



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**IDENTIFICACIÓN DE O-GLICOSILACIÓN EN
CEREBRO EN UN MODELO DE
NEURODEGENERACIÓN DE TIPO ALZHEIMER EN
RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

ROCÍO PAMELA MARTÍNEZ LOUSTALOT



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
2010**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del Alumno

Martínez
Loustalot
Rocío Pamela
56774443
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
098055753

2. Datos del Tutor

Dr.
Arturo Edgar
Zenteno
Galindo

3. Datos del Sinodal 1

Dra.
Ana Brígida Clorinda
Arias
Álvarez

4. Datos del Sinodal 2

Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García

5. Datos del Sinodal 3

Dra.
Luisa Alvarina
Alba
Lois

6. Datos del Sinodal 4

Dra.
Laura
Colín
Barenque

7. Datos del trabajo escrito

Identificación de O-glicosilación en cerebro en un modelo
de neurodegeneración de tipo Alzheimer en rata.
66 p
2010

INDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	4
PLACAS NEURITICAS (PNs)	6
PROTEÍNA TAU	10
GLICOSILACIÓN	13
Definición y tipos de glicosilación	
O- glicosilación	
LECTINAS	19
Uso de lectinas en Alzheimer	
LECTINAS DE <i>Amaranthus leucocarpus</i> y Germen de Trigo	20
Características de la lectinas	
Actividad de marcación	
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
Cirugía estereotáxica	
Inmunohistoquímica	
6. RESULTADOS	32
7. DISCUSIÓN	49
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	59
9. REFERENCIAS	60

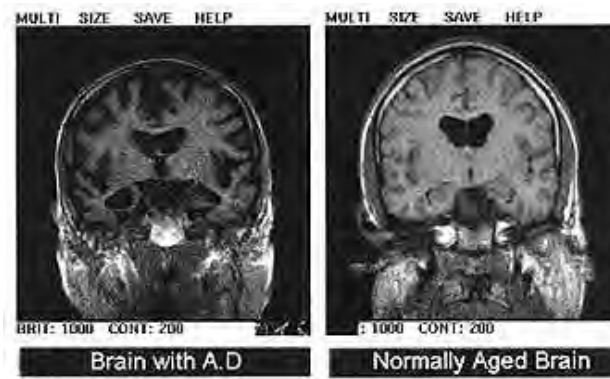
RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo, caracterizado por placas amiloides, marañas neurofibrilares (MNFs) intracelulares, proteína Tau hiperfosforilada, y pérdida neuronal selectiva. La O-glicosilación se ha relacionado con plasticidad neuronal en lesiones características de la EA. Esta glicosilación se efectúa en el Aparato de Golgi por adición de GalNAc a Ser/ Thr (de tipo mucina) o GlcNAc a Ser/ Thr. En este trabajo se identificó la presencia de ambos tipos de O-glicosilación, con las lectinas *Amaranthus leucocarpus* (ALL, específica de GalNAc) y germen de trigo WGA (GlcNAc), respectivamente, en cortes cerebrales de rata macho cepa Wistar, en un modelo de neurodegeneración de tipo Alzheimer, inducida por la fracción 25-35 de la proteína β -Amiloide administrada por cirugía estereotáxica en el hipocampo y comparando con tejido de ratas que recibieron sólo solución salina (SSI). Las ratas fueron sacrificadas de las 8h a los 30 días posteriores a la inyección. Las ratas tratadas con el péptido mostraron pérdida de memoria a los 30 días. Por inmunohistoquímica, con ALL y WGA se observó en la zona del Giro Dentado a partir de las 8h, positividad a las dos lectinas, sin embargo ALL reconoce el citoplasma y membrana de las células neuronales, este reconocimiento se incrementó en los días posteriores. De forma contraria WGA mostró disminución a partir de las 24 h que fue el máximo de intensidad para esta lectina. Ensayos contrastando ALL y WGA con anticuerpos contra proteína Tau nos permiten identificar co-localización exclusivamente de WGA con Tau, sugiriendo que ALL reconoce estructuras no relacionadas a Tau. Nuestros resultados sugieren que en respuesta al péptido β A, hay un incremento de O-glicosilación tipo mucina y decremento de la O-glicosilación GlcNAc-Ser/Thr como posible factores predisponentes de neurodegeneración y muerte neuronal.

1.

Enfermedad de Alzheimer

Alois Alzheimer describió en 1906 las características clínicas y anatomopatológicas de la paciente Auguste D, quien murió, con demencia a los 56 años a causa de una enfermedad singular y grave de la corteza cerebral. Mas tarde Emil Kraepelin bautizó esta enfermedad como Enfermedad de Alzheimer, conocida en un inicio como demencia presenil. (Alberca y López – Pousa, 2002). La EA es la causa más frecuente de demencia en el mundo industrializado, siendo responsable del 50 al 70% del total de casos. Por encima de los 85 años afecta a uno de cada tres individuos y el cuadro clínico se inicia habitualmente con afectación de la memoria a corto plazo o de la atención, que se sigue de la afectación de otras habilidades cognitivas, como el lenguaje, el pensamiento abstracto, el juicio crítico y el reconocimiento de lugares o personas. En estadios avanzados, el paciente evoluciona a un estado de mutismo casi absoluto con un deterioro progresivo de sus capacidades motrices, pudiendo llegar a una total desconexión con el entorno que lo rodea, siendo incapaz de controlar sus funciones fisiológicas más simples. Desde el punto de vista neuropatológico la EA tiene características bien establecidas, distinguiéndose del proceso de envejecimiento normal por la mayor presencia de placas seniles, constituidas por material amiloide, o degeneración neurofibrilar. Estas lesiones se acompañan de una refracción neuronal que afecta predominantemente al córtex frontal y la región hipocámpica (Figura 1) y en mayor medida a los sistemas con neurotransmisión colinérgica (Alberca y López – Pousa, 2002).



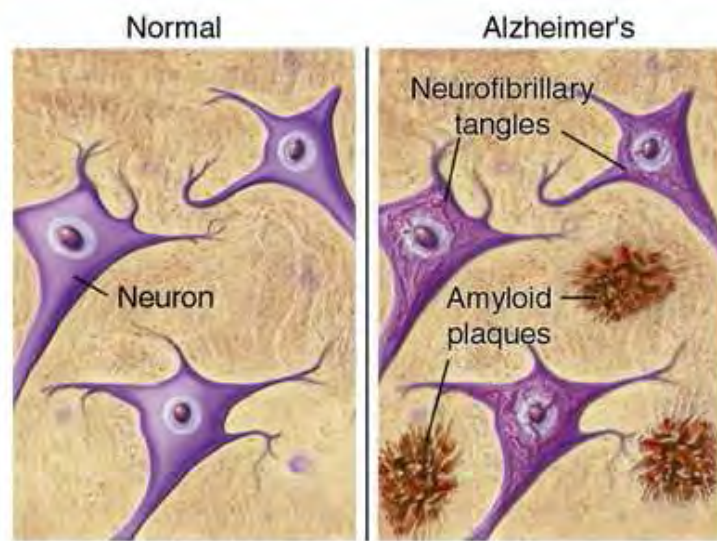
[Fig. 1] Resonancia magnética de persona con EA y una saludable.

Características Histológicas

La EA es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por la presencia de placas seniles extracelulares, marañas neurofibrilares (MNFs) intracelulares, compuestas de paquetes de pares de filamentos helicoidales (PHFs), formadas por una proteína de citoesqueleto llamada proteína Tau en el cuerpo de la célula neuronal, e hilos de neurofibrilas en las dendritas, así como en la sinapsis y la pérdida selectiva de células neuronales (Figura 2) (Söderberg *et al.*, 2005). El péptido β - Amiloide (β A) representa el mayor componente de las placas seniles (también llamadas placas amiloides) y se generan durante la endoproteólisis de una proteína transmembranal larga llamada Proteína Precursora de β - amiloide (β APP) (Alonso, *et al.*, 2001; Buchet y Slawomir., 2000).

La proteína Tau es una de las mayores proteínas asociadas a microtúbulos presentes en neuronas. Su función normal es el promover el ensamble y la estabilidad de los microtúbulos. En cerebros con la enfermedad de Alzheimer, la proteína Tau se encuentra glicosilada, anormalmente hiperfosforilada (AD-P-tau) y agregada a los PHFs. Tau se acumula en las neuronas al experimentar neurodegeneración neurofibrilar, lo cual es una característica diagnóstica en esta enfermedad (Alonso *et al.*, 1997; Liu *et al.*,

2002).



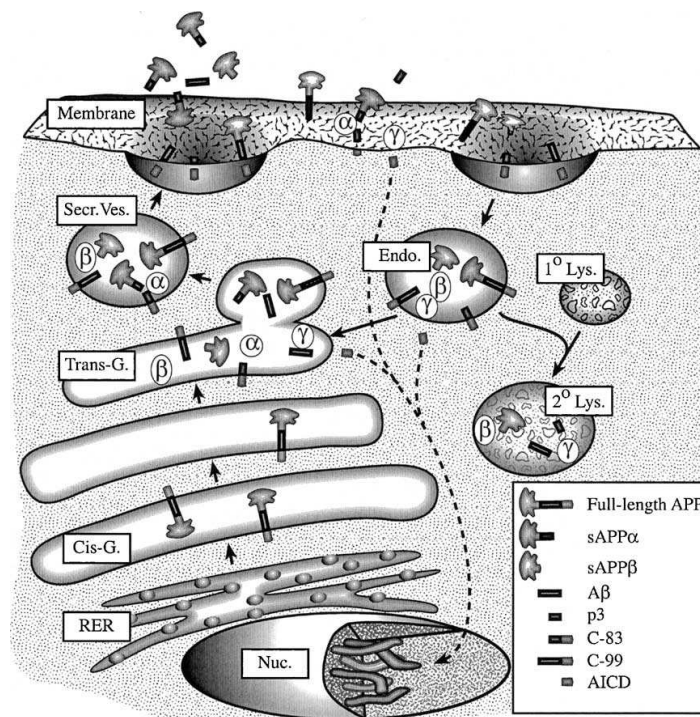
[Fig. 2] Placas amiloideas y marañas neurofibrilares.

PLACAS NEURÍTICAS (PNS)

Las PNs están constituidas principalmente del péptido β A de 39-42 aminoácidos de longitud, que es el producto final de la proteólisis del extremo carboxilo terminal de su proteína precursora (β APP) (Glennner y Wong, 1984; Haass y Selkoe, 1993), y es una proteína integral de membrana tipo I (Kang *et al.*, 1987). El péptido β A tiene un peso aproximado de 4 KD (Masters, 1984) y en la EA se acumula característicamente en el parénquima cerebral como placas seniles, en las paredes corticales y leptomeníngicas. Existen diferentes fracciones del β A, algunas de ellas tienen propiedades tóxicas, dentro se encuentra la fracción 25-35 del β A ($A\beta_{25-35}$) se ha propuesto como la parte más tóxica del péptido completo, con la propiedad de agregarse rápidamente e inducir su neurotoxicidad de forma inmediata (Maurice P y Lochat A, 1996; Selkoe, 2001).

Los depósitos de β A perturban la homeostasis neuronal, induce la

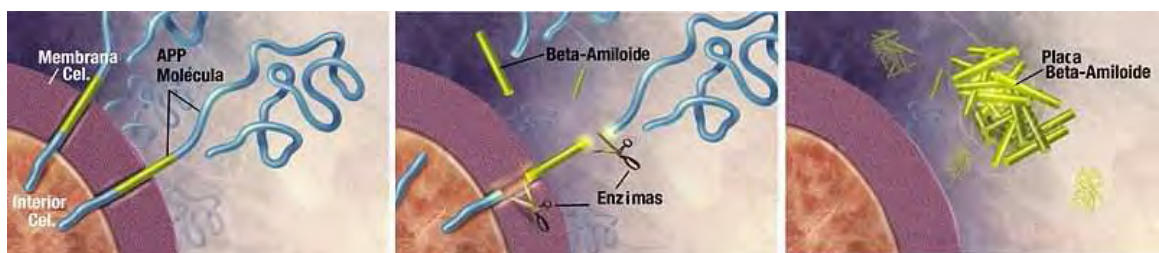
degeneración del miocito vascular y altera el flujo de sangre cerebral. La β A puede unirse a varias moléculas de la superficie neuronal, a células endoteliales o de la glia. En etapas tempranas de la EA, también incrementa los niveles de β A que activan la microglia e induce la secreción de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α e Interleucina 1, provocando efectos citotóxicos (Chaney *et al.*, 2005). Existen tres isoformas conocidas de la proteína precursora de la β A: de 671, 687 y 711 (o 713) aminoácidos, provenientes de un mismo gen que está localizado en el cromosoma 21. La β APP se encuentra en todas las células del organismo y es fragmentada por tres actividades de α , β y γ secretasas (Figura 3) (De Strooper y Annaert, 2000) y en contra de lo que se había sugerido, la sobre expresión de la PPA β no conduce por sí misma a la patología de la EA.



[Fig. 3] Localización del procesamiento de PPA en neuronas. Actividad de las secretasas α , β , γ , en la formación de la Proteína Precursora de β -Amiloide (PPA). (Tomado de Turner *et al.*; 2003).

Las PNs recibieron ese nombre, para diferenciarlas de aquellas placas que no tienen neuritas distróficas agregadas alrededor del depósito de β A

(Figura 4) y que en un inicio, se denominaron como placas seniles, ya que pueden encontrarse en los cerebros de ancianos sanos sin deterioro cognoscitivo (Wilcock y Esiri, 1982; Crystal *et al.*, 1988). Se han hecho intentos para diferenciar las poblaciones de placas con diferentes métodos, tales como las impregnaciones argénticas de Bielschowsky (técnica de impregnación con plata), colorantes fluorescentes como la tioflavina S, el rojo congo, el rojo tiazina y métodos inmunohistoquímicos con anticuerpos contra diferentes regiones de la proteína β A (Delaère *et al.*, 1991; Wisniewski *et al.*, 1989). La clasificación de las placas depende del observador y de los métodos utilizados, algunos autores clasifican a las PNs por subtipos que van desde los estadios iniciales hasta los maduros; otros prefieren definir las en dos grupos: a) las placas difusas (reconocidas sólo con anticuerpos contra la β A) y sin componente neurítico, y b) las placas neuríticas “clásicas”, que están conformadas por un núcleo o depósito de proteína β A y de un agregado de neuritas distróficas, inmunorreactivas a tau, con una disposición radial (Guevara *et al.*, 2004).



[Fig. 4] Actividad de las enzimas secretasas responsables de la formación de la placa Amiloide β a partir de la Proteína Precursora del Amiloide β .

La formación y maduración de las placas podría deberse algunas alteraciones del proceso metabólico normal de la β APP, por lo que se puede encontrar el β A como producto normal de secreción en el torrente sanguíneo y

en el líquido cefalorraquídeo de las personas ancianas (Dickson *et al.*, 1992). Varias modificaciones postraduccionales se han reportado para la PPA β , incluyendo la N- y O-glicosilación y la fosforilación (Espinosa *et al.*; 2003).

Depósitos de A β en el cerebro con la Enfermedad de Alzheimer

Los depósitos de A β denominadas también placas seniles, están comprimidas en β A fibrilar y se encuentran asociadas con neuritas degeneradas. Se han sugerido dos mecanismos en los que participa la β A en la fisiopatología de la EA. La primera sugiere que la β A es neurotóxica y la segunda sería que la neurotoxicidad del péptido está relacionada a su estructura fibrilar; existen diferentes condiciones ambientales que pueden causarlas, como son:

- que el péptido se agrega más fácilmente en condiciones de pH ácido que en pH fisiológico
- en ambientes oxidantes
- en presencia de diferentes metales catiónicos, incluyendo zinc y aluminio, se ha reportado que favorece a la toxicidad de β A en neuronas en cultivo, cada uno de estos metales han implicado en el desarrollo de la patogénesis de EA.

La agregación del β A afecta la comunicación sináptica mediante la activación de mecanismos apoptóticos que generan la muerte neuronal asociada con una disfunción y alteración, en los procesos de aprendizaje y memoria. La β - secretasa, es la causante de la degradación de la β APP, liberando β A soluble, y en ciertas condiciones ambientales, forman agregados fibrilares. La interacción de la β A con el plasma de membrana favorece la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la peroxidación lipídica

(Mark *et al.*, 1997), también favorece la alteración de los receptores neuronales de insulina ejerciendo efectos depresores metabólicos y biosintéticos (Zhao y Townsend; 2009).

Los radicales libres pueden entonces afectar la función de varias enzimas asociadas a membrana y componentes de la señal de transducción. Por ejemplo, la A β inhibe la función de las ATP asas de Ca²⁺ y Na⁺/K⁺ por un mecanismo mediado por radicales libres. El deterioro de estas bombas iónicas incrementa la despolarización de la membrana, el flujo de calcio, e incrementa la muerte celular. También se ha demostrado que la β A altera la traducción del receptor de trombina, lo cual provoca señalización aberrante de calcio y estrés oxidativo (EO) (Brioni y Decker, 1997; Mattson, 2000; Zhang *et al.*, 2006). Otra de las consecuencias de la toxicidad del péptido β A es la desorganización celular y la presencia de estructuras agregadas, esto se ha demostrado con la técnica básica de Hematoxilina y Eosina para la identificación de la morfología celular que indica la organización, y en donde, en pruebas de neurodegeneración en ratas, los tejidos muestran un desorden en la forma y organización de las células, además de intensa acidofilia, presente tanto en los núcleos como en las proyecciones de las células, lo cual se relaciona con un daño celular (Ramírez, 2010).

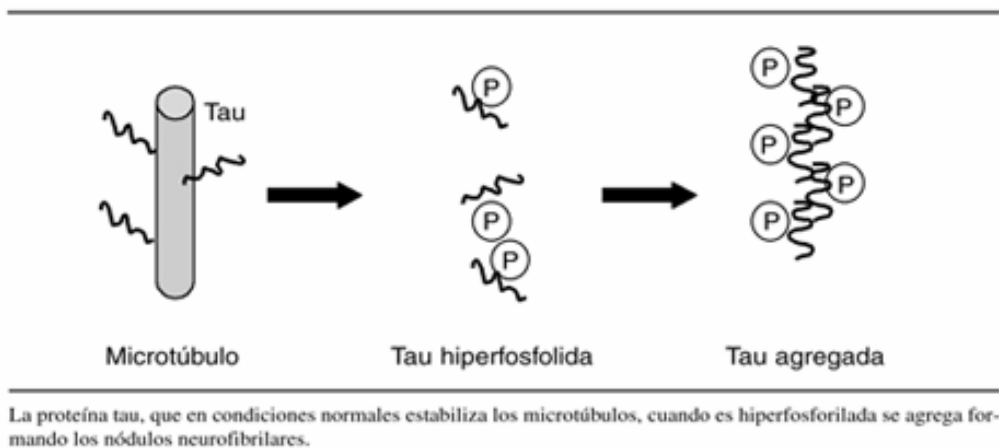
PROTEÍNA TAU

Tau es una fosfoproteína citosólica, que estimula y estabiliza el ensamble de microtúbulos de subunidades de tubulina. Todas las seis isoformas de tau están hiperfosforiladas y agregadas en filamentos helicoidales

pareados (PHFs) en el cerebro de oaceintes con EA. A la fecha, se han identificado mas de 30 sitios de fosforilación de Tau, algunos de estos sitios están fosforilados en cerebros normales. Muchos estudios han demostrado que la hiperfosforilación anormal de Tau es crucial para la pérdida de su función biológica, al aumento de toxicidad, y a su agregación en PHFs en cerebros con EA. La hiperfosforilación de tau está relacionada con otros desordenes neurodegenerativos llamados Tautopatias (Figura 5). La correlación entre los números de marañas neurofibrilares en cerebros de pacientes y la severidad de síntomas de demencia, sugiere el papel de Tau en la patología de la EA. Recientemente se identificó que mutaciones de Tau que causan demencia frontotemporal hereditaria y Parkinson, confirma que la anormalidad de tau es suficiente para producir neurodegeneración y demencia (Stoothoff y Jonson, 2005).

La forma más larga de tau en el cerebro humano contiene 80 residuos de Serina o Treonina y 5 residuos de Tirosina (figura 5) y por lo tanto, casi el 20 % de la proteína tiene el potencial de ser fosforilada. En ensayos In vitro, se han observado que diversas cinasas fosforilan a tau, por lo que tau ha sido considerada como “aceptor universal de fosfatos”, sin embargo se han reportado pocos mecanismos que regulan la fosforilación de tau fisiológicamente (Weingarten *et al.*,1975). Tau forma los PHF, los cuales forman las marañas neurofibrilares (NFT) en los cerebros con la EA y la tau que forma estos filamentos se encuentra anormalmente fosforilada (Stoothoff y Jonson, 2005).

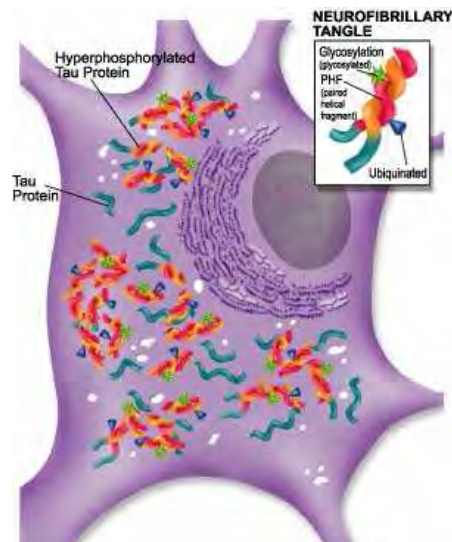
Esquema de la fosforilación y agregación de la proteína tau



[Fig. 5] Esquema ejemplificado de la fosforilación y agregación de la proteína Tau.

En el cerebro adulto, existen seis diferentes isoformas de Tau derivadas de un solo gen (las cuales varían en tamaño de 352 a 441 aminoácidos de longitud, y de 36.8 a 45.9 kDa) y en el cerebro del feto contiene una sola isoforma de Tau (Tau- 352); en el cerebro del adulto se encuentran muchas isoformas, predominantemente en el compartimiento citoplásmico, aunque algunas de estas isoformas se encuentran dentro del núcleo (Neve *et al.*, 1986). El cerebro normal contiene de 2-3 moles de fosfato/mol de la proteína, pero en la EA, tau se encuentra hiperfosforilada, conteniendo de 3-4 moles de fosfato/mol de la proteína más que la tau normal y es la mayor subunidad de PHF que forman las marañas neurofibrilares (MNF) (Figura 6). Las marañas neurofibrilares son polímeros de la proteína tau que corresponde a la zona de los dominios repetidos y que termina en el Glu-391 hacia el extremo carboxilo (Novak *et al.*, 1993), los cuales abarcan agregaciones de filamentos patológicos de Tau hiperfosforilada anormalmente. Además de la hiperfosforilación, las proteínas Tau de cerebros con Alzheimer (pero no de

cerebros normales) son glicosiladas con estructuras sacarídicas de tipo N y O, en contraste, otro tipo de glicosilación, la O-GlcNAc (O-GlcNAc en Ser/Thr) fue reportada en proteínas Tau normales. Tau se encuentra tanto fosforilada como O-GlcNAc.



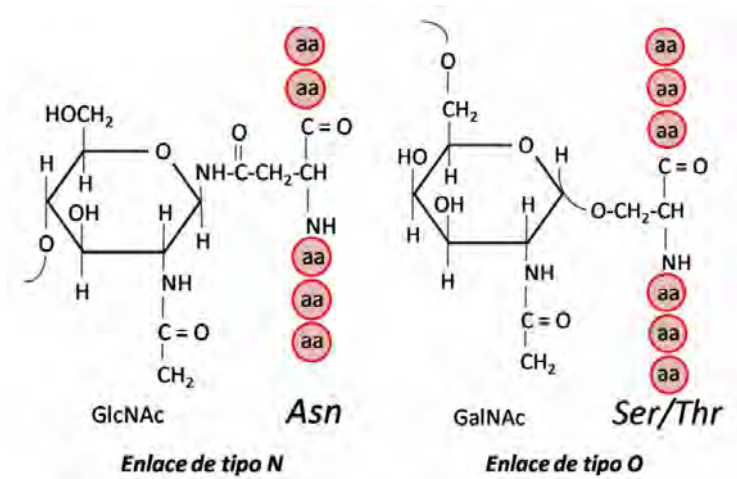
[Fig. 6] Marañas Neurofibrilares encontradas dentro de neuronas del cerebro de las regiones esenciales para la función cognitiva, características patológicas en la EA.

GLICOSILACIÓN

La glicosilación es una modificación co- y pos-traducciona mediante la unión covalente de carbohidratos a proteínas o lípidos a través de enzimas, y genera una gran diversidad en la glicoconjugados, dada la variedad de glicanos que se pueden producir a partir de un número relativamente limitado de monosacáridos (Spiro, 2002). En las proteínas la unión de cadenas oligosacarídicas por transferasas específicas le confiere diferentes cualidades estructurales y funcionales. La glicosilación contribuye al plegamiento de las proteínas, les confiere mayor resistencia a las proteasas, mayor estabilidad ante modificaciones físico-químicas del medio, entre otras propiedades. Los

carbohidratos cumplen funciones en el reconocimiento biológico, uniéndose a diferentes moléculas (como las lectinas), mediando interacciones célula-célula y célula-matriz. El patrón de glicosilación de una proteína es dependiente del tipo celular que la produce, y que puede modificarse ante diversas situaciones fisiológicas o patológicas. (Freire *et al.*, 2002). Se ha sugerido que la fracción glicosilada modula una variedad de eventos como las interacciones célula-célula y célula-matriz, cruciales para el desarrollo y la función de un organismo multicelular complejo y en las interacciones con otros organismos (Varki *et al.*, 1999).

Los glicoconjugados están formados por una porción aglicona que corresponde a una proteína, péptido, lípido o un nucleótido (Rini y Drickamer, 1999), mientras que la porción glicona está formada por monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. Los principales carbohidratos de los glicoconjugados en eucariontes son: glucosa (Glc), galactosa (Gal), manosa (Man), fucosa (Fuc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilneuramínico (NeuAc), también llamado ácido siálico (Sia). Las cadenas de carbohidratos se clasifican de acuerdo al tipo de enlace glicosídico con el aminoácido en: N- y O-glicanos. Los N-glicanos generalmente poseen GlcNAc unida a asparagina (N- glicosilación) y los O-glicanos poseen GalNAc unida a serina o treonina de la cadena polipeptídica (O- glicosilación, denominada de tipo mucina), pero pueden también poseer una N-acetilglucosamina (GlcNAc) unida a Ser/Thr.



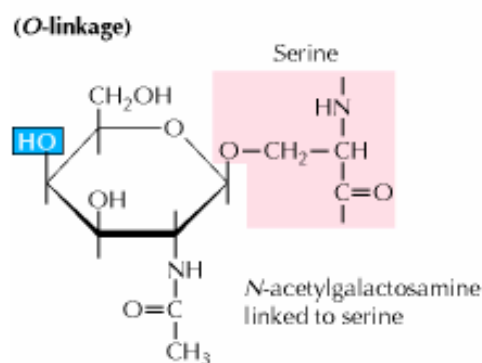
[Fig. 7] Enlace N-glicosídico y O-glicosídico. En la O-glicosilación se da por la unión principalmente de GalNAc al grupo OH- de la Ser/Thr, en la N-glicosilación la unión de GlcNAc se une al grupo NH₂ de la secuencia aminoacídica de Asn-X-Ser/Thr (Tomado de Butters, 2002).

La O-glicosilación es un proceso a diferencia de la N-glicosilación, se efectúa en el aparato de Golgi, en la cual participan hasta ocho diferentes glicosiltransferasas (Carraway y Hull , 1991), que transfieren unidad por unidad sacarídica (una glicosiltransferasa-una unión) (Axford, 1997). Los estudios hasta ahora realizados indican que es necesaria una glicosiltransferasa específica para cada enlace glicosídico (Schachter y Brockhausen, 1992).

O-glicosilación por GalNAc

La O- glicosilación tipo mucínico (Figura 8), debido a que determina la unión de las numerosas cadenas oligosacarídicas, estas glicoproteínas son frecuentemente de muy alto peso molecular que recubren la superficie de diferentes tipos celulares Varki *et al.*, 1999; Hanisch *et al.*, 2001 (Freire *et al.*, 2002). El inicio de este tipo de glicosilación que comprende GalNAc en una secuencia de aminoácidos que incluyen Ser/Thr y que confiere a la proteína estabilidad estructural, esta primera sustitución denominada antígeno Tn es determinada por una O-GalNAc transferasaa tipo 1, que favorece que otras

transferasas logren unir mas carbohidratos, aún mas la extensión en las substituciones de estos residuos en la cadena oligosacáridica favorecen un complejo estructural mayor que las glicosilaciones tipo N-glicosídico. Resultados previos utilizando lectinas, han sugerido la presencia de modificaciones específicas en O-glicosilación en enfermedades neurodegenerativas que fueron representadas por distintos niveles de complejidad en la biosíntesis de oligosacáridos de unión tipo O. La O-glicosilación es el producto de múltiples transferasas que podrían estar activas en presencia de secuencias específicas de amino ácidos, sugiriendo la participación activa de varias proteínas susceptibles a la O-glicosilación en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer.



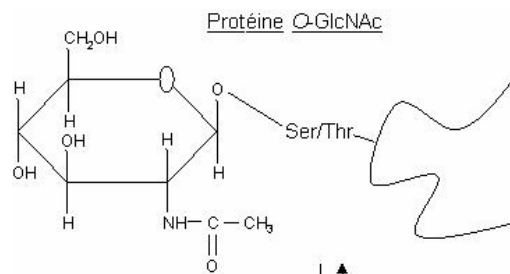
[Fig. 8] Unión tipo O a un polipéptido GalNAc.

a) O- glicosilación por GlcNAc

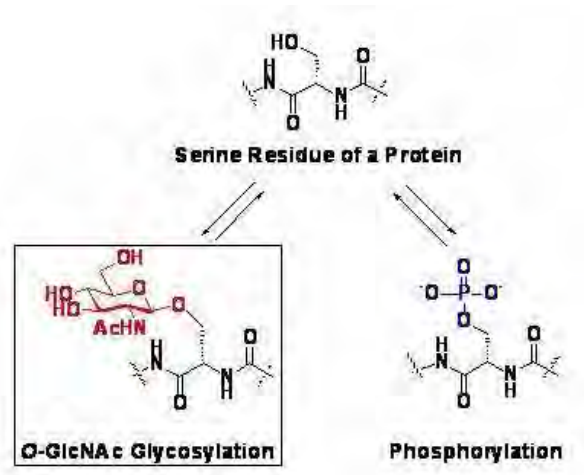
La glicosilación de tipo O-GlcNAc es una modificación de proteínas realizada también en el Aparato de Golgi por la adición de un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en serina o treonina (Figura 9) y se ha observado en los compartimentos citosólicos y nucleares de un gran número de proteínas

que son parte de proteínas estructurales, y no sólo en el lumen del Retículo Endoplasmico o en el Aparato de Golgi. El proceso de glico y deglicosilación de este tipo de enlace está controlada por 2 enzimas citosólicas y nucleares; la O-GlcNAc transferasa (OGT), que le transfiere un monosacárido de la UDP-GlcNAc a una proteína y la glucosaminidasa que hidroliza el azúcar. Además, la O-GlcNAc puede competir con la fosforilación por el mismo sitio o la misma región, causando exclusión mutua (Figura 10). La O-GlcNAc-glicosilación tiene gran relevancia en la actividad transcripcional, en actividad enzimática, en transporte intracelular, especialmente en el transporte nuclear, proteínas citoplásmicas y nucleares, como las proteínas de citoesqueleto, proteínas del poro nuclear, factores de transcripción y proteínas virales. Se ha sugerido que este tipo de glicosilación comparte ciertas características con la fosforilación proteínica (Guinez *et al.*, 2005). Un potente inhibidor de la O- GlcNAc- h-N-acetilglucosaminidasa incrementa los niveles de O-GlcNAc y disminuye la incorporación de fosfatos en la transcripción. Así, O- GlcNAc es recíproca con la fosforilación en algunos sitios. Un gran número de proteínas bien estudiadas se ha identificado que presentan un balance entre la O – GlcNAc glicosilación y la fosforilación. Mientras que el papel de la fosforilación esta bien documentado, el papel de la O- GlcNAc glicosilación aun no se entiende del todo. Algunos autores han sugerido un papel de los residuos de O- GlcNAc en el transporte nuclear de proteínas citosólicas. En apoyo a esta hipótesis, se ha demostrado recientemente que el balance entre fosforilación y O–GlcNAc glicosilación está implicado en el control de la transferencia de proteínas al núcleo.

Las isoformas de Tau en adultos humanos son modificadas por O-GlcNAc, y ese balance ocurre entre la fosforilación y la O-GlcNAc-glicosilación. Como las proteínas Tau son hiperfosforiladas en varias enfermedades neurodegenerativas, se dice que el balance es interrumpido en el curso de dichas patologías. La existencia de dicho balance, explica por que, en vivo, las proteínas tau hiperfosforiladas se agregan en los filamentos helicoidales pareados durante las enfermedades neurodegenerativas y que están desprovistas de residuos de O – GlcNAc. Por lo tanto, la O-GlcNAc glicosilación puede ser considerada como marcador de tau en cerebros sanos (Lefebvre *et al.*, 2003). Ambos fenómenos son dinámicos y están controlados por una actividad relativa de las enzimas responsables de la adición (quinasas y GlcNAc transferasa) y eliminación (fosfatasas y GlcNAc minidasa) de los fosfatos y residuos de GlcNAc respectivamente (Lefebvre *et al*, 1999).



[Fig. 9] Unión tipo O a una GlcNAc



[Fig. 10] Unión de tipo O a una GlcNAc

LECTINAS

Las lectinas están presentes en muchas especies vegetales y animales; estas son proteínas que se unen a carbohidratos (Van Damme *et al.*, 1998 b). Por su capacidad para identificar específicamente estructuras de oligosacáridos, las lectinas de plantas son utilizadas ampliamente en la investigación de la función y análisis de glicoconjugados. Una cualidad en la unión de las lectinas con azúcares además de ser reversible, es que no modifican bioquímicamente a los carbohidratos a los que se unen, característica que las distingue de las enzimas. Las lectinas pueden interaccionar con azúcares libres, oligosacáridos, residuos de azúcares polisacáridos, glicoproteínas o glicolípidos y receptores en la superficie celular (Goldstein y Poretz; 1986). Además, muchas lectinas de plantas son altamente utilizadas en ensayos biológicos y biomédicos en células animales y humanas. Es interesante identificar que diversas lectinas poseen especificidad glicosómica de unión tipo O y por lo tanto, son herramientas muy útiles para el aislamiento y análisis de glicoconjugados (Van Damme *et al.*, 1998).

LECTINAS de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) y Germen de Trigo (WGA)

La familia de las lectinas amarantáceas que incluyen a: *Amaranthus caudatus*, *A. spinosus*, *A. leucocarpus*, y *A. cruentus*, son proteínas homodiméricas de subunidades de 33-35 kDa. ALL fue purificada de las semillas de *A. leucocarpus* (ALL) por cromatografía de afinidad y es específica para N- acetilgalactosamina (GalNAc), en particular en las secuencias Gal β 1,3GalNAc α Ser/Thr (denominado antígeno T o Thomsen Friedenreich) y Tn, GalNAc α Ser/Thr (Hernández *et al.*, 2004). ALL interactúa con glicoproteínas O-glicosiladas identificadas en grupos celulares como los linfocitos vírgenes y en macrófagos no activados, se ha identificado que ALL reconoce estructuras asociadas las lesiones típicas de la EA. La reactividad de ALL en los cerebros con EA sugiere que existe un procesamiento enzimático anormal de receptores glicosilados que puede estar relacionado con la degeneración neuronal (Guevara *et al.*, 1998).

La lectina WGA (Wheat Germ Agglutinin) fué aislada y purificada de *Triticum vulgare* (Germen de Trigo), por Burger y Goldberg en 1967. Tiene dos subunidades y un peso molecular de 43 kDa. Esta lectina se une selectivamente a grupos de GlcNAc y en menor proporción con ácido siálico (Bourne *et al.*, 1974).

HIPÓTESIS

La O-glicosilación es una modificación postraduccional de glicoproteínas de neuronas en lesiones histopatológicas en un modelo de neurodegeneración de tipo Alzheimer en rata.

OBJETIVO

Identificar la participación potencial de la O-glicosilación en el daño neurodegenerativo en un modelo de toxicidad neuronal inducido por el péptido A β , reconociendo las estructuras O-glicosiladas por las lectinas ALL y WGA, con la proteína Tau en cortes cerebrales en un modelo de enfermedad tipo Alzheimer en ratas

Metas

1. Establecer un modelo en ratas, con características semejantes a la Enfermedad de Alzheimer.
2. Identificar modificaciones de la O-glicosilación.
3. Estandarizar lectinas con potencial de aplicación al estudio de la EA.

JUSTIFICACION

La EA está caracterizada por una neurodegeneración asociada a depósitos extracelulares de la proteína β A en el parénquima cerebral y la acumulación intraneuronal de marañas neurofibrilares, compuestos de filamentos de la proteína Tau hiperfosforilada (Rodríguez, *et al.*; 2009), que causa daño cognoscitivo y que concluye con demencia profunda. Dichas lesiones presentan complejos proteínicos importantes, que implican la participación de diversas glicoproteínas diferentes a las placas amiloides, las Marañas Neurofibrilares, que podrían estar participando en la patología (Espinosa *et al.*, 2003), así como algunas modificaciones postraduccionales de las cuales aún no se ha determinado su función en la patología. En varios estudios, se han demostrado modificaciones en la glicosilación de proteínas de cerebro humano de pacientes con la EA (Guevara *et al.*, 1998). Específicamente el reconocimiento de ALL en cerebro de pacientes con EA sugiere un incremento en la producción de proteínas O-glicosiladas que poseen las estructuras Gal1 β ,3GalNAc α 1,0 Ser/Thr o GalNAc α 1,0 Ser/Thr, principalmente en las placas neuríticas (PNs) (Espinosa *et al.*, 2004). Por otra parte se ha identificado un incremento en el reconocimiento de que la lectina WGA reconoce estructuras O-glicosiladas (en específica con GlcNAc) en cerebros con la patología de EA. Se han realizado diversos proyectos para producir modelos de la Enfermedad de Alzheimer (Rodríguez *et al.*, 2009); sin embargo, hasta el momento, no existe un modelo animal que pueda reproducir de manera puntual y concisa la enfermedad de Alzheimer para efectos de la investigación neurológica. En el presente estudio se realizará un modelo,

utilizando cerebros de ratas, en el cual se intenta representar la enfermedad de Alzheimer, inoculando la fracción 25-35 de la proteína Amiloide β en el hipocampo (Yankner *et al.*, 1990).

Estudios realizados inoculando el péptido β A 25-35 indican que esta fracción peptídica es responsable de generar un deterioro en los procesos de aprendizaje y memoria de tipo espacial de corto y largo plazo, como una falla en la transmisión sináptica. El β A25-35 cuando es administrado en el hipocampo de ratas provoca errores en la ejecución de tareas de evitación pasiva y disminuye los procesos de aprendizaje y memoria espacial en modelos como el laberinto radial de 8 brazos y el acuático de Morris. Por lo tanto el péptido β A25-35 es considerado como un péptido que puede ser utilizado en modelos para estudiar el deterioro en el aprendizaje y la memoria espacial (Limón *et al.*, 2009). A pesar del interés por la función y la disfunción de la fosforilación de tau y la O- glicosilación de proteínas en la enfermedad de Alzheimer, no se ha logrado identificar de manera precisa, debido a que los análisis en la expresión de estas modificaciones se ha realizado de manera retrospectiva en cortes histológicos de cerebros humanos. Un modelo animal adecuado que recapitula con precisión la patología de tau, la degeneración neuronal encontrada en tautopatías humanas y la glicosilación, no se ha establecido. En este trabajo se propone evaluar por medio de lectinas, las modificaciones postraduccionales por O-glicosilación, en un modelo de rata en el cual se ha inducido la neurotoxicidad por la administración del péptido β A 25-35 por cirugía estereotáxica (Cuevas *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2009; Limón *et al.*, 2009; Ramírez, 2010)



[Fig. 11] Imagen del Hipocampo y la zona el Giro Dentado.

MATERIALES Y MÉTODOS

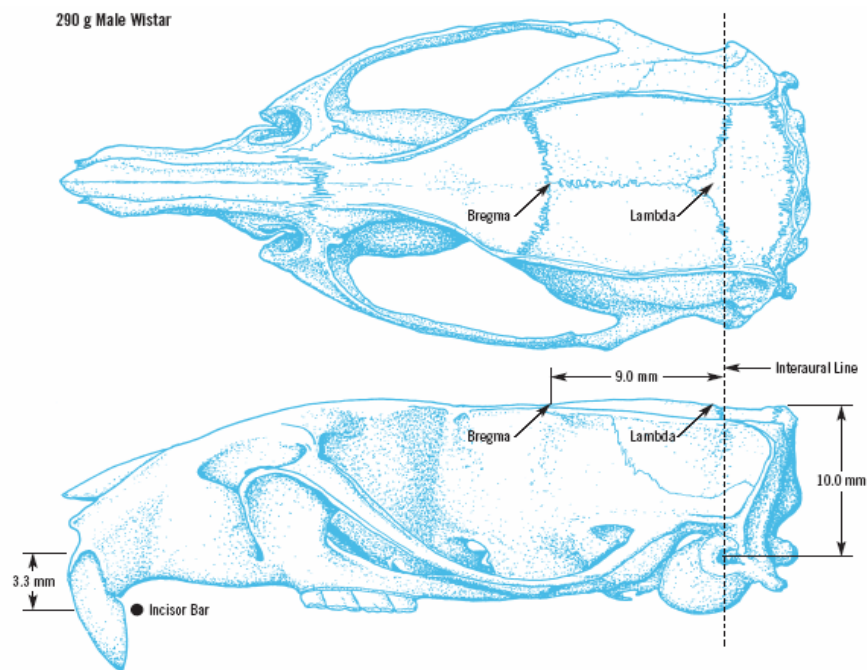
Ratas

Se utilizaron 32 ratas adultas de la cepa Wistar, provenientes del Bioterio Claude Bernard, de la BUAP, con un peso de 250-300 g. A dichas ratas se les mantuvo en condiciones controladas de temperatura 18-23 °C, humedad 50-60, ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas y con libre acceso de agua y alimento. Posteriormente se les inyectó 1 µl de la fracción 25 -35 del péptido Amiloide β a 15 de ellas, en la zona del hipocampo (CA), mediante el método de cirugía estereotáxica; a otro grupo de 15 individuos solo se les inyectó solución salina para efectos de control. Se les sacrificó después de distintos tiempos de exposición al péptido (8 h, 24h, 15 días y 30 días), y se realizaron los cortes cerebrales para practicarles las pruebas de inmunohistoquímica de triples marcas y observar los resultados. A las ratas de 30 días de exposición, se les realizaron las pruebas para evaluar aprendizaje y memoria mediante laberinto radial de 8 brazos; esta técnica a sido utilizada por otros investigadores para estudiar el aprendizaje y memoria espacial de los animales (Olton y Samuelson, 1976; Olton y Collin, 1977; Pérez Severiano *et al.*, 2004).

CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

Las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral, 350mg por kg de peso por vía intraperitoneal. Se les rasuró el área que va desde la parte occipital hacia la parte frontal desde atrás de las orejas hasta enfrente de los ojos. Posteriormente se les realizó una incisión antero posterior sobre el cráneo, con la ayuda de un algodón, en donde se removió el periostio. Luego, se colocó al animal en el aparato estereotáxico, para realizar la microinyección de 1µl de la fracción 25-35 del péptido Aβ, con las siguientes coordenadas: Para el

hipocampo: Antero Posterior -4.2 ; Lateralidad ± 3.0 (respecto a bregma) y Profundidad de -2.9 respecto a la duramadre. Ya localizadas las coordenadas, se les depositó el 1 péptido βA_{25-35} (βA_{25-35}) en el hipocampo bilateralmente (Pérez- Severiano *et al*; 2004; Paxinos y Watson, 2005) .Después se retiró la cánula guía de administración y se cerró la herida. Posteriormente se le colocó al animal solución antiséptica sobre los puntos y se administró antibiótico. Posteriormente se retiró al animal del estereotáxico y sometieron los animales a un periodo de recuperación con acceso libre de alimento y agua.



[Fig. 12] Diagrama del cráneo. Vistas dorsal y lateral del cráneo de una rata Wistar de 290 g. Coordenadas propuestas por el Atlas de Paxinos and Watson, para la localización del hipocampo AP: -4.2 , L: ± 3.0 , P: -2.9 (Atlas de Paxinos y Watson, 2005).

Laberinto radial de 8 brazos. Modelo para evaluación de aprendizaje y pérdida de memoria.

El laberinto radial de ocho brazos presenta una plataforma circular de 30 cm de diámetro, localizada en el centro del laberinto y rodeada de ocho brazos

equidistantes, que tienen 80 cm de largo, 18 cm de alto y 20 cm de ancho cada uno. En la parte final de cada brazo se localiza un contenedor de alimento que no es visible para el animal desde la plataforma central. El diseño del laberinto radial de ocho brazos asegura el regreso a la plataforma central antes de hacer otra elección, posterior a la verificación del alimento al final de cada brazo. La rata puede auxiliarse de señales extra-laberínticas, que estarán dirigidas a cada brazo, y sirven como referencia para encontrar el alimento (**Figura 13**). El aprendizaje en el laberinto se les realizó posterior a la inyección del péptido (Olton y Samuelson, 1976; Olton y Collin, 1977; Pérez Severiano et al., 2004).

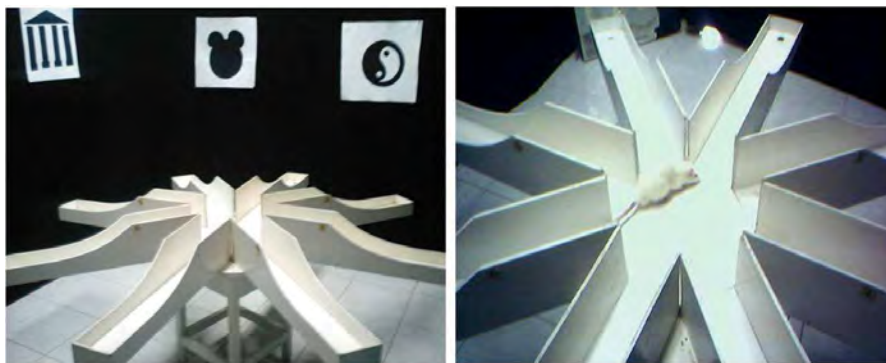


Figura 13. El laberinto radial de ocho brazos. Propuesto por Oltón & Samuelson en 1976, empleado en la evaluación de los procesos de aprendizaje y la memoria espacial en ratas.

Prueba de aprendizaje y memoria en el laberinto radial de ocho brazos

Previo a la prueba de aprendizaje espacial, los animales fueron sometidos a un control de peso durante diez días, hasta alcanzar el 85 % de su peso corporal. Las pruebas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto radial de ocho brazos se basan en el protocolo modificado y propuesto por Pérez Severiano *et al.* (2004). Los animales se sometieron a un proceso de

habitación por un día, que consistió en colocar libremente a cada animal en la parte central del laberinto por tres periodos de 15 min. En cada periodo los animales exploraran todo el laberinto para conocerlo. La prueba de aprendizaje se desarrollo durante los dos días siguientes al proceso de habituación. Consistió en evaluar la habilidad de los animales para localizar únicamente tres brazos que contienen alimento, que se eligió previo al inicio de la prueba (brazos 2, 5 y 6). Cada animal realizo un total de 20 entradas al laberinto radial, cada entrada se considero como un ensayo. Se realizaron diez ensayos por día con intervalos de 50 min y con una duración máxima de 200 segundos, el número de oportunidades para localizar los brazos que contienen el alimento disminuyo conforme transcurría la prueba. En el primer día, las oportunidades para encontrar los brazos donde se localiza el alimento se distribuyeron en 4 ensayos de 8 oportunidades, 3 ensayos de 7 oportunidades y finalmente 3 ensayos de 6 oportunidades. Para el segundo día, los diez ensayos, se distribuyeron de la siguiente forma; 4 ensayos de 5 oportunidades, 3 ensayos de 4 oportunidades y finalmente 3 ensayos de 3 oportunidades. La prueba de memoria espacial en el laberinto radial de ocho brazos se realizo diez días después de haber finalizado la prueba de aprendizaje. En un solo día los animales recordaron donde se encontraban los brazos con el alimento. Cada animal realizo un total de 8 ensayos de 3 oportunidades con intervalos de 50 min entre cada ensayo, con duración máxima de 200 seg. El porcentaje de respuestas correctas, se determino por medio del cociente del número de aciertos entre el número de oportunidades. El acierto se define como la entrada a cualquiera de los brazos donde hay comida y se ingiera. También se registro el tiempo que el animal empleaba para realizar tanto el primer como tercer

acierto, respectivamente, con el objetivo de evaluar la velocidad de adquisición para iniciar y terminar la prueba.

Obtención de cerebros de las ratas

Después de 8h, 24h, 15días de la inyección de βA_{25-35} , las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral a una dosis de 350 mg/Kg de peso y concentración de 1500 mg/25ml, una vez anestesiados los animales se perfundieron con formaldehído al 4%, con 140-160 ml aproximadamente y posteriormente fueron decapitados para extraer el cerebro y se almacenaron en para-formaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1M a pH de 7.4, para su conservación y transportación, a una temperatura de 4° C. Al grupo de ratas que se les realizó la prueba de aprendizaje y pérdida de memoria, fueron decapitadas a los 30 días posteriores a la inyección.

Incluido en parafina

Las muestras fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.4 y se incluyeron en parafina siguiendo protocolos establecidos para este fin. (Hall, 1995). Se prepararon las laminillas con Silano como adherente (Sigma Chem., St. Louis Mo., USA). Luego se cortaron con microtomo Histocut, Reichter-Jung (Cambridge Inst. GmbH, West-Germany) siguiendo de igual manera los procedimientos establecidos. (Achstetter VA; 1995). Los fragmentos obtenidos fueron montados en las laminillas previamente preparadas con el adherente mediante baño de flotación Tissue Float Bath (Lab-Line, USA), a $\pm 52^{\circ}C$ con agua corriente reposada toda la noche anterior, con la finalidad de evitar el burbujeo y agregando 3.0 gr de grenetina (gelatina para microbiología, Merck, México). Los tejidos obtenidos fueron procesados mediante la técnica de inmunohistoquímica de triples marcas.

Inmunohistoquímica de triples marcas.

Las laminillas se desparafinaron con dos enjuagues de Xilol por 10 min cada uno y se re-hidrataron las muestras con tres enjuagues de Alcohol al 100%, 96% y 70%. Posteriormente las laminillas se enjuagaron con amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.4). Luego de exponer las laminillas a temperatura ambiente, se enjuagaron con PBS y se incubaron con 150 μ l de BSA al 0.2% en PBS libre de IgG (Sigma) por 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se enjuagaron con PBS y se incubaron con Tritón X-100 (Sigma) al 0.2% en PBS por 10 min también a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se enjuagaron con PBS exhaustivamente y con PBS-CaCl₂ 0.0014 M pH 7.4. A continuación, se incubaron con las lectinas biotiniladas por 2 horas a 37°C en cámara húmeda. Al cabo de esta incubación, se enjuagaron con PBS-Ca⁺⁺, y luego se incubaron con extravidina marcada con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) dilución 1:60 en PBS, a oscuras, en cámara húmeda a temperatura ambiente por 20 min. Se enjuagaron con PBS-Ca⁺⁺ y se incubaron con el anticuerpo primario dilución 1:100 en PBS toda la noche a 4°C y protegidas de la luz. Al cabo de este periodo de incubación, se enjuagaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario específico marcado con Rhodamina-Red-X dilución 1:100 en BSA libre de IgG 1% durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegidas de la luz. Se enjuagaron con PBS y se montaron con medio VectaShield conjugado con DAPI (Vector Labs., Inc., Burlingame, CA.,USA) en obscuridad. Finalmente, se sellaron los cubreobjetos con barniz de uñas. (Guevara *et al.*, 1998).

Lectinas

La lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) fue purificada a partir de

semillas (de Tulyehualco, México) por cromatografía de afinidad en una columna unida a estroma de eritrocitos tipo O en Sephadex G-25. (Zenteno y Ochoa,1988). La lectina de Germen de Trigo (WGA) fue obtenida de Sigma . Ambas lectinas fueron marcadas con N- hidroxisuccinimida ester de biotina de Pierce Chem. Co. (Rockford, IL, USA) a una proporción marca/proteína de 2:1. (Savage et al. 1992)

Anticuerpos

El anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-Tau hiperfosforilado SC-1995, Lot # 10302 (Chemicon, International, Inc., Washington, USA) fue utilizado como anticuerpo **primario** y el anticuerpo anti-IgG (H+L) de burro anti- cabra (H+L) conjugado con Rhodamina-Red-X (705-295-147, Jackson ImmunoResearch Labs., Inc., West Grove, PA, USA), fue utilizado como secundario.

Microscopia de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia se realizó en un microscopio de fluorescencia Leica DM/LS (Leica Microsystems, Wetzlar, GmBH) con el objetivo de 40x. Las imágenes observadas fueron capturadas mediante una cámara de video Leica DFC-300FX (Leica Microsystems Digital Imaging, Coldhams Lane, Cambridge, UK) adaptada al microscopio y las imágenes se proyectan en una computadora mediante el programa Leica IM1000 versión 1.20 release 9 (Imagic Bildverarbeitung AG, Leica Microsystems, Heerburg, Zwitterland).

RESULTADOS

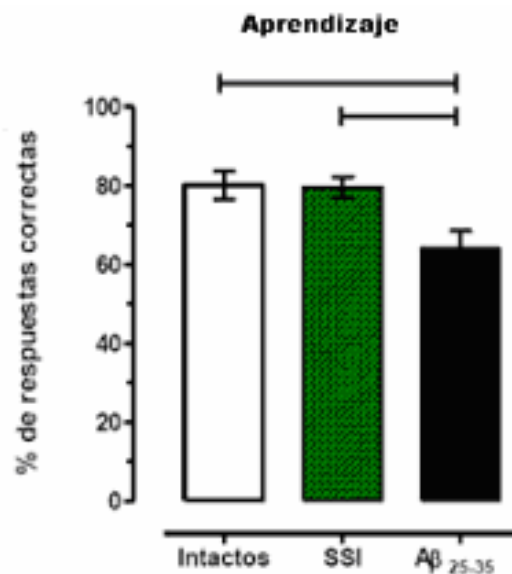
Aprendizaje mediante laberinto radial

Después de haber realizado la cirugía estereotáxica a todos los grupos de ratas, se les dio aprendizaje a un grupo de 8 ratas mediante el ejercicio en el laberinto radial de 8 brazos en donde los animales tenían que relacionar señales extra laberínticas para hallar el sitio en donde se encontraba el alimento. Sólo se les realizó dicha técnica a un grupo de cuatro ratas ya que se quería ver el daño provocado a los 30 días de la inyección del péptido.

Efecto de la inyección del Amiloide β 25-35 en el aprendizaje.

La prueba de aprendizaje se llevo a cabo 20 días después de la administración de SSI y β A25-35, en la región CA1 del hipocampo, comparando con un grupo intacto que no recibió ninguna inyección. La duración del ensayo fue de dos días con un total de 20 ensayos realizados. El objetivo de la prueba es evaluar en los animales la capacidad de adquisición de información, se utilizo el laberinto radial de ocho brazos, en el que los animales tenían que relacionar las señales extralaberínticas para encontrar el sitio donde se encontraba el alimento (brazo 2, 5 y 6). El primer parámetro que se evaluó en la prueba de aprendizaje espacial fue el porcentaje de respuestas correctas (% RC), mostrando un promedio del % RC para el grupo Intacto es de 80.1% con un error estándar de la media (\pm EEM) de 5.6, para el grupo SSI de 81.7% \pm EEM de 7.9, en el grupo administrado con el péptido β A25-35 obtuvo un % RC de 61.5 \pm EEM de 6.7. Los datos obtenidos del % RC demuestran una disminución significativa del 23.1 % para el grupo β A25-35 respecto al grupo intacto, y 24.6 % con respecto al grupo SSI. Todos los datos se analizaron con

una ANOVA de una vía, post- test Tukey (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)
(Figura 14).

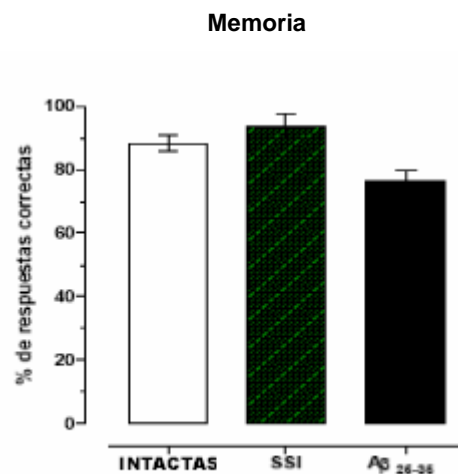


[Figura 14] Porcentaje de respuestas correctas, durante la prueba de aprendizaje en el laberinto radial de ocho brazos, 20 días después de la inyección bilateral SSI, Aβ₂₅₋₃₅, así como un grupo intacto, en la región CA1 del hipocampo, n= 8 para cada grupo. Se grafico el porcentaje de respuestas para cada grupo. (ANOVA de una vía, post-test Tukey *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Prueba de memoria. Efecto de la inyección del Amiloide β 25-35 en la zona del hipocampo en la memoria espacial.

La prueba de memoria se llevo a cabo 10 días después de la prueba de aprendizaje espacial (30 posteriores a la inyección del péptido) en la región del hipocampo. La duración de la prueba fue de un día con un total de 8 ensayos de 3 oportunidades realizados. El objetivo de la prueba es evaluar en los animales la capacidad de la recuperación de información previamente adquirida en el aprendizaje, y se volvió a utilizar el laberinto radial de ocho brazos, en el que los animales tenían que relacionar las mismas señales extra laberínticas para encontrar el sitio donde se encontraba el alimento (brazo 2, 5 y 6). El primer parámetro que se evaluó en la prueba de memoria espacial fue %RC,

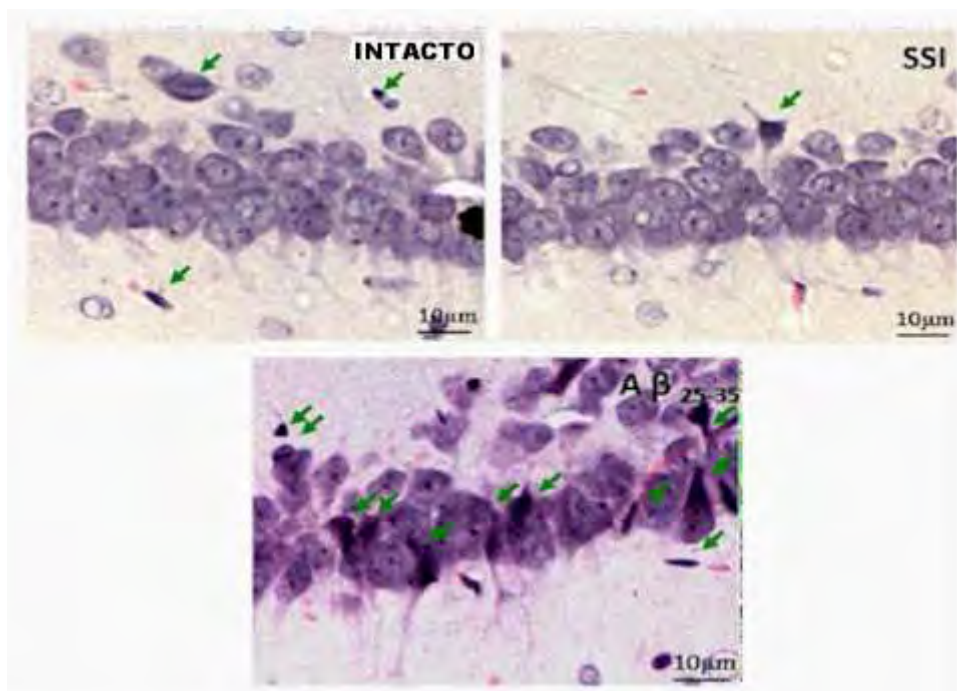
mostrando el grupo Intacto un % RC de 88.32% con un \pm EEM de 6.46, para el grupo SSI de 93.74% con un \pm EEM de 3.08, para el grupo administrado con el péptido A β 25-35 obtuvo un % RC de 75.65% con un \pm EEM de 4.16. Los datos obtenidos del % RC demuestran una disminución significativa del 14.35% para el grupo A β 25-35 respecto al grupo intacto, y 19.30% con respecto al grupo SSI. Los datos obtenidos demuestran una disminución significativa de las respuestas correctas para el grupo denominado A β 25-35, respecto a los grupos SSI e intactos. Todos los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, post-test Tukey (*P<0.05 **P<0.01) (**Figura 15**).



[Figura 15] Porcentaje de respuestas correctas, durante la prueba de memoria en el laberinto radial de ocho brazos, 30 días después de la inyección bilateral SSI y A β 25-35, así como un grupo intacto, en el hipocampo, n= 8 para cada grupo. Se graficó el porcentaje de respuestas para cada uno de los grupos. (ANOVA de una vía, post-test Tukey, *P<0.05, **P<0.01 ***P<0.001).

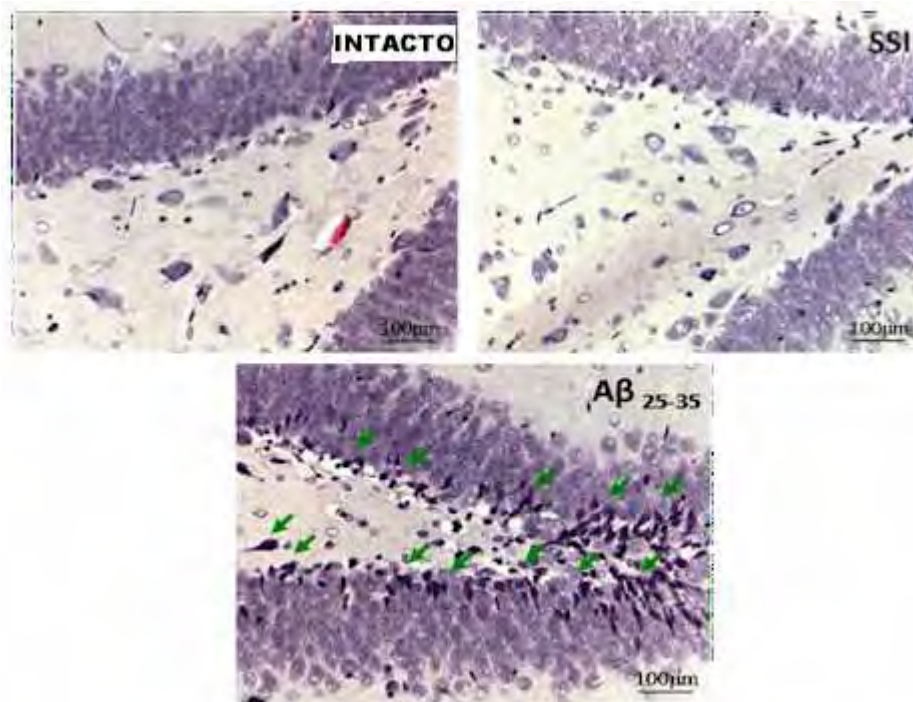
Efecto de la inyección del Amiloide β 25-35 en la morfología celular.

Una de las consecuencias de la toxicidad del A β 25-35, es la desorganización celular y la presencia de estructuras agregadas. Para demostrar la desorganización, se empleó una técnica de Hematoxilina y Eosina para la identificación de la morfología celular que nos indica la organización, así como la presencia de acidofilia en estructuras celulares dañadas. Los tejidos de los grupos Intacto y SSI, mostraron células de tamaño homogéneo, con núcleo definido y sin acidofilia, que indica la ausencia de daño o alteración celular. En los tejidos del grupo A β 25-35 se muestran un desorden en la forma y organización de las células, además de intensa acidofilia, presente tanto en los núcleos como en las proyecciones de las células, lo cual se relaciona con un daño celular (**Figura 16**).



[Figura 16] Se muestra un panel de las fotomicrografías representativas en la histoquímica H&E en microscopía de campo claro. Se estudió el efecto de la inyección bilateral del péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo de rata en los grupos: SSI (100 µM), A β 25-35 (100 µM), 40x.

En los tejidos de los grupos Intacto y SSI, en la región giro dentado se muestra una morfología homogénea, con escasa acidofilia, las células presentan una estructura y tamaño definido. En tejidos del grupo A β 25-35 se observa acidofilia, relacionado con daño celular (**Figura 17**).



[Figura 17] Se muestra un panel de las fotomicrografías representativas en la histoquímica H&E en microscopía de campo claro. Se estudio el efecto de la inyección bilateral del péptido A β 25-35 en la región CA1 y su efecto en la región del giro dentado, del hipocampo de rata en los grupos: Intactos sin inyectar, administrado con SSI (100 μ M), y A β 25-35 (100 μ M), 20x.

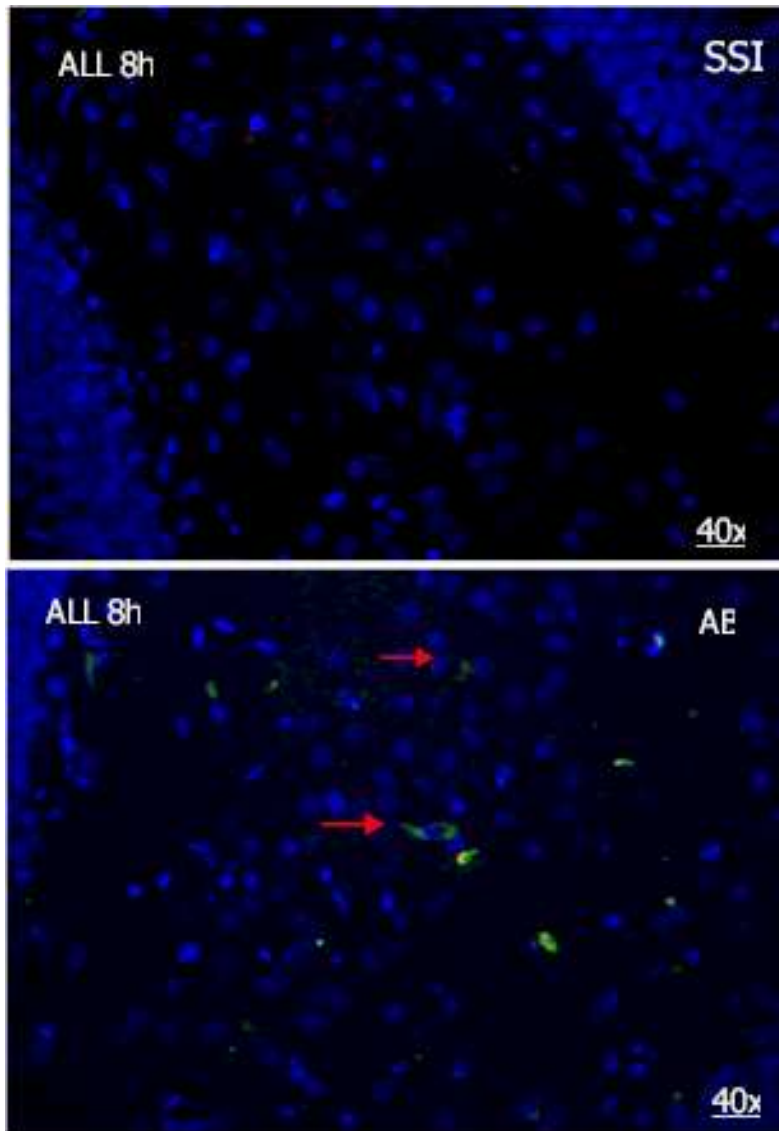
Inmunohistoquímica de triples marcas con 2 lectinas: ALL y WGA.

Para realizar la técnica de inmunohistoquímica acoplada a fluorescencia, se identificaron zonas cercanas al sitio de lesión en la región CA1 del hipocampo de rata, así como el Giro Dentado. Mediante la prueba con Hematoxilina y Eosina, se observó una zona que presentaba neuronas con daño y acidofilia inducida por el péptido en el Giro Dentado, así que se decidió identificar las estructuras O-glicosiladas de dicha zona, ya que, como habíamos mencionado, es una estructura de la formación hipocampal implicada en la consolidación de la memoria reciente como en la de a largo plazo. Después de haber realizado la técnica de inmunohistoquímica a los cortes de cerebro de las ratas inoculadas con el péptido β A y a los tejidos control, pudimos identificar la positividad de estructuras glicosiladas, basándonos en la marca que las identifica con ayuda de las ALL y WGA. Los cortes cerebrales control, mostraron que, en ausencia del péptido β A, la O-glicosilación no fue identificada por estas lectinas. La técnica se realizó a diferentes tiempos de exposición a la toxicidad del péptido β A, lo cual nos permitiría observar la tendencia de aparición de estructuras O-glicosiladas al paso del tiempo. La evaluación de los resultados consistió en un análisis cualitativo de la fluorescencia, localizando las células positivas en cada una de las fotomicrografías. En cada tiempo de exposición, se dieron eventos de diferente positividad o nula.

Inmunohistoquímica con ALL

El reconocimiento de la lectina de ALL (*Amaranthus leucocarpus*) sugiere un incremento en la producción de proteínas O-glicosiladas que contienen Gal(1,3GalNAc(1,0 Ser/Thr o GalNAc) 1,0 Ser/Thr, en las neuronas; además de la aparición de la proteína tau podría significar que se logró reproducir el modelo de neurodegeneración de tipo Alzheimer en rata, ya que es característico de la EA.

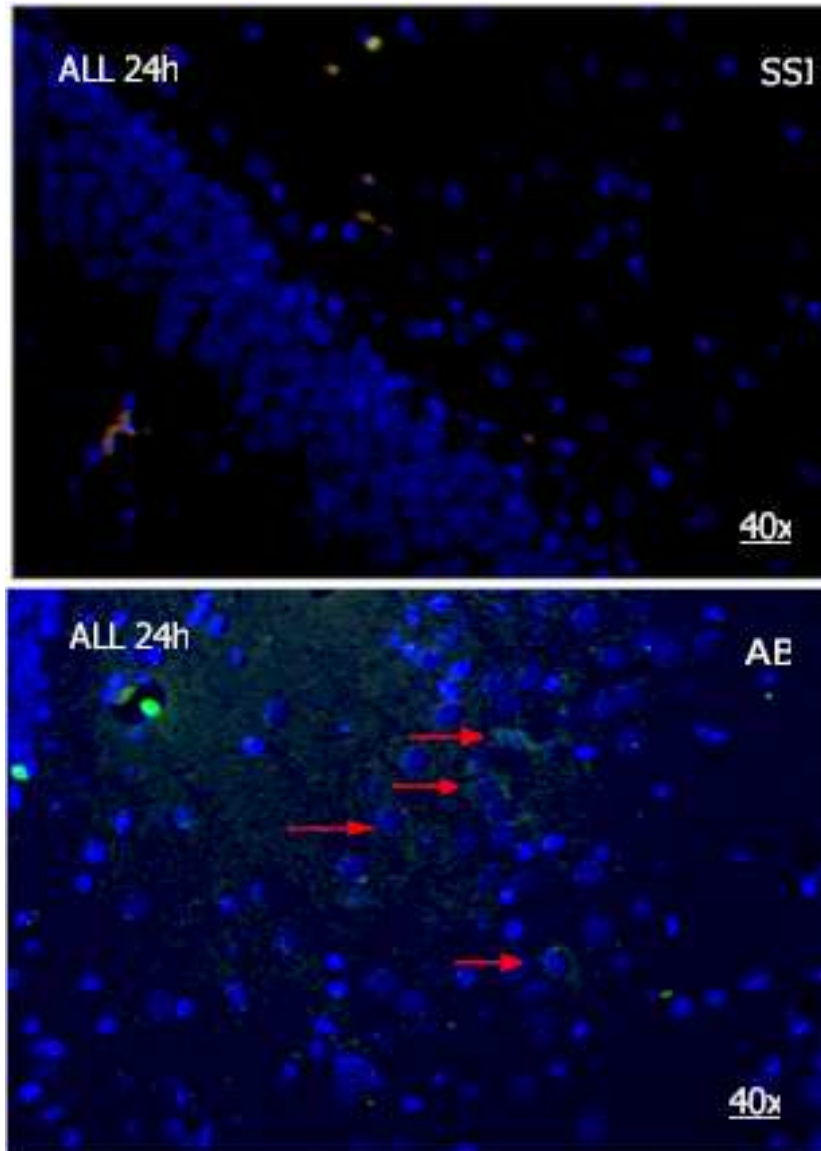
Un grupo de 4 ratas fueron decapitadas a las 8h de haber inoculado el péptido mediante la cirugía, así como también a las ratas control. Los cortes se observaron mediante el microscopio de fluorescencia y se pudo identificar que a este tiempo de exposición al péptido, la lectina de ALL dio positivo a algunas neuronas en el citoplasma (tinción verde) (Figura 18). Además de observarse algunos vasos marcados. No pudimos observar marcaje positivo para Tau fosforilada. Los tejidos control inyectados con SSI no presentó marca positiva ni para ALL ni para los anticuerpos anti-Tau fosforilada.



[Figura 18] Inmunohistoquímica de triples marcas. Cortes con exposición al péptido β - amiloide de 8h. Fotomicrografías representativas para la inmunorreactividad con lectina ALL marcadas con FITC (verde), núcleos marcados con DAPI (azul) y proteína Tau marcada con Rhodamina- Red- X, y del corte control con SSI. (40x).

Cortes con 24h de exposición al péptido Amiloide β .

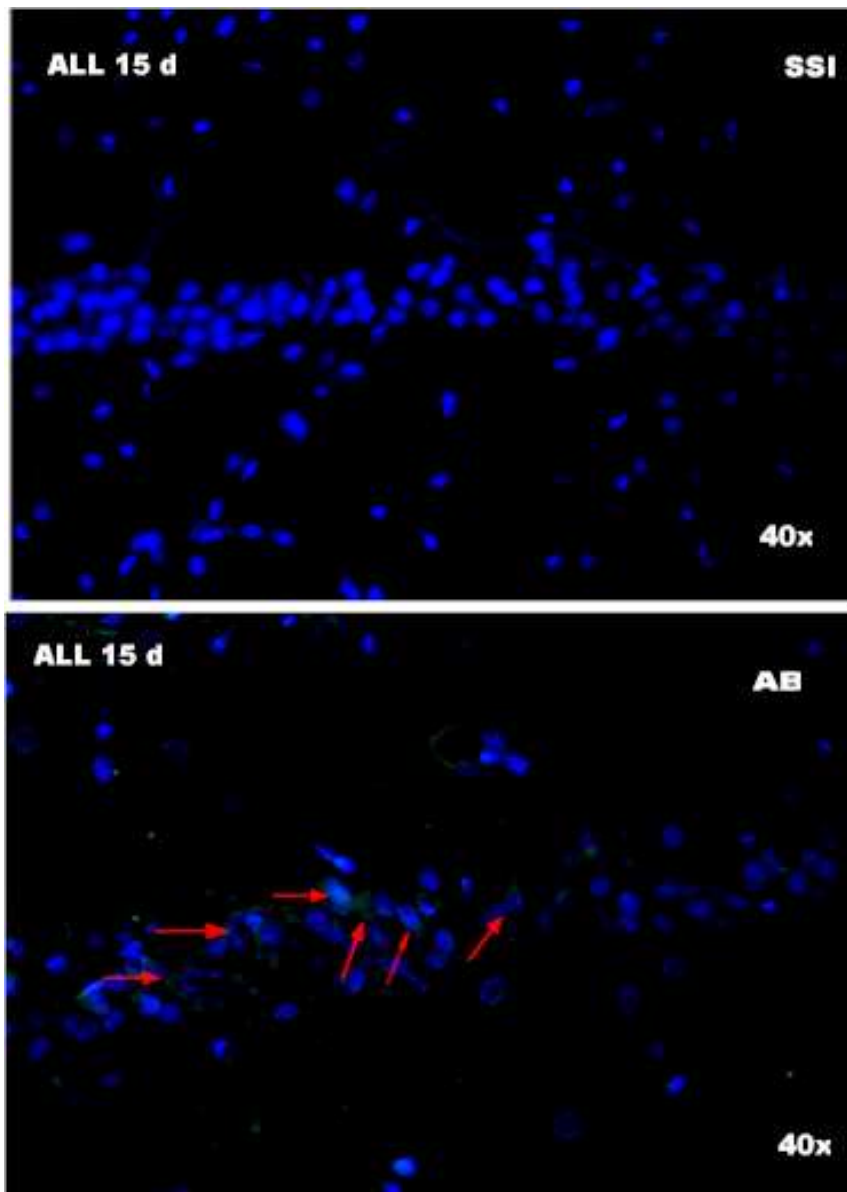
Un grupo de 4 ratas fueron decapitadas a las 24 h de haber inoculado el péptido, así como también 4 ratas control. Se pudo identificar que a las 24 h aplicado el péptido, las neuronas con aparente marcaje positivo para ALL se incrementó (Figura 19), mientras que en el corte control aparecen algunos vasos sanguíneos marcados pero no se observan neuronas con marcaje positivo. No se observa tampoco marcaje para Tau fosforilada (rojo).



[Figura 19] Inmunohistoquímica de triples marcas. Cortes con exposición al péptido β - amiloide de 24 h. Fotomicrografías representativas para la inmunorreactividad con lectina ALL marcadas con FITC (verde), núcleos marcados con DAPI (azul) y proteína Tau marcada con Rhodamina- Red- X (Rojo), y del corte control con SSI. (40x).

Cortes con 15 días de exposición al péptido β -amiloide.

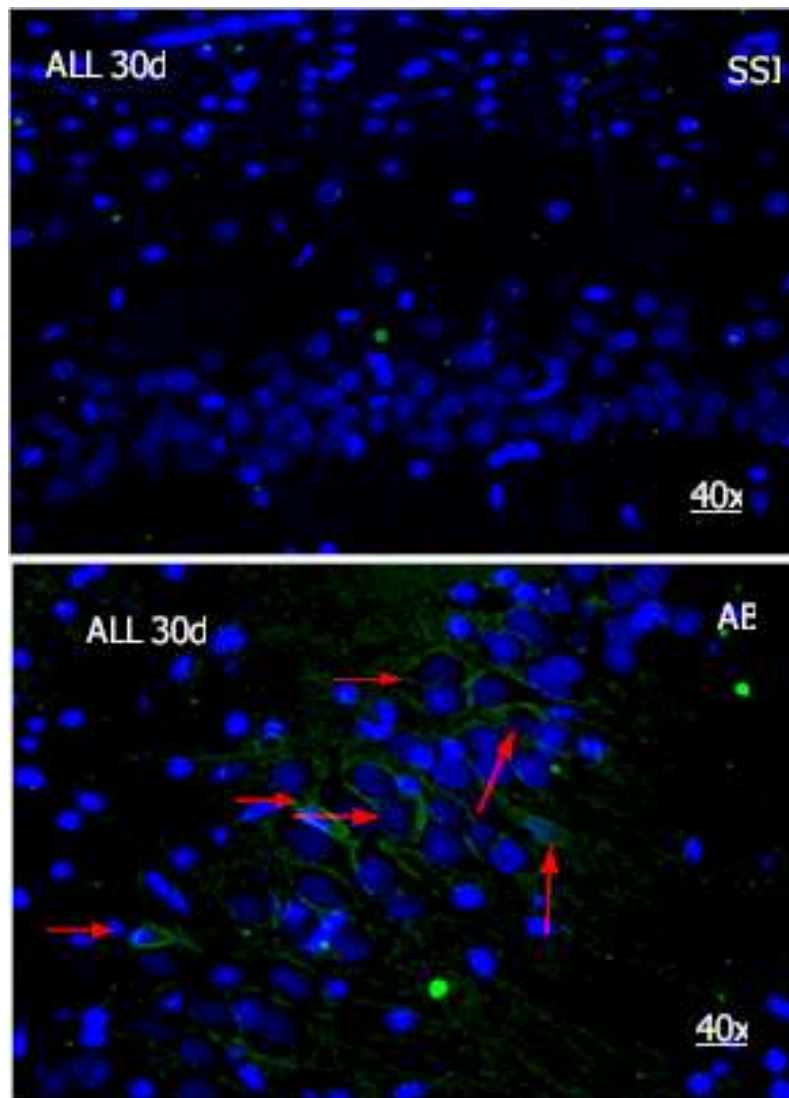
Un grupo de 4 ratas fueron decapitadas a los 15 días posteriores a la inoculación del péptido β A mediante la cirugía, así como también a las ratas control. A este tiempo de exposición a la toxicidad del péptido, aumentaron las neuronas positivas marcadas con ALL (verde) (Figura 20).



[Figura 20] Inmunohistoquímica de triples marcas. Cortes con exposición al péptido β - amiloide de 15 días. Fotomicrografías representativas para la inmunorreactividad con lectina ALL marcadas con FITC (verde), núcleos marcados con DAPI (azul) y proteína Tau marcada con Rhodamina- Red- X (Rojo), y del corte control con SSI. (40x)

Cortes con 30 días de exposición al péptido Amiloide β .

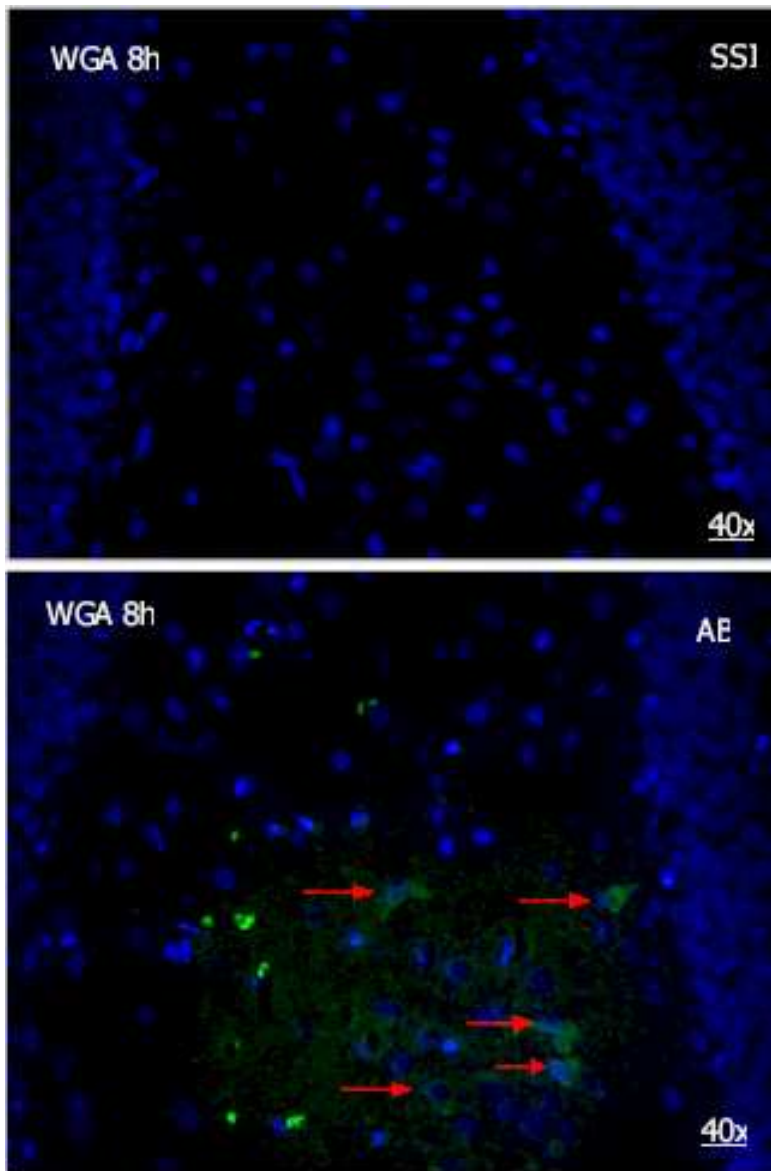
A este grupo de ratas, se les realizó la prueba de aprendizaje y memoria, lo que nos indicó que el animal se encuentra con algún daño, ya que tiene menos aciertos que las ratas que se encuentran sanas y pudimos observar mediante la prueba de hematoxilina y eosina, que a ese tiempo de exposición a la toxicidad del péptido, las neuronas se encuentran con un grave daño celular y con acidofilia. Lo que resultó de la prueba de inmunohistoquímica fue que aumentó el número de neuronas marcadas con la lectina de ALL (Figura 21).



[Figura 21] Inmunohistoquímica de triples marcas. Cortes con exposición al péptido β - amiloide de 30 días. Fotomicrografías representativas para la inmunoreactividad con lectina ALL marcadas con FITC (verde), núcleos marcados con DAPI (azul) y proteína Tau marcada con Rhodamina- Red- X (Rojo), y del corte control con SSI. (40x).

Inmunohistoquímica con WGA

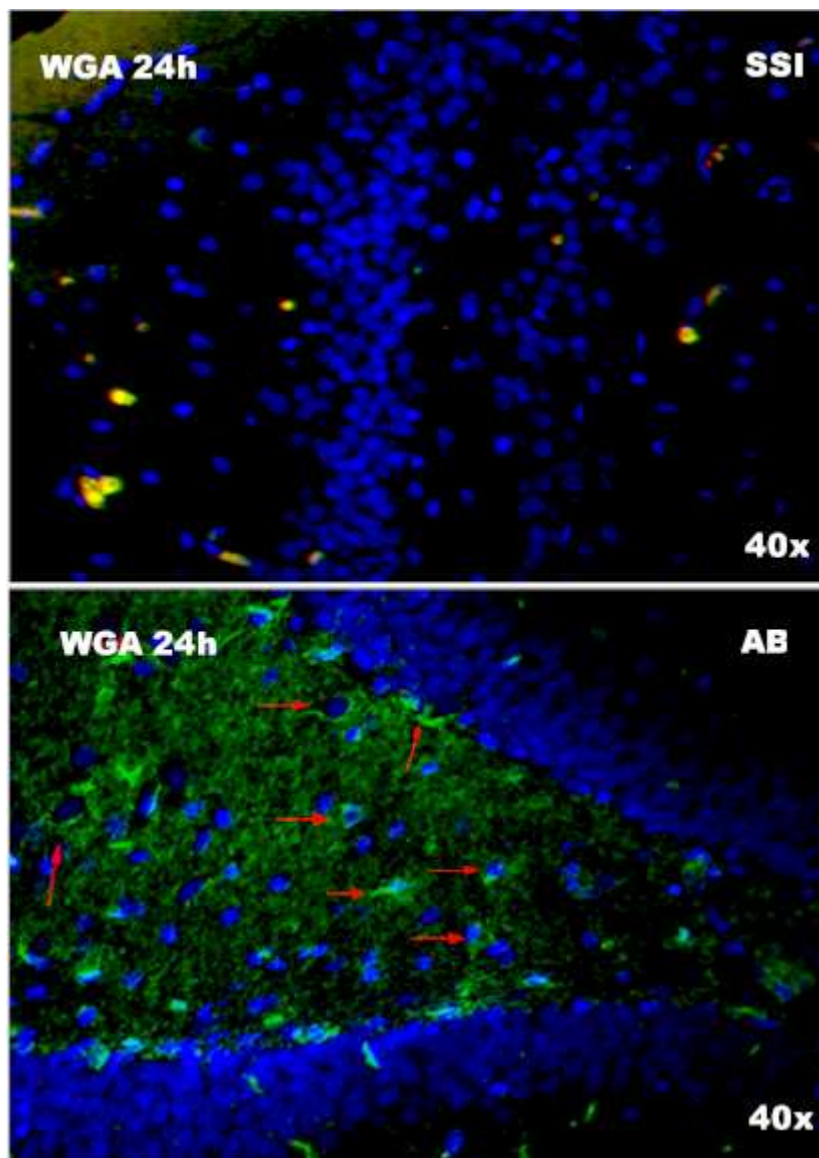
El reconocimiento de la proteína de WGA en los cortes cerebrales sugieren que existe una relación directa entre la GlcNAc y la fosforilación, ya que, al parecer, y observando las imágenes al paso del tiempo, de 8hrs hasta los 30 días de exposición a la lectina, sucede lo contrario que con ALL, un decremento de la positividad de la lectina WGA (específica para la O-glicosilación con GlcNAc), pero se mantiene la positividad a la proteína Tau. Esto podría confirmar lo establecido por Lefebvre, ya que la O-GlcNAc glicosilación puede competir con la fosforilación por el mismo sitio o la misma región, causando exclusión mutua. Un grupo de 8 ratas fueron decapitadas a las 8h de haber inoculado el péptido mediante la cirugía, así como también a las ratas control. Los cortes se observaron mediante el microscopio de fluorescencia y se pudo identificar que a este tiempo de exposición al péptido, la lectina de WGA dio positivo a varias neuronas en el citoplasma (tinción verde) (Figura 22), lo que nos indica que las neuronas presentan estructuras O-glicosiladas de tipo GlcNAc. Además de observarse algunos vasos marcados. No pudimos observar marcaje positivo para Tau fosforilada. El corte control no presentó alguna alteración, sólo se marcan algunos vasos sanguíneos.



[Figura 22] Inmunohistoquímica de triples marcas. Cortes con exposición al péptido β - amiloide de 8h. Fotomicrografías representativas para la inmunorreactividad con lectina WGA marcadas con FITC (verde), núcleos marcados con DAPI (azul) y proteína Tau marcada con Rhodamina- Red- X (Rojo), y del corte control con SSI. (40x).

Cortes con 24h de exposición al péptido Amiloide β .

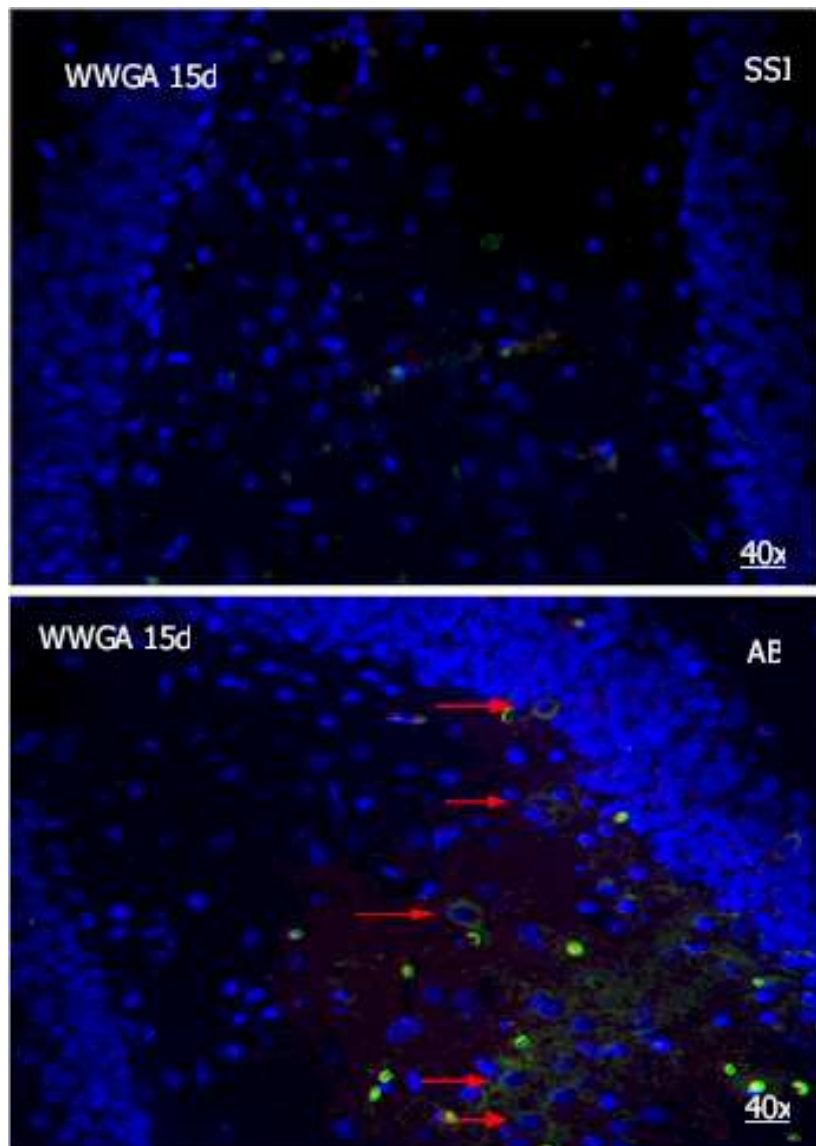
Un grupo de 4 ratas fueron decapitadas a las 24 h de haber inoculado el péptido βA , así como también a las ratas control. Se pudo identificar incremento de marcaje con WGA en neuronas (Figura 23), mientras que en el corte control aparecen algunos vasos sanguíneos marcados pero no se observan neuronas con marcaje positivo. No se observa tampoco marcaje para Tau fosforilada (rojo).



[Figura 23] Inmunohistoquímica de triples marcas. Cortes con exposición al péptido β - amiloide de 24h. Fotomicrografías representativas para la inmunorreactividad con lectina WGA marcadas con FITC (verde), núcleos marcados con DAPI (azul) y proteína Tau marcada con Rhodamina- Red- X (Rojo), y del corte control con SSI. (40x).

Cortes con 15 días de exposición al péptido β Amiloide.

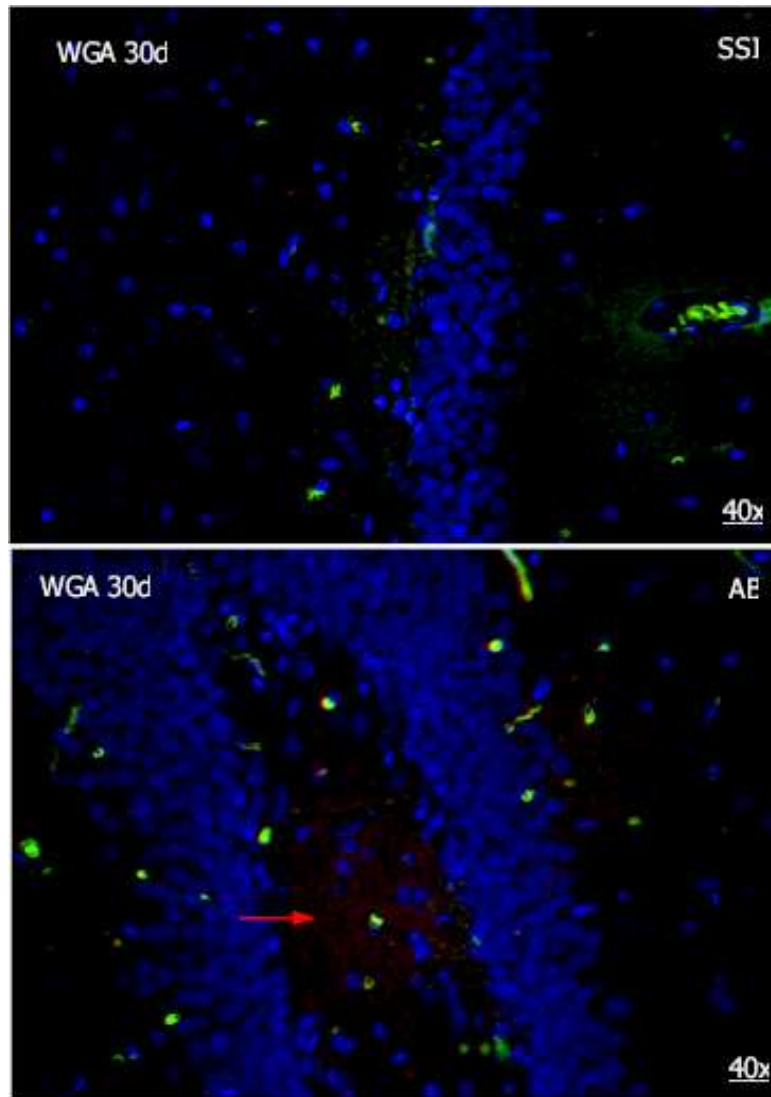
Un grupo de 4 ratas fueron decapitadas a los 15 días de haber inoculado el péptido mediante la cirugía, así como también a las ratas control. Los cortes fueron observados y se logró identificar que a este tiempo de exposición a la toxicidad del péptido disminuyó el marcaje de WGA a neuronas (verde), sin embargo se aprecia incremento del marcaje de la proteína Tau fosforilada (Figura 24).



[Figura 24] Inmunohistoquímica de triples marcas. Cortes con exposición al péptido β - amiloide de 15 días. Fotomicrografías representativas para la inmunorreactividad con lectina WGA marcadas con FITC (verde), núcleos marcados con DAPI (azul) y proteína Tau marcada con Rhodamina- Red- X (Rojo), y del corte control con SSI. (40x).

Cortes con 30 días de exposición al péptido β Amiloide.

En los ensayos de inmunohistoquímica no se observan neuronas marcadas con la lectina WGA, sin embargo se apreció un marcado aumentó el marcaje para la proteína Tau fosforilada (rojo), que nos indica la ausencia de estructuras O-glicosiladas de tipo GlcNAc (Figura 25).



[Figura 25] Inmunohistoquímica de triples marcas. Cortes con exposición al péptido β - amiloide de 30 días. Fotomicrografías representativas para la inmunorreactividad con lectina WGA marcadas con FITC (verde), núcleos marcados con DAPI (azul) y proteína Tau marcada con Rhodamina- Red- X (Rojo), y del corte control con SSI. (40x).

DISCUSIÓN

En la Enfermedad de Alzheimer, existen 2 lesiones histopatológicas características importantes, las generadas por la presencia de las Marañas Neurofibrilares (MNFs) y las Placas Neuríticas (PNs) (Buchet y Slawomir., 2000; Alonso *et al.*, 2001). También se han identificado modificaciones postraduccionales, como la O-glicosilación de tipo mucina, y que se ha relacionado con plasticidad neuronal como con lesiones características de la EA. Esta modificación pos-traducciona se efectúa en el Aparato de Golgi y se caracteriza por la adición por transferasas específicas de GalNAc al –OH de serina y/o treonina en una cadena peptídica (Varki *et al.*, 1999). Recientemente se han identificado otras modificaciones postraduccionales que incluyen enlaces con el –OH de serina y/o treonina pero sustituidos por GlcNAc. La glicosilación de tipo GlcNAc (GcNAcilación) es una modificación de proteínas realizada en el Aparato de Golgi y se ha observado en los compartimentos citosólicos y nucleares de diversas proteínas estructurales y no sólo en el lumen del Retículo Endoplásmico o en el Aparato de Golgi y existen evidencias de que su presencia también está asociada a la EA (Lefebvre, *et al.*, 2003).

Dado que la O-glicosilación tiene un papel fundamental para la localización de lesiones características de la EA, el estudio fue dirigido a identificar la presencia de estructuras O- glicosiladas, mediante la utilización de lectinas como *Amaranthus leocarpus* (ALL), específica para GalNAc (Espinosa *et al.*, 2004), y la lectina WGA de Germen de Trigo específica para residuos de N- acetilglucosamina (GlcNAc) (Lefebvre *et al.*, 2003), para tratar de entender la potencial participación de las modificaciones postraduccionales

que se efectúan a nivel Aparato de Golgi en el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer.

La fracción 25-35 de la proteína β - Amiloide (β A), es el dominio funcional tóxico de la proteína β - Amiloide 1-42, en donde la metionina, en la posición 35, parece ser la responsable de la conformación del sitio redox (Yankner B, *et al*; 1990). Esta provoca el daño neuronal de varias maneras, como son el incremento del calcio intracelular, estrés oxidativo, apoptosis, necrosis, activación de la glia y daño en el tejido. Todos estos eventos convergen en un patrón común que puede ser el responsable por el déficit cognitivo (pérdida espacial del aprendizaje y la memoria) y consecuentemente la peroxidación lipídica, acompañada del incremento de la gliosis reactiva. Esto significa que puede existir una nueva oportunidad para investigar nuevos tratamientos en contra la patología de la Enfermedad del Alzheimer (Cuevas *et al.*, 2009)

Se ha argumentado que la acumulación de la proteína β A es un determinante clave en el mecanismo patogénico de la Enfermedad de Alzheimer. La proteína β -amiloide es un polipéptido de 4 kDa que está íntimamente involucrado en las cascadas patogénicas. Dicho péptido, es tóxico en células de cultivo, en la cual su toxicidad está asociada con la agregación del péptido. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar la toxicidad, los cuales son 1) producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS), tales como el peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, anion superóxido e hidroxilos radicales altamente reactivos. 2) acumulación de calcio intracelular, 3) alteración del flujo de membrana, 4) reducción de la energía, 5) Alteración de los componentes del citoesqueleto y 6) procesos inflamatorios.

Otra característica común de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas de la vejez asociadas con la pérdida de neuronas, es la perturbación del citoesqueleto neuronal. Los neurofilamentos, que juegan un papel importante, manteniendo la estructura de las neuronas y los microtúbulos, utilizados en el transporte de productos entre el cuerpo celular y las porciones distales de los axones y las dendritas, son dos organelos clave del citoesqueleto, responsables de mantener la estructura y la integridad funcional de la neurona. Entendiendo el papel que juega la proteína tau asociada a microtubulos en el ensamblaje y estabilidad del sistema microtubular, la interrupción, y la subsecuente formación de marañas neurofibrilares compuestas por la proteína tau hiperfosforilada, es muy importante, ya que dichas consecuencias pueden ser clave en la muerte de la neurona y la expresión clínica de la EA. Existe evidencia de que las alteraciones en las formas de tau comprenden el componente básico de los filamentos helicoidales pareados (PHFs) en la EA.

Los niveles normales de fosforilación de tau son la consecuencia de una regulación dinámica de cinasas y fosfatasa. Las cinasas son un gran número de enzimas que regulan la actividad de otras proteínas y, más directamente, las actividades de las células. La fosforilación de las proteínas, la adición de un grupo de fosfato a una cadena del aminoácido, es una acción regulatoria muy importante, ya que cada grupo de fosfato lleva consigo dos cargas negativas, la adición de un fosfato puede alterar la forma de la proteína. En la EA, dichas cinasas se encuentran distintas y alteran la conformación de tau, los sustratos de estas enzimas juegan un rol en la hiperfosforilación y en la agregación, además de la fosforilación de los residuos de serina y treonina, la proteína tau

es modificada por monosacáridos GlcNAc, mediante enlaces glicosídicos, este tipo de modificaciones son mejor conocidas como O-GlcNAcilación. Lo más relevante de esta modificación es que tiene la capacidad de regular la fosforilación de tau tanto *in vitro* como *in vivo*. La O-GlcNAcilación de tau, se ha encontrado importantemente disminuída en los cerebros con la EA, lo que correlaciona directamente con la hiperfosforilación de la proteína tau (Lozano., 2009).

Micrografías de electrones han demostrado que las marañas neurofibrilares (MNFs) en la EA están compuestas principalmente de excesivos agregados de tau fosforilada (Stoothoff y Jonson, 2005). Estos agregados se acumulan en el cuerpo de la célula y procesos (axones y dendritas) de las poblaciones neuronales selectivamente vulnerables en el cerebro. Las seis isoformas de tau han sido encontradas tanto en los filamentos helicoidales pareados como en las marañas neurofibrilares. La cascada patológica responsable de convertir a tau normalmente fosforilada asociada a microtubulos en agregados hiperfosforilados que provocan los filamentos helicoidales pareados no está del todo comprendida. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que la tau hiperfosforilada es el principal componente de los filamentos helicoidales pareados (FHPs). Esto se correlaciona con la observación de que una leve pérdida de memoria es la característica clínica más común en las primeras etapas de la EA. Sin embargo, no hay evidencia de que las marañas neurofibrilares de la corteza entorrinal y el hipocampo son suficientes para producir síntomas de demencia desde que es bien conocido que un pequeño número de marañas ocurren en las mismas regiones en individuos ancianos saludables.

En la utilización de modelos animales para reproducir la EA es importante considerar la existencia de factores adicionales que juegan un papel importante para comprender una enfermedad y su progresión, tales como la dieta y el ambiente, a los que los modelos no están expuestos; aunque el impacto de estos factores no ha sido dirigido aún. A pesar de que algunos primates y perros de edad avanzada exhiben patología similar a la EA, no es ideal utilizarlos como modelos de estudio, debido a los costos, tiempo y complejidad involucrada. Con la intención de identificar un modelo similar al del Alzheimer pero en rata, se realizó la técnica de cirugía estereotáxica para inyectar directamente en el cerebro de la rata, la fracción 25 – 35 de la β A en el hipocampo (CA), y así conseguir que se presentaran cambios parecidos a la EA. A las ratas se les decapitó a las 8h, 24h, 15 días y 30 días, para conocer sus estados de alteración a esos tiempos de exposición, en específico la zona del Giro Dentado, que se encuentra relacionada con funciones de reconocimiento y memoria. Sin embargo, para las ratas de 30 días, se les realizaron las pruebas de aprendizaje y memoria espacial post inyección, para conocer el daño provocado en el comportamiento de los animales y posteriormente, teniendo los cortes cerebrales, se les realizó la prueba de Hematoxilina y Eosina para conocer el daño morfológico y la acidofilia de las neuronas provocado por el péptido.

La expresión de estructuras O-glicosiladas en el cerebro de las ratas, control y las tratadas con el péptido β A fueron analizadas con lectinas (ALL y WGA) y se trató de hacer una correlación con una de las principales alteraciones de la EA, como la identificación de depósitos de la proteína Tau fosforilada; se utilizó la técnica de inmunohistoquímica de triples marcas, con

las lectinas y anticuerpos anti-tau, identificando las posibles marañas neurofibrilares, y observando los tejidos con diferentes tiempos de exposición a la toxicidad de la β A. Los cortes fueron observados mediante microscopía de fluorescencia, en donde se revelaron las lectinas, con Extravidina con FITC; la proteína tau con Rhodamina Red X y Hematoxilina de Harris, para la tinción de núcleos. También se realizó dicho estudio en ratas control que fueron administradas con solución salina isotónica (SSI). En este estudio, pudimos observar que las estructuras O-glicosiladas, dieron positivas a las lectinas utilizadas con su respectiva especificidad (ALL por GalNAc y WGA por GlcNAc).

Se ha sugerido que uno de los mecanismos de toxicidad del péptido β A, es la alteración de las señales de calcio, ya que posterior a la administración de la fracción 25-35 de β A a preparados celulares de la corteza o el hipocampo de ratas neonatas las señales de $[Ca^{2+}]$ comienzan 5-15 min posteriores a la administración del β A. El incremento de calcio actúa de manera importante en la señalización de las células de las glía y las neuronas, esta alteración favorece la muerte de la célula. (Kajava, *et al.*, 2006). Posteriormente, a partir de algunas horas después de la inyección de β A empieza a haber pérdida de la memoria. Los resultados concuerdan con estudios realizados por otros investigadores quienes observan un daño cognitivo 15 y 30 días post-administración del péptido β A (Stepanichev *et al.*, 2003, 2004, 2005).

Muchas especies han sido consideradas para desarrollar el modelo de enfermedad de Alzheimer, incluyendo los hámsters (que tienen PPA del tipo humano) o roedores. De éstos, ninguno desarrolla la patología de EA, necesitan la creación de transgénicos para replicar con mayor acercamiento la

neuropatología de la enfermedad. Los modelos en roedores siguen siendo los más utilizados, ya que su Sistema Nervioso Central (SNC) y neurobiología en general es muy similar a la de los humanos. En general, el problema central con los modelos transgénicos en roedores para EA es que no siempre desarrollan el espectro completo de la neuropatología de la enfermedad. No obstante, los modelos creados son herramientas valiosas para comprender los mecanismos *in vivo* relacionados a la patología que se desarrollan a nivel molecular y genético. (Pérez Castro, 2009)

Diversos estudios sugieren que las modificaciones postraduccionales de las proteínas, especialmente la glicosilación, podrían correlacionar con las alteraciones específicas de la EA. Sin embargo, el hecho de que las dos principales proteínas identificadas en la EA, que son la proteína tau y el precursor de la amiloide- β son glicoproteínas, nos proporciona el interés en la identificación de estas proteínas, basándonos en la glicosilación como un marcador nuevo y específico para la EA. (Espinosa, 2009). Nuestros resultados sugieren que se logró una respuesta al péptido β A que favoreció el incremento de O-glicosilación de tipo mucínico que involucra a GalNAc y de la GcNAcilación en la neurodegeneración como un posible intento de plasticidad neuronal, o bien un precedente para los cambios a nivel neuronal que podría provocar la muerte celular. El uso de lectinas debido a su especificidad para reconocer estructuras oligosacáridicas ha permitido entender la función de la glicosilación y en particular de la O-glicosilación y poder estudiar la localización de glicoconjugados en cerebros de personas mayores y de pacientes con la Demencia de Tipo Alzheimer (DTA), y la mayoría han sido conjugadas con biotina para mejores resultados. La lectina GS-I (*Banderiaea simplicifolia* –

específica a Gal y GalNAc), ECA (*Erythrina cristagalli*- específica para GalNAc y para GlcNAc), SBA (*Glycine max* - específica para GalNAc), PNA (*Arachis hypogaea* – específica para Gal – GalNAc), ALL (GalNAc) y WGA (GlcNAc). (Nishimura *et al.*, 2000). Han sido aplicadas en la búsqueda de marcadores glicosilados en neuronas de cerebros con Alzheimer, sin embargo no se han logrado identificar diferencias en la expresión de los receptores para estas lectinas en comparación con otras enfermedades demenciales o de cerebros de individuos sanos (Guevara, 1998., Espinosa, 2003) o en cerebros de individuos sanos. Las diferencias encontradas con otras lectinas con la misma especificidad sugieren de manera importante que cada lectina reconoce secuencias de carbohidratos en estructuras glicoprotéicas específicas, de esta forma, mediante la secuenciación de amino ácidos del receptor para ALL en cerebro humano con Alzheimer, se identifica una homología con glicoproteínas de tipo mucina (Espinosa *et al.*, 2003), y se establece que las lectinas pueden ser una herramienta útil para el estudio de las glicoproteínas en esta enfermedad.

En este estudio, utilizamos las lectinas de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) y de Germen de trigo (WGA) La lectina ALL, es específica para GalNAc y reconoce al hidroxilo del C4 y el N-acetilo del C2 de la GalNAc en la estructura Gal β 1,3GalNAc1,0Ser/Thr (Zenteno *et al.*, 1992), y se ha demostrado que interactúa con glicoproteínas de unión O en algunos procesos neurodegenerativos. Se ha sugerido en algunos trabajos que la lectina ALL, puede reconocer factores determinantes de O-glicanos, arreglados en agrupaciones de un receptor celular específico (Hernández *et al.*,2004). Es interesante identificar que la producción de estas estructuras puede implicar

una competencia entre glicosiltransferasas por el mismo sustrato. Así como en la biosíntesis de otros oligosacáridos, la expresión de los niveles y las distribuciones subcelulares de las glicosiltransferasas dentro del Aparato de Golgi, puede determinar las características de la glicoproteína (Varki *et al.*, 1999). Esto indica la relevancia de contener estructuras GalNAc como indicador de alteraciones patológicas en la EA. Este resultado es importante ya que sugiere la presencia de modificaciones específicas de la O-glicosilación en un receptor putativo para esta lectina. Se ha demostrado que esta lectina identifica estructuras asociadas a las PNs. Estas placas están constituidas principalmente de la proteína β A en estado fibrilar. La proteína precursora del amiloide- β (PP β A) es una proteína de 695-770 aminoácidos que posee 45 treoninas y 30 serinas que pueden ser potencialmente sustituidos por GalNAc. Por esta razón, el marcaje positivo con ALL podría indicar la presencia de O-glicosilación de tipo mucínico pero en una forma críptica en las Placas Neuríticas (PNs). En estudios realizados para caracterizar al receptor para ALL en cerebro humano con EA, se identificó una glicoproteína de 90 kDa con homología con mucina humana, sugieren de manera importante que las estructuras relacionadas con la enfermedad podrían estar relacionadas con modificaciones de otros componentes neuronales. Esto sugiere la relevancia de contener estructuras GalNAc como indicador de alteraciones patológicas en la EA (Espinosa, 2009). Existen más estudios que sugieren un incremento en la producción de proteínas ocultas unidas O-glicosidicamente en brotes neuríticos en cerebros con Alzheimer como determinados por un marcaje positivo con lectinas como *A. leucocarpus*, WGA y patrones de O-glicosilación de proteínas

cercanamente relacionadas a plasticidad neuronal en la Enfermedad de Alzheimer (Espinosa, *et al*; 2001).

El análisis con lectinas marcadas con FITC en tejido de la EA, nos ayudaron a identificar las zonas en donde se dio un evento de O-glicosilación conociendo las estructuras que normalmente reconoce cada una de las lectinas y nos sugieren que las diferencias que se observaron en las estructuras patológicas en la EA, representan diferentes grados de complejidad de biosíntesis de oligosacáridos unidos por enlaces O- glicosídicos, que están expresados en su manera mas sencilla, ya que al parecer no tienen otra estructura pegada y solo son los sitios core de GalNAc o GlcNAc. En estos fenómenos participarían entonces, una gran variedad de transferasas que están influenciadas por la presencia de aminoácidos cargados adyacentes, como la prolina, serina y treonina (Marth, 1996). Aunado a esto, dependiendo de la sustitución de los residuos de GalNAc, las glicoproteínas difieren estructuralmente en sus ángulos de torsión y en sus enlaces glicosídicos, a diferencia de los enlaces de tipo N-glicosídicos, lo que enfatiza la relevancia del ordenamiento estructural en una membrana biológica de las glicoproteínas O-glicosiladas (Pepe *et al*; 1991).

Nuestro estudio sugiere que en los cerebros con EA, un patrón específico de O-glicosilación, podría producir re-arreglos fibrilares de tau y β A. Después de haber realizado la técnica de inmunohistoquímica, pudimos observar dos situaciones: una, que las lectinas utilizadas, en efecto nos ayudaron a localizar estructuras O-glicosiladas, y en la O-GlcNAcilación, la positividad por parte de la proteína WGA (específica para esta estructura), compite con la fosforilación, a medida que esta avanzaba, la positividad de la

proteína fue disminuyendo, lo que confirma lo estudiado por Lefebvre, y que apareció como componente de la neurodegeneración. Se sugiere que las lectinas ALL y WGA son herramientas útiles y específicas para el estudio e identificación de las modificaciones postraduccionales de las proteínas en la EA. Sin embargo, la falta de marcadores confiables para el crecimiento en el cerebro humano, dificulta examinar los cambios neurodegenerativos o identificar los puntos clave bioquímicos en la respuesta sinaptogénica (Espinosa, 2009). La regulación de la fosforilación y de la glicosilación, pueden ser los procesos más importantes para la formación de las MNFs (Lefebvre *et al*, 2005), y participan en la fisiopatogénesis de la Enfermedad de Alzheimer.

CONCLUSIÓN

- Se identificaron modificaciones de la O-glicosilación de tipo mucínico (GalNAc) y por O-GlcNAcilación por el efecto del péptido β A inducida mediante cirugía estereotáxica.
- Se identificó que ALL reconoce estructuras O-glicosiladas de tipo GalNAc (mucínico), que fueron aumentando con el paso del tiempo.
- Se identificó que WGA reconoce estructuras O-glicosiladas de tipo GlcNAc, que al ir disminuyendo con el paso del tiempo, podría confirmar que la O-GlcNAcilación puede competir con la fosforilación por el mismo sitio o la misma región, causando exclusión mutua.
- Se sugiere que la administración de la fracción 25-35 del péptido β Amiloide, provoca una cascada de eventos provenientes de la toxicidad y la O-glicosilación.
- Aunque no se tienen datos precisos, se sugiere que estas modificaciones podrían participar en la muerte celular.
- Las lectinas de ALL y WGA pueden ser útiles como marcadores de O-glicosilación en la EA.

PERSPECTIVAS

- Caracterizar al receptor reconocido por la lectina ALL.
- Identificar el papel biológico de los receptores de la lectina ALL.

BIBLIOGRAFÍA

Achstetter VA (1995). **Microtomía. Métodos Histotecnológicos.** Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) C8: 47-54.

Alberca R, López- Pousa S. (2002). **Enfermedad de Alzheimer y otras demencias.** Editorial Médica Panamericana. España.

Alonso A, Grundke- Iqbal I, Barra H, Iqbal K. (1997). **Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: Sequestration of microtubule- associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 94:298-303.

Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke- Iqbal I, Iqbal K. (2001). **Hyperphosphorylation induces self- assembly of tau into tangles of paired helical filaments/ straight filaments.** PNAS 98;12:6923-6928

Axford J. 1997. **Glycobiology and medicine: an introduction.** Journal of the Royal Society of Medicine. 90: 260-264.

Barriga Pérez Castro, María de Jesús. (2009). **Alzheimer: Modelos de estudio en animales.** Tesis de Licenciatura. Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química, UNAM.

Bourne GH y Danielli JF. (1974). **International Review of Cytology.** Volumen 39. Academic Press, Inc.

Brioni, J; Decker, M. (1997). **Pharmacological Treatment of Alzheimer's Disease: Molecular and Neurobiological Foundations.** Wiley- Liss Publication. USA. 217 – 275.

Buchet R, Slawomir P. (2000) **Alzheimer's disease: It's origin at the membrane, evidence and questions.** Acta Biochimica Polonica. 47; 3:725-733.

Butters TD. (2002). **Control in the N-linked glycoprotein biosynthesis pathway.** Chemistry and Biology. 9: 1266-1268.

Carraway KL, Hull SR. (1991). **Cell surface mucin-type glycoproteins and mucin-like domains.** Glycobiology. 1: 131-138.)

Crystal H; Dickson D; Fuld P. (1988). **Clinico-pathologic studies in dementia: non-demented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease.** Neurology. 38:1682-1687.

Chaney M; Stine W, Kokjohn T; Kuo Y; Esh C; Rahman A; Luehrs D; Schmidt A; Stern, D; Yan, S; Roher, A. (2005). **RAGE and amyloid beta interactions: Atomic force microscopy and molecular modeling.** Biochimica et Biophysica Acta.1741:199– 205

Cuevas E, Limón D, Pérez-Severiano F, Díaz A, Ortega L, Zenteno E, Guevara J. (2009) **Antioxidant effects of Epicatechin on the hippocampal toxicity caused by Amyloid-beta 25-35 in rats.** European Journal of Pharmacology. 616 :122– 127.

Delaère, P; Duykaerts, C; He, Y; Piette, F; Hauw, J-J. (1991). **Subtypes and differential laminar distributions of β A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases.** Acta Neuropathologica. 81:328-335.

De Strooper, B; Annaert, W. (2000). **Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein.** Journal of Cell Science. 113: 1857-1870.

Díaz D, De Jesús L, Mendieta L, Calvillo M, Espinosa B, Zenteno E, Guevara J, Limón D. (2010). **The amyloid- $_{25-35}$ injection into the CA1 region of the neonatal rat hippocampus impairs the long-term memory because of an increase of nitric oxide.** Neuroscience Letters. 468(2):151-5

Dickson, D; Crystal, H; Mattiace, L et al. (1992). **Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans.** Neurobiology. 13: 179-189.

Espinosa B, Zenteno R, Mena R, Robitaille Y, Zenteno E, Guevara J. (2001). **O-Glycosylation in sprouting neurons in Alzheimer disease, indicating reactive plasticity.** Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 60: 441-448.

Espinosa B, Guevara J, Hernández P, Slomianny MC, Guzmán A, Martínez-Cairo S, Zenteno E. (2003). **Characterization of an O-Glycosylated Plaque-Associated Protein from Alzheimer Disease Brain.** Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 62 : 34-41.

Espinosa B (2009) **Análisis de marcadores glicosilados en la enfermedad de alzheimer.** Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas.UNAM

Freire T, Robillo C, Casaravilla C, Alvarez Errico D, Medeiros A, Carmona C y Osinaga E. (2002). **Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos.** Actas de Fisiología. 8: 89-107.

Glennner GG, Wong CW. (1984). **Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 12:885-890.

Goldstein IJ, Poretz RD. (1986). **Isolation, physicochemical characterization, and Applications in Biology and Medicine.** Academic Press, Orlando, USA. 233-247.

Guevara J, Dilhuydy H, Espinosa B, Delacourte A, Quirino R, Mena R, Joannette Y, Zenteno E, and Robitaille Y. (2004). **Coexistence of reactive plasticity and neurodegeneration in Alzheimer diseased brains.** Journal of Histology and Histopathology. 19:1075-1084.

Guevara, J, Espinosa B, Zenteno E, Vázquez L, Luna J, Perry G, MENA R. (1998). **Altered Glycosylation Pattern of Proteins in Alzheimer Disease.** Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 57 (10); 905-914.

Guinez C, Morelle W, Michalski J C, Lefebvre T. (2005). **O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.** 37:765–774.

Haass C and Selkoe DJ (1993). **Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide.** Cell 75: 1039-1042.

Hall J. Inclusión de tejidos (1995). **Métodos Histotecnológicos. AFIP.** C7: 41-46.

Hanisch, FG; Reis, CA; Clausen, H; Paulsen H. (2001). **Evidence for glycosylation-dependent activities of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases rGalNAc-T2 and -T4 on mucin glycopeptides.** Glycobiology. 11: 731-740.

Hernández P, Tetaert D, Vergoten G, Debray H, Jiménez MC, Alvarez G, Agundis C, Degand P, Zenteno E. (2004). **Specificity of *Amaranthus leucocarpus syn. hypocondriacus* lectin for O-glycopeptides.** Biochimica et Biophysica Acta 1674: 282– 290

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, *et al.* (1987). **The precursor of Alzheimer disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.** Nature. 325:733-736.

Kajava AV, Squire JM, Parry DA. (2006) **Beta-structures in fibrous proteins.** Advances in protein chemistry. 73:1-15.

Lefebvre T, Alonso C, Mahboub S, Dupire M J, Zanetta J P, Caillet-Boudin M L, Michalski J C. (1999). **Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line.** Biochimica et Biophysica Acta. 1472: 71-81.

Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussiere T, Dupire M, Delacourte A, Michalski J C, Caillet-Boudin M L. (2003). **Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins—a role in nuclear localization.** Biochimica et Biophysica Acta. 1619: 167– 176.

Lefebvre T, Guinez C, Dehennaut V, Beseme-Dekeyser O, Morelle W, Michalski JC. (2005). **Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases?** Expert Review of Proteomics. 2 : 265-275.

Limón D, Mendieta L, Díaz A, Chamorro G, Espinosa B, Zenteno E, Guevara J. (2009). **Neuroprotective effect of alpha-asarone on spatial memory and nitric oxide levels in rats injected with amyloid - β (25–35).** Neuroscience Letters 453: 98–103

Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke- Iqbal I, Merkle R, Gong C. (2002). **Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease.** FEBS Letters. 512: 101-106.

Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart G, Xin Gong C. (2004). **O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: A mechanism involved in Alzheimer's disease.** PNAS 29:10804–10809.

Lozano- Rodríguez, L. (2009). **Papel de la N-acetilglucosaminilación y fosforilación de la proteína Tau en un modelo de toxicidad por Amiloide β 25-35.** Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UNAM.

Mark RJ, Pang Z, Geddes JW, Uchida K, y Mattson M. (1997). **Amyloid β -peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation.** Journal of Neuroscience. 17: 1046-1054.

Marth J. (1996). **Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases.** Glycobiology . 6: 701-705.

Masters CL. (1984). **Etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease.** Pathology. 16:233-234.

Mattson M. (2000). **Existing Data Suggest That Alzheimer's disease Is Preventable.** The New York Academy of Sciences. 924:153-159.

Maurice P, Lochat A. (1996). **Privat Amnesia induced in mice by centrally administered beta–Amyloid peptide involvels cholinergic dysfunction.** Brain Research. 706(2):181-93.

Neve, RL; Harris, P; Kosik, K; Kurnit, D; Donlon, T. (1986). **Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2.** Brain Research. 387: 271-280

Nishimura A, Sawada S, Ushiyama I, Yamamoto Y, Nakagawa T, Tanegashima A, Nishi K. (2000). **Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain.** Forensic Science international. 11: 265-269.

Novak M, Kabat J, Wischik CM. (1993). **Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament.** The EMBO Journal. 12: 365-370.

Pappolla M. A., Chyan Y. R., Omar R. A., Hsiao K., Perry G., Smith M. A. y Bozner P. (1998) **Evidence of Oxidative stress and in Vivo neurotoxicity of b-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's Disease.** American Journal of Pathology. 152. 871-878.

Paxinos G, Watson C. (2005). **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.** 5ta. Edición. Elsevier Academic Press.

Pèpe G, Siri D, Oddon Y, Pavia AA, Reboul JP. (1991). **Conformational analysis of the amino termini (5 residues) of human glycophorin AM and AN: differentiation of the structural features of the TN and T antigenic determinants in relation to their specificity.** Carbohydrate Research. 209:67-81

Pérez-Severiano F, Salvatierra-Sánchez R, Rodríguez-Pérez M, Cuevas-Martínez E, Guevara J, Limón D, Maldonado P, Medina-Campos O, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A. (2004). **S-Allylcysteine prevents amyloid-h peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits.** European Journal of Pharmacology 489:197– 202

Ramírez-Hernández, E. (2010). **Efecto de la inyección del A β ₂₅₋₃₅ en el hipocampo de rata sobre el cambio en los patrones de sialilación y el daño en la memoria espacial.** Tesis Licenciatura QFB. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Puebla.

Rini J., Drickamer K. (1999). **Carbohydrates and glycoconjugates.** Current Opinión in Structural Biology. 9: 547-548.

Rodríguez JJ, Olabarría M, Chvatal A, Verkhratsky A. (2009). **Astroglia in dementia and Alzheimer's Disease.** Nature. 16: 378-385.

Schachter H, Brockhousen I. (1992). **The biosynthesis of serine (threonine)-N-acetylgalactosamine-linked carbohydrate moieties.** En Glycoconjugates. Composition, Structure, and function. Eds. Allen, H.J. and Kisailus, E.C. Edit. Marcel Dekker, New York EUA. Pags. 263-332.

Selkoe D. (2001). **Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.** Physiological Reviews. 81: 741-766.

Selkoe D, Schenk D. (2003). **Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics.** Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 43: 545-84.

Söderberg L, Kakuyama H, Möller A, Ito A, Winblad B, Tjernberg L, Näslund J. (2005) **Characterization of the Alzheimer's Disease-associated CLAC Protein and Identification of an Amyloid β - Peptide- binding Site.** Journal of Biological Chemistry. 280;1007- 1015.

Spiro R. (2002). **Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds.** Glycobiology 12: 43- 56.

Stepanichev M, Moiseeva V, Lazareva A, Onufriev V, Gulyaeva V. (2003). **Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25-35) peptide induces impairment in short- term rather than long-term memory in rats.** Neuroscience and Behavior Physiology. 35: 511-518.

Stepanichev M, Moiseeva V, Lazareva N, Guliaeva N. (2004). **Effects of amyloid beta peptide (25-35) on the behavior of rats in a radial maze.** Zhurnal vyssheĭ nervnoĭ deiatelnosti imeni I P Pavlova. 54: 382-389.

Stepanichev M, Moiseeva V, Lazareva N and Gulyaeva N. (2005). Studies of the effects of fragment (25-35) of beta-amyloid peptide on the behavior of rats in a radial maze. Neuroscience and Behavioral Physiology. 35: 5

Stoothoff, W; Jonson, G. (2005).**Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences.** Biochimica et Biophysica Acta. 1739: 280– 297.

Turner P, O'Connor K, Tate W, Abraham W. (2003). **Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory.** Progress in Neurobiology 70:1–32

Van Damme, E.J. M; Peumans, W. J. (1998). **Plant lectins: Specific Tools for the identification, Isolation, and Characterization of O- linked Glycans.** Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 33: 209 – 258.

Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. (1999). **Essentials of Glicobiology.** Edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Weingarten,MD; Lockwood, A; Hwo S, Kirschner M.(1975). **A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 72:1858-1862.

Wilcock, G; Esiri, M. (1982). **Plaques, tangles and dementia: a quantitative study.** Journal of the Neurological Sciences. 56: 407-417.

Wisniewski, H; Wen, G; Kim, K. (1989). **Comparison of four staining methods on the detection of neuritic plaques.** Acta of Neuropathology. 67:22-27.

Yankner, BA; Duffy, LK; Kirschner, DA. (1990). **Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides.** Science. 250: 279-82.

Zhang X, Zhou K, Wang R, Cui J, Lipton SA, Liao F-F, Xu H, Zhang Y-W. (2006). **Hypoxia-inducible Factor 1(alpha) (HIF-1{alpha})-mediated Hypoxia Increases BACE1 Expression and beta-Amyloid Generation.** Journal of the Biological Chemistry. 282: 10873-10880.

Zhao W-Q y Townsend M. (2009). **Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease.** Biochimica et Biophysica Acta. 1792: 482-496.

Zenteno, E; Ochoa, JL. (1988). **Isolation and purification of Amaranthus leucocarpus lectin on stroma column.** Phytochemistry, 27: 313-317

Zenteno E, Lascurain R, Montaña LF, Vazquez L, Debray H, Montreuil J. (1992). **Specificity of Amaranthus leucocarpus lectin.** Glycoconjugate JI. 9:204-208.

[Fig.1] http://rst.gsfc.nasa.gov/Intro/Part2_26c.html

[Fig.2] <http://www.memorydisorder.org/research/amyloid/images/klnk/plaques.jpg>

[Fig. 3] Figura tomada de: Turner *et al*; 2003.

[Fig. 4] <http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Resources/HighRes.htm>

[Fig. 5] http://www.revistahospitalarias.org/imagenes/info_2002/167/figura_2.jpg

[Fig. 6] biomed.uninet.edu/2006/n1/sanmiguel-a.html

[Fig. 7] Figura tomada de: Butters, 2002.

[Fig.8] <http://www.premierbiosoft.com/images/Olinked.GIF>

[Fig. 9] <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5a/O-GlcNAc.jpg>

[Fig. 10] <http://www.cce.caltech.edu/~fucose/GlcNac-phospho.JPG>

[Fig. 11] <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n3/argibay.jpg>

[Fig. 12] Figura tomada del libro: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Paxinos G, Watson C. (2005). 5 ta. Edición. Elsevier Academic Press.