origen mamario, renal, pulmonar, ganglionar, dérmico y tiroideo. Se realizó la inmunohistoquímica empleando los anticuerpos anti-NCAM-PSA a una dilución de 1:300 y los anticuerpos anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP), diluidos 1:100. La ubicación de los anticuerpos fue identificada

con anticuerpos secundarios específicos marcados con fluorocromos y localizados por medio de microscopía de fluorescencia. Observamos que la NCAM-PSA se expresó de manera oscilante en el modelo de neurotoxicidad con A β , en el cuerpo calloso y giro dentado. En la región del giro dentado se observan dos picos intensos: uno a las 8 horas y otro a los 30 días, el cual decrece, sin llegar a la expresión de los controles, a las 24 horas y a los 15 días. En el cuerpo calloso se observó la máxima reactividad a NCAM-PSA a las 24 horas. La mayoría de la expresión se localizó en estructuras neuronales y sólo una pequeña proporción en astrocitos.

Para el estudio de NCAM-PSA en la metástasis de cerebro, se emplearon biopsias o necropsias. Los experimentos se realizaron en 19 muestras humanas, provenientes de necropsias o biopsias de cerebro con metástasis de orígenes diversos: mamario, renal, pulmonar, ganglionar, dérmico y tiroideo. Se realizaron inmunohistoquímicas con los anticuerpos anti-NCAM-PSA, anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y anti-sinaptofisina (diluciones 1:100). Se localizaron con anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos y se observaron con microscopía de fluorescencia. Se observó que en los tejidos metastásicos, la expresión ocurre en las masas tumorales. No se identificó tejido cerebral íntegro en ninguna muestra. La expresión en estos tejidos se observó en estirpes que pudieron reexpresar a NCAM-PSA como antígeno embrionario (*i.e.* renal) y en estirpes que normalmente no debían de expresarla (*i.e.* mama).

Nuestros resultados indican que NCAM-PSA se expresa en estadios de neurotoxicidad aguda (8 horas) y crónica (30 días). Al decrecer su expresión entre las 24 horas y los 15 días, es posible que se activen otras rutas de regulación que participarían en los eventos de plasticidad. En las metástasis, la presencia de NCAM-PSA podría favorecer la invasión y el potencial metastásico de las masas tumorales invasoras en el cerebro. La expresión tendría lugar a través de reexpresiones embrionarias, o eventos miméticos convenientes para las células tumorales.

II. INTRODUCCIÓN

1. Sistema nervioso

Las funciones normales del organismo dependen de la recepción de estímulos propios y desde el ambiente externo, así como de la generación de reacciones integradas dirigidas en respuesta. Esta actividad requiere un eslabón coordinador entre el estímulo y la respuesta, entre el órgano receptor y el órgano efector. En el organismo de los mamíferos uno de los sistemas coordinadores e integradores es el sistema nervioso (SN), el cual representa la base estructural para llevar a cabo reacciones precisas y rápidas [1].

1.1. COMPOSICIÓN ANATÓMICA

Anatómicamente, el SN se divide en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal. El SNP incluye el resto del tejido nervioso. En el SNC las neuronas están sostenidas por una vaina de células llamadas en conjunto neuroglia [2].

El SNC es responsable de las funciones superiores que caracterizan a los seres vivos. Estas funciones incluyen la conciencia, el pensamiento, la percepción, el aprendizaje, la memoria y el lenguaje [3]. El hipocampo es una de las estructuras del cerebro que juega un papel importante en la memoria y el aprendizaje [4].

1.1.1. *Hipocampo.*

El hipocampo es una parte del cerebro, localizada en el lóbulo temporal. Forma parte del sistema límbico. El nombre deriva de su forma curva, semejante a un caballito de mar (griego: *Hippocampus*) [5].

Puede ser dividido en cuatro regiones, llamadas CA1 a CA4 por Lorente de No. Estructuras vecinas como el giro dentado, subiculum y córtex entorrinal se incluyen también dentro de la llamada formación hipocámpica [5].

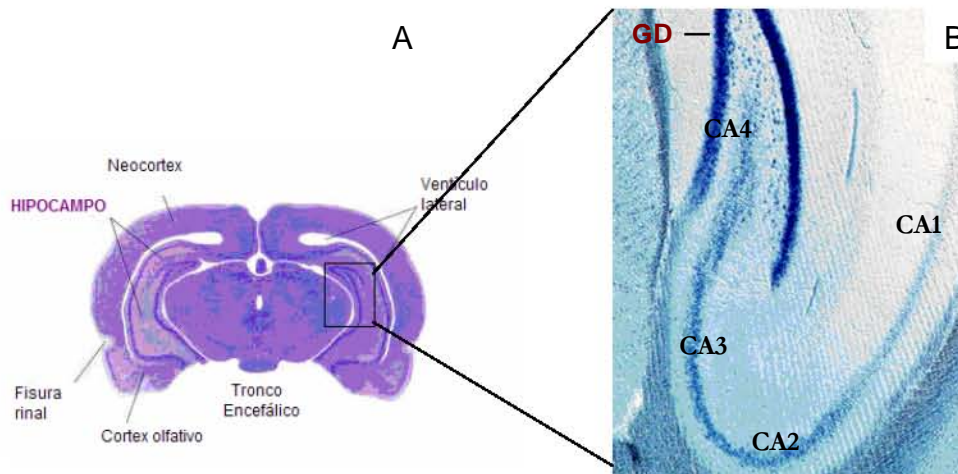


Fig. 1. Hipocampo de rata. **(A)** Corte coronal de cerebro de rata, en donde se muestra el hipocampo. **(B)** Se muestra un acercamiento de la zona en donde se puede apreciar el giro dentado (GD) y las diferentes regiones del cuerno de Ammón: CA1, CA2, CA3 y CA4.

En la enfermedad de Alzheimer (EA), el hipocampo es una de las primeras estructuras dañadas y por eso la memoria y el aprendizaje se encuentran alterados [6].

1.2. COMPOSICIÓN CELULAR

La red de comunicación en el cerebro está formada por neuronas, que son las unidades funcionales del SN. El cerebro humano contiene aproximadamente 10^{12} neuronas. Estas células son las especializadas en recibir información, tomar decisiones al respecto y transmitir señales a otras neuronas y células efectoras como el músculo o las células glandulares. La mayoría de las neuronas tienen varias dendritas y un axón. Las dendritas reciben información de otras neuronas y el axón manda información a otras neuronas o células efectoras. En una neurona la información se transmite a través de una conexión eléctrica, llamado impulso

nervioso o potencial de acción, desde el soma y la región dendrítica a lo largo del axón hasta la terminación sináptica [3].

Las neuronas están sostenidas por una variedad de células llamadas neuroglia [2] Neuroglia significa “pegamiento entre los nervios” [3] (*neuron*: nervio. *Glia*: pegamento) [1].

1.2.1. Glia

Las células gliales superan por mucho a las células neuronales, hay entre 10 a 50 veces más células gliales que neuronas en el SNC.

Las células gliales de los vertebrados se dividen en dos tipos principales: microglia y macroglia [7].

La microglía está constituida por fagocitos que se movilizan después de la lesión, la infección o la enfermedad.

En el SN de los vertebrados predominan tres tipos de células de la macroglia: oligodendrocitos, células de Schwann y astrocitos. Los astrocitos son las células gliales más numerosas, se caracterizan por tener aspecto de estrella y por el ancho pie terminal de sus prolongaciones [7].

Una consecuencia prominente del daño al SNC adulto es la astrogliosis, en la que los astrocitos reactivos se vuelven hipertróficos y aumentan el contenido de diversas proteínas [8]. Evidencias recientes sugieren que el proceso de reactividad astrocítica puede ser benéfica para el SNC [9]. El daño al SNC conlleva al reclutamiento de células inflamatorias mononucleares intrínsecas (ej. microglia) y extrínsecas (ej. macrófagos, linfocitos y natural killers), las cuales liberan citocinas difusibles; además, después del trauma los niveles de interleucina IL-1, IL-6, factor de crecimiento transformador (TGF)- β y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α están elevados [10-13].

Se piensa que la glia se activa en cierto tipo de enfermedades crónicas neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y la de Alzheimer [7].

2. Enfermedad de Alzheimer

Alois Alzheimer describió en 1906 las características clínicas y anatomopatológicas de la paciente Auguste D, quien murió, gravemente demenciada a los 56 años a causa de una enfermedad singular y grave de la corteza cerebral. Mas tarde Emil Kraepelin bautizó a esta enfermedad como Enfermedad de Alzheimer, conocida en un inicio como demencia presenil, dejando de existir el diagnóstico de demencia senil [14]. El término demencia se utiliza para describir un síndrome adquirido caracterizado por un conjunto de signos y síntomas que producen deterioro persistente de las capacidades cognitivas y que alteran la capacidad funcional de los individuos sin presentar alteración al nivel de la conciencia. [15]. La EA es una enfermedad neurodegenerativa, y es la forma más frecuente de demencia caracterizada por pérdida de la memoria progresiva, en donde hay destrucción de las neuronas y las vías de comunicación del cerebro [14].

La EA es la cuarta causa de muerte en los EUA y es quizás la enfermedad crónica más devastadora para los pacientes y sus familias. Ataca al 3% de las personas mayores de 65 años y entre el 25 y 50% de las personas mayores de 85 años. Tiene una evolución promedio de entre 6-10 años [14].

Existen dos tipos de EA, la familiar, que representa entre el 5 y 10% de los casos y la esporádica, que representa aproximadamente el 90% de los casos. En la EA de tipo familiar, están implicadas mutaciones en los cromosomas 1, 12, 14, 19 y 21. Se caracteriza por manifestaciones en edad temprana de demencia (40 años aproximadamente). En la EA esporádica, el agente causal hasta el momento se desconoce [16].

El cuadro clínico se inicia habitualmente con una afección de la memoria a corto plazo o de la atención que se sigue de la afección de otras actividades cognitivas como el lenguaje, el pensamiento abstracto, el juicio crítico y el reconocimiento de lugares o personas. En estados avanzados, el paciente evoluciona a un estado de mutismo casi absoluto con un deterioro progresivo de capacidades motrices, pudiendo llegar a una desconexión total del entorno que los rodea, siendo incapaz

de controlar sus funciones fisiológicas más simples [17].

La EA se caracteriza, primordialmente, por la presencia de dos lesiones en el cerebro: placas amiloideas y marañas neurofibrilares. Se acompaña de pérdida progresiva de la sinapsis, de neuronas y de funciones cognitivas [18-20].

Las marañas neurofibrilares están formadas por fibrillas entrelazadas insolubles, llamadas filamentos helicoidales apareados. Su componente principal es la proteína *tau* [21].

Las placas amiloideas están formadas por depósitos de una proteína llamada amiloide beta (A β) [22 y 23]. La formación de depósitos amiloideos es el primer suceso anatómo-patológico observable en la EA [24]. En cerebros con la EA dos tipos diferentes de depósitos de A β se han identificado: las placas seniles y las placas difusas, las cuales contienen A β fibrilar y no fibrilar, respectivamente [18, 24-27]. Mientras que las placas seniles están asociadas con la degeneración de neuritas y cuerpos celulares neuronales, las placas difusas pueden inducir rápidamente degeneración morfológica y muerte neuronal en la ausencia de A β fibrilar [28 y 29].

Los agregados amiloideos del péptido, se sitúan en el espacio extracelular del neurópilo cortical, donde ejercen efectos tóxicos sobre la neurona [30].

2.1. AMILOIDE BETA

A β es un péptido de 39-43 aminoácidos derivado de la proteína precursora de amiloide- β (APP) [27]. La APP proviene de una familia de glicoproteínas transmembranales de tipo I y se encuentra en diferentes tipos de células de manera generalizada. El dominio *N*-terminal de APP se proyecta a la región extracelular o puede estar localizado en el lumen de vesículas intracelulares, como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y los endosomas intracelulares [31]. Por otro lado, el dominio *C*-terminal se encuentra en el citoplasma. La APP es producida constantemente por las células y es secretado en concentraciones nanomolares en el líquido cefalorraquídeo de individuos normales y con EA [32 y 33]. APP es

sensible a la proteólisis llevada a cabo por tres proteasas llamadas α , β , y γ -secretasas. Estas secretasas son responsables de la producción de fragmentos de A β solubles, los cuales son: el péptido A β (1-40) presente en un 90% y el péptido A β (1-42) presente en un 10% [33 y 34].

Evidencias recientes han mostrado que A β (1-42) se deposita inicialmente y puede actuar como “semilla” para la formación de A β (1-40) fibrilar [25 y 26].

Existe evidencia *in vitro* de que intermediarios de una especie de A β , designados como A β protofibrilar se forman antes de constituir el péptido A β fibrilar [25]. El A β (1-42) protofibrilar se deposita más rápidamente y en una mayor cantidad que A β (1-40). Aunque el A β protofibrilar aparece transitoriamente, sus potentes efectos neurotóxicos, conllevan a la hipótesis de que el A β protofibrilar es más importante que el fibrilar, desde el punto de vista patológico [35-37].

Se ha sugerido la existencia de diversos dominios funcionales en la secuencia de A β . En cuanto a la neurotoxicidad de A β , se sabe que el fragmento de A β (25-35) (Fig. 2), causa retracción axonal y dendrítica, seguida de muerte neuronal en neuronas diferenciadas y neuronas maduras, comprobado mediante estudios *in vitro* [25]. Estudios subsecuentes han demostrado que la secuencia de aminoácidos de A β (25-35) es responsable de los efectos neurotóxicos de A β [39-43].

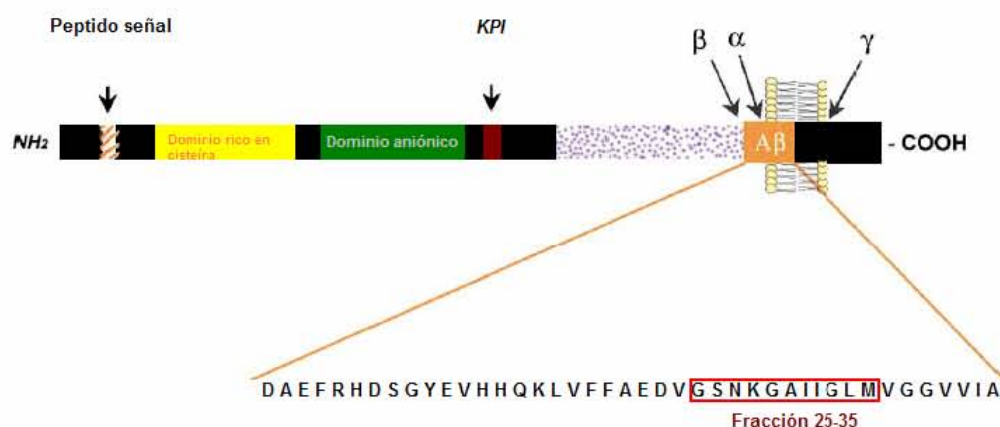


Fig. 2. Representación esquemática de la APP, en la que se indica la secuencia del péptido amiloide-beta de 4 kDa, que es cortado por las secretasas α -, β -, y γ -. Se muestra la secuencia de la fracción neurotóxica del péptido: fracción 25-35 (A β (25-35)) [44].

Algunos de los efectos neurotóxicos que ocasiona los depósitos de amiloide- β son la formación de ovillos neurofibrilares, muerte neuronal (activación del proceso apoptótico) y activación de las células de la glia, induciendo la producción de radicales libres y moléculas inflamatorias, que incluyen citocinas, interleucinas, monóxido de nitrógeno radical y otras moléculas potencialmente tóxicas, que finalmente provocan estrés oxidativo [14].

El estrés oxidativo parece ser el cambio patológico más temprano en la EA [45-47].

2.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Diferentes estudios han mostrado evidencia de que el estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos patológicos implicados en la EA [48 y 49]. El concepto de estrés oxidativo se refiere al estado en el cual la producción de especies oxidantes sobrepasa las especies antioxidantes endógenas, permitiendo que haya daño oxidativo a nivel molecular en el tejido. En la EA existe una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como son superóxido, peróxido de hidrógeno, monóxido de nitrógeno radical y peroxinitrito. Se ha considerado que estos factores median el daño celular y las señales de apoptosis [44].

A β induce la formación de concentraciones inusualmente altas de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno [48]. En cerebros de pacientes con EA hay niveles aumentados de marcadores de estrés oxidativo, incluyendo oxidación en proteínas, en membranas lipídicas y en el DNA [50].

Aunque las especies nitridérgicas como el monóxido de nitrógeno radical y el peroxinitrito se sobreproducen y contribuyen a la patogénesis de la EA, la producción depende de mecanismos inflamatorios secundarios incluyendo células de la glia activadas, lo cual puede representar un importante fuente de NO [51].

Además del daño provocado por el estrés oxidativo, otros mecanismos, como la glicosilación se han asociado con los cambios patológicos en la etapa temprana de la EA [45 y 52].

2.3. GLICOSILACIÓN

La correcta adhesión enzimática covalente de carbohidratos a proteínas o lípidos se conoce como glicosilación y es la más extensa modificación co- y postraduccional (en cuanto al tiempo empleado y número de organelos involucrados) en células eucariontes [53].

Las múltiples funciones de los carbohidratos radican en la estabilidad y la diversidad estereoquímica de las uniones glicosídicas [54].

Las glicoproteínas consisten en oligosacáridos o cadenas de ellos unidos covalentemente a proteínas. Los carbohidratos encontrados predominantemente en las glicoproteínas humanas incluyen; galactosa (Gal), manosa (Man), fucosa (Fuc), *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), ácido *N*-acetilneuramínico (NeuNAc) (forma humana del ácido siálico) [54].

Existen tres tipos de glicosilación: la *N*-glicosilación, la *O*-glicosilación y la *C*-glicosilación [55].

La *N*-glicosilación es la unión de la GlcNAc a la porción amino terminal de la asparagina y ocurre cotraduccionalmente en el retículo endoplásmico, la *O*-glicosilación, más frecuentemente, liga la GalNAc al OH- de grupos serina o treonina, esta glicosilación ocurre en el aparato de Golgi; la *C*-glicosilación adiciona covalentemente glucosa o manosa al carbono 2 del residuo indol del triptofano por unión carbono-carbono en regiones de la proteína donde la secuencia de aminoácidos es Trp-X-X-Trp, la X puede ser cualquier otro aminoácido generando derivados *C*-glicosídicos; esta glicosilación también se lleva a cabo en el aparato de Golgi [55].

Las enzimas encargadas de la formación de uniones de carbohidratos (glicosil transferasas) y las modificadoras/degradativas de las uniones de los oligosacáridos (glicosido hidrolasas, polisacarido liasas, y carbohidrato esterasas), permiten la gran diversidad estructural y química de los oligosacáridos. Las cadenas de oligosacáridos se forman a través de la acción coordinada de estas glicosil transferasas mediante adiciones paso a paso; las glicosil transferasas catalizan la transferencia de monosacáridos desde donadores nitrogenados a una cadena de

carbohidratos en crecimiento como aceptora.

La composición de los oligosacáridos afecta la función celular, por modificaciones del plegamiento proteico y en la selección de la ruta de secreción. Los carbohidratos también afectan el rango de aclaramiento de las glicoproteínas del torrente circulatorio [56]. También, se ha observado que glicosilaciones anormales están relacionadas con diversas enfermedades como son: la artritis reumatoide, la epilepsia, la esquizofrenia, el mal de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer.

Un tipo de glicosilación anormal observada en los cerebros con EA es la O-glicosilación y la presencia de ácido siálico transferasa. Existen estudios que sugieren que alteraciones en la plasticidad cerebral se pueden deber a la participación diferencial de O-glicosil- y de las sialil-transferasas, en el trans Golgi, durante el procesamiento de proteínas que participan en la sinaptogénesis reactiva. Se piensa que esto puede ser un evento temprano en la degeneración neuronal de tipo Alzheimer [55].

2.4. PLASTICIDAD

A pesar de la pérdida de neuronas y de sinapsis en la corteza y en el hipocampo, que provoca la deficiencia cognitiva y el desarrollo de la demencia en la EA, existen datos que avalan que en esta patología se conserva una cierta plasticidad dependiente del uso [57].

El término plasticidad se ha utilizado para describir los diversos tipos de cambio asociados a la neurona y a sus conexiones. La plasticidad neuronal es la propiedad que tienen las células nerviosas de reorganizar sus conexiones sinápticas y de modificar los mecanismos bioquímicos y fisiológicos implicados en su comunicación con otras células, como respuesta a la pérdida parcial de sus neuritas, a la presencia mantenida de cambios en sus aferentes neurales, o a la actuación local sobre ellas de diversos agentes humores. [57].

El sistema nervioso posee una gran capacidad plástica que le permite recuperarse, bajo ciertas condiciones, de las lesiones que puedan ocasionarle diversos eventos; ya sea por traumatismos, trombosis o hemorragias cerebrales.

La remodelación de las conexiones sinápticas parece ser una de las mayores propiedades fisiológicas de las neuronas y puede provocar cambios funcionales en la organización del cerebro [60]. La plasticidad sináptica parece ser el principal mecanismo que permite a los organismos adultos aprender y adaptarse a los cambios ambientales.

La capacidad fisiológica de reorganizar las conexiones sinápticas se mantiene en los cerebros adultos aún en condiciones patológicas. Después de un trauma en el SNC, las neuronas sobrevivientes rempazan a las células perdidas a causa de la lesión. Esta sinaptogénesis reactiva (Fig. 3) fue descrita por Liu y Chambers en 1958 en la espina dorsal y por Raisman (1969) en el cerebro [60].

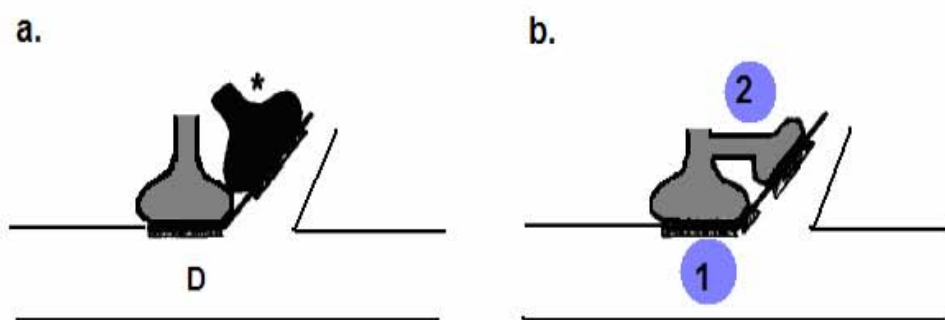


Fig. 3. Sinaptogénesis reactiva (A) Una lesión en el SNC provocó la degeneración de una terminal axonal (marcada con asterisco). (B) En respuesta a la lesión la sinapsis sobreviviente forma múltiples sinapsis. 1) nuevas terminales nerviosas se forman alternativamente o simultáneamente. 2) nuevas terminales se forman, las cuales dan lugar a nuevas sinapsis [58].

Una lesión en el SNC causa la muerte de las neuronas que son parte de un largo circuito neuronal. Por lo tanto, su muerte tendrá profundos efectos en la función en la totalidad del sistema [61 y 62]. Diversos tipos de neuronas se pueden reconocer con respecto al tipo de daño que sufren. Un grupo de células puede sufrir axotomía y morir, un segundo grupo de células puede perder su célula blanco, un tercer grupo puede perder sus conexiones y un cuarto grupo no será directamente afectado por

la lesión, pero se localiza en la vecindad de las células dañadas (Fig. 4). Todos estos grupos de neuronas participarán en el proceso de degeneración y reorganización que se lleva a cabo posterior a un trauma en el SNC.

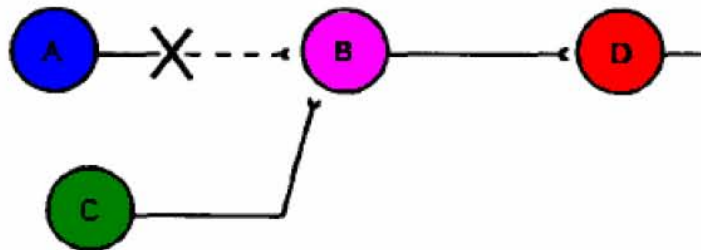


Fig. 4. Representación esquemática de los efectos en el circuito neuronal tras una lesión. Una lesión en el SNC afectó el circuito neuronal. La célula A sufre una axotomía, la célula B pierde sus señales, la célula C no es directamente dañada por la lesión, pero termina en la vecindad de las terminales dañadas y la célula D es blanco de la célula B, y puede ser dañada transneuronalmemente si la célula B se muere o se atrofia [58].

El crecimiento axonal parece ser un proceso inducido por una variedad de circunstancias y es regulado por diversas moléculas. Estas moléculas crean un ambiente propicio necesario para el crecimiento axonal actual [63], ya que controlan la formación de nuevas neuritas, la elongación axonal dirigida y la localización del sitio blanco de los axones crecientes [60].

Las interacciones neurona-glía y la composición de la matriz extracelular en la cual los axones crecen son también de importancia para el proceso de crecimiento axonal (Fig. 5). El paso final, la formación de la sinapsis, parece ser dependiente del axón así como de las moléculas dendritas-soma y de numerosos factores pre- y postsinápticos, los cuales se ha visto que regulan la especificidad de las conexiones neuronales durante el desarrollo [63 y 64].

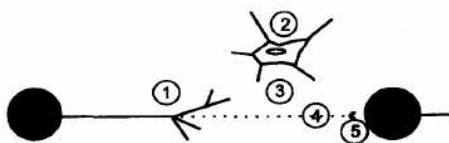


Fig. 5. ¿Cómo crecen los axones? Interacciones entre un axón en crecimiento y su ambiente, regula el crecimiento axonal. Los factores importantes son (1) interacciones axon-glía (2) composición de la matriz extracelular (3) factores que regulan la elongación y el blanco (4) factores que regulan la formación de la sinapsis [58].

De la misma manera en que los axones crecen durante el desarrollo, estos crecen bajo ciertas condiciones después de un daño. La regeneración axonal es frecuentemente exitosa en el sistema nervioso periférico, en donde la función se puede restaurar casi por completo. En contraste, en el sistema SNC de mamíferos, sólo se presenta una pequeña o casi nula regeneración, perdiéndose generalmente la función. En el SNP después de un daño los macrófagos se encargan de quitar los residuos. Las células de Schwann disminuyen la expresión de proteínas específicas de mielina y aumentan la expresión de moléculas de adhesión que promueven el crecimiento como las L1 y las moléculas de adhesión celular neural (NCAM).

Por el contrario, en el SNC la mielina no desaparece después del daño y las células formadoras de mielina (oligodendrocitos) continúan expresando proteínas de la mielina y no promueven la expresión de ninguna molécula de adhesión celular. Existe evidencia suficiente de que la presencia de mielina y la ausencia de moléculas que promueven el crecimiento son dos factores responsables de la falta de regeneración en el SNC de mamíferos [65].

Una meta esencial en la investigación neurocientífica se dirige a determinar si la modificación de la plasticidad puede suponer un beneficio terapéutico en el tratamiento de los daños asociados a diferentes enfermedades neurodegenerativas como la EA [66].

Se ha propuesto que la plasticidad reactiva, que incluye elongaciones axonales y dendríticas y la sinaptogénesis, contribuyen a la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas [61-63]. Se ha sugerido que la plasticidad reactiva (demostrada por medio de la existencia de anomalías en las terminales sinápticas peri-neurales y meganeuritas) representa un proceso de regeneración en los cerebros con EA [70].

Se han observado en las neuronas con EA, cambios en el patrón de sialilación de NCAM sin embargo, NCAM en su forma polisialilada (NCAM-PSA) no está presente en las neuronas normales. Al parecer este patrón contribuye a la temprana degeneración neurofibrilar que se presenta en los enfermos con EA [71-73].

3. Molécula De Adhesión Celular Neural

Dentro de la célula existen proteínas encargadas de la unión célula-célula llamadas moléculas de adhesión celular (CAMs, por sus siglas en ingles *Cell Adhesión Molecules*). Existen cuatro tipos de CAMs que son: las selectinas, las integrinas, las cadherinas y las inmunoglobulinas (Ig). Dentro de la familia de las Ig se encuentran:

- N-CAM (neural-CAM): implicada en el desarrollo del SN, de la que existen hasta 20 tipos
- Ng-CAM/Nr-CAM: Neurofascina
- Contactina
- MAGP (Myelin Associated Glycoprotein): Que está presente en la vaina de mielina
- I-CAM (Inflammatory-CAM): Que se expresa en leucocitos
- V-CAM (vascular-CAM): Que se encuentra en células endoteliales.

La NCAM es una molécula de unión célula-célula dependiente de calcio, es miembro de la superfamilia de las Ig (Fig. 6); llamada así porque contiene uno o más dominios tipo Ig característicos de los anticuerpos. NCAM se expresa en muchos tipos celulares incluyendo células nerviosas. La parte extracelular de la cadena del polipéptido de todas las formas de NCAM está plegada en cinco dominios Ig y dos dominios de fibronectina tipo-III (Fig. 6) [74].

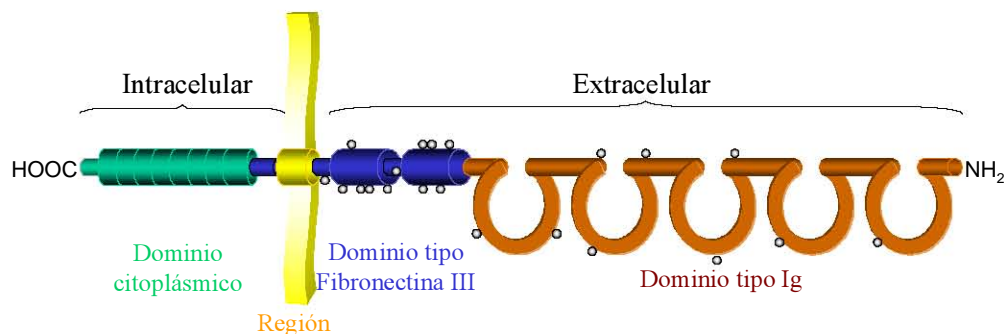


Fig. 6. Molécula de adhesión celular neuronal (NCAM). Se muestra el dominio citoplasmático, la región transmembranal y la región extracelular formada por dos dominios de fibronectina tipo III y cinco dominios tipo Ig.

Está codificada por un sólo gen y puede estar presente en diferentes tamaños dependiendo del corte y empalme que sufra el RNA. Existen hasta 20 formas diferentes; las formas predominantes son las que tienen un peso molecular de 120kDa, 140kDa y 180kDa (Fig. 7) [74].

Los tipos de NCAM con respecto al tipo de anclaje a la membrana lipídica son:

- Con dominio intracelular de diversos tamaños, encargados de señalización o unión para el citoesqueleto (NCAM-140 y NCAM-180; Fig. 7).
- Sin dominio intracelular, no atraviesa membrana lipídica. NCAM está unida a la membrana por medio del fosfatidilinositol (NCAM-120; Fig. 7).
- NCAM que es secretado y que debe ser incorporado a la matriz extracelular (NCAM-105; Fig. 7) [74].

La NCAM media uniones célula-célula y célula-matriz de manera homo- y heterofílica, así como interacciones *cis* y *trans*. La molécula no sólo se puede unir a otra molécula de NCAM (interacción homofílica), si no que también se puede unir de manera heterofílica a un gran número de componentes de la matriz extracelular o a

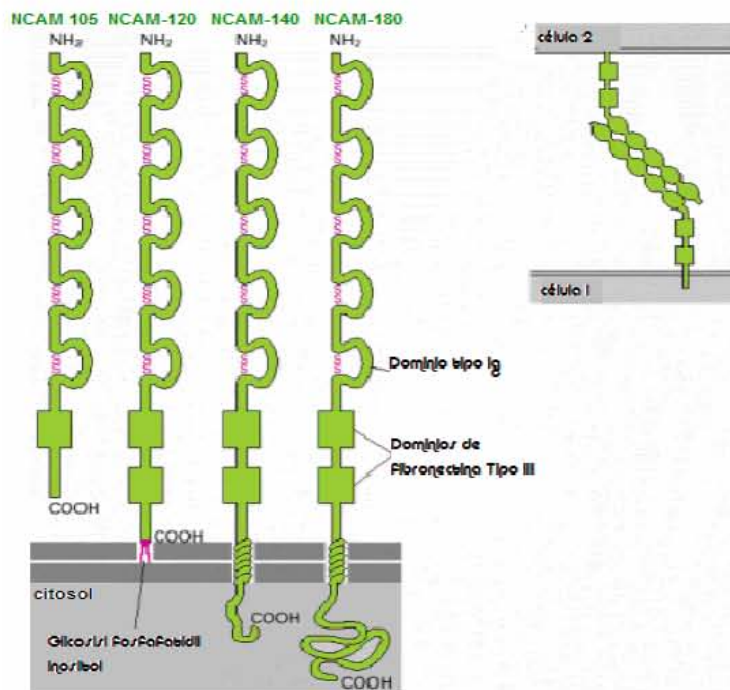


Fig. 7. Estructura de las diferentes isoformas de NCAM. La isoforma de 120kDa de NCAM está unida a la membrana lipídica por medio del fosfatilinositol. NCAM de 140kDa (NCAM-140) y NCAM de 180kDa (NCAM-180) tienen dominios intracelulares, a través de los cuales pueden interactuar con componentes del citoesqueleto o con componentes postsinap ticos. La NCAM-105 no está unida a la membrana celular [74].

otras moléculas de adhesión celular, como L1 [75], el receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) [76], ATP [77], así como lamininas o integrinas [78], a través de interacciones heterofílicas. También, puede formar interacciones *cis* con cualquier otra molécula en la misma superficie celular por medio de un epítipo específico. Su expresión y su estado funcional están regulados con precisión y sus interacciones con elementos extracelulares, de membrana y citoplasmáticos provocan cambios funcionales que alteran las propiedades de la membrana y las cascadas de señalización intracelulares [79].

Una característica bioquímica particular de NCAM es que puede unirse a largas cadenas de más de 55 monómeros de ácido siálico unidos a través enlaces α -2-8, generando una pesada molécula de carga negativa llamada ácido polisiálico (PSA).

El ácido siálico es un carbohidrato de 9 carbonos, en el que los carbono del 1 al 3 son derivados del piruvato y los carbono del 4 al 9 se derivan de *N*-acetilmanosamina (ManNAc). El ácido siálico generalmente ocupa zonas finales de cadenas de oligo- o polisacáridos *N*-glicanos, O-glicanos y glicoesfingolípidos [80]. Este PSA se une a dos asparaginas en la región Ig5 del dominio extracelular de NCAM (Fig. 8) [81].

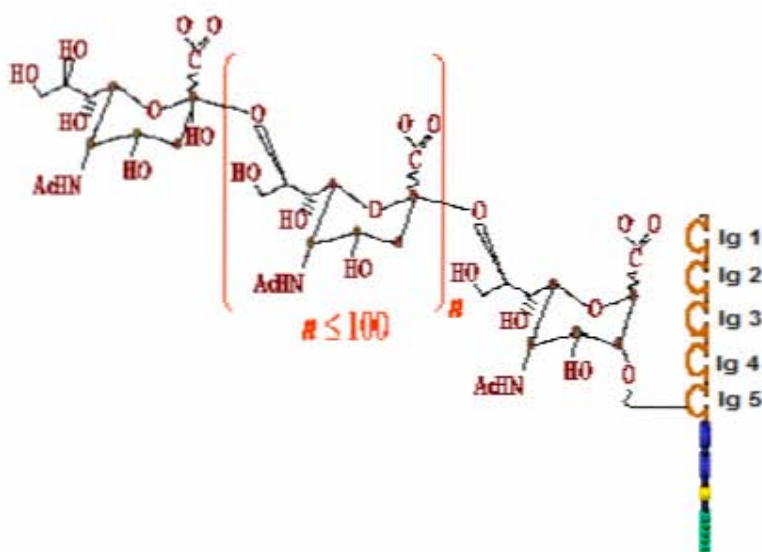


Fig. 8. Ácido polisiálico unido al dominio Ig 5 de una molécula de NCAM. (Poli α -2, 8-siálico). El número de unidades de ácido siálico que se puede unir a NCAM puede ser desde 8 hasta 200 unidades [82 y 83].

3.1. NCAM-PSA

La adición de PSA a NCAM toma lugar, como otras vías de glicosilación de proteínas, en el compartimiento *trans* del aparato de Golgi. Dos sialiltransferasas (ST8SialIV/PST y ST8SialII/STX) regulan la síntesis de NCAM-PSA (Fig. 9) [85-87]. Estas dos enzimas parecen ser factores reguladores de la síntesis de NCAM-PSA y su actividad está controlada por los niveles de RNAm [85]. La expresión de PSA en la superficie de las células depende de dos mecanismos regulatorios: (1) la biosíntesis de NCAM-PSA, que es dependiente del nivel de transcripción y de la actividad de las sialiltransferasas y, (2) el transporte intracelular que afecta el movimiento de moléculas a la superficie celular [88].

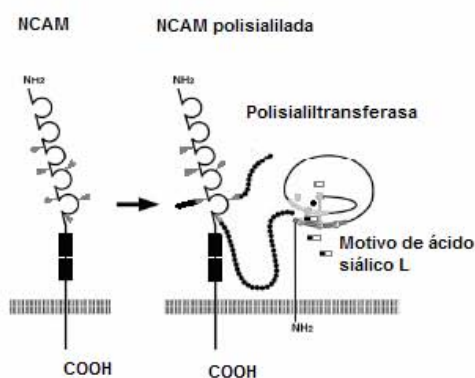


Fig. 9. Esquema de NCAM y la polisialiltransferasa (ST8SialIV). El ácido polisiálico es sintetizado por polisialiltransferasas en *N*-glicanos unidos al dominio Ig 5 de NCAM [84].

El ácido siálico puede disminuir la adhesión entre las células. Células con una pequeña cantidad de ácido siálico en la proteína NCAM unen cuatro veces más fuertemente a las células, que una célula con altos niveles de ácido siálico (Fig. 10C). Esta molécula en los humanos se encuentra en forma abundante en las etapas del desarrollo embrionario y su concentración decrece en el estado fetal.

3.1.1. **La NCAM-PSA y la organogénesis**

Durante la organogénesis NCAM-PSA se expresa en diferentes órganos como son:

Células epiteliales. En general NCAM-PSA es prominente en las células epiteliales durante la formación del epitelio y disminuye posteriormente [90].

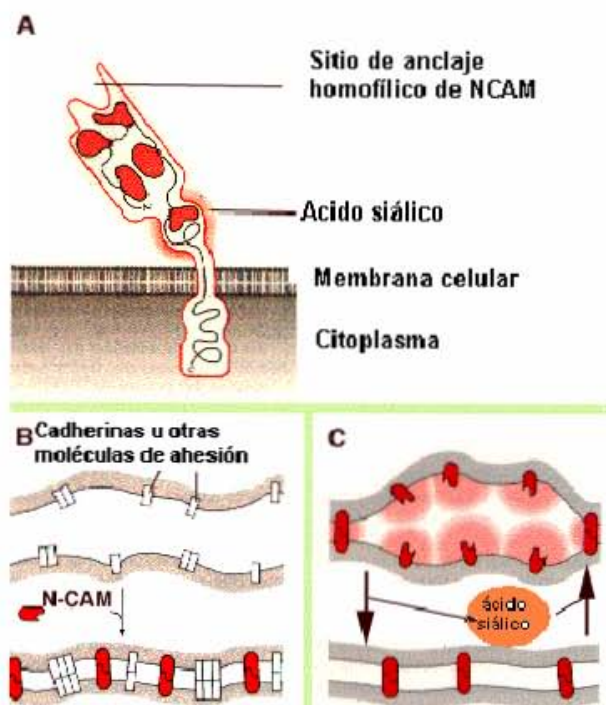


Fig. 10. Mecanismos por medio de los cuales NCAM puede promover o inhibir la adhesión célula-célula **(A)** Estructura de la molécula de NCAM. **(B)** Expresión de ácido siálico en las moléculas de NCAM en las superficies celulares que permiten la formación de numerosos enlaces entre las moléculas de NCAM. **(C)** NCAM altamente sialilada puede inhibir la interacción célula-célula, lo cual podría resultar en otras moléculas de adhesión (representadas como pelotas y cuencas) en la membrana celular adyacente. Cuando los residuos de ácido polisialílico son removidos, ambas células pueden adherirse [89].

- **Páncreas.** NCAM-PSA se expresa en células del páncreas en desarrollo [90].
- **Corazón.** Se expresa en varios axones y células que contribuyen en el desarrollo de la pared septal ventricular [90].
- **Riñón.** NCAM-PSA se expresa en estados tempranos del desarrollo del riñón localizándose en el nacimiento del uretero y en las células del riñón de origen embrionario [90].

La eliminación selectiva de PSA de NCAM por una enzima neuroaminidasa ha mostrado en diferentes sistemas y, particularmente, en las uniones neuromusculares, que NCAM-PSA juega un papel importante en la fasciculación nerviosa, ramificación axonal y la formación de sinapsis [91-93]. De manera similar el remover PSA de NCAM altera las interacciones de fibra-blanco y la ramificación de axones sensoriales en el epitelio ótico [94]. También, se ha asociado con errores en las proyecciones de células ganglionares en la retina [95], invaciones aberrantes de fibras musgosas y botones sinápticos ectópicos en el hipocampo [96],

y alteraciones en las ramificaciones axonales y en la organización laminar de la entrada cortical del tálamo [97]. Todos estos ejemplos indican que la expresión de NCAM-PSA durante el desarrollo contribuye al establecimiento y dirección de patrones específicos de conexiones sinápticas [81].

3.1.2. La NCAM-PSA y la dirección del crecimiento axonal a sitios de inervación

Durante el desarrollo, los axones se extienden del cuerpo celular neuronal y crecen largas distancias con la finalidad de hacer más precisas las conexiones con el sitio blanco. La mayoría de las señales de unión son CAMs expresadas por la glia, otras células o axones viejos que ya han seguido un camino [65].

Usualmente, cuando los axones crecen hacia su sitio blanco se encuentran unidos y crecen juntos. Sin embargo, hay un momento, durante el camino que sigue al crecer, en donde los axones se separan y los diferentes axones siguen caminos distintos (Fig. 11). La expresión de CAMs puede afectar la dirección que el axón siga, lo cual es un evento clave a lo largo del camino. La forma en que un axón tiende a separarse y crecer, está modulado por la polisialilación de NCAM.

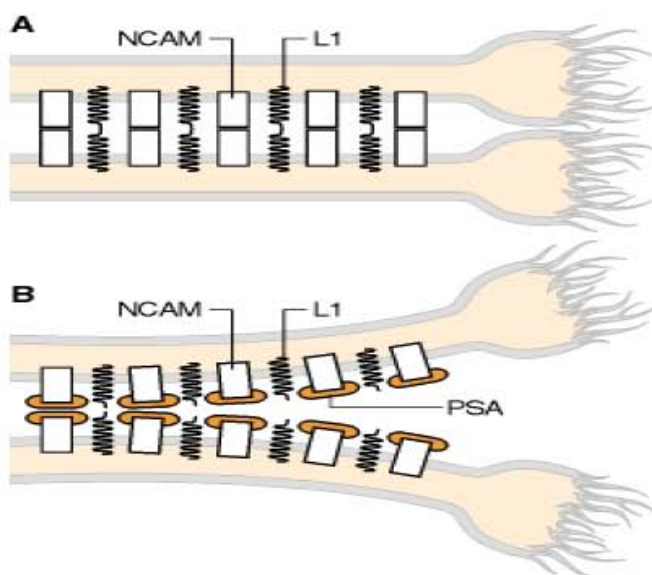


Fig. 11. La NCAM posee diferentes niveles de polisialilación. **(A)** NCAM se expresa en un axón en crecimiento, sin ácido polisialílico. Bajo estas condiciones, NCAM y L1 interactúan de manera hemofílica y los axones crecen juntos. **(B).** NCAM, posee ácido siálico, y las moléculas de NCAM y L1 están separadas y no pueden interactuar. Los axones en crecimiento no fasciculan bajo estas circunstancias [59].

La NCAM-PSA formada posee una gran carga negativa lo que provoca una menor adhesión debido al proceso de repulsión entre las cargas célula-célula comparada con la NCAM no sialilada. El ácido siálico suele secuestrar agua debido a la gran carga negativa que posee, por lo que ocupa un gran volumen en el espacio extracelular, lo que provoca la repulsión de las moléculas de NCAM-PSA una a otra, manteniendo así las membranas plasmáticas suficientemente separadas para prevenir la adhesión, por medio de otras moléculas de adhesión como L1 y cadherinas, manteniéndolas lo suficientemente lejos para que no puedan interaccionar [65].

3.1.3. La NCAM PSA y el cáncer

El PSA se reexpresa durante la progresión de varios tumores malignos incluyendo el carcinoma de células pequeñas, el tumor de Wilms, el neuroblastoma y el rhabdomyosarcoma. [98-100]. En estos tumores la polisialilación de NCAM incrementa el potencial metastático y ha sido correlacionado con la progresión del tumor y con un pobre pronóstico [101-104].

Aunque existe evidencia abundante de que el ácido polisiálico es crítico en el desarrollo y en la malignidad del tumor, su modo de acción a nivel celular aun no está claro [105]. De acuerdo con el modelo que más prevalece, la inhibición estérica producida por la presencia del PSA causa una atenuación general de la adhesión celular [106]. Además, de modular la adhesión celular, el PSA puede actuar como receptor de factores de crecimiento [107]. Recientemente, se ha mostrado que el PSA es necesario para la adecuada sensibilización de las neuronas al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) [108]. La remoción enzimática de PSA induce una marcada inhibición del crecimiento celular en células neuroblásticas de humano SH-SY5Y [64].

4. Cancer

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, sobretodo en países desarrollados. En los hispanos adultos es la segunda causa de muerte [109].

El término cáncer, que significa “cangrejo” en latín, fue creado por Hipócrates en el siglo cinco D.C para describir la enfermedad en donde los tejidos crecen y se esparcen sin control en todo el cuerpo [110]. Ambrossie Paré en 1517 describió por primera vez el cáncer y lo relacionó con la muerte del sujeto. Félix Plater en 1520 describe el primer cáncer cerebral, en un sujeto que tenía dos años de enfermedad progresiva que lo llevó a la demencia, la cual culminó con su muerte; el lo describió como una masa amorfa del tamaño de una nuez en el cerebro y lo relaciona con la demencia y la muerte del sujeto [111].

El cáncer es un mal funcionamiento de los controles de crecimiento de las células corporales provocando que éstas proliferen sin control, incrementándose el número de células indefinidamente. Se desarrolla invadiendo, destruyendo y aferrándose al tejido sobre el que se apoya [111].

La carcinogénesis es un evento complejo; se trata de un evento multifactorial, para el cual se ha propuesto cuatro mecanismos principales por los que ocurre el cáncer: (1) la infección de un virus tumorígeno, (2) la mutación de los genes que controlan el crecimiento celular, (3) la activación de un oncogen preexistente y (4) la alteración de los mecanismos normales de control de crecimiento [110].

El proceso carcinogénico evoluciona en una de dos formas, mediante la proliferación clonal o por alteración progresiva del desarrollo celular desde una etapa “premaligna” reversible a una etapa maligna irreversible. Los dos procesos no se excluyen mutuamente. Las alteraciones premalignas progresivas en una población celular mayor pueden provocar la degeneración maligna de una célula que clonalmente sobrepasa en tamaño a otras células debido a que tiene una ventaja selectiva en su desarrollo. Por lo tanto, muchos cánceres pueden aparecer de acuerdo a una secuencia perfectamente definida de cambios premalignos, en tanto que otros pueden surgir *de novo* en otros tejidos normales [110].

El cáncer se puede desarrollar en casi todos los tejidos del cuerpo. Dependiendo del tipo celular involucrado, el cáncer se divide en tres categorías [111]:

Carcinomas. Es el tipo más común de cáncer, se origina en las células epiteliales que cubren la superficie externa e interna del cuerpo.

Sarcomas. Se originan en tejidos de soporte de origen mesodérmico; como hueso, cartílago, tejido graso, tejido conectivo y músculo.

Linfomas. Se originan de células de la sangre y células de origen linfático.

Dependiendo del patrón de crecimiento, los tumores son clasificados en benignos o malignos. Los tumores benignos crecen en áreas limitadas. Los tumores malignos son un problema más serio porque pueden invadir los tejidos que lo rodean y entrar al torrente circulatorio, lo cual les permite invadir tejidos distantes, por medio del proceso llamado metástasis [111].

Una de las principales causas de complicaciones y muerte en el cáncer es la metástasis.

3.1. METÁSTASIS

La metástasis, es el escape de células cancerosas desde un sitio primario y su establecimiento a distancia, en lugares secundarios. Estas células cancerosas migran desde el sitio primario a otros órganos cercanos, y, en ocasiones, resultan mucho más devastadoras que el mismo tumor primario.

El proceso de la metástasis puede dividirse en tres estadios mayores, que no tienen una línea clara de demarcación entre uno y otro, y pueden operar simultáneamente (Fig. 12) [112]. En cada paso, las células cancerosas evitan diversos reguladores que mantienen a las células en su lugar [111 y 113].

Paso 1. Las células cancerosas invaden los tejidos vecinos y los vasos sanguíneos.

Primero, la adhesión célula-célula entre las células cancerosas disminuye, por lo tanto las fuerzas que mantienen unida a la masa tumoral decrecen. Posteriormente,

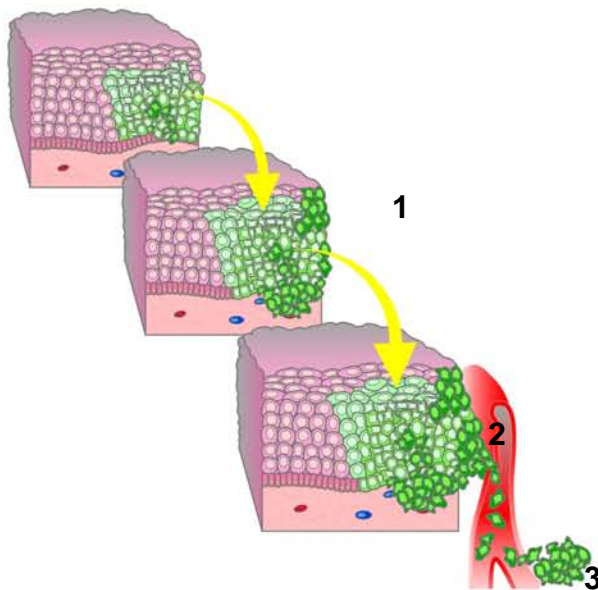


Fig. 12. Proceso de invasión y metástasis. **(1)** Las células cancerosas crecen e invaden los tejidos y vasos sanguíneos vecinos. **(2)** Las células cancerosas son transportadas por el sistema circulatorio a sitios distantes. **(3)** Las células cancerosas invaden nuevamente y crecen en un nuevo sitio [114].

las células cancerosas tienden a ser más móviles, aumentando la probabilidad de que puedan migrar y abandonar la masa tumoral. Por último, las células cancerosas pueden secretar proteasas que digieren la matriz extracelular para abrirse camino [112].

Paso 2. Las células cancerosas a través del torrente circulatorio son transportadas a distintos sitios.

Una vez que las células cancerosas han traspasado la barrera linfática, son llevadas por el sistema circulatorio a distintas partes del cuerpo. Un tumor maligno de pocos gramos de peso, puede liberar a la circulación a millones de células cancerosas por día. La sangre es un medio inhospitable para muchas células cancerosas y sólo un pequeño número de células puede sobrevivir y posteriormente invadir otro tejido [112].

Paso 3. Las células cancerosas reinvaden selectivamente y crecen en sitios específicos.

Algunas de las células cancerosas que sobreviven en el sistema circulatorio forman agregados de células que son retenidas en los capilares de otros tejidos u órganos.

Estas células posteriormente, penetran a través de la pared de los vasos capilares e invaden el tejido que las rodea. Sólo una pequeña porción de las células cancerígenas que inicialmente entran al torrente circulatorio pueden culminar en metástasis [112].

Las causas más frecuentes del inicio de invasión celular pueden ser:

- Presiones mecánicas: la invasión sucede por un crecimiento descontrolado caracterizado por la rápida proliferación de células neoplásicas. La presión que ejerce la masa celular en crecimiento bloquea vasos sanguíneos locales que llevan a la muerte celular y a una reducción en la resistencia mecánica.
- Presencia de enzimas líticas: las células tumorales incrementan enzimas proteolíticas como captesinas, metaloproteinasas, colagenasas tipo IV, y activadores del plasminógeno.
- Incremento en la motilidad de células tumorales (migración celular), en donde participan diversos factores de motilidad para células cancerosas y células no malignas, primero como factores de crecimiento. Un factor de motilidad convierte una célula de un estado estático a uno dinámico, transición caracterizada por la aparición de agregados de membrana como digitaciones filiformes, lamelares y pseudopodios.
- Diversos factores de motilidad se han descrito para las células cancerosas; por ejemplo, el factor de motilidad autócrina (AMF), que es una citocina secretada por tumores y que regula el crecimiento celular y la motilidad por una vía mediada por receptor. Ésta estimula la quimiocinesis y quimiotaxis [115].

Las células invasoras se adhieren *in vivo* alrededor de las moléculas de la matriz extracelular por vía de receptores específicos y responden a señales transducidas por esta interacción, junto con señales de citocinas y factores de crecimiento celular, para producir una serie de proteasas. La degradación de la matriz sumada con la liberación de mediadores químicos celulares, generan atractantes celulares

tumorales. Existen dos mecanismos atractantes involucrados en el fenómeno de regulación de la invasión tumoral y la metástasis: la quimiotaxis (estimula motilidad celular en respuesta a un gradiente de attractante soluble) y la haptotaxis (motilidad a través de fijadores de sustratos atractantes insolubles) que ocurre en caso de no ser suficientes los atractantes solubles desde la pared vascular [109].

Se sabe que alteraciones de la glicosilación de las proteínas juegan un papel crucial en los eventos invasivos y metastásicos cancerosos. Las proteínas *N*-glicosiladas desempeñan funciones importantes en la señalización, en la migración celular y en las interacciones célula-célula y cómo ya se mencionó, la disrupción célula-célula es el primer evento en el proceso metastático. [90]

Dentro de las moléculas de carbohidratos implicadas en la tumorigénesis y la migración celular, tanto fisiológica (en crecimiento) como cancerígena metastásica el ácido siálico desempeña un papel importante. En particular, cuando sufre modificaciones sustanciales como la *O*-acetilación que sirve como marcador específico de enfermedad, tal como sucede en enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer. De igual forma, en el melanoma el incremento adicional de ésteres *O*-acetilados en la posición C₉ del ácido siálico terminal se relaciona con la malignidad y el potencial metastático [109].

En este trabajo hemos demostrado la presencia de NCAM-PSA, tras la inyección intrahipocampal del A β (25-35). Se observó a lo largo de los tiempos establecidos, la presencia de astrocitos reactivos, lo que sugiere que probablemente las moléculas proinflamatorias implicadas en este proceso, estén influyendo en la expresión de NCAM-PSA. Por otro lado, en el modelo de metástasis en el cerebro, se observó que la célula tumoral expresa NCAM-PSA, lo cual pudiera ser una reexpresión embrionaria, en las muestras provenientes de tejidos que expresan NCAM-PSA en el estado embrionario, o bien un mimetismo de esta molécula; en ambos casos con la finalidad de favorecer su invasión y a la vez proliferar.

Debido a que en la metástasis, existe una inmusupresión, es difícil pensar que en este caso la expresión de NCAM-PSA se vea regulada por la presencia de moléculas proinflamatorias, por lo que la expresión de NCAM-PSA en el tejido cerebral metastásico, probablemente obedezca a la activación de otro tipo de mecanismos.

III. HIPÓTESIS

La expresión de NCAM-PSA puede favorecer la proliferación tumoral en células metastásicas de cerebro; siendo a la vez un probable factor de plasticidad celular en la neurodegeneración de tipo Alzheimer.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Co-localizar la expresión de NCAM-PSA en tipos celulares específicos de los diferentes tejidos tumorales metastásicos en cerebro y en los cerebros animales con toxicidad y neurodegeneración de tipo Alzheimer.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar la población celular que expresa NCAM-PSA tras la inyección intrahipocampalmente de la fracción 25-35 del amiloide- β .
2. Observar el patrón de expresión de NCAM-PSA después de 8h, 24h, 15 días y 30 días.
3. Evidenciar la astrogliosis presente por medio de un anticuerpo anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP) después de 8 y 24 horas y 15 y 30 días.
4. Identificar la población celular que expresa NCAM-PSA en diferentes tejidos tumorales metastásicos en cerebro.

4.3. METAS

A partir de la identificación de las poblaciones celulares que expresan NCAM-PSA establecer de manera indirecta, el papel que juega dicha expresión, tanto en la plasticidad neuronal involucrada en la enfermedad de Alzheimer, como en el desarrollo metastásico.

V. METODOLOGÍA

5.1. MATERIALES

5.1.1. *Tejido*

Se empleó tejido metastásico cerebral humano de diferentes casos (18 casos de diferente origen primario) al igual que tejido cerebral sano como control. El tejido se obtuvo del Departamento de Neuropatología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Casos:

Diagnóstico histopatológico

- Metástasis en cerebro de carcinoma epidermoide pulmonar (2 casos).
- Metástasis en cerebro de adenocarcinoma pulmonar (4 casos).
- Metástasis en cerebro de adenocarcinoma renal (1 caso).
- Metástasis en cerebro de cáncer de células claras (3 casos).
- Metástasis en cerebro de carcinoma papilar (1 caso).
- Metástasis en cerebro de linfoma no Hodgking (2 casos).
- Metástasis en cerebro de cáncer de mama (3 casos).
- Metástasis en cerebro de cáncer de tiroides (1 caso).
- Metástasis en cerebro de melanoma maligno (1 caso).

5.1.2. *Anticuerpos*

Los *anticuerpos primarios* utilizados en este ensayo fueron: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-NCAM-PSA (Chemicon, International, Inc., EEUU). Anticuerpo Policlonal de conejo anti-Proteína Glial Fibrilar Acídica (GFAP, DakoCytomation,). Anticuerpo monoclonal de ratón anti-sinaptofisina (Chemicon, International, Inc., EEUU).

Los *anticuerpos secundarios* empleados fueron: anticuerpo anti-IgG (H+L) de cabra anti-conejo conjugado con Rhodamina-Red-X (115-295-146) y anticuerpo anti-IgG (H+L) de cabra anti-conejo conjugado con lissamina-rhodamina (111-

085-003) ambos de Jackson ImmunoResearch Labs., Inc., West Grove, PA, EEUU. y Fluorescein Anti-Mouse IgG (H+L) de Vector Laboratorios, Inc.

5.1.3. Amiloide- β

Fracción 25-35 de la proteína amiloide- β (Sigma Chemical G).

5.1.4. Modelo animal experimental

Ratas macho de la cepa Wistar, provenientes del bioterio del INNN, con un peso entre 250-300 g. Se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura 18-23°C, humedad de 50 al 60%, un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas y con libre acceso de agua y alimento.

5.2. MÉTODOS

La expresión de NCAM-PSA se estudió en un modelo de neurotoxicidad de la enfermedad de Alzheimer en ratas; así como en metástasis de cerebros de diferentes orígenes primarios.

Para el modelo de neurotoxicidad se contó con 36 ratas machos de la cepa Wistar. Los animales fueron separados en tres grupos: el primer grupo, llamado “intactas”, estuvo constituido por 4 animales, los cuales fueron anestesiados y sacrificados inmediatamente; el segundo grupo llamado “control”, estuvo formado por 16 ratas, a los cuales se les administró solución salina isotónica, de manera intrahipocampal, por medio de cirugía estereotáxica y el tercer grupo, llamado “tratado A β ”, estuvo constituido por 16 ratas, a los cuales se les administró la fracción 25-35 del amiloide- β , de manera intrahipocampal por medio de cirugía estereotáxica.

5.2.1. Anestesia

Los tres grupos de ratas fueron administrados, por vía intraperitoneal, con hidrato de cloral como anestesia, a una dosis de 350mg/kg de peso. El grupo de ratas intactas fue sacrificado inmediatamente y se prosiguió al punto 5.2.3. Los dos grupos restantes fueron preparados para la cirugía estereotáxica.

5.2.2. Inyección por medio de cirugía estereotáctica

Una vez anestesiados los animales, se procedió a razurarles el cráneo y a colocarlos en el equipo de cirugía estereotáctica. Después de haber sido colocados de manera adecuada, se les realizó una incisión sobre el cráneo y posteriormente se les removió el periostio.

El grupo de ratas control fue inyectado bilateralmente con 1 μ L de solución salina isotónica; mientras que al grupo tratado A β fue inyectado con 1 μ L de una solución 1 μ M de A β (25-35) [116]. Ambos grupos fueron inyectados con las siguientes coordenadas: AP = -4.2; L = \pm 3.0 respecto a bregma y P = -2.9 respecto a la duramadre.

Posteriormente, a las ratas se les administró por vía intramuscular 20 μ L de antibiótico, por cuatro días consecutivos. Finalmente, los animales fueron sometidos a un periodo de recuperación con acceso libre de agua alimento.

Después de 8 horas, 24 horas, 15 días y 30 días del depósito de SSI o de A β (25-35), las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral, administrado por vía intraperitoneal a una dosis de 350 mg/kg de peso y concentración de 1500 mg/25ml.

5.2.3 Obtención del cerebro

Ya anestesiadas las ratas, se les realizó una perfusión con 140-160 mL de formaldehído al 4%. Los animales fueron decapitados y el cerebro extraído. Los cerebros se almacenaron en *para*-formaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (PBS) 0.1M de pH 7.4 (Anexo I y II) y conservados a 4° C.

Las muestras así conservadas fueron procesadas siguiendo los pasos siguientes:

5.2.4. Inclusión en parafina, cortado y montado de las muestras

Las muestras fijadas en paraformaldehído se incluyeron en parafina siguiendo protocolos establecidos [117]. Las laminillas se prepararon con Silano, (Sigma Chem., USA; Anexo III), el cual permitió la adhesión del tejido a la laminilla. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de 5 μ m por medio de un

microtomo Histocut, Reichter-Jung (Cambridge Inst. GmbH, West-Germany) [118]. Los fragmentos obtenidos se montaron en las laminillas, previamente silanizadas mediante un baño de flotación Tissue Float Bath (Lab-Line, USA), a ~52°C con agua corriente (reposada la noche anterior) y 30g de grenetina (gelatina para microbiología, Merck, México).

5.2.5. Inmunohistoquímica para microscopía de fluorescencia

El procedimiento de inmunohistoquímica de triple marcado empleado se realizó siguiendo el protocolo descrito por Guevara y cols. en 1998 [119].

Se desparafinaron las laminillas y se rehidrataron las muestras mediante la inmersión en xilol, Xilol/alcohol 100% y posteriormente, en alcohol a las siguientes concentraciones: 100, 96 y 70 %. Las laminillas se sumergieron por 5 minutos aproximadamente en cada solución.

Posteriormente, las laminillas se sometieron a recuperación antigénica que consistió en sumergir a las laminillas en amortiguador de citratos (citrato de sodio 0.1M pH=6, Productos Químicos Monterrey, Monterrey, NL, México y ácido cítrico 0.1M, Técnica Química, High Purity de México, México, D.F.; Anexo IV). a temperatura de ebullición del citrato, durante 3.5 minutos, después las laminillas se enfriaron a temperatura ambiente.

Las laminillas se enjuagaron con PBS y se incubaron con albúmina sérica bovina (BSA) libre de IgG (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EEUU) al 0.2% en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se enjuagaron con PBS y se incubaron con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EEUU) al 0.2% en PBS, por 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Posteriormente, se enjuagaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario anti-NCAM-PSA (1:300 en PBS) toda la noche a 4°C y protegidas de la luz. Al término de este periodo de incubación, se enjuagaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario específico marcado con fluoresceína (dilución 1:100 en BSA libre de IgG al 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegidas de la luz. Se enjuagaron con PBS y se incubaron con el segundo anticuerpo primario anti-GFAP (1:100 en PBS)

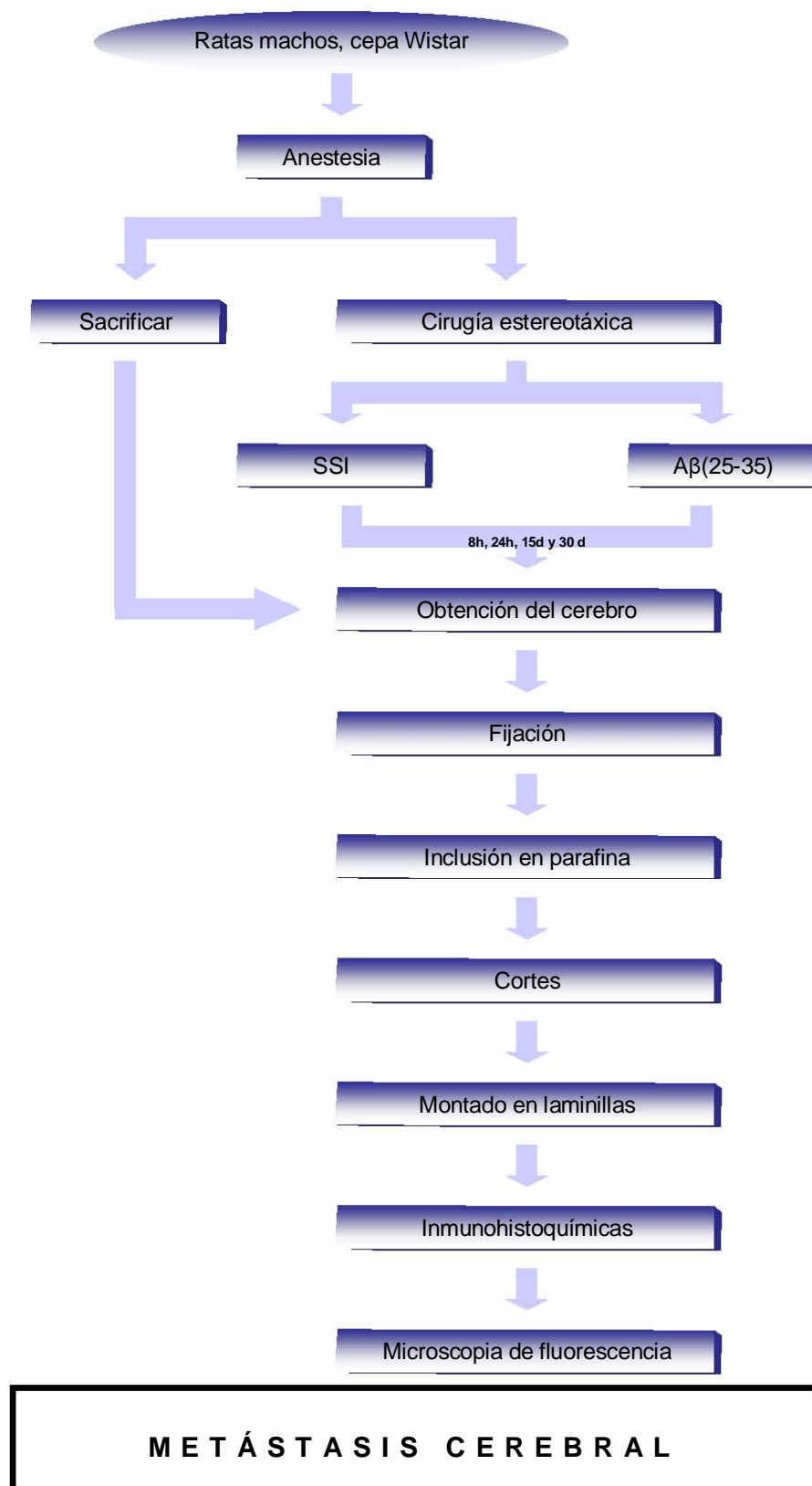
durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron con el segundo anticuerpo secundario: Rhodamina-Red X (1:100 en PBS). Finalmente, las laminillas se enjuagaron con PBS y se montaron con medio VectaShield conjugado con DAPI (Vector Labs., Inc., Burlingame, CA., EEUU) a oscuras. Los cubreobjetos se sellaron con barniz de uñas.

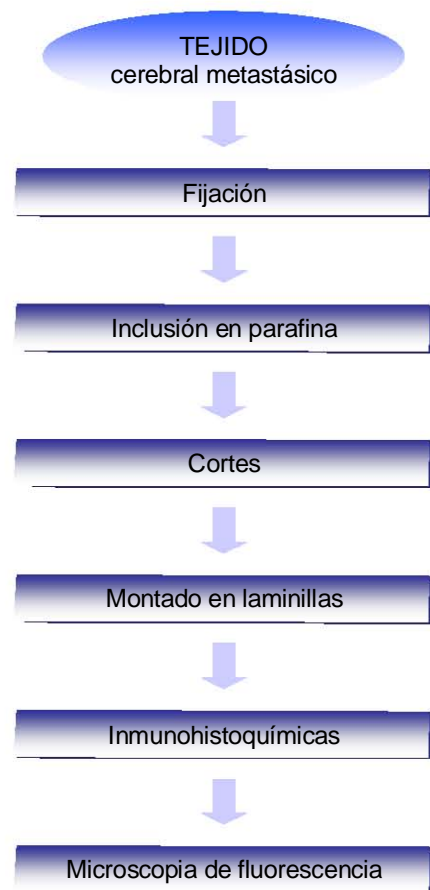
5.2.6. Microscopia de fluorescencia

Ésta se realizó con un microscopio de fluorescencia marca Leica DM/LS (Leica Microsystems, Wetzlar, GmBH) con objetivos de 10×, 20×, 40×, 63× y 100×. El registro de las imágenes observadas se capturó mediante una cámara de video Leica DFC-300FX (Leica Microsystems Digital Imaging, Coldhams Lane, Cambridge, RU) adaptada al microscopio. Las imágenes se proyectaron en una computadora mediante el programa Leica IM1000 versión 1.20 release 9 (Imagic Bildverarbeitung AG, Leica Microsystems, Heerburg, Zwitterland).

Para el estudio de casos de **metástasis cerebral**, los tejidos cerebrales obtenidos de biopsias o necropsias (sección 5.1.1) se procesaron por medio de las técnicas histológicas antes descritas (sección 5.2.4). Posteriormente, se realizaron ensayos inmunohistoquímicos, como se describió para los cerebros de rata, con la diferencia que se empleó como segundo anticuerpo secundario anti-sinaptofisina (1:100 en PBS), en lugar de anti-GFAP (sección 5.2.5). La expresión de NCAM-PSA se evaluó por medio de la microscopía de fluorescencia antes descrita (sección 5.2.6).

**DIAGRAMA DE FLUJO. MODELO DE NEUROTOXICIDAD EN RATAS
INDUCIDO POR LA FRACCIÓN 25-25 DEL AMILOIDE-BETA.**







VI RESULTADOS

6.1. MODELO DE NEUROTOXICIDAD DE LA EA EN RATA

Se inyectó a dos grupos de ratas por medio de cirugía estereotáxica en la región CA1 del hipocampo. El hipocampo es la región del cerebro en donde se encuentran los depósitos de A β y, por lo tanto, es la región donde ocurre mayor pérdida neuronal en la neurodegeneración de tipo Alzheimer.

Al grupo de ratas tratado A β se les microinyectó el péptido A β (25-35) usando como vehículo SSI, con la finalidad de reproducir los eventos neurotóxicos a nivel molecular que se llevan a cabo en la EA, tras la presencia de la fracción neurotóxica del péptido A β . Como control de dicha inyección se empleó un grupo de ratas (grupo control) quienes fueron inyectadas de la misma manera, pero sólo empleando vehículo.

Con la finalidad de descartar, que el daño que se observase fuera causado por la acción mecánica de la cirugía estereotáxica, se utilizó el grupo de ratas intactas que no fueron inyectadas y fueron sacrificadas luego de previa anestesia con hidrato de cloral.

Los animales que si fueron microinyectadas por cirugía estereotáxica, fueron sacrificados a las 8 horas, 24 horas, 15 días y 30 días con la finalidad de observar la cinética de expresión de NCAM-PSA tras el tratamiento.

El cerebro se preparó como se indica en material y métodos y se marcó con un anticuerpo anti-NCAM-PSA marcado con un fluoróforo verde (FITC, isotiocianato de fluoresceína). Con la finalidad de ver si el daño provocado por la inyección mecánica era el mismo que el provocado por la suma de la inyección mecánica y la presencia del A β (25-35), se realizó un marcaje con anticuerpo anti-GFAP marcado con un fluoróforo rojo (Rhodamina-RedX) para poder observar la presencia de astrocitos



reactivos, indicativo de inflamación y daño. Los núcleos fueron marcados con Vecta-Shield que contiene un intercalador de ácidos nucleicos que fluoresce con luz azul (Dapi).

Para los grupos de ratas sometidos a cirugía estereotáctica; por cada tiempo se analizaron 4 laminillas del grupo control y 4 del grupo tratado A β . En cada laminilla se analizó la región CA1 del hipocampo, que fue la zona en donde se depositaron las sustancias empleadas (SSI y A β (25-35), también se analizaron las zonas cercanas al depósito. Se observó inmunorreactividad positiva en el cuerno de Ammón, en el giro dentado y el cuerpo calloso. Se observó que las zonas en donde se mostraba una mayor inmunorreactividad a NCAM-PSA fueron: la región CA1 del cuerno de Ammón, el cuerpo calloso y el giro dentado, por lo que fueron las zonas consideradas para el análisis tanto de los grupos sometidos a cirugía estereotáctica como del grupo de ratas control.

De acuerdo al análisis realizado se eligió la imagen más representativa de cada tiempo y cada tratamiento para ser mostrada en los resultados.

6.1.1. Grupo de ratas intactas

Encontramos que en las ratas intactas se presentó una expresión de baja intensidad de NCAM-PSA en tres regiones principalmente: en el giro dentado, en la región CA1 y en el cuerpo calloso. La mayor expresión se observó en la región CA1 y la menor expresión en las neuronas del giro dentado y cuerpo calloso, siendo a penas visible la inmunorreactividad de NCAM-PSA en esta última región (Fig. 13).

En relación con la astrogliosis, se encontraron muy pocos astrocitos reactivos en el cuerpo calloso, en la región CA1 (Fig. 13C) y el giro dentado (Fig. 13A y B).

6.1.2. Grupo de ratas control

A las 8 horas, en la región CA1 se observó un incremento en la expresión de NCAM-PSA. La inmunorreactividad a NCAM-PSA en estas neuronas se observó claramente, en el soma y en algunas neuritas.



En el cuerpo calloso también se observó aumento en la inmunorreactividad a NCAM-PSA, aunque no como en la región CA1 (Fig. 14A).

En las neuronas del giro dentado se observó un aumento en la expresión de NCAM-PSA. La inmunorreactividad a NCAM-PSA se observó tanto en el soma neuronal como en las neuritas (Fig. 15A). La inmunorreactividad observada fue menor que en el cuerpo calloso y la región CA1.

A las 24 horas, la inmunorreactividad a NCAM-PSA disminuyó en la región CA1 (Fig. 14C), en el cuerpo calloso (Fig. 14C) y el giro dentado.(Fig. 15C).

A los 15 días, se observó que la expresión de NCAM-PSA, aumentó ligeramente en la región CA1 (Fig. 15E). La expresión de NCAM-PSA se mantiene constante en el cuerpo calloso (Fig. 15E) y el giro dentado (Fig. 15E).

A los 30 días, la inmunorreactividad a NCAM-PSA aumentó considerablemente en el cuerpo calloso (Fig. 14G) y el giro dentado (Fig. 15G).

En cuanto a la astrogliosis, se observó un notorio incremento en la cantidad de astrocitos reactivos en las tres zonas analizadas. Se vió que, en el cuerpo calloso y en la región CA1, conforme pasó el tiempo la astrogliosis se mantuvo constante (Fig. 14A, C, E y G), a diferencia de lo observado en el giro dentado en donde la astrogliosis disminuyó conforme transcurrió el tiempo (Fig. 15A, C, E y G).

6.1.3. Grupo de ratas “tratadas A β ”

A las 8 horas, se observó incremento en la inmunorreactividad de NCAM-PSA, en la región CA1. En esta zona, la expresión se encontró tanto en el soma neuronal como en diversas neuritas (Fig. 14B). En el cuerpo calloso no se observó aumento en la inmunorreactividad de NCAM-PSA (Fig. 14B). Por el contrario, en el giro dentado si se observó aumento en la expresión de NCAM-PSA. La expresión fue homogénea a lo largo del giro dentado y se encontró principalmente en el soma neuronal (Fig. 15B).



A las 24 horas, la inmunorreactividad a NCAM-PSA aumentó considerablemente en el cuerpo calloso (Fig. 13D). Por otro lado, en el giro dentado la expresión de NCAM-PSA disminuyó considerablemente (Fig. 15D).

A los 15 días, en el cuerpo calloso la inmunorreactividad a NCAM-PSA disminuyó (Fig.14F) y en el giro dentado se mantuvo constante (Fig.15F).

A los 30 días, en el cuerpo calloso, la inmunorreactividad a NCAM-PSA se mantuvo constante (Fig.14H). Sin embargo, en el giro dentado se observó un aumento considerable en la expresión de NCAM-PSA (Fig.15H).

En cuanto a la astrogliosis, se observó a las 8 horas un aumento en la cantidad de astrocitos reactivos en el cuerpo calloso (Fig. 14B) y giro dentado (Fig. 15B), siendo mayor la astrogliosis en el giro dentado. En el cuerpo calloso la cantidad de astrocitos reactivos aumentó a las 24h horas (Fig. 14D), manteniéndose constante a los 15 días y disminuyendo a los 30 días (Fig. 14F y H). En el giro dentado a las 24 horas se observó una disminución en la astrogliosis (Fig. 15D) y a los 15 días la cantidad de astrocitos reactivos disminuyó aún mas (Fig. 15F). A los 30 días la cantidad de astrocitos reactivos aumentó de manera importante (Fig. 15H).

Con la finalidad de poder apreciar de mejor manera los resultados observados, se realizó un análisis semicuantitativo, en donde se marcó con tres cruces, la mayor expresión de NCAM-PSA; con dos, la expresión media y con una, una baja expresión.

Con base a lo anterior, se construyó una gráfica de la expresión de NCAM-PSA en el cuerpo calloso (Fig. 16), en donde se observa que el comportamiento de la expresión de NCAM-PSA, en el grupo control y tratado A β , es diferente. Se observa que a las 8 horas ambos grupos muestran una inmunorreactividad semejante, sin embargo a las 24 horas y 15 días la expresión de NCAM-PSA es mucho mayor en el grupo tratado A β , y a los 30 días, el grupo control muestra la misma inmunorreactividad a NCAM-PSA que el grupo tratado A β .

Debido a que dicho análisis sólo es semicuantitativo, no se puede saber si las diferencias observadas fueron significativas.



De igual forma se construyó una gráfica para la zona del giro dentado (Fig. 17), en donde se observa que el comportamiento en la expresión de NCAM-PSA en el grupo control y el grupo tratado A β son semejantes, a diferencia que el grupo control muestra una expresión menor que el grupo tratado problema a los 30 días. Sin embargo, es necesario realizar un análisis estadístico para poder saber si las diferencias observadas son significativas.

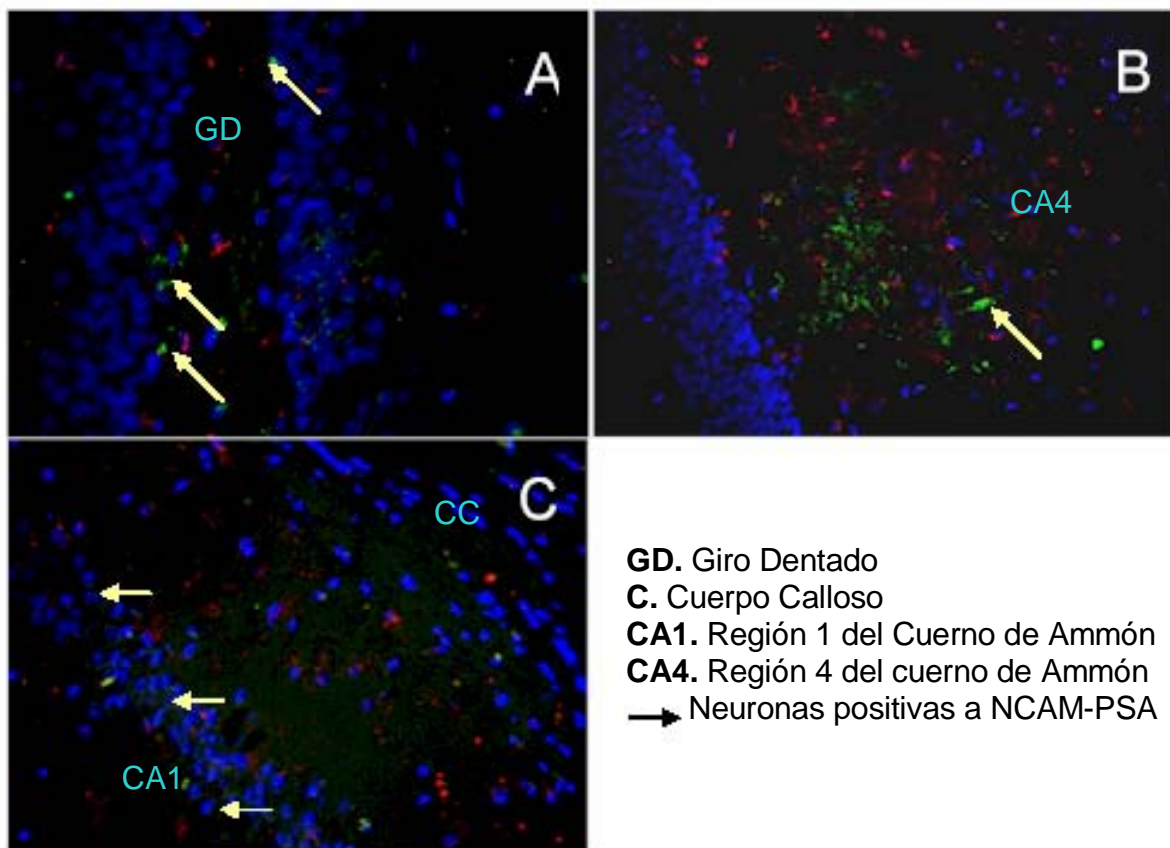


Fig. 13. Expresión basal de NCAM-PSA en cerebros de rata del grupo de ratas intactas. Se marcó NCAM-PSA (verde) y GFAP (rojo). Un color amarillo indica colocalización. Los núcleos fueron marcados con Vecta Shield-Dapi (azul). **(A)** pico del giro dentado **(B)** región media del giro dentado (CA4) **(C)** en el lado izquierdo se muestra la región CA1 en donde se observan los núcleos grandes y redondeados. En el lado derecho superior se muestra el cuerpo calloso, en donde se observan núcleos más pequeños y alargados. Aumento 20x

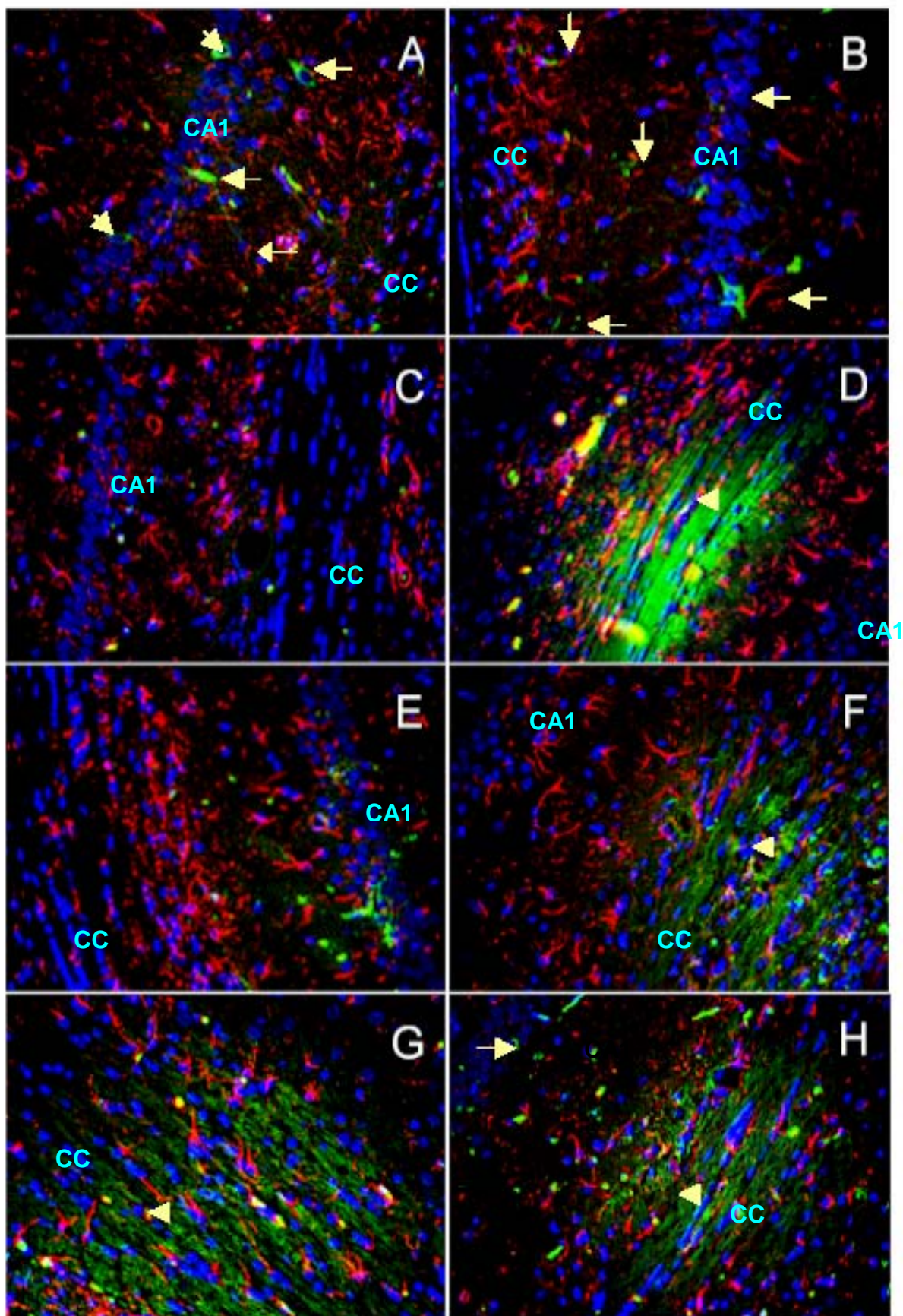




Fig 14. Expresión de NCAM-PSA a diferentes tiempo, después de la inyección intrahipocampal de SSI y A β (25-35) en la región CA1 y cuerpo calloso. Se marcó NCAM-PSA (verde) y GFAP (rojo). Un color amarillo indica colocalización. Los núcleos fueron marcados con Vecta Shield-Dapi (azul). En los paneles de la izquierda (A, C, E y G) se muestra el resultado observado con los cortes de cerebro del grupo de ratas microinyectadas con SSI. En los paneles de la derecha (B, D, F y H) se observan los cortes de cerebro del grupo de ratas microinyectadas con A β (25-35).

De arriba hacia abajo se muestran los cortes obtenidos a las 8h (A y B), 24h (C y D), 15 días (E y F) y 30 días (G y H).

Aumento 40x.

CA1. Región 1 del Cuerno de Ammón

CC. Cuerpo calloso

→ Neuronas positivas a NCAM-PSA

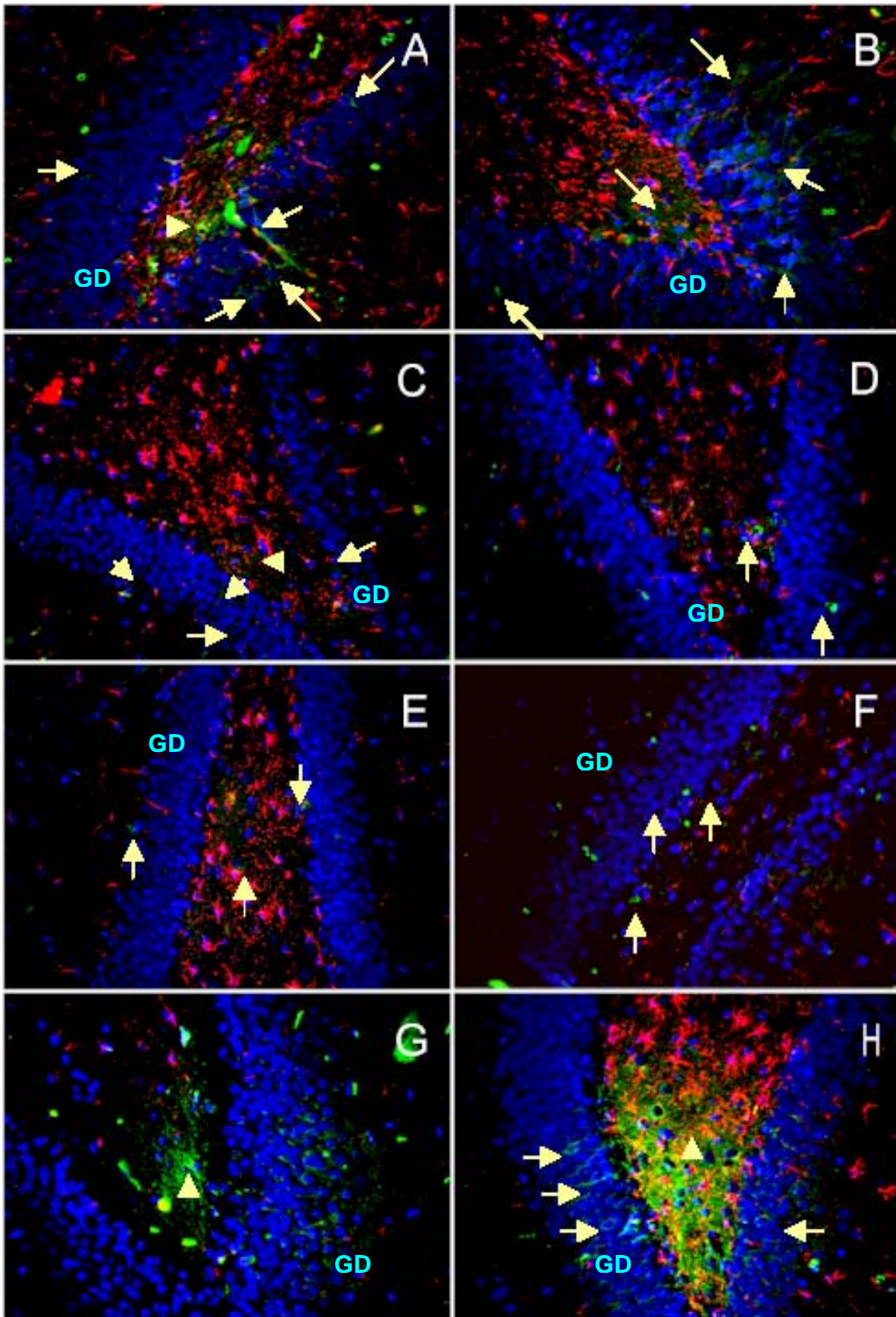




Fig. 15. Expresión de NCAM-PSA a diferentes tiempo, después de la inyección intracraneal de SSI y A β (25-35) en el giro dentado. En los páneles de la izquierda (A, C, E y G) se muestra el resultado observado con los cortes de cerebro del grupo de ratas microinyectadas con SSI. En los paneles de la derecha (B, D, F y H) se observan los cortes de cerebro del grupo de ratas microinyectadas con A β (25-35).

De arriba hacia abajo se muestran los cortes obtenidos a las 8h (A y B), 24h (C y D), 15 días (E y F) y 30 días (G y H). Aumento 40x

GD. Giro dentado

→ Neuronas positivas a NCAM-PSA

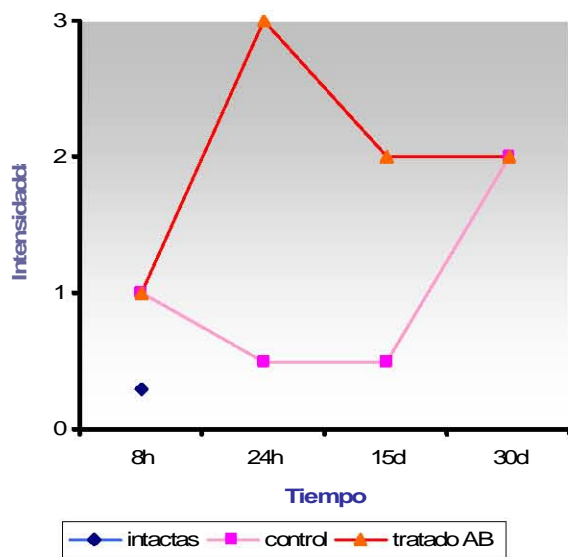


Fig. 16. Representación semi-cuantitativa de la expresión de NCAM-PSA a diferentes tiempos, en el cuerpo calloso de cerebros de rata inyectados de manera intra-hipocampal por medio de cirugía estereotáctica con SSI y con A β (25-35).

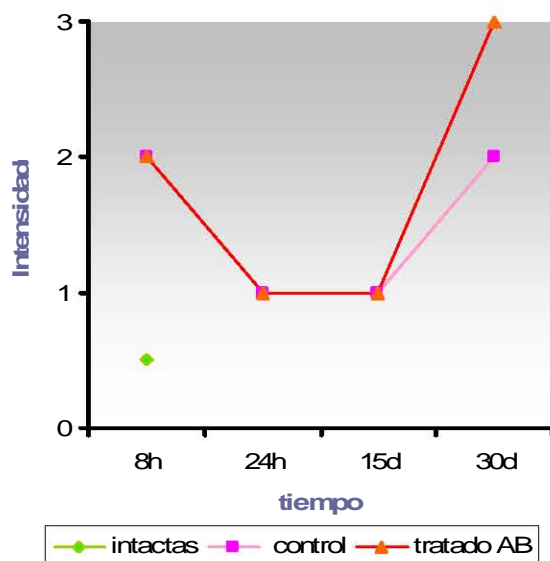


Fig. 17. Representación semicuantitativa de la expresión de NCAM-PSA a diferentes tiempos, en el giro dentado de cerebros de rata inyectados de manera intra-hipocampal por medio de cirugía estereotáctica con SSI y con A β (25-35).

6.2. CASOS DE METÁSTASIS CEREBRAL

Para recabar información adicional sobre el papel que desempeña NCAM-PSA en el proceso de plasticidad cerebral; se analizaron tejidos de metástasis en cerebro con diferente origen primario, en donde realizamos un marcaje con anti-NCAM-PSA (verde), se realizó un segundo marcaje con sinaptofisina (rojo), el cual marca terminales nerviosas. En caso de que NCAM-PSA se encuentre en las terminales sinápticas se tratará de una colocalización observándose una marca en amarillo. Se marcaron los núcleos con Vecta-Shield con Dapi.

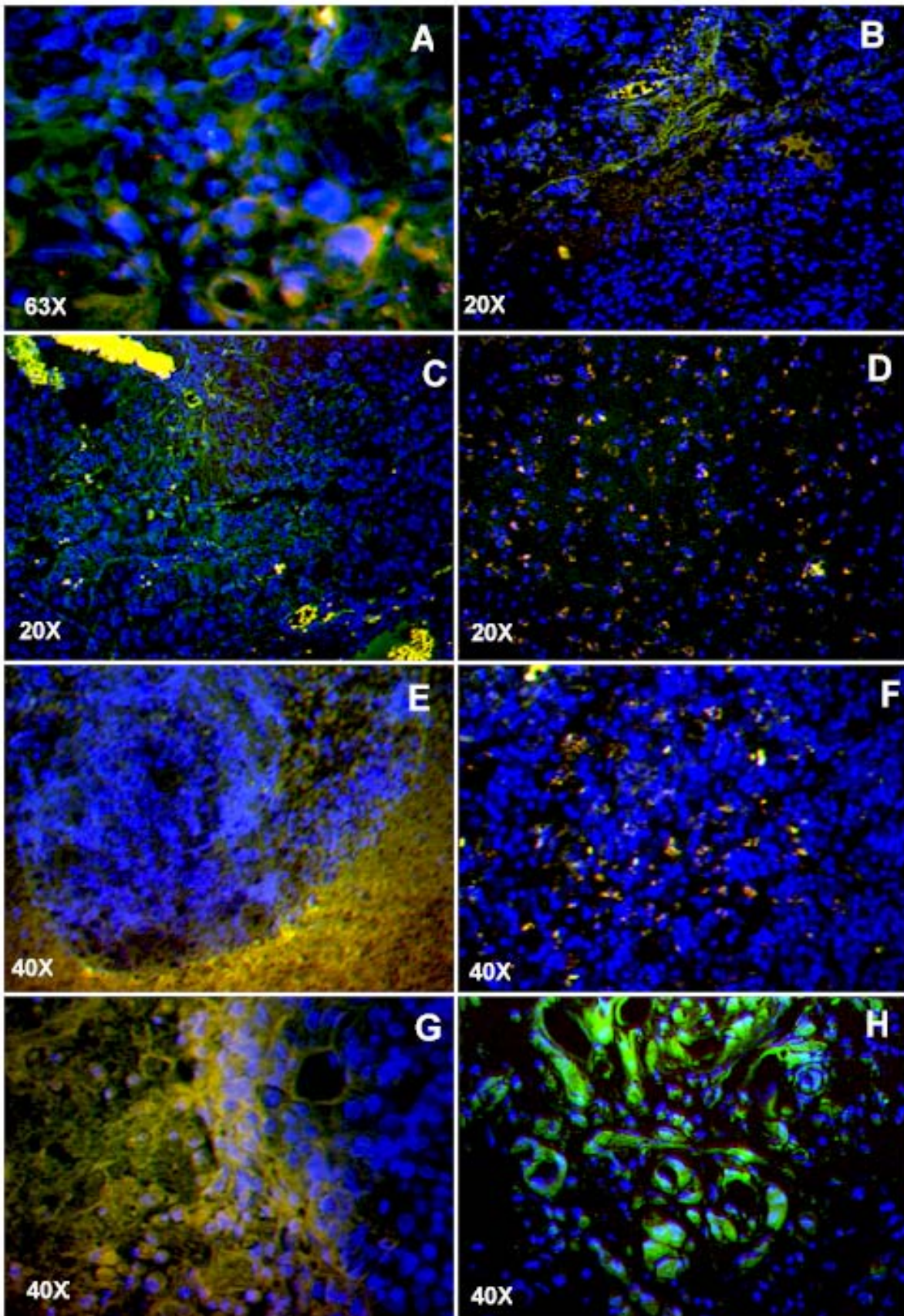
Observamos que en todos los casos de metástasis de tejido cerebral provenientes de diferentes tejidos primarios, una intensa expresión de PSA-NCAM. En ninguno de los casos observamos tejido cerebral íntegro e incluso en algunos no se observa tejido (Fig. 18).

Observamos en la metástasis del carcinoma epidermoide pulmonar (MCEP) (Fig.18A) la mayor expresión de NCAM-PSA en células no neuronales, una menor expresión en residuos neuronales y la mínima expresión en el endotelio de vasos sanguíneos. En el caso de metástasis de adenocarcinoma pulmonar (MAcP; Fig. 18B) la mayor expresión la observamos en tejido no neuronal, sin embargo se observó la expresión de NCAM-PSA, en los vestigios del tejido neuronal. En la metástasis del adenocarcinoma renal (MAcR; Fig. 18C), NCAM-PSA se expresó abundantemente en las células no neuronales y muy poco en los vestigios de tejido neuronal. En uno de los casos analizados (Fig. 18D) ya no se observó tejido neuronal. En MAcR, NCAM-PSA se expresó en el tejido neuronal en una mayor proporción, comparado con MAcP y MCEP (Fig. 18A, B y C). En el linfoma no Hodgkin (LnH) (Fig. 18 E y F). NCAM-PSA se expresó en el tejido conectivo de formación glandular. En el caso de la metástasis del cáncer de mama de tipo canalicular (MCM; Fig. 18 G y H) NCAM-PSA se expresó claramente en el tejido mamario, no existiendo ya tejido neuronal. En la metástasis de cáncer de tiroides de tipo folicular (MCT; Fig. 18 I) NCAM-PSA se expresó totalmente en el tejido no neuronal, pues prácticamente ya no existía tejido neuronal. En la metástasis de



melanoma maligno (MMM; Fig. 18 J) la mayoría de NCAM-PSA se expresó en tejido no neuronal observándose una pequeña cantidad en los vestigios neuronales.

De forma similar, a como fueron ordenados los resultados obtenidos en el modelo de neurotoxicidad empleado, se ordenaron los resultados obtenidos en el estudio de metástasis. Se realizó una tabla (tabla 1) con los resultados obtenidos de la expresión de NCAM-PSA en el estudio de metástasis. Se asignó un valor de tres cruces a la máxima expresión observada durante el estudio; un valor de dos a la mediana expresión y un valor de uno a la mínima.



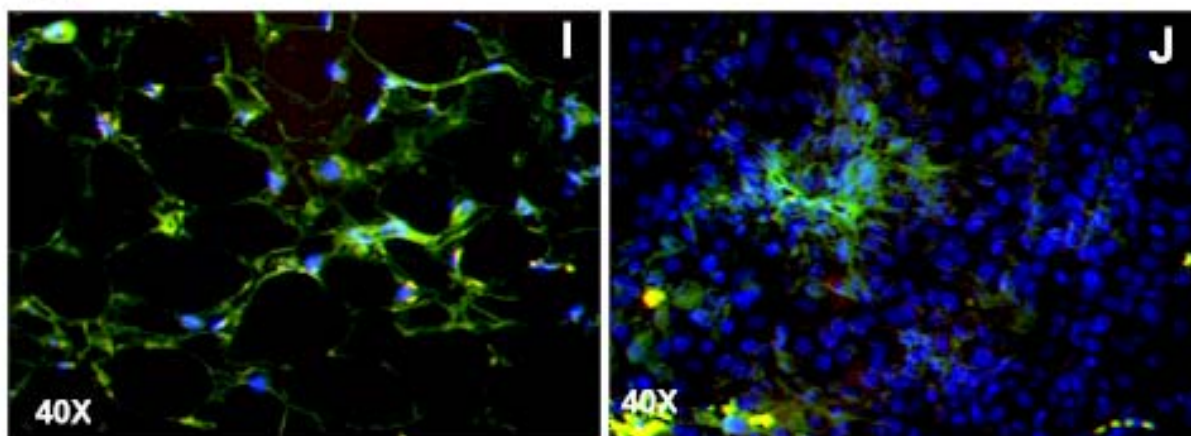


Fig. 18. Biopsias de metástasis en cerebro con diferentes orígenes primarios. Se marcó NCAM-PSA (verde) y sinaptofisina (rojo). Un color amarillo indica colocalización. Los núcleos fueron marcados con Vecta Shield-Dapi (azul). (A) MCEP. (B) MacP (C) MacR. (E y F) LnH. (G y H), MCM. (I) MCT. y (J) MMM.

Tabla 1. Expresión de NCAM-PSA en tejido cerebral y tejido tumoral. Se observa que en la mayoría de los casos la expresión de NCAM-PSA es en el tejido no neuronal y sólo una pequeña proporción en los vestigios de tejido neuronal.

Tejidos metastásicos	NCAM-PSA en tejido metastático	NCAM-PSA en tejido neuronal*
Adenocarcinoma epidérmico pulmonar	++	+
Adenocarcinoma pulmonar	++	+
Adenocarcinoma renal	++	+
Linfoma de no Hodgking	+++	---
Cáncer de mama	++	+
Cáncer de tiroides	+++	---
Melanoma maligno	++	+

* trazas de tejido neuronal.

+ Baja expresión.

++ Mediana expresión.

+++ Alta expresión.

--- Sin expresión.

VII DISCUSIÓN

Hemos evidenciado el patrón de expresión de NCAM-PSA en cerebro en dos eventos antagónicos: uno de neurotoxicidad inducida por la inyección intrahipocampal, de la fracción $A\beta(25-35)$, en el cerebro de rata, y otro de metástasis tumoral en cerebro humano con origen primario diverso.

7.1 MODELO DE NEUROTOXICIDAD EN CEREBRO DE RATA INDUCIDO POR LA FRACCIÓN $A\beta(25-35)$

La EA es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por pérdida de la memoria progresiva y por la presencia de marañas neurofibrilares y placas neuríticas [18-20]. El componente de las placas neuríticas es el péptido $A\beta$ [22 y 23]. Se sabe que la fracción neurotóxica del péptido $A\beta$ es la fracción 25-35 [39-43].

Se ha observado que en cerebros con EA existe cierta plasticidad reactiva dependiente del uso [57]. Una de las moléculas que participa activamente en el fenómeno de plasticidad es la NCAM-PSA [65]. Hasta ahora se desconoce si la plasticidad existente en los cerebros con EA, ayuda a la patogénesis de la enfermedad o tiene un efecto neuroprotector.

Se sabe que NCAM-PSA se expresa de manera abundante durante el desarrollo embrionario y que su expresión disminuye durante la maduración y diferenciación neuronal [120]. Diversos autores han reportado cambios en la expresión basal de NCAM-PSA en la región del hipocampo; bajo condiciones de estrés crónico con condicionamiento al miedo [124], tras la administración aguda de cocaína en ratas [125], durante el proceso de memoria y aprendizaje [126 y 127] y posterior a un trauma cerebral severo [65]. No obstante, el patrón de la expresión de NCAM-PSA, tras la administración intrahipocampal de $A\beta(25-35)$ aún no ha sido reportado. Por lo que nosotros evaluamos la expresión de NCAM-PSA en un modelo de



neurotoxicidad en ratas, inducido por la inyección intrahipocampal de la fracción A β (25-35).

Cuando nosotros analizamos el hipocampo de ratas control, sacrificadas bajo anestesia, encontramos una expresión basal de NCAM-PSA en el giro dentado del hipocampo, la región CA1 y el cuerpo calloso. Cabe mencionar que la expresión de NCAM-PSA, en el cerebro adulto, aparece en zonas del cerebro donde ocurre una constante neurogénesis y plasticidad sináptica [120], como lo es el hipocampo [121-123].

Debido a los efectos neurotóxicos que se ha reportado induce la inyección intrahipocampal de A β (25-35) [39-43], esperábamos un incremento en la inmunorreactividad de NCAM-PSA en el grupo tratado A β y en el grupo control una inmunorreactividad sin cambio, al ser comparados con el grupo intactas. Sin embargo, observamos que, el grupo control mostró aumento en la inmunorreactividad a NCAM-PSA, al igual que el grupo tratado A β .

Pensamos que la expresión de NCAM-PSA en el grupo control se debe a que el proceso de inyección por medio de cirugía estereotáctica provoca daño a las células neuronales, ya que NCAM-PSA se expresa como respuesta a un trauma cerebral severo y permite el crecimiento de nuevas neuritas, con la finalidad de reemplazar a aquellas perdidas a causa de la lesión [120, 128 y 129]. Para poder corroborar lo anterior hicimos un marcaje con GFAP y encontramos gran cantidad de astrocitos reactivos; en la región donde fue depositada la SSI (región CA1) y en otras zonas. La presencia de los astrocitos reactivos en la región CA1 afirmó que el proceso de inyección por medio de cirugía estereotáctica provocó un daño celular. La glia se activa con la finalidad de remover las neuronas o terminales nerviosas dañadas [130]. Las pérdidas neuronales, o bien sólo axonales, posiblemente provocaron una interrupción del circuito neuronal, por lo que pensamos, que fue necesario una reestructuración de las conexiones sinápticas dañadas; función que dirige la NCAM-PSA [128 y 129].

Nosotros observamos presencia de astrocitos reactivos y aumento en la inmunoreactividad, de NCAM-PSA en la zona directamente lesionada y en otras



zonas aledañas al daño (giro dentado y cuerpo calloso). Lo cual nos sugiere que el aumento en la inmunorreactividad de NCAM-PSA, en las zonas cercanas al daño, pudo ser ocasionado por la expansión del daño que provoca la activación del proceso inflamatorio. Ya que, se ha reportado que después de un daño al SNC, además de la expresión de NCAM-PSA [81 y 120], células características del proceso inflamatorio liberan diversas citocinas, las cuales pueden potenciar el daño inicial [10-13]. Otra posibilidad es que el daño haya llegado a esta zona por la presión que ejerce sobre las células la SSI microinyectada.

Nuestros resultados en el grupo tratado A β muestran que en el cuerpo calloso hay mayor inmunorreactividad a NCAM-PSA a las 24 horas y 15 días y mayor astrogliosis en todos los tiempos analizados (8 y 24 horas, 15 y 30 días), en comparación con el grupo control. La glía se activa por la presencia de péptido A β [8, 130-134] y provoca la liberación de moléculas proinflamatorias que incluyen citocinas [131 y 133, 134], interleucinas [133, 135 y 136], monóxido de nitrógeno radical y otras moléculas potencialmente tóxicas [130 y 137], que provocan un daño celular mayor al inicial [130-135]. Por lo que, es de esperarse que exista mayor daño en el grupo tratado A β que el grupo SSI, en donde el daño no sólo se debe a la acción mecánica de la inyección por medio de cirugía estereotáxica, sino además a la presencia del A β (25-35). Al existir mayor daño es necesaria una mayor remodelación sináptica, por lo que pensamos que se refleja en una mayor expresión de NCAM-PSA y en una expresión en un periodo de tiempo más corto de la misma, como se observó a las 24 horas en el grupo tratado A β en el cuerpo calloso.

En el giro dentado del grupo tratado A β encontramos que la inmunorreactividad a NCAM-PSA aumentó considerablemente a las 8 horas y posteriormente disminuyó a las 24 horas y 15 días, volviendo a aumentar a los 30 días. La disminución a las 24 horas y a los 15 días pudo deberse a que los niveles de transcripción de las sialiltransferasas o bien la actividad de ellas haya disminuido [85 y 88]. Pensamos que esta disminución, tal vez se deba a que otros mecanismos de reparación axonal hayan sido activados. Uno de los probables mecanismos que pudieron compensar la síntesis de NCAM-PSA, fue la molécula de adhesión celular L1 que, al igual que NCAM-PSA, media la plasticidad celular [138].



Los datos en conjunto sugieren que tras un daño como lo fue la inyección intracerebral por medio de cirugía estereotáxica, hay activación de mecanismos dirigidos hacia la regeneración celular, como son la expresión de NCAM-PSA. Lo cual podría asemejarse a lo observado posterior a un trauma cerebral severo en donde se ha reportado que existe cierta plasticidad posterior al daño [120, 128 y 129]. Posiblemente, cuando ocurre el daño neuronal, moléculas del proceso inflamatorio influyan en la polisialilación de esta molécula de adhesión celular. Sin embargo, como se desconoce si siempre existe astrogliosis conjuntamente con expresión de NCAM-PSA, cabe la posibilidad de que haya otros mecanismos de regulación autócrinos o parácrinos, involucrados.

Diversos autores han reportado que las citocinas liberadas durante el proceso inflamatorio pueden tener una función neuroprotectora [139], activando entre muchos otros factores, a moléculas de adhesión celular [140]. Sin embargo, otros autores han reportado que cuando no hay un equilibrio entre las citocinas liberadas, se produce un daño celular mayor al inicial [139]. Nosotros encontramos que en el grupo control y tratado A β , hay presencia de NCAM-PSA y de astrocitos reactivos, en el giro dentado y el cuerpo calloso, regiones diferentes a la inicialmente dañada. Debido al papel dual de las citocinas, la presencia de astrocitos reactivos puede estar indicando dos situaciones diferentes. Por un lado, los astrocitos reactivos presentes en todos los casos, pueden indicar daño; pero también, dicha astrogliosis puede indicar presencia de citocinas que están cumpliendo un papel neuroprotector, promoviendo dentro de otros mecanismos, la reparación neuronal. Para poder responder esta cuestión y poder esclarecer el papel que juega la inflamación en la neuroplasticidad, es necesario medir marcadores de daño celular conjuntamente con la astrogliosis y la presencia de NCAM-PSA. Así como medir algunas citocinas, para evaluar si hay correlación entre los niveles de estas y la presencia de NCAM-PSA.

Para poder obtener mejor información a partir de los datos preliminares en este modelo de neurotoxicidad, es necesario contar con muestras con un tiempo mayor a los 30 días, para así poder apreciar cómo es el patrón expresión de NCAM-PSA posterior al proceso inflamatorio provocado por la inyección por medio de cirugía



estereotáxica. De esta manera se podrá definir la expresión de NCAM-PSA tras el daño provocado sólo por la presencia de A β (25-35). También, sería conveniente acortar los intervalos de tiempo de valoración; así como obtener muestras antes de las 8 horas. Todo esto, con la finalidad de poder observar con mayor precisión la cinética de expresión de NCAM-PSA y poder entender mejor el papel que desempeña NCAM-PSA en la plasticidad reactiva en la EA.

Es necesario realizar un análisis cuantitativo, porque en algunos casos la inmunoreactividad a NCAM-PSA es muy baja y diferencias pequeñas no fueron perceptibles con el análisis semicuantitativo empleado; lo cual limitó una buena apreciación del fenómeno.

7.2. METÁSTASIS EN CEREBRO

Como se vió en los resultados, al parecer, la expresión de NCAM-PSA, como molécula que promueve el crecimiento axonal, está altamente regulada. Por lo que pensamos que el mejor modelo para comparar y comprender este fenómeno es aquel en el que la expresión de NCAM-PSA no se encuentre regulada. Tal es el caso del modelo empleado de metástasis en cerebro.

La principal complicación y causa de muerte en el cáncer es la metástasis. La metástasis ocurre por un alto potencial celular invasivo, proliferativo y metastásico en una masa clonal cancerosa [116]. Se ha encontrado expresión de NCAM-PSA en diferentes tumores pediátricos tumorales que culminan en metástasis [98-100], su expresión se ha relacionado con la progresión del tumor hacia metástasis y con el pobre pronóstico del paciente [99-104].

Cuando las masas tumorales invasoras logran vencer todas las barreras y llegan al cerebro, comienza una destrucción del tejido cerebral [111-113]. Dicha destrucción provoca activación de la glía [140]. Probablemente, como sucede en un trauma cerebral severo donde ocurre pérdida neuronal; puede ser que en la metastásis, las células neuronales expresen NCAM-PSA como un intento de regeneración o un



intento de restauración de la función ante la pérdida neuronal sufrida a causa del ataque. Sin embargo, contrario a lo esperado, la mayor expresión de NCAM-PSA se observó en el tejido invasor no neuronal.

Se sabe que NCAM-PSA se expresa en el estado embrionario, además de en el cerebro, en otros tejidos como el páncreas, el corazón y el riñón [90]. Exceptuando el cerebro, en los demás tejidos la expresión de NCAM-PSA en el estado adulto desaparece casi por completo, permaneciendo en niveles significativamente bajos. Por lo que la expresión de NCAM-PSA en la masa tumoral del adenocarcinoma renal, del adenocarcinoma pulmonar y la de tiroides de tipo folicular se pudiera deber a una reexpresión embrionaria, evento comúnmente observado en células transformadas a la malignidad [112]. En este caso, es probable que la expresión haya sido inducida, en parte, por la activación de la glía que ocurrió en el inicio de la invasión de la masa tumoral. Otra posibilidad es que se hayan preservado antígenos gliales por parte de las células tumorales.

La expresión de NCAM-PSA en las masas tumorales metastásicas de tejidos primarios que en estado embrionario no expresan NCAM-PSA, no es posible que obedezcan a reexpresiones embrionarias. En todo caso la expresión observada de NCAM-PSA, puede ser que se deba a la preservación de fracciones neuronales mimetizadas de manera conveniente

Cualquiera de los tres probables mecanismos descritos, es probable que la masa tumoral metastásica, se vea favorecida a través de los efectos de estimulación trófica, proliferación y dirección celular que ofrece la presencia de NCAM-PSA [142 y 143].

Es probable que bajo la expresión de NCAM-PSA las células tumorales puedan proliferar e invadir, a la vez que proveerse de alimento; en un sustrato nuevo e invadido, el cerebro. De esta manera, pudiera ser que se garantice una metástasis exitosa y la proliferación de nuevas clonas tumorales, que repitan el evento tumoral igual que el tejido de origen, con el mismo fenotipo invasivo, proliferante, agresivo y metastásico.



Como se observó que el tejido neuronal fue remplazado casi por completo por la masa tumoral metastásica y que es ella quien expresa NCAM-PSA. Entonces, es posible que al expresar la masa tumoral metastásica NCAM-PSA, esto no sólo le permita establecerse exitosamente en el tejido secundario, sino además, continuar con su crecimiento celular incontrolado, ya que NCAM-PSA confiere a las células efectos tróficos y proliferantes [141 y 142], contribuyendo a que se pueda consumir y sustituir el tejido secundario.

Se hace obligado realizar un análisis de la cinética de expresión de NCAM-PSA en modelos experimentales controlados de inducción metastásica, ya sea en animales *in vivo*, o en cultivos celulares, *in vitro*, para determinar la curva de expresión de esta molécula de adhesión y establecer con mayor precisión, su función en la metástasis. De igual forma, es importante establecer si la expresión de NCAM-PSA se estimula por mecanismos miméticos neuronales, de re-expresión embrionaria, de preservación de estructuras funcionales o la combinación de una o más de estas posibilidades.

7.3. CORRELACIÓN DE EA y METÁSTASIS

Correlacionando nuestros hallazgos en ambos modelos, se observa que la expresión de NCAM-PSA probablemente no sólo se rija a través de mecanismos proinflamatorios, ya que en el modelo tumoral metastásico, la proliferación tumoral es favorecida por la inmunosupresión, dejando a la respuesta inmune sin el control total de regulación de la expresión de la NCAM-PSA. En todo caso, sin la regulación inmunológica, cabría la posibilidad de que otras vías celulares, moleculares o de otro tipo, se estuvieran activando concomitantemente con la inmunológica, o en lugar de ésta.



VIII CONCLUSIONES

- El proceso de microinyección por medio de cirugía estereotáxica, provoca daño neuronal y por lo tanto la expresión de NCAM-PSA.
- Existe una expresión oscilante de NCAM-PSA, en la región del giro dentado y del cuerpo calloso, en cerebros de rata posterior a la inyección de A β (25-35) y de SSI. La extirpe celular que mayoritariamente expresa NCAM-PSA es la neurona y en menor proporción la glía.
- La expresión de NCAM-PSA, en el caso de plasticidad reactiva puede estar regulada por la glía a través de las moléculas que ésta secreta al estar activada.
- La expresión de NCAM-PSA en los casos de metástasis en cerebro es en el tejido tumoral, lo cual habla de re-expresión embrionaria de esta molécula, mimetismo o combinación de los dos.
- La expresión de NCAM-PSA en el caso de las células tumorales es dependiente de factores que al aparecer son independientes del proceso inflamatorio.

IX PERSPECTIVAS

- Realizar la cinética de expresión de NCAM-PSA, contando con un análisis cuantitativo.
- En el mismo modelo *in vivo* usado, medir, conjuntamente la expresión de NCAM-PSA, algunas moléculas del proceso inflamatorio como la interleucina 1, monóxido de nitrógeno radical e IFN γ y ver si existe correlación entre la expresión de NCAM-PSA y las moléculas antes mencionadas.
- Evaluar daño celular conjuntamente con la expresión de NCAM-PSA
- Empleando cultivos celulares, medir la expresión de NCAM-PSA, tras la administración de la fracción 25-35 del péptido A β .
- Emplear modelos experimentales controlados de inducción metastásica para evaluar la cinética de expresión de NCAM-PSA en.
- Esclarecer si en las masas tumorales metastásicas, NCAM-PSA se expresa debido a mecanismos miméticos neuronales, de re-expresión embrionaria, de preservación de estructuras funcionales o por la combinación de una o más de estas posibilidades.

X REFERENCIAS

- [1] Steensen N. 2000. *Tejido nervioso*. En: Histología. Genesser S, eds. Editorial Médica Panamericana. Argentina, pp. 327-376
- [2] Lesson TS, Lesson CR y Paparo AA. 1988. *Sistema Nervioso*. En: Texto/Atlas de Histología. Lesson TS, Lesson CR y Paparo AA, eds. McGraw Hill Interamericana. México, pp 263-306.
- [3] Berne RM y Levy MN. 2002. *Fisiología*. Elsevier Science. España, pp 630.
- [4] Olton DS. 1980. *Memory fuctions and the hippocampus*. En: Neurobiology of the hippocampus. Siefert W, ed. Academic press. N.Y, pp. 335-373.
- [5] Fernandez EE. 1996. *Neurobiología básica de la formación hipocámpica*, Rev Neurol. 24:779-784.
- [6] Arias C, Pasantes H, Massieu L, Zentella A y Tapia R. 1997. *Enfermedad de Alzheimer*. En: Enfermedades neurodegenerativas. Mecanismos celulares y moleculares. Fondo de Cultura Económico. México, pp. 133-159.
- [7] Kandel ER. 2000. Neuronas y conducta. En: *Principios de neurociencia*. Kandel, ER, Schwartz JH y Jessel TM. eds. Mc Graw Hill-Interamericana. España, pp 19-35.
- [8] Eddleston M y Mucke L. 1993. *Molecular profile of reactive astrocytes Implications for their role in neurological disease*. Neurosci. 1: 15-36.
- [9] Yong VW. 1996. *Cytokines, astrogliosis, and neurotrophism following CNS trauma*. En: *Cytokines and the CNS*. Ransohoff R y Benveniste E, eds. Boca Raton, FL: CRC. pp 309-327.
- [10] Woodroffe MN, Sarna GS, Wadhwa M, Hayes GM, Loughlin AJ, Tinker A y Cuzner ML. 1991. *Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production*. J. Neuroimmunol. 3:227-236.
- [11] Taupin V, Toulmond S, Serrano A, Benavides J y Zavala F. 1993. *Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand*. J Neuroimmunol. 2:177-185.
- [12] Rimaniol AC, Lekieffre D, Serrano A, Masson A, Benavides J y Zavala F. 1995. *Biphasic transforming growth factor-beta production flanking the pro-inflammatory cytokine response in cerebral trauma*. Neuroreport. 1:133-136
- [13] Lausch RN, Chen SH, Tumpey TM, Su YH y Oakes JE. 1996. *Early cytokine synthesis in the excised mouse cornea* J Interferon Cytokine Res. 1:35-40

- [14] Lopez de Munain A. 1998. *La EA genéticamente determinada*. En: Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Alberca R y López-Pousa S, eds. Médica Panamericana. España, pp.149-157.
- [15] López-Pousa S. 1998. *Epidemiología de las demencias*. En: Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Alberca R. y López-Pousa S, eds. Médica Panamericana. España, pp.137-148.
- [16] Blass JP y Poirier J. 1996. *Pathophysiology of the Alzheimer syndrome*. En: Clinical diagnosis and management of Alzheimer's disease. Gauthier S, eds. Butterworth-Heinemann. USA, pp. 17-31.
- [17] Bermejo F. 1998. *Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Alzheimer*. En: Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Alberca R. y López-Pousa S, eds. Médica Panamericana. España, pp.237-255.
- [18] Arai H, Lee VM, Otvos L Jr, Greenberg BD, Lowery DE, Sharma SK, Schmidt ML y Trojanowski JQ. 1990. *Defined neurofilament, tau and beta-amyloid precursor protein epitopes distinguish Alzheimer from non-Alzheimer senile plaques*. Proc Natl Acad Sci USA. 87:2249–2253.
- [19] Braak H y Braak E. 1991. *Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections*. Brain Pathol. 1:213–216.
- [20] Coyle JT, Price DL y Delong MR. 1983. *Alzheimer's disease: a disorder of central cholinergic innervation*. Science 219:1184–1190.
- [21] Kurt MA, Davies DC y Kidd M. 1997. *Paired helical filament morphology varies with intracellular location in Alzheimer's disease brain*. Neurosci Res Lett. 239:241.
- [22] Glenner GG. 1988. *Alzheimer's disease: its proteins and genes*. Cell. 52:307-308.
- [23] Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN y Beyreuther K. 1985. *Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels*. EMBO J 4:2757–2763.
- [24] Coria F, Rubio I y Bayon C. 1994. *Alzheimer's disease, β -amyloid dosis, and aging*. Rev Neurosci. 5:275:292.
- [25] Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N y Ihara Y. 1994. *Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)*. Neuron. 3:45–53.
- [26] Jarrett JT y Lansbury PT. 1993. *Seeding one-dimensional crystallization of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?* Cell. 73:1055–1058.
- [27] Mattson MP. 1997. *Cellular actions of amyloid precursor protein*. Physiol Rev 77:1081–1131.
- [28] Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA y Klein WL. 1998. *Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins*. Proc Natl Acad Sci USA. 95:6448–6453.

- [29] Zhu YJ, Lin H y Lal R. 2000. *Fresh and nonfibrillar amyloid β protein (1–40) induces rapid cellular degeneration in aged human fibroblasts: evidence for $A\beta$ -protein channel-mediated cellular toxicity*. FASEB J. 14:1244–1254.
- [30] Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H y Roger A. *RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease*. Nature. 382:685–691.
- [31] Behl C, Davis JB, Lesley R y Schubert D. 1994. *Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity*. Cell. 77:817–827.
- [32] Haass C, Sciossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow BD y Selkoe DJ. 1992. *Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism*. Nature. 359:322–325.
- [33] Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schiossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, McCormack R, Wolfert R, Selkoe D, Lieberburg I y Schenk D. 1992. *Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids*. Nature. 359:325–327.
- [34] Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I y Schenk DB. 1993. *Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid*. J Neurochem. 61:1965–1968.
- [35] Bhatia R, Lin H y Lal R. 2000. *Fresh and globular amyloid β protein (1–42) induces rapid cellular degeneration: evidence for $A\beta$ -protein channel-mediated cellular toxicity*. FASEB J. 14:1233–1243.
- [36] Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB y Selkoe DJ. 1999. *Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons*. J. Neurosci. 19:8876:8884.
- [37] Lansbury Jr PT. 1999. *Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis*. Proc Natl Acad Sci USA. 96:3342–3344.
- [38] Yankner BA, Duffy LK y Kirschner DA. 1990. *Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides*. Science. 250:279–282.
- [39] Harkany T, O'Mahony S, Kelly JP, Soos K, Toro I, Penke B, Luiten PG, Nyakas C, Gulya K y Leonard BE. 1998. *β -Amyloid (Phe(SO₃)₂₄)_{25–35} in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation*. Behav Brain Res. 90:133–145.
- [40] Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG y Cotman CW. 1993. *Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state*. J Neurosci. 13:1676–1687.
- [41] Pike CJ, Overman MJ y Cotman CW. 1995. *Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro*. J Biol Chem. 270:23895–23898.
- [42] Schubert D, Behl C, Lesley R, Brack A, Dargusch R, Sagara Y y Kimura H. 1995. *Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism*. Proc Natl Acad Sci USA. 92:1889–1993.

- [43] Tang Y, Yamada K, Kanou Y, Miyazaki T, Xiong X, Kambe F, Murata Y, Seo H y Nabeshima T. 2000. *Spatiotemporal expression of BDNF in the hippocampus induced by the continuous intracerebroventricular infusion of beta-amyloid in rats*. Brain Res Mol. 80:188-197.
- [44] Maccioni RB, Munoz JP y Barbeito L. 2001. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Arch Med Res. 32:367-381.
- [45] Smith MA, Taneda S, Richey PL, Miyata S, Yan SD, Stern D, Sayre LM, Monnier VM y Perry G 1994. *Advanced maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology*. Proc Natl Acad Sci USA. 91:5710-5714.
- [46] Smith MA y Perry G. 1994. *Alzheimer disease: An imbalance of proteolytic regulation?* Med Hypoth. 42:277-279.
- [47] Castellani R, Smith AM, Richey LP y Perry G. 1996. *Glycosilation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease*. Brain Res. 737:195-200.
- [48] Henderson VW y Buckwalter JG. 1994. *Cognitive deficits of men and women with Alzheimer's disease*. Neurology. 44:90-96.
- [49] Matsumoto A. 1991. *Synaptogenic action of sex steroids in developing and adult neuroendocrine brain*. Psychoneuroendocrinology. 16:25-40.
- [50] Smith MA, Sayre LM, Anderson VE, Harris PL, Beal MF, Kowall N y Perry G. 1998. *Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine*. J Histochem Cytochem. 46:731-735.
- [51] Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA y Van Eldik LJ. 1998. *Amyloid beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release*. Brain Res. 785:195-206.
- [52] Yan SD, Chen X, Schmidt AM, Brett J, Godman G, Zou YS, Scott CW, Caputo C, Frappier T, Smith MA, Perry G, Yen S-H y Stern N D. 1994. *Glycated tau protein in Alzheimer disease. A mechanism for induction of oxidant stress*. Proc Natl Acad. Sci. USA. 91: 7787:7791.
- [53] Lowe JB y Marth JD. 1999. *Structures common to different types of glycans*. En: Essentials of Glicobiology. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G y Marth J, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press.USA, pp. 211-252.
- [54] Coutinho PM y Henrissat B. 1999. *Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach*. En: *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. Gilbert HJ, Davies G, Henrissat B y Svensson B, eds. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, pp. 3-12.
- [55] Dwek RA. 1996. *Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars*. Chem Rev. 96:683-720.
- [56] Ramakrishnan B, Shab P y Qasba PK. 2001. *A-Lactalbumin (LA) Stimulates Milk β -1,4-Galactosyltransferase I (β 4Gal-T1) to transfer glucose from UDP-glucose to N-Acetylglucosamine*. J Biol Chem. 276: 37665-3767.

- [57] Redolat R y Carrasco MA. 1998. *¿Es la plasticidad cerebral un factor crítico en el tratamiento de las alteraciones cognitivas asociada al envejecimiento?* Anales de psicología. 14:45-53.
- [58] Deller T y Frotscher M. 1997. *Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion.* Prog Neurobiol. 53:687-727.
- [59] Recanzone GH, Merzenich MM, Jenkins WM, Grajski KA y DinseHR. 1992. *Topographic reorganization of the hand representations in cortica area 3 β in owl monkeys trained frecuency discrimination task.* J. Neurophysiol. 67:1031-1056.
- [60] Deller T. y Frotscher M. 1997. *Lesion plasticity of central neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion.* Progress in Neurobiology. 53:687-727.
- [61] Bleier R. 1969. *Retrograde transsynaptic cellular degeneration in mamillary and ventral tegmental nuclei following limbic decortication in rabbits of various ages.* Brain Res. 15:365-393.
- [62] Cowan WM. 1970. *Anterograde and retrograde transneuronal degeneration in the central and peripheral nervous system.* En: *Contemporary Research Methods in Neuroatomy.* Nauta WJH y Ebbensson SOE, eds. Springer: Berlin, pp. 217-240.
- [63] Kapfhammer JP y Schwab ME. 1992. *Modulators of neuronal migrations and neurite growth.* Curr. Opin. Cell Biol. 4:863-868.
- [64] Hildebrandt HC, Becker S, Glüer H, Rösner R, Gerardy-Schahn y Rahmann H. 1998. *Polysialic acid on the neural cell adhesion molecule correlates with expression of polysialyltransferases and promotes neuroblastoma cell growth.* Cancer Res. 58:779-784.
- [65] Colman DR y Filbin MT. 1999. *Cell Adhesion Molecules.* En: *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Siegel GJ, Agranoff B, Albers RW, Fisher SK y Uhler MD, eds. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, pp. 435-500.
- [66] Colom LV, Diaz ME, Beers DR, Neely A, Xie WJ y Appel SH. 1998. *Role of potassium channels in amyloid-induced cell death.* J Neurochem. 70:1925–1934.
- [67] Beffert U, Cohn JS, Petit-Turcotte C, Tremblay M, Aumont N, Ramassamy C, Davignon J y Poirier J. 1999. *Apolipoprotein E and beta-amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E nenotype dependent.* Brain Res. 843:87-94.
- [68] Blanchard F, Duplomb L, Raher S, Vusio P, Hoflack B y Jacques Y. 1999. *Manose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor mediates internalization and degradation of leukemia inhibitory factor but not signal transduction.* J Biol Chem. 274:24685:24693.
- [69] Bohne S, Sletten K, Menard R, Buhling F, Vockler S, Wrenger E, Roessner A y Rocken C. 2004. *Cleaveage of AL amyloid proteins and AL amyloid deposits by cathepsins B, K and L.* J Pathol. 203:528:537.

- [70] Peterson DA y Gage FH. 1999. *Trophic factor therapy for neural death*. En: Alzheimer Disease. Terry RD, Katzman R, Bick KL y Sisodia SS, eds. Lippincott Williams & Wilkins. EUA, 373-388.
- [71] Wang JZ, Grundke-Iqbal I e Iqbal K. 1996. *Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease*. Nat Med. 2:871-875.
- [72] Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, Vazquez L, Luna J, Perry G, y Mena R. 1998. *Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease*. J Neuropathol Exp Neurol. 57:905-914
- [73] Araujo H, Menezes M y Mendez-Otero R. 1997. *Blockage of 9-O-acetyl gangliosides induces microtubule depolymerization in growth cones and neurites*. Eur J Cell Biol. 72:202-213.
- [74] Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. 2002. *Cells in their social context*. En: Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing. New York, pp. 949-1009.
- [75] Kristiansen LV, Marques FA, Soroca V, Ronn LC, Kiselyov V, Pedersen N, Berezin V y Bock E. 1999. *Homophilic NCAM interactions interfere with L1, stimulate neurite outgrowth*. FEBS lett. 464:30-34.
- [76] Doherty P y Walsh FS. 1996. *CAM-FGF receptor interactions: a model for hexagonal growth*. Mol Cel Neurosci. 8:99-111.
- [77] Skladchikovag G, Ronn LC, Berezin V y Bock E. 1999. *Extracellular adenosine triphosphate affects neural cell adhesion molecule (NCAM)-mediated cell adhesion and neurite outgrowth*. J Neurosci. Res. 57:207-218.
- [78] Takei K, Chan TA, Wang FS, Deng H, Rutishauser U y Jay DG. 1999. *The neural cells adhesion molecules L1 and NCAM-180 act in different steps of neurite outgrowth*. J. Neurosci. 19:9469-9479.
- [79] Welz H. y Stork O. 2002. *Cell adhesion molecules: key players in memory consolidations*. News Physiol. Sci. 18:147-150.
- [80] Varki A. *Sialic Acid*. En: Essentials of Glicobiology. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G y Marth J, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA, pp. 195-209.
- [81] Kiss JZ, Troncoso E, Djebbara Z. y Muller D. 2001. *The role of neural cell adhesión molecules in plasticity and repair*. Brain Res Rev. 36:175-184.
- [82] Kojima N, Tachida Y, Yoshida Y y Tsuji S. 1996. *Characterization of mouse ST8Sia II (STX) as a neural cell adhesion molecule-specific polysialic acid synthase. Requirement of core alpha1,6-linked fucose and a polypeptide chain for polysialylation*. J Biol Chem., 271:19457–19463.
- [83] Mahal LK, Charter NW, Angata K, Fukuda M, Koshland DE Jr, Bertozzi CR. 2001. *A small-molecule modulator of poly-alpha 2,8-sialic acid expression on cultured neurons and tumor cells*. Science, 294:380-381.

- [84] Angata K y Fukuda M. 2003. *Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule*. Biochimie. 85:195-206.
- [85] Eckhardt M, Muhlenhoff M, Bethe A, Koopman J, Froch M y Gerardy-Schahn R. 1995. *Molecular characterization of eukaryotic polysialyl transferase-1*. Nature. 373:715-718
- [86] Kitagawa H y Paulson JC, 1994. *Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues*. J. Biol. Chem. 269:17872-17878.
- [87] Nakayama J, Fukuda MN, Fredette B, Ranscht B y Fukuda M. 1995. *Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:413-422.
- [88] Kiss JZ e Irougon G. 1997. *Cell Biology of polysialic acid*. Curr Opin Neurobiol. 7:640-6.
- [89] Rutishauser U. 1990. *Neural cell adhesion molecule as a regulator of cell-cell interactions*. Adv Exp Med Biol. 265:179-83.
- [90] Marth JD. *Glycosylation Changes in Ontogeny and Cell Activation. Neurogenesis y angiogenesis*. En: Essentials of Glicobiology. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G y Marth J, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA, pp. 515-536.
- [91] Takei K, Chan TA, Wang FS, Deng H, Rutishauser U y Jay DG. 1999. *The neural cell adhesion molecules L1 and NCAM-180 act in long-term potentiation in different steps of neurite outgrowth*. J. Neurosci. 19: 9469-9479.
- [92] Tang J y Landmesser L. 1993. *Reduction of intramuscular nerve branching and synaptogenesis is correlated with decreased motoneuron survival*. J. Neurosci. 13:3095–3103.
- [93] Tang J, Landmesser L y Rutishauser U. 1992. *Polysialic acid influences specific pathfinding by avian motoneurons*. Neuron. 8:1031–1144.
- [94] Hrynkow SH, Morest DK, Bilak M y Rutishauser U. 1998. *Multiple roles of neural cell adhesion molecule, neural cell adhesion molecule-polysialic acid, and L1 adhesion molecules during sensory innervation of the otic epithelium in vitro*. Neuroscience. 87:423–437.
- [95] Monnier PP, Beck SG, Bolz J y Henke-Fahle S. 2001. *The polysialic moiety of the neural cell adhesion molecule is involved in intraretinal guidance of retinal ganglion cell axons*. Dev. Biol. 229:1–14.
- [96] Seki T y Rutishauser U. 1998. *Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus*. J. Neurosci. 18: 3757–3766.
- [97] Yamamoto N, Inui K, Matsuyama Y, Harada A, Hanamura K, Murakami F, Ruthazer ES, Rutishauser U y Seki T. 2001. *Inhibitory mechanism by polysialic acid for lamina-specific branch formation of thalamocortical axon*. J. Neurosci. 20:9145–9151.
- [98] Figarella Branger, DF, Durbec PL y Rougon GN. 1990. *Differential spectrum of*

- expression of neural cell adhesion molecule isoforms and L1 adhesion molecules on human neuroectodermal tumors.* Cancer Res. 50:6364–6370.
- [99] Fukuda M. 1996. *Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens.* Cancer Res. 56:2237–2244.
- [100] Glüer S, Schelp C, Von Schweinitz D y Gerardy-Schahn R. 1998. *Polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood rhabdomyosarcoma.* Pediatr. Res. 43:145–147.
- [101] Daniel L, Durbec P, Gautherot E, Rouvier E, Rougon G y Figarella-Branger D. 2001. *A nude mice model of human rhabdomyosarcoma lung metastases for evaluating the role of polysialic acids in the metastatic process.* Oncogene. 20:997–1004.
- [102] Daniel L, Trouillas J, Renaud W, Chevallier P, Gouvernet J, Rougon G y Figarella-Branger D. 2000. *Polysialylated-neural cell adhesion molecule expression in rat pituitary transplantable tumors (spontaneous mammatropic transplantable tumor in Wistar-Furth rats) is related to growth rate and malignancy.* Cancer Res. 60:80–85.
- [103] Glüer S, Schelp C, Madry N, Von Schweinitz D, Eckhardt M y Gerardy-Schahn R. 1998. *Serum polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood neuroblastoma.* Br. J. Cancer. 78:106–110.
- [104] Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Inui K, Oyanagi H, Yamada T, Nakayama J, Fujimoto I, Ikenaka K y Wada H. 2001. *Prognostic significance of polysialic acid expression in resected nonsmall cell lung cancer.* Cancer Res. 61:1666–1670.
- [105] Seidenfaden R, Krauter A, Schertzinger F, Gerardy-Schahn R y Hildebrandt H. 2003. *Polysialic Acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions.* Mol Cell Biol. 23:5908-5918.
- [106] Fujimoto I, Bruses JL y Rutishauser U. 2001. *Regulation of cell adhesion by polysialic acid: Effects on cadherin, IgCAM and integrin function and independence from NCAM binding or signaling activity.* J. Biol. Chem. 276:31745–31751.
- [107] Joliot AH, Triller A, Volovitch M, Pernelle C y Prochiantz A. 1991. *alpha-2, 8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide.* New Biol. 3:1121–1134.
- [108] Vutskits L, Djebbara-Hannas Z, Zhang H, Paccaud J P, Durbec P, Rougon G, Muller D. y Kiss J Z. 2001. *PSA-NCAM modulates BDNFdependent survival and differentiation of cortical neurons.* Eur. J. Neurosci. 13:1391–1402.
- [109] Mayoral M.A, Zenteno E, Espinosa B, Martinez S y Guevara J. 2004. *Perspectiva Monográfica del cáncer pulmonar: Un enfoque molecular y la metástasis al cerebro.* Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 17:283-292.
- [110] Benjamini E, Rennick DM y Sell S. 1993. *Inmunología tumoral.* En: Inmunología Básica y Clínica. Suites DP, Fudenberg HH, Stobo JD y Wells JV, eds. México, pp. 241-258.
- [111] Franks LM. y Teich M. 2003. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*, 2nd edition. 456, pp

- [112] Kleinsmith AJ y Rish VM. 1995. *Cancer Cell and Growth Control*. En: Principles of Cell and Molecular Biology. Kleinsmith AJ y Rish VM, eds. HarperCollins College Publisher. New York, pp. 777-810.
- [113] Keller ET. 2002. *Overview of metastasis and metastases*. J Musculoskel Neuron Interact. 2:567-569.
- [114] <http://www.cancer.gov/cancer/cancertopics/understandingcancer/espanol/cancer/slides6>.
- [115] Silletti S, Paku S y Raz A. 1998. *Autocrine motility factor and the extracellular matrix. II. Degradation or remodeling of substratum components directs the motile response of tumor cells*. Int J Cancer. 76:29-35.
- [116] Perez-Severiano F, Salvatierra-Sanchez R, Rodriguez-Perez M, Cuevas-Martinez EY, Guevara J, Limon D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J y Santamaria A. 2004. *S-Allylcysteine prevents amyloid β peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits*. Eur J Pharmacol. 489:197-202.
- [117] Hall J. 1995. Inclusión de tejidos. En: *Métodos Histotecnológicos*. Prophet, ed. AFIP. México, pp. 41-46
- [118] Achstetter VA. 1995. Microtomía. En: *Métodos Histotecnológicos*. Prophet, ed AFIP. México, pp. 47-54.
- [119] Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, Vazquez L, Luna J, Perry G y Mena R. 1998. *Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer Disease*. J Neuropathol Exp Neurol. 57:905-914.
- [120] Rutishauser U y Landmesser L. 1996. *Polysialic acid in the vertebrate nervous system a promoter of plasticity in cell-cell interactions*. Trends Neurosci. 19:422-427.
- [121] Seki T. 2002. *Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons*. J Neurosci Res. 69:772-83.
- [122] Seki y Arai Y. 1999 *Temporal and spacial relationships between PSA-NCAM-expressing, newly generated granule cells, and radial glia-like cells in the adult dentategyrus*. J Comp Neurol. 410:503-13.
- [123] Seki T y Arai Y. 1999. *Different polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression patterns in distinct types of mossy fiber boutons in the adult hippocampus*. J Comp Neurol. 410:115-25.
- [124] Sandi C, Merino JJ, Cordero MI, Touyarot K y Venero C. 2001. *Effects os chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialilation and L1*. Neurosci. 102:329-339.
- [125] Mackowiak M, Markowicz-Kula, Fijal K y Wedzony K. 2005. *Acute and repeated administration of cocaine differentially regulates expression of PSA-NCAM-positive neurons in rat hippocampus*. Brain Res. 1055:149-155.

- [126] Foley AG, Ronn LC, Murphy KJ y Regan CM. 2003. *Distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule in rat septal nuclei and septohippocampal pathway: transient increase of polysialylated interneurons in the subtriangular septal zone during memory consolidation.* J Neurosci Res. 74:807-17.
- [127] Foley AG, Hedigan K, Roullet P, Moricard Y, Murphy KJ, Sara SJ y Regan CM. 2003. *Consolidation of memory for odour-reward association requires transient polysialylation of the neural cell adhesion molecule in the rat hippocampal dentate gyrus.* J Neurosci Res. 74:570-576.
- [128] Deller T y Frotscher M. 1997. *Lesion Plasticity of Central Neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion.* Progress in Neurobiology. 53:687-727.
- [129] Steward O. 1992. *Signals that induce sprouting in the central nervous system: Sprouting is delayed in a strain of mouse exhibiting delayed axonal degeneration.* Exp. Neurol. 118:340-351.
- [130] Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt, B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G y WyssCoray T. 2000. *Inflammation and Alzheimer's disease.* Neurobiol. Aging 21: 383-421.
- [131] Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA, Yen SH y Brosnan C. 1993. *Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease.* Glia 7:75-83
- [132] Wallace MN, Geddes J, Farquhar DA, Masson MR, 1997. *Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to h-amyloid plaques.* Exp. Neurol. 144:266-272.
- [133] Gitter BD, Cox LM, Rydel RE, May PC, 1995. *Amyloid beta peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1 beta-activated human astrocytoma cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:10738-10741
- [134] Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ, 1998. *Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release.* Brain Res. 785:195-206.
- [135] Chao CC, Hu S, Ehrlich L, Peterson PK, 1995. *Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors.* Brain Behav. Immun. 9: 355-365
- [136] Griffin, W.S., Sheng, J.G., Roberts, G.W., Mrak, R.E., 1995. *Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution.* J. Neuropathol. Exp. Neurol. 54:276-281.
- [137] Eddleston M y Mucke L. 1993 *Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease.* Neuroscience. 54:15-36.
- [138] Doherty P, Williams E y Walsh FS. 1995. *A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth.* Neuron. 14:57-66.

- [139] Collins T. 1999. *Inflamación aguda y crónica*. En: Patología estructural y funcional. Cotran RS, Kumar V y Collins T, eds. MacGraw Hill-Interamericana. México, pp. 53-93.
- [140] Nicolson GL, Menter DG, Hermann JL, Yun Z, Cavanaugh P y Marchetti D. 1996. *Brain metastasis: role of trophic, autocrine, and paracrine factors in tumor invasion and colonization of the central nervous system*. Curr Trop Microbiol Immunol. 213:89-115.
- [141] Walsh FS y Doherty P. 1997. *Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: Role in axon growth and guidance*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13:425–456.
- [142] Walsh FS, Meiri K y Doherty P. 1997. *Cell signaling andCAM-mediated neurite outgrowth*. Soc. Gen. Physiol. Ser. 52:221–226.



X. ANEXOS

Anexo I

Buffer de fosfatos, pH 7.4

Solución A

Fosfato monosódico NaH_2PO_443.8 g

Disolver en 250 ml de agua destilada

Solución B

Fosfato disódico Na_2HPO_456.8 g

Disolver en 1 L de agua destilada

Mezclar 190 mL de la solución A, con 810 mL de la solución B.

NUNCA AL REVÉS.

- para preparar PBS se diluye 1:1 la solución
- agregar 0.08g de NaCl por cada 100mL

Anexo II

Paraformaldehído 4% en PBS 0.2M , pH 7.4

Reactivos:

Paraformaldehído.....4g

PBS.....100ml



Procedimiento:

- agregar 4 g de Paraformaldehído por cada 100 ml de PBS 0.2M pH 7.4
- mantener en agitación constante tomando la temperatura (no más de 60°C, si los pasa se vuelve formaldehído)
- es opcional la colocación de gotas de NaOH para ayudar a clarificar la solución
- dejar enfriar
- se filtra y se puede esterilizar en autoclave

Nota: trabajar en campana de extracción

Anexo III

Silano, adherente para tejidos (SIGMA)

Reactivos:

Silano.....2 mL

Acetona.....98 mL

Procedimiento:

Lavar los portaobjetos con detergente de pH neutro, enjuagarlos con agua destilada y dejarlos secar completamente.

Se sumergen en la solución de silano al 2% en acetona, durante 2 minutos y sumergirlos en agua destilada dos veces, dos minutos cada vez. Se secan completamente a temperatura ambiente o en estufa.

La solución de silano debe almacenarse en refrigeración, a 4 °C. Puede volver a utilizarse siempre que su transparencia no cambie a color amarillo o rojizo.



Anexo IV

Buffer de citratos 10 mM, pH 6 (reactivación antigénica)

Reactivos.

Solución stock ácido: 0.1M de ácido cítrico

Solución stock base: 0.1 M de citrato de Na

Solución de trabajo; 9 ml de A + 41 ml de B. Llevar a 500 ml con agua desionizada.

Almacenar entre 2 y 8° C.

Procedimiento:

- Las laminillas deparafinadas deben ser colocadas en vaso de Köplin con el buffer de citratos
- el vaso en baño de María se calienta en horno de microondas durante 3. 30 minutos. , a 750 watts
- se observa el ebullición del amortiguador por lo que se debe evitar que los cortes se sequen agregando más amortiguador de ser necesario
- dejar enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos
- enjuagar en PBS

nota: para evitar que no haya burbujas atrapadas en las laminillas, el espacio entre éstas debe de ser entre 4mm aproximadamente.