



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLICÓGENO  
SINTASA 3 $\beta$  Y LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU EN NEURONAS OBTENIDAS  
DEL EPITELIO OLFATORIO DE PACIENTES CON DEMENCIA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**AGUSTÍN RIQUELME SANDOVAL**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. GLORIA A. BENÍTEZ-KING  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN  
FACULTAD DE MEDICINA  
DRA LAURA COLIN BARENQUE  
FES-IZTACALA

**MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLICÓGENO  
SINTASA 3 $\beta$  Y LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU EN NEURONAS OBTENIDAS  
DEL EPITELIO OLFATORIO DE PACIENTES CON DEMENCIA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**AGUSTÍN RIQUELME SANDOVAL**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. GLORIA A. BENÍTEZ-KING  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN  
FACULTAD DE MEDICINA  
DRA LAURA COLIN BARENQUE  
FES-IZTACALA

**MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2013**

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 09 de septiembre de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **RIQUELME SANDOVAL AGUSTÍN** con número de cuenta 301115241, con la tesis titulada **"ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLICÓGENO SINTASA  $\beta$  Y LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU EN NEURONAS OBTENIDA DEL EPITELIO OLFATORIO DE PACIENTES CON DEMENCIA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. GLORIA ACACIA BENITEZ KING**:

Presidente: DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO  
Vocal: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY  
Secretario: DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN  
Suplente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
Suplente: DRA. LAURA COLIN BARENQUE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de octubre de 2013



**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**. Por darme la oportunidad de desarrollarme, formarme académicamente y crecer profesionalmente, por ofrecerme las enseñanzas y recursos que hicieron posible concluir esta etapa.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca otorgada (número de becario **262386**), durante mis estudios de maestría, la cual me permitió realizar mis estudios durante estos dos años.

A la **Dra. Gloria Benítez King** por su tutoría y enseñarme el valor de la diligencia y la disciplina, por permitirme formar parte de su laboratorio y equipo de trabajo. Por el apoyo recibido tanto en lo académico como en los recursos materiales para la realización de este trabajo. Por darme una proyección profesional importante al impulsar las publicaciones que de mi estancia en su laboratorio resultaron. Por su motivación y comprensión. Por ser mi mamá científica.

A la **Dra. Rosalinda Guevara Guzmán** y la **Dra. Laura Colin Barenque** por ofrecerme su tiempo y dedicación para el buen desarrollo de la maestría por todos los consejos e ideas para mejorar el proyecto. Pero principalmente por todas las aportaciones académicas durante la maestría.

Finalmente, a la **Dra. Lourdes Massieu Trigo** y la **Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echegaray**. Por su asesoría y sabios consejos en la revisión de esta tesis, por sus sugerencias y comentarios que enriquecieron esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A **Jimena de Garay Hernández**, mi amor, gracias por toda la ayuda en la realización de este proyecto. Gracias a ti tenemos caminos planos y soleados. Por tomar mi mano y caminar lado a lado. Estamos dos somos uno.

A mi tía **Olga Sandoval García**, a mi tío (preferido) **Rogelio Sandoval García** y a mi abuelita **María Luisa García** por confiar en mí y apoyarme en todo momento de mi vida. Con su ejemplo, me ayudan a seguir adelante. Sobre todo por su amor incondicional. Sin ustedes no nunca lo hubiera logrado.

A mi abuela **María Elena Viguera** y mi abuelo **Agustín Riquelme Mejía** por todo su apoyo para impulsarme a dar lo mejor de mí.

A mi papá **Agustín Riquelme Viguera** por demostrarme que existen segundas oportunidades para reflexionar y continuar el camino. Por todos esos momentos (y comidas deliciosas), pretextos para compartir pláticas enriquecedoras y momentos de felicidad.

A **Yolanda Pedroza**, por darle un nuevo significado a la palabra familia. Por haber llegado a nuestras vidas y cambiarlas 360°. Por todo el apoyo incondicional y amoroso.

A **Ángel Emiliano Riquelme Pedroza** por dejar que sea tu hermano.

A mis amigos: **Jorge Estrada Benítez**, **Ricardo Estrada Benítez**, **Ángel Zambrano Villalobos**, **Lizbeth Zambrano Villalobos**. Por tantas risas y buenos momentos, parte de lo que soy es por ustedes.

A mis amigos del laboratorio: **Dr. Horacio Zamudio Meza**, **Salvador Alarcón**, **M.C. Marcela Valdés Tovar**, **M.C. Aline Domínguez Alonso** y **Dr. Hector Solís**. Por la cotidianidad. Por toda la ayuda técnica y por los buenos momentos que pasamos en el laboratorio.

A mi amiga **Martha Varela Miranda** por su amistad. Por ayudarme y guiarme en cada uno de los trámites desde antes de la maestría. Agradezco los buenos consejos y momentos que pasamos durante este tiempo.

## **DEDICATORIA**

**A mi madre Lucy, por haber creído en mí, por haberme educado en libertad y enseñarme a dar lo mejor de mí; porque su cariño es mi motor para cada día ser mejor persona.**

*“When I was younger I could remember anything, whether it had happened or not. But my faculties are decaying now, and soon I shall be so that I cannot remember any but the things that never happened. It is sad to go to pieces like this, but we all have to do it”*

Mark Twain

# ÍNDICE

<b>I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>5</b>
<b>II. ABREVIATURAS</b>	<b>9</b>
<b>III. RESUMEN</b>	<b>13</b>
<b>IV. ABSTRACT</b>	<b>15</b>
<b>V. INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
<b>1. Enfermedades neurodegenerativas</b>	<b>17</b>
<b>1.1. Generalidades</b>	<b>17</b>
<b>1.2. Plegamiento anormal y agregación de proteínas en las Enfermedades Neurodegenerativas</b>	<b>19</b>
<b>2. Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>23</b>
<b>2.1. Características de la Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>24</b>
<b>2.1.1. El procesamiento de la proteína precursora amiloide y la formación de las placas seniles</b>	<b>26</b>
<b>2.1.2. Patología neurofibrilar en la Enfermedad de Alzheimer (Marañas neurofibrilares)</b>	<b>27</b>
<b>3. Otras alteraciones encontradas en la Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>29</b>
<b>4. Generalidades del citoesqueleto y de la proteína tau</b>	<b>30</b>
<b>4.1. Citoesqueto</b>	<b>30</b>
<b>4.2. Proteína Tau</b>	<b>31</b>
<b>5. Participación de la GSK-3<math>\beta</math> en la hiperfosforilación de tau</b>	<b>35</b>

<b>6. Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>39</b>
<b>6.1. La melatonina como un coadyuvante en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>40</b>
<b>7. Melatonina</b>	<b>41</b>
<b>7.1. Biosíntesis y metabolismo de la melatonina</b>	<b>42</b>
<b>7.2. Efectos fisiológicos de la melatonina</b>	<b>43</b>
<b>7.3. Mecanismos de acción de la melatonina</b>	<b>45</b>
<b>7.4. Melatonina y GSK-3<math>\beta</math></b>	<b>47</b>
<b>8. Epitelio olfatorio</b>	<b>49</b>
<b>8.1. Funcionamiento de las neuronas sensoriales olfativas</b>	<b>51</b>
<b>8.2. Epitelio olfatorio como modelo de investigación en la enfermedad de Alzheimer</b>	<b>51</b>
<b>9. Planteamiento del problema</b>	<b>54</b>
<b>VI. HIPÓTESIS</b>	<b>55</b>
<b>VII. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>55</b>
<b>VIII. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>55</b>
<b>IX. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>56</b>
<b>1. Materiales</b>	<b>56</b>
<b>2. Sujetos</b>	<b>56</b>
<b>3. Obtención de la muestra</b>	<b>58</b>
<b>4. Cultivo celular</b>	<b>59</b>

<b>5. Crio-preservación</b>	<b>59</b>
<b>6. Inmunofluorescencia de doble marcaje</b>	<b>60</b>
<b>7. Obtención de los extractos de proteína</b>	<b>61</b>
<b>8. Separación de proteínas por electroforesis unidimensional</b>	<b>62</b>
<b>9. Inmunodetección de la proteína tau y la enzima GSK-3<math>\beta</math></b>	<b>62</b>
<b>10. Separación electroforética en geles de 2D (isoelectroenfoque/ SDS PAGE)</b>	<b>63</b>
<b>11. Inmunodetección de las isoformas de la proteína tau</b>	<b>65</b>
<b>12. Determinación de la cantidad relativa de tau y GSK-3<math>\beta</math> por el método de ELISA</b>	<b>65</b>
<b>13. Cuantificación de la proteína tau y la enzima GSK-3<math>\beta</math> en los cultivos tratados con melatonina</b>	<b>67</b>
<b>14. Determinación de la actividad de la GSK-3<math>\beta</math> Incubación de melatonina y LiCl en cultivo celular</b>	<b>67</b>
<b>15. Análisis estadístico</b>	<b>68</b>
<b>X. RESULTADOS</b>	<b>69</b>
<b>1. Caracterización de las Marañas Neurofibrilares</b>	<b>69</b>
<b>2. Caracterización del patrón de isoformas de tau expresada en los precursores neuronales</b>	<b>71</b>
<b>3. Validación de los anticuerpos contra tau y GSK-3<math>\beta</math></b>	<b>73</b>
<b>4. Establecimiento de las condiciones para la cuantificación de los niveles de tau defosforilada y tau fosforilada</b>	<b>74</b>
<b>5. Determinación de los niveles de tau defosforilada y tau fosforilada</b>	<b>77</b>

<b>6. Determinación de los niveles de GSK-3<math>\beta</math> total y GSK-3<math>\beta</math> inactiva</b>	<b>83</b>
<b>7. Efecto de la melatonina sobre la fosforilación de tau</b>	<b>85</b>
<b>8. Efecto de la melatonina sobre la inhibición de la GSK-3<math>\beta</math></b>	<b>87</b>
<b>9. Efecto de la melatonina sobre la actividad de la GSK-3<math>\beta</math></b>	<b>88</b>
<b>XI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
<b>XII. REFERENCIAS</b>	<b>103</b>

## I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
<b>Fig.1. Esquema de los procesos que podrían estar involucrados en las enfermedades neurodegenerativas</b>	<b>18</b>
<b>Fig.2.I Imagen representativa de un corte frontal del cerebro humano</b>	<b>24</b>
<b>Fig.2.II Comparación de imágenes cerebrales de una persona cognitivamente normal y un paciente con enfermedad de Alzheimer</b>	<b>24</b>
<b>Fig.3.I Dibujo esquemático de los cambios histopatológicos de la Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>25</b>
<b>Fig.3.II Corte histopatológico de la corteza cerebral de un paciente con EA.</b>	<b>25</b>
<b>Fig.3.III Inmunocitoquímica de las Marañas Neurofibrilares</b>	<b>25</b>
<b>Fig.4. Vías del procesamiento del péptido amiloideo <math>\beta</math></b>	<b>27</b>
<b>Fig.5. Microscopía electrónica de los filamentos helicoidales apareados (FHA).</b>	<b>28</b>
<b>Fig.6. Representación esquemática de los dominios funcionales de la proteína tau</b>	<b>32</b>
<b>Fig.7. Representación esquemática del gen transcrito y de las 6 isoformas de la proteína tau</b>	<b>32</b>
<b>Fig.8. Sitios de fosforilación de la proteína tau</b>	<b>33</b>

<b>Fig.9.I Dibujo esquemático del citoesqueleto microtubular una neurona sana y de una neurona en proceso de degeneración</b>	<b>34</b>
<b>Fig.9.II Dibujo esquemático de la desorganización microtubular característica de la enfermedad de Alzheimer</b>	<b>34</b>
<b>Fig.10. Dibujo esquemático de los efectos de la patología neurofibrilar</b>	<b>34</b>
<b>Fig.11. Representación esquemática de la estructura primaria de las enzimas GSK-3<math>\beta</math> y la GSK-3<math>\alpha</math></b>	<b>35</b>
<b>Fig.12. Sustratos regulados por la GSK-3<math>\beta</math></b>	<b>36</b>
<b>Fig.13. Múltiples vías de regulación de la GSK-3</b>	<b>37</b>
<b>Fig.14. Participación de la GSK-3<math>\beta</math> en la enfermedad de Alzheimer</b>	<b>38</b>
<b>Fig.15.I Esquema representativo de la síntesis de la liberación de la melatonina por la glándula pineal</b>	<b>41</b>
<b>Fig.15.II Estructura química de la melatonina</b>	<b>41</b>
<b>Fig.16. Esquema de la vía de síntesis de la melatonina</b>	<b>42</b>
<b>Fig.17. Mecanismos de acción de la melatonina</b>	<b>46</b>
<b>Fig.18. Ilustración esquemática del Epitelio Olfatorio humano</b>	<b>50</b>
<b>Fig.19. Dibujo esquemático del procedimiento de exfoliación</b>	<b>58</b>
<b>Fig.20. Caracterización de las Marañas Neurofibrilares</b>	<b>69</b>
<b>Fig.21. Determinación del número de precursores neuronales con Marañas Neurofibrilares</b>	<b>70</b>
<b>Fig.22. Caracterización del patrón de proteínas de los precursores neuronales separadas por electroforesis bidimensional</b>	<b>71</b>

<b>Fig.23. Caracterización en dos dimensiones del patrón de isoformas de la proteína tau</b>	<b>72</b>
<b>Fig.24. Inmunodetección de los anticuerpos específicos contra GSK-3<math>\beta</math> y tau</b>	<b>73</b>
<b>Fig. 25. Curva estándar para la obtención de la concentración óptima de proteína para la técnica de ELISA</b>	<b>75</b>
<b>Fig.26. Curvas de calibración de la proteína tau humana recombinante</b>	<b>76</b>
<b>Fig.27. Cantidad de tau defosforilada en el epitope 189-207 determinada en homogeneizados de los progenitores neuronales de pacientes con Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>78</b>
<b>Fig.28. Cantidad de tau fosforilada en las ser 199-202 determinada en homogeneizados de precursores neuronales obtenidos del Epitelio Olfatorio de pacientes con Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>79</b>
<b>Fig.29. Determinación de las absorbancias obtenidas mediante la inmunodetección con el anticuerpo que reconoce a la tau fosforilada en la ser 396-404 en homogeneizados de precursoras neuronales obtenidos del epitelio olfatorios de pacientes con Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>80</b>
<b>Fig.30. Determinación de la cantidad de tau fosforilada en las ser 199-202 y ser 396-404 en pacientes femeninos con Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>81</b>
<b>Fig.31. Determinación de la cantidad de tau fosforilada en las ser 199-202 y ser 396-404 en pacientes masculinos con Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>82</b>
<b>Fig.32. Determinación de la cantidad de tau fosforilada en las ser</b>	<b>83</b>

<b>199-202 y ser 396-404 en pacientes femeninos con diagnósticos de otras demencias.</b>	
<b>Fig.33. Determinación de los niveles de GSK-3<math>\beta</math> total y GSK-3<math>\beta</math> inactiva en pacientes femeninos con Enfermedad de Alzheimer etapa I y etapa II</b>	<b>84</b>
<b>Fig.34. Efecto de la melatonina sobre la fosforilación de la proteína tau en el epitope ser 399-404 y la ser 199-202.</b>	<b>86</b>
<b>Fig.35. Efecto de la melatonina sobre la activación de la GSK-3<math>\beta</math>.</b>	<b>88</b>
<b>Fig.36. Determinación de la actividad de la GSK-3<math>\beta</math> en células tratadas con melatonina y LiCl.</b>	<b>90</b>

<b>TABLAS</b>	
<b>Tabla.1. Enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por el depósito de agregados de proteínas.</b>	<b>21</b>
<b>Tabla.2. Datos sociodemográficos de los donadores de epitelio olfatorio</b>	<b>57</b>
<b>Tabla.3. Condiciones de corrimiento para la separación por punto isoeléctrico de las proteínas del homogenizado de los precursores neuronales.</b>	<b>64</b>

## II. ABREVIATURAS

<b>AAD</b>	Aminoácido Aromático Descarboxilasa
<b>aMT6S</b>	Compuesto 6 sulfatoximelatonina
<b>AFMK</b>	<i>N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinoneimina</i>
<b>AMP<sub>c</sub></b>	Monofosfato de Adenosina Cíclico
<b>AO</b>	Ácido Ocadaico
<b>APC</b>	<i>Adenomatous Polyposi Coli.</i>
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>CAM</b>	Calmodulina
<b>CaMPK II</b>	Cinasa II dependiente de Ca <sup>2+</sup> /calmodulina
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CPB</b>	Componente Pittsburgh B
<b>DAPI</b>	4 6-diamidino-2-fenilindol
<b>DFT</b>	Demencia Fronto-Temporal
<b>DMEM</b>	Médio de cultivo Dulbecco's modified Eagle
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer

<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EH</b>	Enfermedad de Huntington
<b>ELA</b>	Esclerosis lateral amiotrófica
<b>EO</b>	Epitelio Olfatorio
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>FDG</b>	Fluorodesoxiglucosa
<b>FHA</b>	Filamentos Helicoidales Apareados
<b>GMPc</b>	Monofosfato de Guanina Cíclico
<b>GPx</b>	Glutation Peroxidasa
<b>GRd</b>	Glutación Reductasa
<b>GSH</b>	Glutación
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	Glicógeno Sintetasa 3 $\beta$
<b>HIOMT</b>	Hidroxiindol-O metiltransferasa
<b>INPRFM</b>	Instituto Nacional de Psiquiatría Ramon de la Fuente
<b>IRM</b>	Imagen Realizada por Resonancia Magnética
<b>MAPs</b>	Proteínas Asociadas a los Microtúbulos
<b>MAPK</b>	Cinasa de Proteínas Activadoras de Mitógenos

<b>MARK</b>	Cinasas reguladoras de Afinidad a microtúbulos
<b>MEL</b>	Melatonina
<b>MMSE</b>	Mini Examen del estado Mental
<b>Mt1</b>	Receptor a Melatonina del tipo 1
<b>MN</b>	Marañas Neurofibrilares
<b>NAT</b>	Serotonina N-acetiltransferasa
<b>NINCDS-ADRDA</b>	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association.
<b>NMDA</b>	N-metil-D Aspartato
<b>NSO</b>	Neuronas Sensoriales Olfativas
<b>OPD</b>	Sustrato o-fenilendiamida
<b>PA</b>	Peptido-Amiloide
<b>PBS</b>	Solución Amortiguadora de fosfatos
<b>PI 3</b>	Fosfatidil Inositol 3
<b>PKA</b>	Proteína Cinasa dependiente de AMP cíclico
<b>PKB</b>	Proteína Cinasa B
<b>PKC</b>	Proteína Cinasa C
<b>PMA</b>	12-13 miristato acetato de forbol

<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonilo
<b>PPA</b>	Proteína Precursora Amiloide
<b>PP1</b>	Fosfatasa 1
<b>PP2A</b>	Fosfatasa 2 A
<b>PP2B</b>	Fosfatasa 2B
<b>PP2C</b>	Fosfatasa 2C
<b>PS</b>	Placas Seniles
<b>P-ST</b>	Residuos Prolina serina/treonina
<b>ROR</b>	Receptores Tipo Huérfano
<b>ROS</b>	Espécies Reactivas de Oxígeno
<b>SAPK</b>	Cinasas Activadas por Estrés
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SOD</b>	Super Óxido Dismutasa
<b>SUS</b>	Células Sustentaculares
<b>TEP</b>	Tomografía de Emisión de Positrones
<b>TPH</b>	Triptófano Hidroxilasa

### III. RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento neurológico asociado con una pérdida progresiva de la cognición, la memoria, la evocación y el reconocimiento. La hipótesis predominante sugiere que la formación de las marañas neurofibrilares (MN) son el principal factor etiológico de esta enfermedad. Sin embargo, por limitaciones metodológicas, sólo pueden ser observadas en estudios *post mortem*. Se ha observado la presencia de MN en biopsias del epitelio olfatorio (EO) obtenidas de pacientes con EA. En el 2011 se implementó un método para la obtención de precursores neuronales del EO mediante una exfoliación nasal sin producir daño al donante (Benitez-King *et al.*, 2011). En este estudio se caracterizó la presencia de las MN en los precursores neuronales obtenidos del EO de pacientes vivos con EA. Los precursores neuronales se obtuvieron por medio de una exfoliación de la cavidad nasal de los pacientes reclutados en la clínica de Psicogeriatría del INPRFM. En las células obtenidas, se efectuó un análisis inmunohistoquímico de tau mediante la técnica de inmunofluorescencia, realizado con el anticuerpo tau-1, que reconoce las ser199-202. La inmunoreactividad al anticuerpo se detectó como inclusiones y/o agregados de la proteína tau hiperfosforilada. Se observó más cantidad de MN en los precursores neuronales de los pacientes comparado con los controles, así como un aumento de estas con respecto a la edad de los sujetos. También se caracterizó el patrón de variantes isoeléctricas de tau. La Inmunodetección de la proteína tau, separada por 2D con el anticuerpo Tau-C17, reveló la presencia de 3 isoformas en los homogenizados de los sujetos control, mientras que los pacientes con EA presentaron 5. Las isoformas encontradas en los pacientes exhiben pesos moleculares más grandes y puntos isoeléctricos más básicos. Los niveles de fosforilación se cuantificaron con el método de ELISA, mediante la utilización de dos anticuerpos que reconocen epítopes fosforilados de tau: la ser 199-202 y ser 396-404. Se encontró una mayor proporción de tau fosforilada en ambos epítopes en los pacientes femeninos con EA. Se encontró una mayor fosforilación en las ser396-404 en el paciente masculino con EA. En los pacientes con otras demencias se encontró una mayor cantidad de fosforilación para los epítopes. Se obtuvieron los niveles de GSK-3 $\beta$  total y el estado de inactivación (fosforilación en la ser-9) de la enzima en un

paciente con EA etapa I y uno con etapa II. Los niveles de GSK-3 total se encontraron disminuidos en los pacientes. Se observó un aumento en los niveles de la enzima inactiva en los pacientes con EA II.

Por otra parte, varios estudios realizados en modelos químicos de neurodegeneración indican que la melatonina (MEL) es capaz de disminuir la fosforilación de tau. En este trabajo se estudió el efecto de la melatonina en la regulación de la fosforilación de tau en las ser 199-202 y 396-404 en los precursores neuronales de dos pacientes con EA (etapa I y II). Estos se incubaron con diferentes concentraciones de MEL ( $10^{-11}$ M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-5}$ M) durante 6 horas, lo que indujo un decremento en los niveles de tau fosforilada en ambos epítopes. Para evaluar si la MEL inhibe a la GSK-3 $\beta$  para así disminuir la cantidad de tau fosforilada, se determinaron los niveles de GSK-3 $\beta$  fosforilada en la ser 9. Se observó un incremento en la cantidad de GSK-3 $\beta$  inactiva al incubar a las células con  $10^{-5}$ M y  $10^{-7}$ M. También se midió la actividad de esta enzima. Los precursores neuronales se incubaron durante 6 horas con LiCl (20 $\mu$ M), que es un inhibidor de la GSK-3 $\beta$ , y con melatonina ( $10^{-7}$ M). Se observó que la actividad enzimática en pacientes es significativamente menor. También se vio que la MEL es capaz de inhibir la actividad de esta enzima, pero esto fue más visto en el sujeto control que en los pacientes EA.

Si bien la presencia de MN es un rasgo de la EA y, estas son agregados de la tau hiperfosforilada, podemos concluir que los precursores neuronales obtenidos por exfoliación nasal reflejan los cambios patológicos que ocurren en el cerebro de los pacientes con EA. Los resultados de este estudio sugieren que las MN, el patrón de isoformas fosforiladas de la proteína tau y las concentraciones relativas de tau fosforilada determinadas en los precursores neuronales del EO, podrían ser utilizados como biomarcadores para el diagnóstico de la EA. Se observó que la MEL puede proteger a las células del daño inducido por la hiperfosforilación de tau, aumentando la cantidad de GSK-3 $\beta$  inactiva. Sin embargo, debido a que la cantidad total de la GSK-3 $\beta$  y la actividad de la enzima se encuentran disminuidas en pacientes con EA, no podemos concluir que la disminución de la fosforilación de tau inducida por MEL se deba únicamente a la inactivación de la GSK-3 $\beta$ , sino también a la regulación de la actividad de algunas otras cinasas y fosfatasa.

#### **IV. ABSTRACT**

Alzheimer's Disease (AD) is a neurological condition associated with progressive loss of cognition, memory, recall and recognition. The predominant hypothesis suggests that formation of neurofibrillary tangles (NT) is the main etiological factor in this disease. However, due to methodological limitations, they can only be observed in postmortem studies. The presence of NT has been observed in biopsies of the olfactory epithelium (OE) taken from patients with AD.

In 2011 a method for obtaining neuronal precursors from the OE through a nasal exfoliation without damage to the donor was implemented (Benitez-King et al., 2011). In this study, the presence of neural precursors NT OE obtained from living patients with AD was characterized. The neural precursors were obtained by exfoliation of the nasal cavity of patients recruited in the Psychogeriatric clinic of the INPRFM. In the cells obtained, an immunohistochemical analysis of tau was conducted by the immunofluorescence technique, performed with the tau-1 antibody, which recognizes ser199-202.

The immunoreactivity of the antibody was detected as inclusions and/or aggregates of hyperphosphorylated tau protein. There was a higher amount of NT in the neural precursors from patients compared with control subjects, and an increase of these with respect to the age of the subjects. The pattern of isoelectric variants of tau was characterized. Immunodetection of the tau protein, separated by 2D with Tau-C17 antibody, revealed the presence of three isoforms in homogenates of the control subjects, whereas patients with AD presented five. Isoforms found in patients show higher molecular weights and more basic isoelectric points than those of control subjects.

The ELISA method was used for the quantification of the levels of phosphorylation of tau by the use of two antibodies that recognize phosphorylated tau epitopes: the ser 199-202 and the ser396-404. A higher proportion of phosphorylated tau was found for both epitopes in female patients with AD. There was an increased phosphorylation at Ser396 - 404 in the male patient with AD. In patients with other dementias an increased amount of phosphorylation was found for both epitopes. The levels of total GSK- 3 $\beta$  and the inactivation state (phosphorylation at Ser -9) of the

enzyme were also obtained in a patient with AD stage I and in a patient with AD stage II. Levels of total GSK-3 were found decreased in both patients. An increase in the levels of the inactive enzyme was observed in AD patients stage II.

Moreover, various studies made on chemical neurodegeneration models indicate that the melatonin (MEL) is capable of decreasing tau phosphorylation. In this work the effect of melatonin in the regulation of tau phosphorylation in ser199-202 and 396-404 in neural precursors of two patients with AD (stage I and II) was studied. These were incubated with different concentrations of MEL ( $10^{-11}$ M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-5}$ M) for 6 hours, which induced a decrease in the levels of phosphorylated tau for both epitopes. To evaluate whether the MEL inhibits GSK- 3 $\beta$  in order to decrease the amount of phosphorylated tau, the levels of phosphorylated GSK- 3 $\beta$  were determined in ser 9. An increase in the amount of inactive GSK- 3 $\beta$  was observed by incubating the cells with  $10^{-5}$ M and  $10^{-7}$ M.

The activity of this enzyme was also measured. Neuronal precursors were incubated for 6 hours with LiCl (20  $\mu$ M), which is an inhibitor of GSK- 3 $\beta$ , and with melatonin ( $10^{-7}$ M). It was observed that the enzyme activity is significantly lower in patients compared with control subjects. It was also found that the MEL is capable of inhibiting the activity of this enzyme, but this inhibition was more evident in the control subject than in AD patients.

Although the presence of NT is a feature of AD and these are aggregates of hyperphosphorylated tau, we can conclude that neural precursors obtained by nasal exfoliation reflect the pathological changes that occur in the brains of patients with AD. The results of this study suggest that the MN, the pattern of phosphorylated isoforms of tau protein and the phosphorylated tau relative concentrations determined in neural precursors of the OE, could be used as biomarkers for the diagnosis of AD. It was observed that MEL can protect cells from damage induced by tau hyperphosphorylation, increasing the amount of inactive GSK- 3 $\beta$ . However, because the total amount of GSK- 3 $\beta$  and enzyme activity are reduced in patients with AD, we cannot conclude that decreased tau phosphorylation induced by MEL is solely due to the inactivation of GSK - 3 $\beta$ , but also to the regulation of the activity of some other kinases and phosphatases.

# V. INTRODUCCIÓN

## 1. Enfermedades neurodegenerativas

### 1.1. Generalidades

Las enfermedades neurodegenerativas se encuentran entre algunos de los padecimientos más debilitantes para el ser humano, ya que afectan el pensamiento, el movimiento, los sentimientos y la memoria.

Éstas se caracterizan por presentar pérdidas selectivas de las neuronas en los sistemas motor, sensorial y/o cognitivo. Este grupo de enfermedades incluye trastornos comunes, tales como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP); así como otros menos comunes, como la enfermedad de Huntington (EH), la ataxia espinocerebelosa, las encefalopatías espongiiformes transmisibles y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre otras.

A pesar de las diferencias en las manifestaciones clínicas, los trastornos neurodegenerativos comparten algunas características en común: la aparición tardía en la vida, una enorme pérdida neuronal, la presencia de alteraciones sinápticas y depósitos de agregados de proteínas mal plegadas. Los mecanismos de degeneración de las neuronas dentro de estas enfermedades aun no son claros; sin embargo, múltiples tipos han sido propuestos, entre los cuales se incluyen la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, las disfunciones mitocondriales, la disfunción en la degradación de proteínas (Rubinsztein, 2006), la presencia de priones (Caughey y Baron, 2006), la muerte celular programada (Bredesen *et al.*, 2006), la inflamación, las deficiencias en el transporte axonal y la agregación de proteínas (Chevalier-Larsen y Holzbaur, 2006). Cada uno de estos procesos podría estar actuando en conjunto o por separado y afectar diferentes tipos neuronales y regiones cerebrales dependiendo del trastorno neurodegenerativo. Por consiguiente, si uno de estos procesos se encuentra alterado, podría estar afectando la función de otro, por lo que la muerte neuronal será la consecuencia final (Fig. 1)

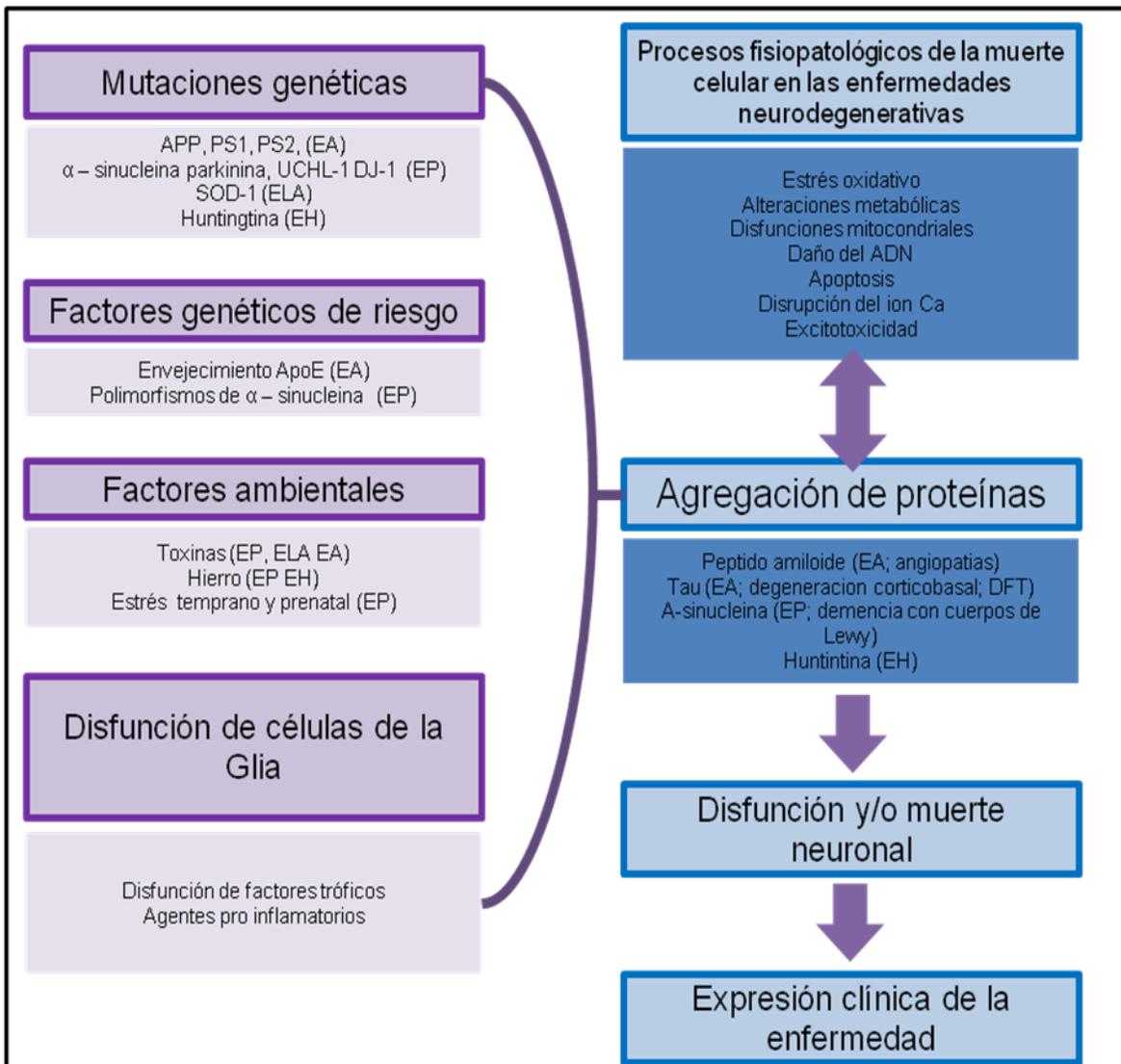


Fig. 1. Esquema de los procesos que podrían estar involucrados en las enfermedades neurodegenerativas. En la primera columna se muestran las proteínas donde se han encontrado mutaciones genéticas dentro de cada enfermedad, los factores genéticos de riesgo y los factores ambientales que causan las enfermedades, así como los procesos encontrados cuando existe una disfunción en las células de la Glia. Todos estos factores podrían estar involucrados en la formación de agregados de proteínas. La segunda columna presenta los posibles mecanismos que conducen a la formación de agregados de proteínas, los cuales, a su vez, podrían estar conduciendo a la muerte neuronal, y esta contribuir a la expresión clínica en las enfermedades neurodegenerativas. EA: Enfermedad de Alzheimer; EP: Enfermedad de Parkinson; EH: Enfermedad de Huntington; ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica; DFT: Demencia Fronto-Temporal. Modificado de Nieoullon *et al.*, 2011.

## **1.2. Plegamiento anormal y agregación de proteínas en las Enfermedades Neurodegenerativas**

La agregación de proteínas es un proceso anormal por el cual ciertas proteínas mal plegadas dejan su estado soluble y comienzan a agregarse y/o asociarse entre sí y así formar acumulaciones fibrosas. Se ha observado que algunas modificaciones post-traduccionales anormales o el secuestro por otras proteínas acelera esta agregación. También, se ha observado que la disfunción en las vías de degradación, como el sistema de ubiquitina-proteosoma o la autofagia, pueden aumentar el depósito de proteínas (Rubinsztein, 2006). Se ha propuesto que éstos afectan la integridad de las sinapsis, tanto de las terminales presinápticas como de las células postsinápticas y, en consecuencia, se promueve la ruptura de circuitos neuronales (Soto y Estrada, 2008). Se ha observado que la presencia de los agregados usualmente ocurre dentro de las regiones cerebrales que están implicadas dentro de cada tipo de enfermedad. Cada una de ellas se distingue por tener diferentes patrones temporales y regionales de estos agregados. Estos depósitos son exclusivos para cada padecimiento; no obstante, aunque la distribución y la composición proteica de los agregados son diferentes en cada una, comparten morfologías y estructuras semejantes.

Existen dos tipos de depósitos de proteínas: los extracelulares y los intracelulares. Amiloide es el nombre original de los extracelulares observados en los trastornos neurodegenerativos (Soto y Estrada, 2008). En la EA, existen agregados extracelulares llamados placas amiloideas, que se localizan en el parénquima cerebral y en las paredes de los vasos cerebrales (Glennner y Wong, 1984).

Dentro de los agregados intracelulares, se distinguen varias inclusiones, tales como las marañas neurofibrilares (MN), que son las más comunes, los cuerpos de Hirano, los de Lewy, y los de Pick. En pacientes con la enfermedad de Parkinson, se han observado cuerpos de Lewy en el citoplasma de las neuronas de la sustancia nigra, cuyo principal componente son fragmentos de la proteína  $\alpha$ -sinucleína (Spillantini *et al.*, 1997). En la enfermedad de Huntington, una de las principales

características es la agregación intranuclear de la proteína huntingtina (DiFiglia *et al.*, 1997). Asimismo, en los pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica se observan agregados de la enzima superóxido dismutasa (SOD), tanto en los cuerpos celulares como en los axones de las motoneuronas (Bruijin *et al.*, 1998). Tabla. 1.

Las MN se han encontrado frecuentemente en la EA (Braak y Braak., 1991), la Esclerosis Lateral Amiotrófica, la demencia con parkinsonismo, complejo de Guam (Hirano *et al.*, 1966), la degeneración corticobasal (Paulus y Selim, 1990), la demencia pugilística, el trauma cerebral (Corsellis *et al.*, 1973; Hof *et al.*, 1992), el síndrome de Down (Hof P.R *et al.*, 1995), el parkinsonismo postencefalítico (Geddes *et al.*, 1993), la parálisis supranuclear progresiva (Hauw *et al.*, 1990) y algunas veces en la enfermedad de Pick (Hof *et al.*, 1994). También se han descrito en pacientes con el síndrome de Gerstmann–Straüssler– Scheinker (Ghetti *et al.*, 1995), la enfermedad de Hallervorden–Spatz (Malandrini *et al.*, 1995), la distrofia miotónica (Kiuchi *et al.*, 1991), la enfermedad de Niemann–Pick (Love *et al.*, 1995) y en otras más poco comunes. Por otra parte, existe la presencia de MN en el envejecimiento normal. Por lo general se afirma que durante el envejecimiento neuronal existe la presencia de MN dentro del hipocampo y algunas zonas de la neocorteza (Bouras *et al.*, 1994; Buee-Scherrer *et al.*, 1995; 1996; 1997; Feany *et al.*, 1996; Giannakopoulos *et al.*, 1997; Pollock *et al.*, 1986).

Sin embargo no existen estudios claros donde se observe la diferencia en la distribución precisa y la densidad de la MN entre las personas sanas y en pacientes con las etapas más tempranas de demencia. Dicha información es obviamente importante para una comprensión completa de la diferencia entre el envejecimiento saludable y la demencia, y también puede proporcionar información sobre la etiología y algunos mecanismos iniciales de la enfermedad.

Tabla. 1. Enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por el depósito de agregados de proteínas

Enfermedad	Lesión microscópica	Localización	Proteína
Enfermedad de Alzheimer	Placas amiloideas	extracelular	$\beta$ -amiloide ( $\beta A$ )
	Marañas neurofibrilares	Intracitoplasmática (neuronas)	Tau
Esclerosis Lateral Amiotrofica	Inclusiones Hialinas	Intracitoplasmática (neuronas)	Superoxido dismutasa 1 (SOD1)
Degeneración cortico-basal/ parálisis supra nuclear progresiva	Inclusiones tau positiva	Intracitoplasmática (neuronas oligodendroglia y astocitos)	Tau
Demencia con cuerpos de Lewy	Cuerpos de Lewy	Intracitoplasmática (neuronas)	$\alpha$ -sinucleína
Enfermedad de Huntington	Inclusión Neuronal	Intracitoplasmática(neuronas)	Huntintina
Atrofia sistémica múltiple	Inclusiones citoplasmáticas Gliales	Intracitoplasmática (oligodendroglia)	$\alpha$ -sinucleína
Enfermedad de Parkinson	Cuerpos de Lewy	Intracitoplasmática(neuronas)	$\alpha$ -sinucleína
Enfermedad de Pick	Cuerpos de Pick	Intracitoplasmática(neuronas)	Tau
Enfermedad por Prion	Placas amiloideas de priones	Extracelular	Proteína prionica resistente a proteasas
Ataxia Espinocerebelosa	Inclusiones neuronales	Intranuclear (neuronas)	Ataxina

Tomada y modificada de Skovronsky *et al.*, 2006

Se ha sugerido que estos agregados proteicos podrían ser la causa y/o la consecuencia de las enfermedades neurodegenerativas (Landsbury, 2006). Igualmente, existen estudios que observan que si existen mutaciones en el gen codificante para la proteína causante y/o formadora de la agregación, se producen las formas hereditarias de los padecimientos, cuyos inicios son normalmente más

tempranos y los fenotipos más severos (Buxbaum y Tagoe, 2000). Del mismo modo, al producir animales transgénicos que expresan el gen mutante humano de la proteína para la proteína causante y/o formadora de la agregación, éstos desarrollan algunas de las características típicas de las enfermedades (Price *et al.*, 2000); por ejemplo, la transferencia del gen mutante del péptido precursor amiloide conduce a la formación de los depósitos de placas amiloides (Calhoun *et al.*, 1999). Por último, se ha observado que los agregados de proteínas mal plegadas producidos *in vitro* son neurotóxicos y capaces de inducir apoptosis (Bucciantini *et al.*, 2002).

Los depósitos pueden afectar la función y supervivencia neuronal, ya sea por un efecto citotóxico, al inducir estrés oxidativo mediante la formación de radicales libres, lo que resulta en la oxidación de proteínas y lípidos, en el aumento en los niveles de calcio intracelular y en la disfunción mitocondrial. Se ha observado que dentro del tejido neural obtenido de pacientes con distintas enfermedades neurodegenerativas, se presentan mayores niveles en productos de la peroxidación como malondialdehído y carbonilos (Pappolla *et al.*, 2000). Otro mecanismo por el cual los depósitos pueden afectar la función celular es mediante la disrupción de la membrana (formación de poros) y la despolarización neuronal (alteración en los canales de iones), lo que resulta en la alteración de la homeostasis de iones y en la desregulación en las señalizaciones celulares lo que lleva a la muerte celular (Soto y Estrada 2008)

## 2. Enfermedad de Alzheimer

La EA es un padecimiento neurológico progresivo que se asocia con una pérdida continua de la cognición, la memoria, la evocación y el reconocimiento. En ocasiones, estos síntomas están acompañados por afasia, apraxia, agnosia y desórdenes en algunas funciones de ejecución (Selkoe, 2001). Igualmente, se observan cambios en la personalidad y en la conducta que incluyen depresión, ansiedad, irritabilidad, ideas paranoides, alucinaciones, agresividad y desregulación del ciclo sueño-vigilia (Burns *et al.*, 2002). En etapas iniciales, ésta se caracteriza por la disminución de la percepción espacial, así como desorientación en tiempo y espacio. En las etapas tardías se presenta aumento en el tono muscular, desinhibición emocional y el hundimiento de la personalidad normal del individuo.

Otros datos clínicos comunes son la pérdida del control de esfínteres, disminución de peso y finalmente, el paciente termina en estado vegetativo (McKhann *et al.*, 1984).

Esta enfermedad es la demencia neurodegenerativa más frecuente y el principal tipo a nivel mundial; entre el 60% y 70% de todas las demencias son EA. La Asociación Internacional de la Enfermedad de Alzheimer (ADI por sus siglas en inglés) estimó la existencia de 35.6 millones de personas en todo el mundo con demencia en el 2010. Su prevalencia general en personas de 60 años es del 1%, en individuos mayores de 65 años oscila entre el 6% y 10% y aumenta en forma exponencial cada cinco años hasta alcanzar entre el 35% y 40% en mayores de 85 años (Brookmeyer *et al.*, 2007; Villalpando, 2006). En México son más de 350,000 personas las que son afectadas por la EA y mueren por ella anualmente 2,030 pacientes<sup>1</sup>. Asimismo, a través de estimaciones indirectas con modelos epidemiológicos, ha sido posible estimar la prevalencia en México, que podría alcanzar el 5 % entre la población de mayores de 60 años (Gutiérrez, 2001).

---

<sup>1</sup> Cifra disponible en [www.innn.salud.gob.mx](http://www.innn.salud.gob.mx)

## 2.1. Características de la Enfermedad de Alzheimer

Algunas de las principales características patológicas de la EA son el alargamiento y el engrosamiento de los surcos cerebrales (Selkoe, 2001), junto con una disminución de la masa cerebral en áreas corticales y la atrofia cerebral generalizada (Andersen *et al.*, 2007). Ésta afecta diferentes áreas cerebrales del sistema límbico (el hipocampo, la amígdala y el giro parahipocampal), la corteza cerebral, la entorrinal y la de asociación. Igualmente, perturba otras regiones subcorticales, que incluyen el sistema colinérgico del procencéfalo basal, el cuerpo estriado, el tálamo y el cerebelo, así como los lóbulos frontal, temporal y parietal (Andersen *et al.*, 2007; Squire *et al.*, 2008). (Fig. 2).

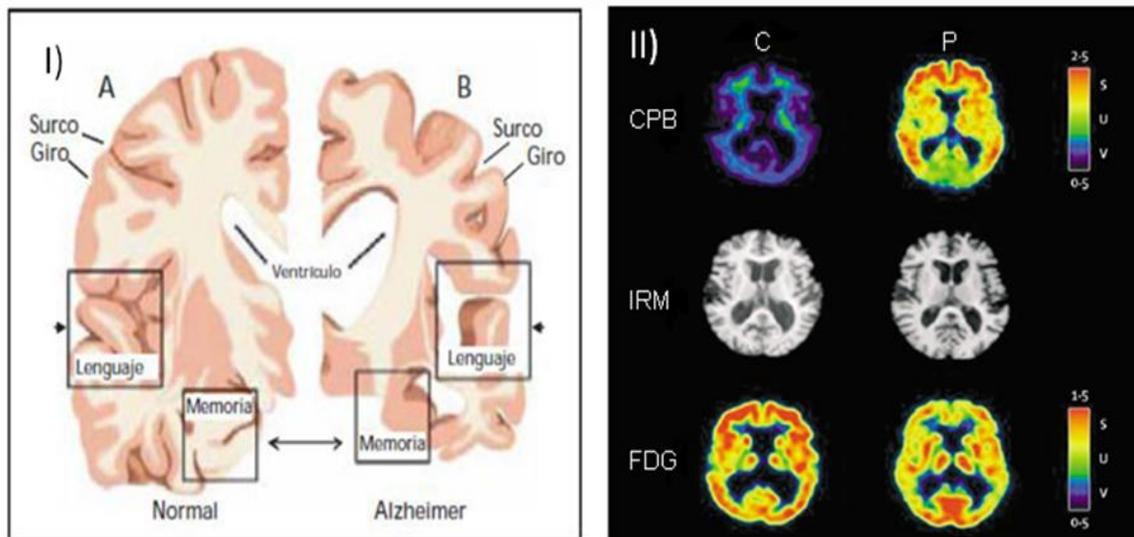


Fig. 2. I) Imagen representativa de un corte frontal del cerebro humano. A: Cerebro de un individuo normal. B: de un individuo con Alzheimer. Se observa una reducción (atrofia) global del tejido, un ensanchamiento de los surcos, ventrículos agrandados, una reducción del hipocampo (área relacionada con la memoria), un daño y una reducción de corteza asociada al lenguaje. Modificado de [www.ahaf.org/alzdis/about/BrainAlzheimer.htm\\_II](http://www.ahaf.org/alzdis/about/BrainAlzheimer.htm_II)) Comparación de imágenes cerebrales de una persona cognitivamente normal (C) y un paciente con enfermedad de Alzheimer (P). El panel superior muestra imágenes obtenidas por tomografía de emisión de positrones (TEP) donde se mide el componente Pittsburgh B (CPB), que permite la identificación de las placas seniles. El paciente con Alzheimer presenta una mayor acumulación de estas. El panel del medio muestra una imagen realizada por resonancia magnética (IRM), donde se observa la atrofia de la corteza. El panel inferior presenta una imagen obtenida por TEP donde se mide la fluorodesoxiglucosa (FDG), utilizada para hacer una valoración del metabolismo de la glucosa en el cerebro. Se observa un hipometabolismo en las zonas temporoparietal y fronto temporal en el cerebro del paciente. Modificado de Blennow (2006).

Aunque la causa exacta del padecimiento todavía se desconoce, la hipótesis predominante sugiere que la formación de las placas seniles (agregados de peptido-amiloide) y las MN son los principales factores etiológicos de la EA. (Fig. 3).

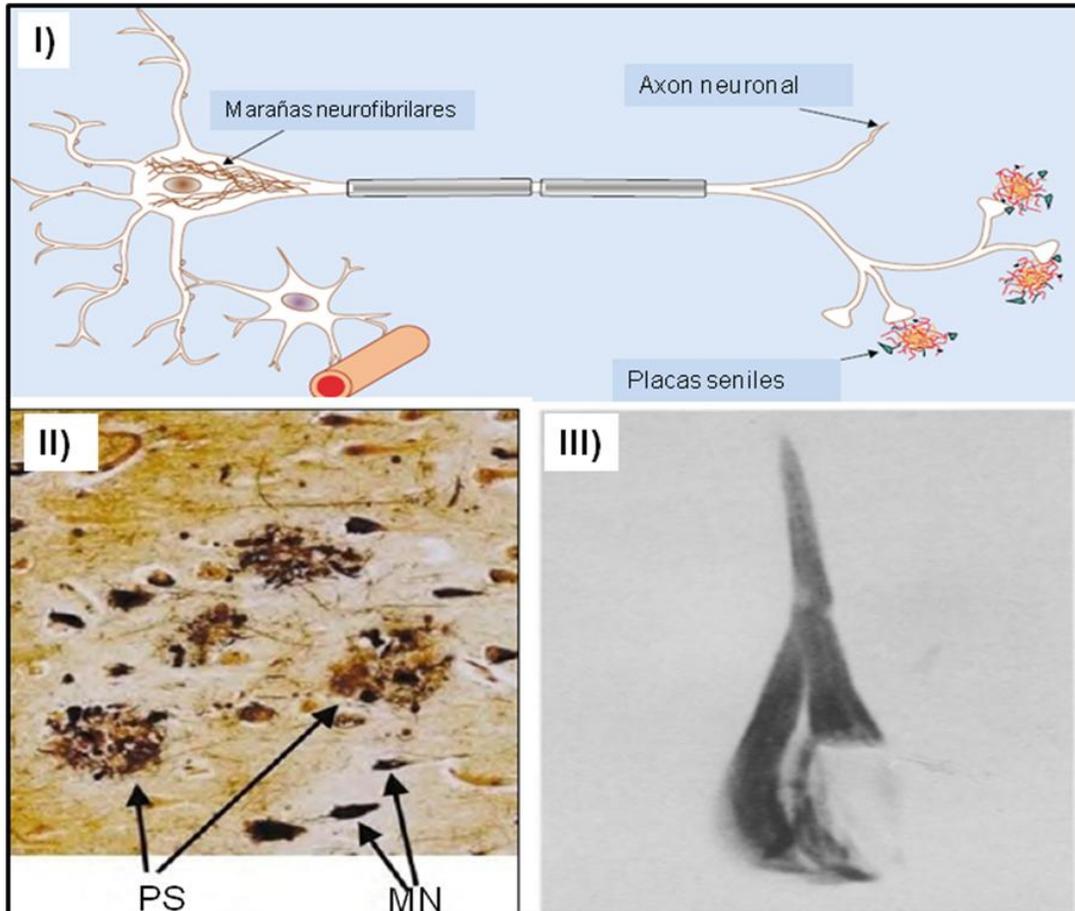


Fig. 3. I) Dibujo esquemático de los cambios histopatológicos de la EA. El dibujo muestra una neurona con un astrocito y un capilar. Se representan las marañas neurofibrilares dentro de la neurona y las placas seniles junto a los botones sinápticos. Modificada de Blennow y Hampel (2003). II) Corte histopatológico de la corteza cerebral de un paciente con EA. Se muestra la presencia de placas seniles (PS) y marañas neurofibrilares (MN). Tomada de Blennow, *et al.*, (2006) III) Marañas Neurofibrilares. Se muestra una neurona piramidal teñida con el anticuerpo PHF, el cual reconoce a las marañas neurofibrilares. Modificada de Price, *et al.*, (1991)

### **2.1.1. El procesamiento de la proteína precursora amiloide y la formación de las placas seniles**

Uno de los marcadores de la EA es la proteína precursora amiloide (PPA) y su producto de degradación, el péptido-amiloide (PA); ambos tienen un papel central en la etiopatogenia de la EA. La PPA es una glicoproteína transmembranal que consta de 770 aminoácidos (aa), y tiene 3 dominios: N'-terminal (extracelular), A $\beta$  (membranal) y el C'-terminal (intracelular) (Zheng y Koo, 2006). Esta proteína está relacionada con proceso de proliferación y adhesión celular y está fuertemente ligada al desarrollo y la plasticidad neuronal (Spires *et al.*, 2007).

La idea central detrás de la teoría de la cascada amiloidea sugiere que la producción y acumulación anormal del PA ocurren debido a un procesamiento erróneo de la proteína precursora amiloide.

Hay tres tipos de enzimas que metabolizan a la PPA: la  $\alpha$ , la  $\beta$  y la  $\gamma$  secretasas. En su metabolismo normal, la  $\alpha$ -secretasa corta a esta proteína a la mitad de su región transmembranal entre los aa 687 y 688 del dominio A $\beta$ . Como resultado de este corte, se libera el extremo extracelular de la proteína que se denomina  $\alpha$ PPA. Anclado a la membrana, deja el fragmento C83, que es escindido por el complejo multiproteico de la  $\gamma$ -secretasa, produciendo el péptido P3, que es pequeño y soluble (Allison *et al.*, 2003). A diferencia de lo que sucede normalmente en la EA, la PPA es metabolizada por una vía alterna a la de la  $\alpha$ -secretasa, llamada la vía de la  $\beta$ -secretasa, que corta la proteína en los aa 671 y 672, liberando el  $\beta$  PPA y anclando a la membrana el fragmento C99 de la proteína. Este último es procesado por el complejo  $\gamma$ -secretasa en los residuos 712, 714 o 715, de forma que se puedan producir 3 péptidos de 40, 42 y 43 aa (De Strooper y Annaert, 2000). Estos oligómeros de PA adquieren una conformación tridimensional  $\beta$ -plegada, que los vuelve insolubles y los deposita fuera de las neuronas a nivel cortical, formando las placas seniles, que activan a la microglía astrocitos y macrófagos, que a su vez producen citocinas proinflamatorias que favorecen la toxicidad del péptido. (Fig. 4).

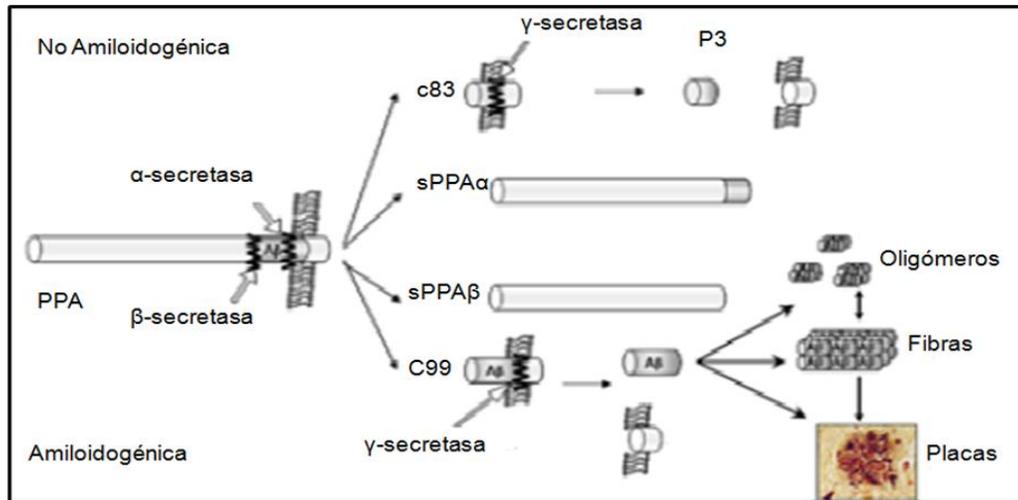


Fig. 4. Vías del procesamiento del péptido amiloide  $\beta$ . En la parte superior se observa la vía no amiloidogénica. La proteína precursora amiloidea (PPA), que es una proteína integral de membrana, es cortada por la  $\alpha$ -secretasa en el dominio A $\beta$ , generando una fracción soluble sPPA $\alpha$ . El restante fragmento C-terminal (C83) es cortado por la  $\gamma$ -secretasa, liberando al péptido p3. Mientras tanto, en la vía amiloidogénica, la  $\beta$ -secretasa fragmenta a la PPA antes del dominio A $\beta$ , liberando la fracción sPPA $\beta$ . La parte restante C99 es fragmentada por la  $\gamma$ -secretasa, liberando A $\beta$  de 40 o 42 aminoácidos.

### 2.1.2. Patología neurofibrilar en la Enfermedad de Alzheimer (Marañas neurofibrilares)

En la EA existe una patología neurofibrilar que consiste en la acumulación intraneuronal de fibras anormales formadas por filamentos helicoidales pareados, compuestos principalmente por la proteína tau hiperfosforilada. Estos agregados son los principales componentes de las MN. Normalmente, en el citoplasma, la proteína tau está fosforilada en aminoácidos específicos; es decir, tiene grupos de fosfatos unidos, los cuales son muy importantes en la regulación de la función de la misma. En dicha enfermedad, se forman agregados de tau que contienen un número elevado de fosfatos, por lo que se dice que esta proteína se encuentra en un estado de hiperfosforilación.

El dímero formado, al asociarse dos proteínas tau hiperfosforiladas, tiene la capacidad de secuestrar más proteína tau, formando oligómeros. La unión de varios de estos genera protómeros y, posteriormente, filamentos helicoidales apareados (FHA), que son las unidades estructurales básicas de las MN, que se localizan principalmente en el cuerpo neuronal y llenan casi todo el citoplasma de las células

afectadas (Kosik y Greenberg, 1994). Estos filamentos tienen un diámetro de 15 a 20 nm y, cuando se aparean dos hebras, se enrollan entre sí con una periodicidad (vuelta), promedio de 160 nm y un máximo de ancho de 24 nm (Kidd, 1963; Wisniewski *et al.*, 1976). (Fig. 5).

Hay tres sitios diferentes en los que localiza dicha patología: a manera de MN en el cuerpo de la neurona, como fibras tortuosas en las dendritas distróficas de dichas neuronas y en los axones (Villalpando, 2006). La presencia de MN es uno de los principales criterios de diagnóstico *postmortem* para la confirmación de la EA. De la misma forma, se ha correlacionado el nivel de demencia en la EA con la formación de las MN, ya que el daño que producen lleva a la pérdida de la densidad sináptica y finalmente al deterioro neuronal.

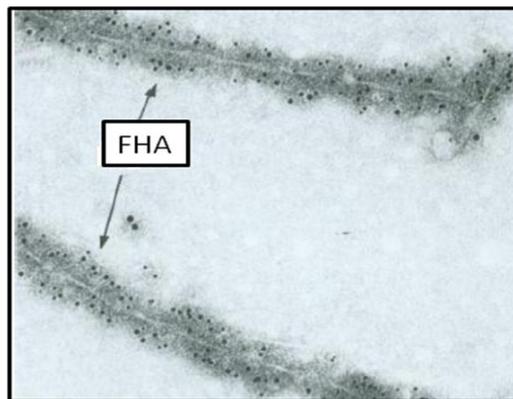


Fig. 5. Microscopía electrónica de los filamentos helicoidales apareados (FHA). La imagen muestra unos FHA tratados con un anticuerpo anti-FHA llamado mAb-42 Tomada de Wischik, *et al.*, (1988).

La formación de las MN se extiende de manera ordenada y sistemática; su presencia en distintas áreas corticales se correlaciona bien con la presencia de las diferentes alteraciones cognitivas de la EA. En estadios tempranos y cuando el paciente aún está asintomático, se observan ya alteraciones neurofibrilares a nivel de la corteza entorrinal y la región hipocampal; después, aparecen en regiones corticales y subcorticales cercanas al sistema límbico, progresan a las cortezas asociativas, comenzando por el neocórtex temporal inferior y anterior, y finalizan su evolución en la corteza temporal superior, parietal y prefrontal, aunque tienden a respetar las cortezas motoras y sensoriales primarias (Villalpando, 2006).

### 3. Otras alteraciones encontradas en la Enfermedad de Alzheimer

Las alteraciones mitocondriales también tienen un papel importante dentro de la EA, ya que se ha observado que existe un vínculo entre estas y la fosforilación de tau, así como en la formación de las placas amiloideas (Swerdlow *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2010). Su aparición puede inducir a un déficit funcional en los complejos de la cadena respiratoria, lo que provoca una disfunción mitocondrial y un estrés oxidativo (Viña y Lloret, 2010).

Se ha propuesto que tanto el péptido A $\beta$  como las MN pueden desencadenar un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) e interactuar con los complejos mitocondriales (principalmente el complejo IV mitocondrial y la Adenosín trifosfato (ATP) sintetasa) de la cadena respiratoria. Esto favorece una disminución en el potencial de membrana y en la producción de energía y la posterior salida del citocromo c, con lo cual se activa la apoptosis (Pagani y Eckert, 2011).

Además de las alteraciones estructurales mencionadas, existe también una importante modificación en la neurotransmisión. En particular, el sistema colinérgico se ve muy reducido por la afección precoz del núcleo *basalis* de Meynert, principal sitio de producción de acetilcolina, la cual se ha relacionado con los procesos de aprendizaje y de atención sostenida; el grado de déficit de dicho neurotransmisor se correlaciona con el cognitivo en la EA.

Igualmente, se ve una reducción de alrededor de 50% de la función de los sistemas serotoninérgicos, noradrenérgicos, GABA-érgicos y glutamatérgicos en regiones del cerebro involucradas en la memoria y el aprendizaje (D'Amato *et al.* 1987; Doraiswamy *et al.*, 2003; Jansen *et al.*, 1990; Villalpando, 2006).

## 4. Generalidades del citoesqueleto y de la proteína tau

### 4.1. Citoesqueleto

En la EA, en las neuronas, se producen anomalías en el citoesqueleto (Kowall y Kosik, 1987), el cual es un soporte mecánico interno formado por un sistema de fibras y túbulos localizados en el citoplasma.

En dicha enfermedad, se modifica la citoarquitectura, la polaridad estructural y la morfología de las neuronas, lo cual provoca la interrupción del transporte de materiales celulares y de las conexiones sinápticas. Estos cambios podrían alterar la circuitería neuronal involucrada en la memoria declarativa y el aprendizaje (Kowall y Kosik, 1987; Squire *et al.*, 2008; Bamberg y Bloom, 2009). Esto se sugiere debido al descubrimiento, en un modelo de ratas, donde la disrupción de los microtúbulos, inducida por una administración crónica de colchicina, resultó en un déficit de aprendizaje y en una pérdida en la memoria (Bensimon y Chermat, 1991).

En su función normal, el citoesqueleto mantiene el volumen citoplasmático, así como la morfología y estructura polarizada de los dominios somatodendrítico y axonal de las neuronas, por lo que su participación es crucial para la fisiología neuronal. También participa en funciones como la división celular, la exocitosis, la endocitosis, la adhesión celular, el movimiento de los organelos y en el transporte axoplásmico (Benítez-King, 2006; Alberts *et al.*, 1996; Squire *et al.*, 2008). Estructuralmente, se han definido los siguientes tres elementos: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos. Los primeros están constituidos por la proteína actina y se involucran en procesos de motilidad celular y movimientos intracelulares (Alberts *et al.*, 2006). Los segundos son bioquímicamente heterogéneos y se forman por diversas proteínas, tales como queratina, vimentina y desmina. Los terceros son estructuras tubulares constituidas por unidades de tubulina, que intervienen en diversas funciones, tales como el transporte intracelular, el movimiento de cilios y flagelos y los cromosomas; también participan en el mantenimiento de la forma asimétrica de la polaridad neuronal, así como en el transporte axoplásmico (Benítez-King, 2006; Alberts *et al.*, 1996).

Todas las funciones del citoesqueleto dependen de una gran variedad de proteínas asociadas, que se unen a los diferentes filamentos y/o túbulos y componentes celulares (Alberts *et al.*, 1996). Éstos son esenciales en el control del ensamblaje y la actividad motora dentro del transporte intracelular (Alberts *et al.*, 1996); justamente, proveen estabilidad y confieren las propiedades mecánicas de los componentes del citoesqueleto. En las neuronas, el dominio somatodendrítico que recibe y codifica la información entrante está constituido principalmente por microfilamentos de actina, neurofilamentos y proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (proteínas asociadas de microtúbulos, por sus siglas en inglés). De este modo, el dominio axonal, que transmite la información a las neuronas postsinápticas, está constituido por microtúbulos, neurofilamentos y la proteína tau, la cual se asocia a los microtúbulos (Bohm *et al.*, 1990).

## **4.2. Proteína Tau**

Las MAPs pueden ser sustratos de diferentes cinasas, las cuales son un tipo de enzimas que transfieren grupos fosfatos desde el ATP a un sustrato específico. La fosforilación resultante de las MAPs puede ser un factor determinante de su función y de su posición dentro de la célula. En las neuronas sanas, tau se une a los microtúbulos, estabilizándolos. Esta unión es mediada por procesos enzimáticos reversibles de fosforilación/defosforilación. Los procesos antes mencionados son necesarios para la dinámica de los microtúbulos, así como para el crecimiento y el funcionamiento celular.

La tau es una proteína citosólica que participa en el transporte axonal anterógrado. Inicialmente, fue caracterizada como una proteína que se encuentra exclusivamente en los axones (Binder *et al.*, 1985). Sin embargo, posteriormente se demostró que se localiza en todos los compartimentos de las células nerviosas y no exclusivamente en los axones (Hamre, *et al.*, 1989), aunque, comparada con las otras MAPs, ésta está preferencialmente en el axón. Esta proteína se une a los microtúbulos, estabilizando su estructura y promoviendo la polimerización de la tubulina (Brandt y Lee, 1994). Estos dominios de unión a los microtúbulos se encuentran localizados en el extremo carbonilo terminal y están compuestos de 18

aminoácidos altamente conservados y separados por secuencias de interrepetición flexibles de 13-14 aminoácidos menos conservadas (Butner y Kirschener, 1991) (Fig. 6). Esta proteína tiene un peso molecular de entre 45 y 65 kDa y es codificada por el gen tau, el cual se encuentra en el cromosoma 17q21. Existen 6 isoformas que son resultado del *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10. Estas son proteínas de 441 aminoácidos (2+3+10+), 410 (2+3+10-), 412 (2+3-10+), 381 (2+3-10-) y 383 aminoácidos (2-3-10+). (Fig. 7).

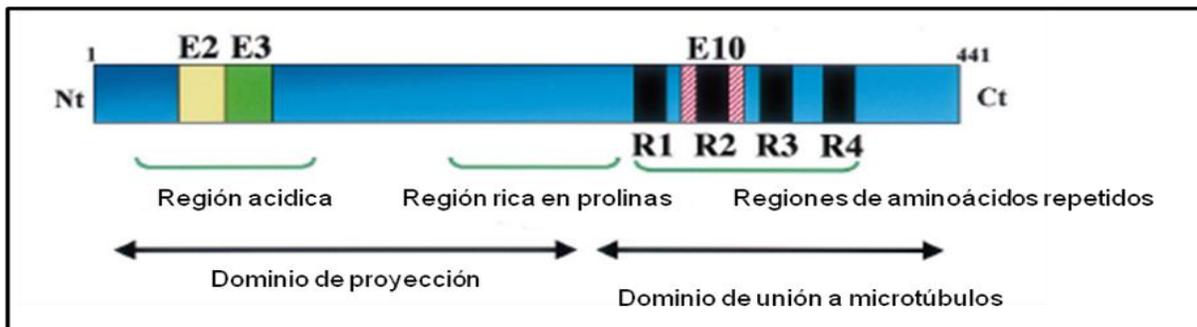


Fig. 6. Representación esquemática de los dominios funcionales de la proteína tau. El dominio de proyección incluye la región acidica y la región rica en prolina, la cual interactúa con los elementos del citoesqueleto para determinar el espaciado entre los microtúbulos de los axones. El extremo C-terminal está involucrado en la unión a los microtúbulos, regulando la tasa de polimerización. Modificado de Buee, *et al.*, (2000).

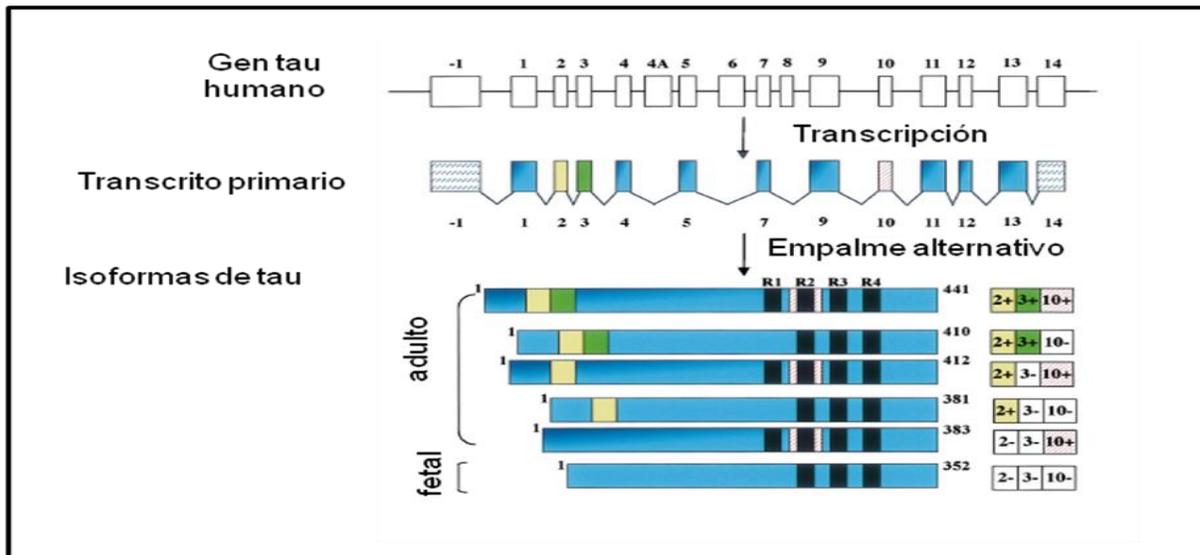


Fig. 7. Representación esquemática del gen transcrito y de las 6 isoformas de la proteína tau. El gen se localiza en el cromosoma 17, que contiene 16 exones, de los cuales el exon -1 es parte del promotor. El transcrito primario contiene 13 exones, pero el exon 4A, 6 y 8 no son transcritos en el sistema nervioso central (sólo se expresan en sistema periférico, dando lugar a isoformas de la proteína de alto peso molecular). Los exones 1, 4, 5, 7, 8, 11, 12 y 13 son constitutivos y los exones 2,

3 y 10 sufren empalme alternativo, dando origen a los 6 transcritos de ARNm, que al ser traducidos producen a las 6 isoformas de la proteína tau. Modificado de Buee, *et al.*, (2000).

Existen 79 sitios potenciales de residuos serina y treonina para su fosforilación en la isoforma más larga de tau, pero solo alrededor de 30 de estos sitios fosforilados se han reportado en la proteína normal (Billingsley y Kincaid, 1997; Buee *et al.*, 2000). Casi todos los sitios están localizados fuera de los dominios de unión a los microtúbulos, y la mayoría son motivos ser-pro o thr-pro, con la excepción de las ser262, ser285, ser305, ser324, ser352 y ser356 (Goedert *et al.*, 1989; Roder *et al.*, 1997) (Fig. 8).

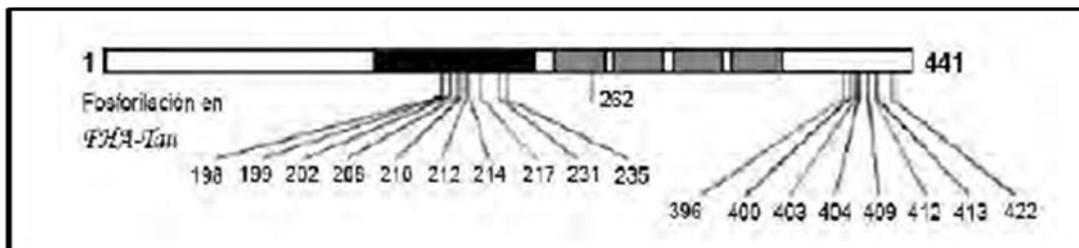


Fig. 8. Sitios de fosforilación de la proteína tau. Se pueden observar los sitios específicos de fosforilación de la proteína tau tanto en *in vitro* como *in vivo*, proveniente de tejido neuronal *post mortem* de pacientes con demencia tipo Alzheimer. Modificado de Lovestone y Reynolds (1997).

En la EA, la hiperfosforilación de la proteína tau conduce a una disminución de su afinidad por los microtúbulos, ya que afecta su capacidad para regular el ensamblaje debido a una pérdida de función; por consiguiente, los microtúbulos se despolimerizan, lo que ocasiona una interrupción del citoesqueleto neural, que a su vez genera la forma asimétrica de las neuronas (Alonso *et al.*, 1997). (Fig. 9).

Además, esto provoca una disfunción sináptica y una alteración del transporte axoplásmico (Griffin y Watson, 1988). Por su parte, la hiperfosforilación conduce a un estado de resistencia de la degradación proteolítica de la proteína tau y, después, a una acumulación gradual dentro del cuerpo de la neurona (Fig. 10).

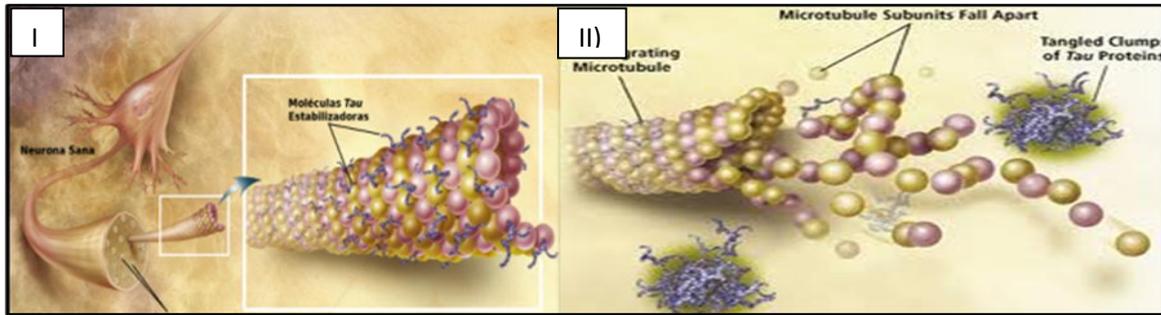


Fig. 9. I) Dibujo esquemático del citoesqueleto microtubular una neurona sana y de una neurona en proceso de degeneración. I: muestra los Microtúbulos neuronales, los cuales se encuentran asociados a la proteína tau, la cual confiere estabilidad a estos para lograr una correcta polimerización. II) Dibujo esquemático de la desorganización microtubular característica de la enfermedad de Alzheimer. La proteína tau ya no cumple su función estabilizadora, que al disociarse de los microtúbulos, puede sufrir diferentes modificaciones post traduccionales, llevándola a auto ensamblarse y a formar de manera paulatina las marañas neurofibrilares. Modificada de National Institute of Aging.

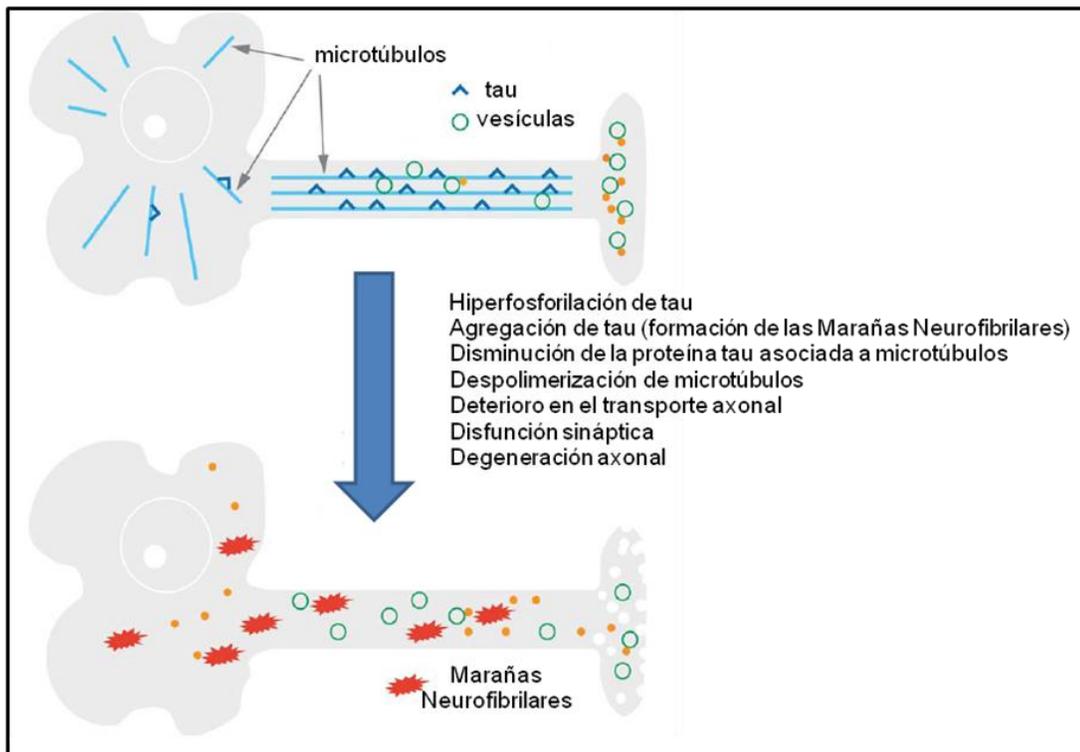


Fig.10. Dibujo esquemático de los efectos de la patología neurofibrilar. La hiperfosforilación de la proteína tau y su posterior agregación pueden conducir a una disfunción neuronal a través de varios mecanismos, tales como la despolimerización de los microtúbulos. Esto a su vez puede conducir a un deterioro en el transporte axonal, una disfunción sináptica y una degeneración axonal, lo que concluiría con la muerte neuronal.

## 5. Participación de la GSK-3 $\beta$ en al hiperfosforilación de tau

La hiperfosforilación de tau es el resultado del desequilibrio de la acción de diferentes cinasas y fosfatasas. La mayoría de estas enzimas involucradas en la fosforilación de tau forman parte de las cinasas dirigidas por prolina. Algunas de estas son la cinasas de proteínas activadoras de mitógenos (MAPK) (Steiner *et al.*, 1990), la cinasa tau-tubulina (Greenwood *et al.*, 1994), la cdc2 y cdk5 (Buee-scherrer *et al.*, 1996) y la cinasas activadas por estrés (SAPK) (Jicha *et al.*, 1999). Asimismo, existen enzimas no dirigidas por prolina, las cuales incluyen cinasas reguladoras de afinidad a microtúbulos (MARK) (Cohen, 1989), la proteína cinasa II dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaMPK II) (Ingebritsen y Cohen, 1983), la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) (Liao *et al.*, 1998) y la cinasa II de la caseína (Cleveland *et al.*, 1977). Igualmente, se ha observado que las fosfatasas PP1, PP2A, PP2B y PP2C son capaces de interactuar con la proteína tau (Fleming y Johnson, 1995; Goedert *et al.*, 1995; Goto *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1995). Además de estas cinasas, se encuentra la sintasa de la glicógeno 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), una de las principales enzimas que participa en la fosforilación aberrante de tau, que parece estar implicada en la patología de EA. Ésta es capaz de fosforilar ambos residuos de serina y treonina. (Fig. 11).

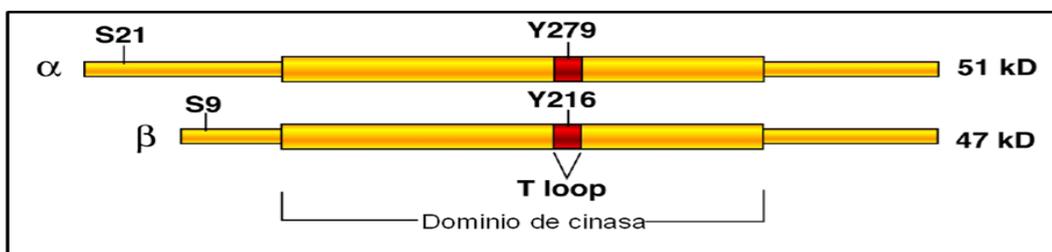


Fig. 11. Representación esquemática de la estructura primaria de las enzimas GSK-3 $\beta$  y la GSK-3 $\alpha$ . Se muestran los sitios de fosforilación (serinas S y tirosinas Y), que son sitios importantes para la regulación de su función. Tomada de Woodgett (2001).

Dicha enzima ha sido implicada en procesos importantes para el funcionamiento celular, tales como el metabolismo, el control transcripcional y la oncogénesis. De la misma forma, se ha descrito que participa en algunos mecanismos etiopatológicos de algunas enfermedades neurológicas. Existen dos isoformas de esta proteína: la GSK-3 $\alpha$  y la GSK-3 $\beta$ ; cada una de las cuales es

codificada por un gen distinto (Grimes y Jope, 2001). Esta enzima se expresa en varios tejidos en mamíferos y en algunas líneas celulares (Woodgett, 1990) y fosforila varias proteínas, como la glucógeno sintasa (que a su vez regula el metabolismo del glucógeno en respuesta a la insulina), el factor de iniciación 2B, la ATP citrato liasa, (que regula la síntesis de lípidos), la subunidad reguladora de la PKA, c-Jun, c-Myc, la proteína elemento de unión a la respuesta de cAMP, el inhibidor-2, la  $\beta$ -catenina, las neurofilaminas, la sinapsina y el producto del gen APC (*adenomatous polyposis coli*). Igualmente, regula la fosforilación de tau y la apoptosis a través de la vía de la cinasa de PI 3 (fosfatidil inositol 3) y PKB (proteína cinasa B) (Kim y Kimmel, 2000; Grimes y Jope, 2001; Ramakrishna *et al.*, 1990; Hemmings *et al.*, 1982; Plyte *et al.*, 1992; Agarwal-Mawal *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2000; Welsh *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1992). (Fig. 12).

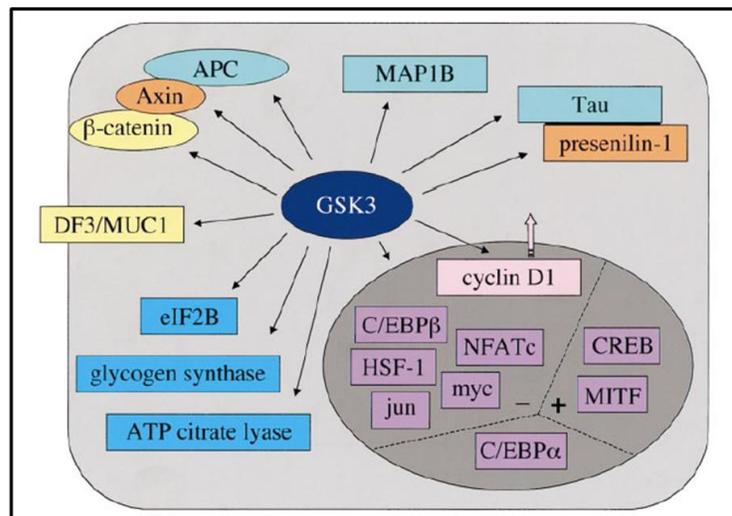


Fig. 12. Sustratos regulados por la GSK-3 $\beta$ . La imagen muestra los diferentes sustratos diferenciados por color de acuerdo a su función dentro de la células: los factores de transcripción (morado), enzimas que regulan el metabolismo (azul), las proteínas unidas a los microtúbulos (turquesa), proteínas de andamiaje (naranja), componentes de la maquinaria del ciclo de división celular (rosa) y proteínas que participan en la adhesión celular (amarillo). Tomada de Frame y Cohen 2001.

La actividad de la GSK-3 $\beta$  puede ser modulada por la insulina y la vía de Wnt. La señalización mediada por insulina conduce a la activación de la vía de la cinasa de PI3 y posteriormente la activación de Akt/PKB, que a su vez fosforila a la GSK-3 $\beta$ . La vía de señalización de Wnt regula la actividad de la GSK-3 $\beta$  y así evita la fosforilación y la degradación de la  $\beta$ -catenina. La actividad de ésta puede ser

regulada mediante la fosforilación de la serina 9 y 21 (Saltiel y Kahn 2001; Lizcano y Alessi 2002). Además de lo anterior, la actividad de esta enzima puede ser controlada por la fosforilación en las tirosinas 216 y 279, pero este modo es menos común que la regulación en la ser 9/21 (Bhat *et al* 2000; Bijur y Jope 2001). (Fig. 13).

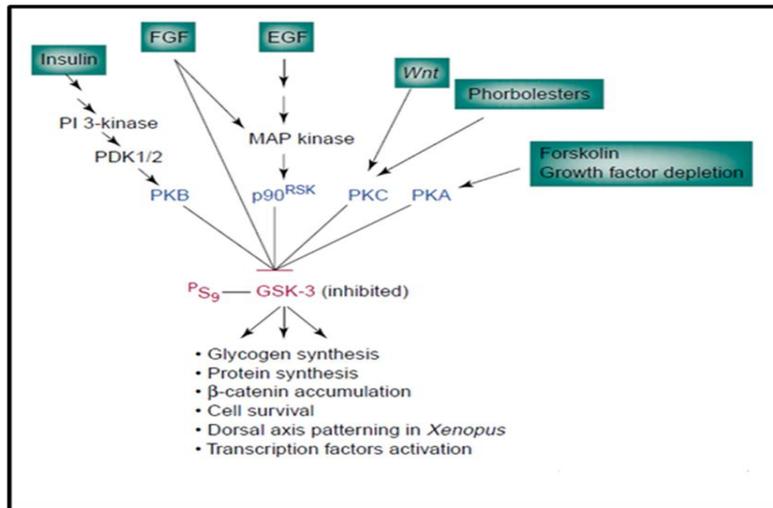


Fig. 13. Múltiples vías de regulación de la GSK-3. El diagrama muestra las vías de señalización activadas por estímulos externos (verde). Cuatro enzimas (la proteína cinasa B (PKB), p90rsk, la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa A (PKA) fosforilan a la GSK-3 en ser 9, un sitio inhibitor clave en la regulación de la función. Aunque las rutas de señalización convergen en la GSK-3, la inhibición de la enzima afecta sustratos específicos, es decir, la inhibición de la GSK-3 por una cierta señal no dará lugar a la activación de todos los sustratos, pero sí a uno determinado por la vía de señalización. Tomada de Eldar-Finkelman (2002).

Se ha propuesto que la GSK-3 $\beta$  desempeña un papel fundamental en la cascada de eventos que presenta la EA. Existe evidencia de que esta enzima está involucrada en la hiperfosforilación de tau (Rankin *et al.*, 2007), en el deterioro de la memoria y en el aumento de la formación de proteínas  $\beta$ -amiloides (Hooper *et al.*, 2008). (Fig. 14). Se ha observado un incremento en los niveles de la GSK-3 $\beta$  dentro de neuronas que presentan MN (Pei *et al.*, 1999); igualmente, existe un aumento en los niveles de la forma activa de GSK-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ pTyr216) y una disminución en la forma inactiva (GSK-3 $\beta$ p ser 9) en la corteza frontal de afectados con EA (Leroy *et al.*, 2007). Por otra parte, hay una sobrerregulación en la expresión de ésta en el hipocampo de pacientes con EA (Blalock *et al.*, 2004). Hay pocos estudios que evalúan esta actividad, ya que técnicamente es difícil medir la actividad enzimática en el tejido cerebral *post mortem*. Sin embargo, existe evidencia indirecta que apoya

el papel de la GSK-3 $\beta$  en la enfermedad de EA: varios estudios han demostrado la co-localización de la enzima con las MN y la presencia de neuritas distróficas (Yamaguchi *et al.*, 1996; Imahori y Uchida 1997; Pei *et al.*, 1997). Algunas investigaciones han observado que la GSK-3 $\beta$  induce una hiperfosforilación de tau tanto *in vitro* como en modelos de neurodegeneración (Hanger *et al.*, 1992; Ishiguro *et al.*, 1992; Lovestone *et al.*, 1994; Cho y Johnson 2003; Asuni *et al.*, 2006). Lucas *et al.*, en el 2001 realizaron estudios con ratones transgénicos que sobreexpresan a la GSK-3 $\beta$ . Estos ratones mostraron una hiperfosforilación de tau y la formación de agregados somatodentriticos de esta proteína; a su vez, encontraron indicativos de estrés celular y muerte neuronal (Lucas *et al.*, 2001). Mediante el uso de ratones doblemente transgénicos los cuales sobreexpresaban a la enzima GSK-3 $\beta$  y contenían una mutación en el triplete FTDO-17 de la proteína tau se observó que el tratamiento con cloruro de litio (un inhibidor de la GSK) previene la hiperfosforilación de tau y la formación de las MN (Engel *et al.*, 2006). Se ha observado que la sobreactividad de la GSK-3 $\beta$  reduce la síntesis de acetilcolina, lo cual concuerda con el déficit colinérgico presente en la EA (Hoshi *et al.*, 1996); además, la enzima es un mediador clave de la apoptosis y, por lo tanto, podría estar contribuyendo en la pérdida neuronal en dichos pacientes (Turenne y Price 2001).

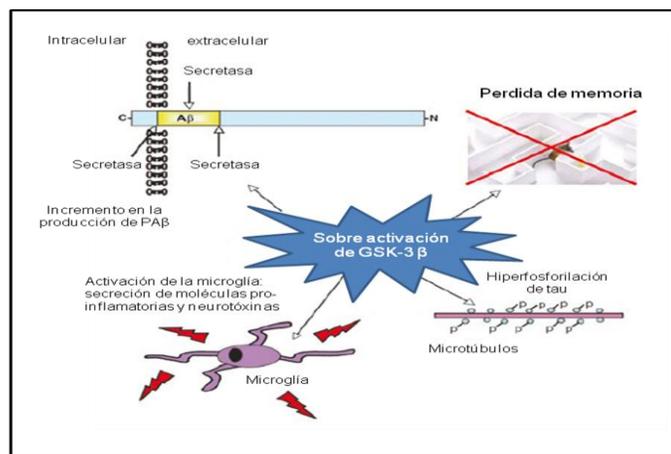


Fig. 14. Participación de la GSK-3 $\beta$  en la enfermedad de Alzheimer. La sobreactividad de GSK causada ya sea por la señalización aberrante de la vía Wnt o la vía de la insulina en los pacientes con EA, podría desempeñar un papel fundamental en la progresión de la enfermedad. Se ha observado que la GSK-3 participa en la hiperfosforilación de tau y en el aumento de la producción del péptido Amiloide  $\beta$  (PA $\beta$ ) (a través de la vía  $\beta$ - secretasa). Esto conlleva al aumento en las respuestas inflamatorias mediadas por la microglía. Todos estos eventos podrían causar deficiencias en el aprendizaje y la memoria. Modificada de Hooper *et al.*, 2008.

## 6. Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer

En la actualidad no existe ningún tratamiento que prevenga, elimine o revierta la degeneración provocada por la EA. Sin embargo, existen tres clases de medicamentos que han mostrado su utilidad en el tratamiento sintomático: los que aumentan la producción de acetilcolina, los inhibidores de la acetilcolinesterasa y los antagonistas de los receptores N-metil-D-aspartato. Su utilidad se basa en que en EA hay una pérdida neuronal a nivel del núcleo basal de Meynert, origen de las neuronas colinérgicas involucradas en memoria y cognición. Estos inhibidores impiden la degradación del neurotransmisor acetilcolina; sin embargo, con el tiempo pueden disminuir su efecto debido a la pérdida gradual de este neurotransmisor en el cerebro. Entre estos, están el donepecilo, la rivastigmina y la galantamina. Estos medicamentos no curan la enfermedad, sin embargo, mejoran los síntomas como son la memoria, la movilidad y la conducta, sobre todo al inicio del tratamiento, (Roger, 2003). Se han probado compuestos como el donepecilo (Eranz) el cual es una piperidina con efecto inhibidor de la acetilcolinesterasa de acción prolongada, relativamente selectivo y reversible (Rogers et al., 1998a) y la rivastigmina (Exelon) que es un subtipo de inhibidor de la acetilcolinesterasa selectivo y pseudoirreversible (Schneider y Farlow, 1998). A pesar de que los inhibidores de la acetilcolinesterasa producen una mejoría en la cognición, también producen efectos colaterales. Los más frecuentes producidos por el donepecilo, la rivastigmina, y la galantamina son náuseas, vómitos, diarrea y anorexia. Algunos pacientes desarrollan también calambres musculares, cefalea, mareos, síncope, sofocos, insomnio, debilidad, somnolencia, astenia y agitación (Rogers et al, 1998b).

Asimismo, se ha utilizado a la memantina, la cual es un antagonista de los receptores ionotrópicos a glutamato: los receptores a N-metil-D Aspartato (NMDA), con el fin de evitar la excitotoxicidad por este neurotransmisor (Mucke, 2009). El daño en las neuronas colinérgicas produce una sobreexcitación por glutamato que puede ser anterior o independiente de la lesión colinérgica (Tiraboschi et al., 2000). Su efecto terapéutico radica en que impide que concentraciones tóxicas de glutamato provoquen la muerte celular. No obstante, estos antagonistas producen efectos

colaterales potencialmente graves. Por esto, resulta importante la búsqueda de nuevas alternativas que ayuden en el tratamiento de esta enfermedad para disminuir el estrés oxidativo y ayudar a restablecer la estructura del citoesqueleto.

## **6.1. La melatonina como un coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

Además de la disfunción cognitiva y de la memoria, en la EA se observa con frecuencia una alteración del ciclo sueño-vigilia y otros ritmos circadianos (Fotuhi *et al.*, 2009; Beaulieu *et al.*, 2009; Cochen *et al.*, 2009; Vecchierini, 2010). Estas alteraciones están vinculadas con una ritmicidad perturbada en la liberación de melatonina (MEL) y con una disminución de sus niveles en la circulación y el cerebro de pacientes con EA (Skene *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1999; Mishima *et al.*, 1999).

Algunas evidencias han demostrado que la administración de la MEL a sujetos que padecen esta enfermedad causa una mejoría en los trastornos de los ritmos circadianos (Brusco *et al.*, 1998; Jean-Louis *et al.*, 1998) y una reducción en la disfunción cognoscitiva (Brusco *et al.*, 2000). Esta indolamina actúa como un cronobiótico, al interactuar con estructuras de los ritmos circadianos. La administración de 1 a 5 mg de melatonina disminuye la latencia del sueño y el número de despertares totales y mejora la eficiencia, el humor y el rendimiento de los pacientes (Cardinali *et al.*, 2006); también reduce el comportamiento agitado y la confusión y produce efectos benéficos sobre la memoria (Cohen-Mansfield *et al.*, 2000; Brusco *et al.*, 2000; Brusco *et al.*, 1998). Asimismo, algunos hallazgos indican que la MEL es capaz de modular la organización del citoesqueleto y la tasa de fosforilación de la proteína tau (Jiménez-Rubio, 2007; Wang *et al.*, 2004). Ante estas evidencias, la MEL puede proveer de una terapia complementaria para esta enfermedad.

## 7. Melatonina.

La MEL (5-metoxi-N-acetiltriptamina) es el principal producto de la glándula pineal. Esta se produce rítmicamente en sincronía con el ciclo de luz y oscuridad, y su síntesis y liberación son estimuladas por la oscuridad y suprimidas por la luz (Reiter *et al.*, 2007; Hardeland *et al.*, 2006). Fig. 15. Los pinealocitos son las células que sintetizan a la MEL. Sin embargo, la indolamina no se almacena dentro de la glándula secretora, sino que es rápidamente liberada dentro de la sangre y después a otros fluidos corporales (Vakkuri, 1985; Brzezinski *et al.*, 1987; Kivela *et al.*, 1990).

Esta hormona también tiene un origen extrapineal, es decir, se produce en múltiples células, tejidos y órganos, tales como los leucocitos mononucleares, las glándulas Harderianas, la cóclea membranosa, el tracto gastrointestinal, los ovarios, los testículos, la médula ósea, el cristalino, la retina, el corazón, los riñones y los órganos linfoides (Hardeland *et al.*, 2006; Reiter *et al.*, 2007; Pan y Allen, 1986; Menendez-Pelaez *et al.*, 1987; Huether *et al.*, 1992; Itoh *et al.*, 1997; Tijimes *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1999; Conti *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 1999; Macchi *et al.*, 2004).

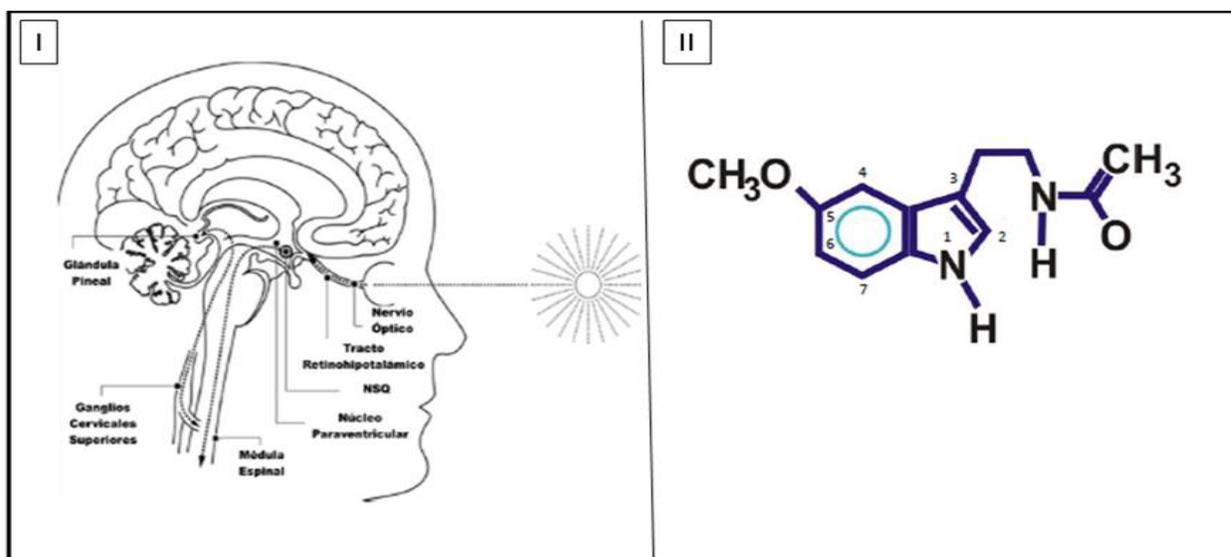


Fig. 15. I) Esquema representativo de la liberación de la melatonina por la glándula pineal son inhibidas por la luz y estimulada por la oscuridad. Las señales neuronales provenientes de las células ganglionares son transferidas hacia el hipotálamo anterior y al SNC por el tracto retinohipotalámico, luego a los ganglios cervicales superiores y finalmente a la glándula pineal. II) Estructura química de la melatonina. La melatonina, es la principal hormona producida por la glándula pineal, es un compuesto metoxiindolico de naturaleza lipofílica. Modificada de Doghramji (2007).

## 7.1. Biosíntesis y metabolismo de la melatonina

La MEL se sintetiza a partir del aminoácido L-triptófano como precursor, sobre el cual actúan cuatro enzimas principales: la triptófano hidroxilasa (TPH), la aminoácido aromático descarboxilasa (AAD), la serotonina N-acetiltransferasa (NAT) y la hidroxindol-O metiltransferasa (HIOMT) (todas reconocidas por sus siglas en inglés) (Nowak y Zawilska, 1998). Conforme a lo anterior, la vía principal de la biosíntesis consta de la hidroxilación, descarboxilación, N-acetilación y O-metilación del triptófano. (Fig. 16).

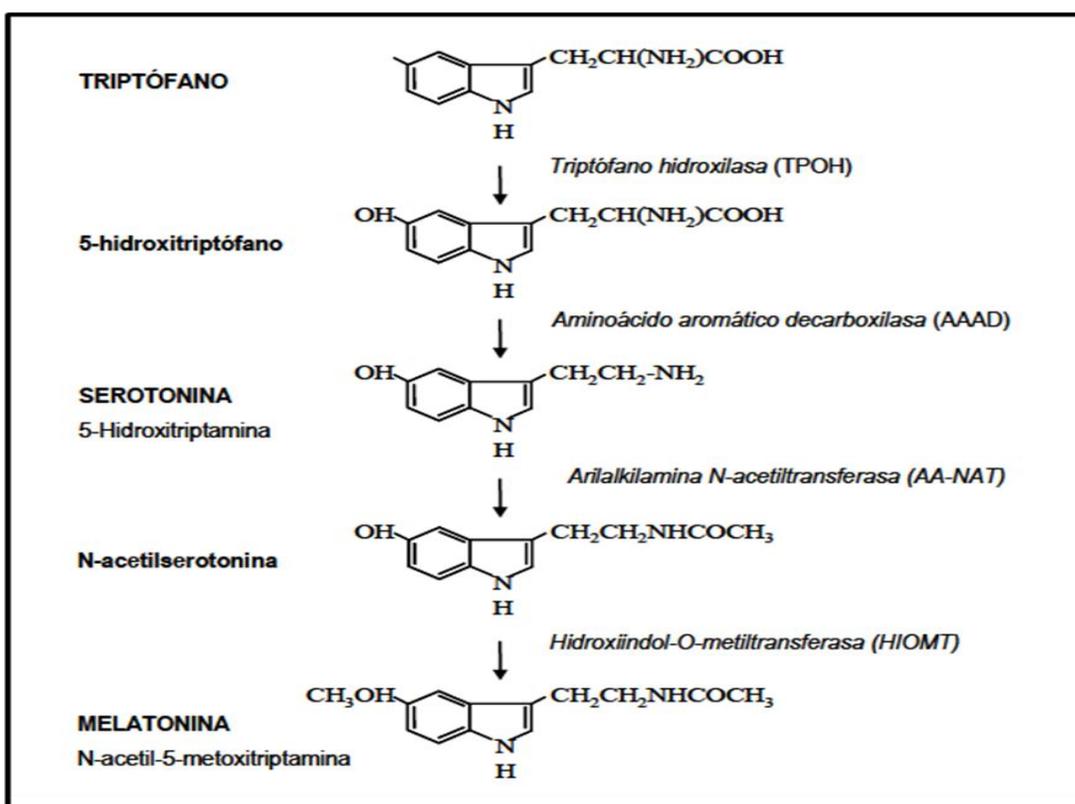


Fig. 16. Esquema de la vía de síntesis de la melatonina. La síntesis de melatonina se lleva a cabo a partir del aminoácido triptófano e inicia con la hidroxilación de este en la posición 5 del anillo indólico por la enzima triptófano hidroxilasa. Esta hidroxilación resulta en el 5-hidroxitriptófano, que es descarboxilado por la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos para formar a la 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina. A continuación, la 5-hidroxitriptamina es acetilada en la cadena lateral por la N-acetiltransferasa, lo cual genera a la N-acetilserotonina. Finalmente, la N-serotonina es metilada en la posición 5 del anillo indólico por la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa, lo que resulta en la formación de la melatonina. Modificada de Hardeland *et al* 2006.

El metabolismo de la MEL circulante se realiza principalmente en el hígado, mediante la hidroxilación del carbono 6 por la citocromo monooxidasa P450; posteriormente, se une covalentemente a un sulfato para formar el compuesto 6 sulfatoximelatonina (aMT6S por sus siglas en inglés) (Facciola *et al.*, 2001), el cual es el principal metabolito de la MEL en la orina. En el cerebro, esta hormona se metaboliza en derivados de la quinoneimina como *N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinoneimina* (AFMK por sus siglas en inglés) (Hirata *et al.*, 1974; Hardeland *et al.*, 2009). En varios tejidos, esta indolamina se metaboliza de una manera no enzimática a 3 hidroxil melatonina cíclica (Tan *et al.*, 1998).

## **7.2. Efectos fisiológicos de la melatonina**

Esta hormona ejerce diversas acciones fisiológicas en los organismos, actúa como un sincronizador de los ritmos circadianos (inducción del sueño), regula la respuesta neuroinmunológica (Tan *et al.*, 2002), es un antioxidante (captador de radicales libres) (Fuhrberg *et al.*, 1997) y modula la organización del citoesqueleto. Uno de los papeles más reconocidos de la MEL es el de sincronizar los ritmos biológicos, debido a que actúa como un reloj interno para los eventos diarios, indicando el ritmo circadiano necesario para el ciclo de sueño-vigilia.

La mayoría de los organismos presentan niveles elevados de ésta durante la fase oscura, sin importar que sus patrones de actividad sean diurnos, nocturnos o crepusculares (Nowak y Zawilska, 1998).

El patrón que presentan los humanos está caracterizado por un pico de melatonina que aparece a media noche y disminuye gradualmente conforme amanece. Particularmente, la concentración de plasma sanguíneo comienza a elevarse en la tarde con umbrales detectables de 5 pg/ml y alcanza su nivel máximo a la media noche o entre 2 a.m. y 3 a.m.; para disminuir de nuevo antes de la hora de despertar (Macchi *et al.*, 2004; Nowak y Zawilska, 1998).

Otra función importante de la MEL es la captación de radicales libres, (Reiter *et al.*, 2007), ya que forma parte de un sistema de defensa antioxidante endógeno de la célula, el cual está encargado de reducir la toxicidad del oxígeno molecular y de

especies reactivas de nitrógeno. Esta propiedad como captador de radicales puede ser de manera directa, que es cuando la molécula de MEL interactúa directamente con las especies reactivas, y de manera indirecta, cuando actúa sobre algunos factores de transcripción para regular los niveles de ARN mensajero y las actividades de otros antioxidantes endógenos del cuerpo, tales como las enzimas que remueven moléculas tóxicas antes del daño celular o que evitan que se formen agentes tóxicos: la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión (GSH) peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GRd) y la catalasa (CAT) (Reiter, 2001).

Otra acción fisiológica ejercida por la MEL es la modulación del citoesqueleto. Se sabe que promueve la reorganización de los microtúbulos mediante el antagonismo de  $Ca^{2+}$ / calmodulina la cual participa de manera importante en la formación de neuritas (Benitez-King *et al.*, 1996) de igual manera, el receptor a melatonina del tipo 1 (Mt1) participa en la formación de neuritas inducida por melatonina (Bordt *et al.*, 2001; Witt-Enderby *et al.*, 2000).

Además, existe evidencia de que esta indolamina estimula la actividad de la proteína cinasa C (PKC), (Anton -tay *et al.*, 1998) en las células de neuroblastoma, con lo cual aumenta dos veces la fosforilación de la vimentina, causando la reorganización de sus filamentos intermedios de una manera similar a la producida por el agonista de la PKC, el 12-13 miristato acetato de forbol (PMA) (Benitez-King *et al.*, 2000).

Existen evidencias de que mediante la utilización de inhibidores específicos de la PKC (bisindolílmaleimida y calfostina C) y de un antagonista específico de la CaM (opobiolina), el mecanismo que subyace a la reorganización de los microfilamentos en anillos corticales y en fibras de tensión se media por la interacción de la hormona con la PKC y la CaM, respectivamente (Benítez-King *et al.*, 1999). Además la MEL disminuye la tasa de fosforilación de la proteína tau (Benítez-King *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2004); disminuye la hiperfosforilación de tau inducida por haloperidol (Benítez-King *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2004), isoprotenerol (Wang y Wang, 2006) y wortmanina (Deng *et al.*, 2005).

Se ha demostrado en las células N1E-115 de neuroblastoma, que el ácido ocaidaico (AO) causa la retracción del citoesqueleto alrededor del núcleo, así como un incremento significativo en la fosforilación de la proteína tau. En este modelo de neurodegeneración, la melatonina previene en un 100% el efecto del AO. La red del citoesqueleto se mantiene en el citoplasma y en las neuritas de las células N1E-115 cultivadas 2 horas con melatonina, previas a la adición de 50 nM de AO (Benítez-King, 2003). Recientemente, se demostró que la incubación durante 6 horas con 100 nM de melatonina en células de neuroblastoma N1E-115 previene la hiperfosforilación de la proteína tau causada por el AO (15 nM -24h-) (Jiménez-Rubio, 2007).

### **7.3. Mecanismos de acción de la melatonina**

Esta hormona participa en muchas de las funciones ya mencionadas (sincronizar los ritmos circadianos, regular la respuesta neuroinmunológica, actuar como un antioxidante y modular la organización del citoesqueleto), actuando a través de receptores de membrana acoplados a proteínas G: los de melatonina MT1 y MT2 (Dubocovich 1995; Reppert *et al.*, 1994; Reppert *et al.*, 1995). Igualmente, se han descrito receptores nucleares de melatonina, los cuales pertenecen a la clase de receptores tipo huérfano (ROR por sus siglas en inglés) de la familia RZR/ROR  $\alpha$  (Reiter *et al.*, 2010; Carlberg y Wiesenberg, 1995; Jetten *et al.*, 2001).

Esta indolamina también actúa sobre las células sin la intervención de ningún receptor, ya que debido a su naturaleza anfifílica, esta indolamina puede cruzar la membrana y actuar directamente por medio de la unión a proteínas intracelulares como la calmodulina (CAM) (Benitez-King, 2006). Generalmente, la acción de captación de radicales libres de la melatonina no involucra la activación de ningún tipo de receptor, excepto para la inducción de la síntesis de algunas enzimas antioxidantes, tales como la  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasa, que implica a los receptores nucleares de la familia RZR/ROR  $\alpha$  (Urata *et al.*, 1999) (Fig. 17).

Las alteraciones en el citoesqueleto, así como los bajos niveles de melatonina observados en las enfermedades neurodegenerativas, apoyan la noción de que estas están asociadas a la deficiencia de melatonina. En vista de que la melatonina combina efectos cronobióticos, antioxidantes, antiinflamatorios y propiedades antifibrilares, se plantea la hipótesis de que los niveles disminuidos de melatonina pueden estar contribuyendo en la patofisiología de la EA (Srinivasan *et al.*, 2006), ya que en la EA existe una severa alteración en el ciclo sueño-vigilia, relacionada con los niveles bajos de la MEL circulante en el plasma, así como una pérdida de la polaridad estructural y la morfología neuronal. Se ha propuesto a la MEL como un coadyuvante potencial en el tratamiento de este tipo de demencias (Jiménez-Rubio *et al.*, 2007).

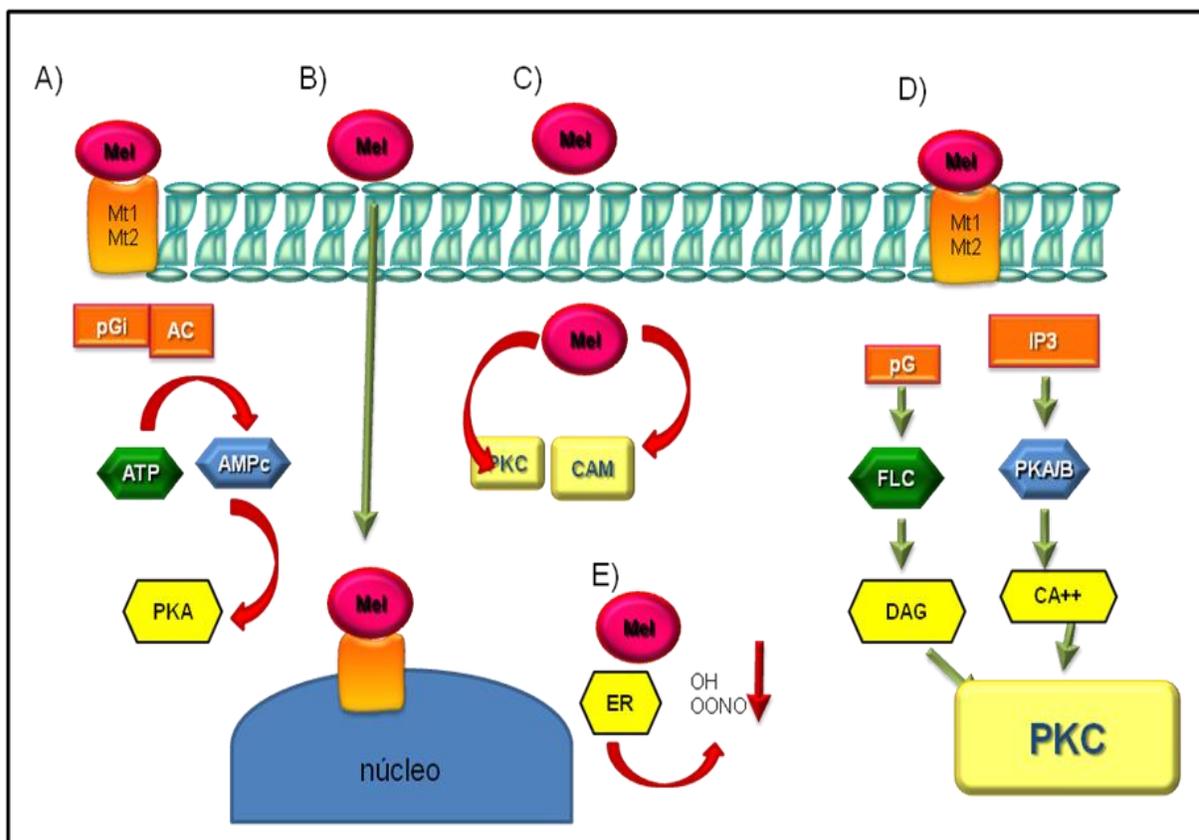


Fig. 17. Mecanismos de acción de la melatonina. A) Interacción de melatonina con receptores de membrana activa la vía de la Adenilato Ciclasa (AC) B) interacción de la melatonina con receptores nucleares C) con proteínas citoplasmáticas como la PKC y la CAM D) interacción de la melatonina con receptores de membrana activa la vía del fosfatidil inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG) y E) la melatonina como captador de radicales libres.

## 7.4. Melatonina y GSK-3 $\beta$

Aunque no existe evidencia de una relación directa entre la melatonina y la actividad de la GSK-3 $\beta$ , es posible que la indolamina pueda regular la actividad de GSK-3 $\beta$  mediante la regulación de otras enzimas. Un estudio demostró que el tratamiento con esta indolamina en ratones con isquemia cerebral conduce a una reducción de dicho daño mediante un incremento en la fosforilación de Akt, que es un regulador de la GSK-3 $\beta$ .

Esto indica que la melatonina puede inhibir la actividad de esta enzima a través de la activación de la vía de la cinasa de fosfatidilinositol 3 (Pi3K)/Akt (Kilic et al 2005). Lo cual propone que la melatonina puede actuar como un modulador de otras enzimas para poder regular la actividad de la GSK-3 $\beta$ . Teniendo en cuenta que la actividad de la GSK-3 $\beta$  puede ser regulada por otras cinasas, no podemos excluir la posible participación de la melatonina en la activación de la PKC y MAPK para la regulación de la GSK-3 $\beta$ .

Aunque el mecanismo de sobre activación de la GSK-3 $\beta$  en la EA no se conoce claramente, la actividad de la GSK-3 $\beta$  puede ser manipulada por medio de la modulación de diferentes vías de señalización, ya que esta enzima es un elemento río abajo en la vía de la cinasa de fosfatidil inositol-3 (PI3) / Akt. Se sabe que la cinasa PI3 estimula la actividad de la Akt, la cual a su vez inhibe a la GSK-3 $\beta$ . Además, se ha demostrado que la fosforilación de la GSK-3 $\beta$  por las isoformas  $\delta$  y  $\theta$  de la PKC (PKC $\delta$  y PKC $\theta$ ) en los residuos de ser 9 reduce su actividad *in vitro* (Goode, 1992).

Se sabe que la inhibición de la PI3K y la PKC promueve la sobre activación de la GSK-3 $\beta$ , la cual suscita la hiperfosforilación de la proteína tau (Li *et al.*, 2006). Se ha observado que la GSK-3 $\beta$  es capaz de fosforilar a tau en los residuos de ser 199-202 y ser 396-404 (Lovestone *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2002; Agarwal-Mawal *et al.*, 2003).

Debido a que la PKC inhibe a la GSK-3 $\beta$ , se ha sugerido también que la activación de la primera tiene un papel neuroprotector. Conforme a estas evidencias, la hiperfosforilación de la tau inducida mediante la actividad de la GSK-3 $\beta$  puede ser inhibida por la MEL al regular otras enzimas que inhiban la actividad de GSK-3 $\beta$ .

## 8. Epitelio olfatorio

El epitelio olfatorio (EO) es una región especializada de revestimiento de la cavidad nasal, es un epitelio pseudoestratificado columnar que se localiza en la cavidad nasal superior, en la zona turbinada media, en el septum y en la pared nasal, que se extiende 150  $\mu\text{m}$  hacia el hueso inferior o cartílago (Vanelli *et al.*, 1995, Meredith, 2001). Se compone de un grupo de células madre multipotenciales (células basales), células sustentaculares (SUS) y neuronas sensoriales olfativas (NSO). Estudios realizados con microscopía óptica y electrónica muestran que el EO está intercalado con parches de epitelio respiratorio (Leopold *et al.*, 2000).

Las células SUS también llamadas de soporte, tienen una forma columnar. El cuerpo celular se expande desde la lámina basal hasta la parte apical del EO. La parte apical de la célula está cubierta con microvellos largos y cortos y el soma está localizado en la zona medial del epitelio. Las células SUS tienen un papel de soporte parecido al que presentan las células de la glía en el cerebro (Coon *et al.*, 1989). Asimismo, estas células detoxifican muchas de las sustancias nocivas presentes en el aire, a las cuales está expuesto el EO. Las SUS también fagocitan NSO muertas y proveen de soporte estructural a las NSO (Carr *et al.*, 1990; Dahl, 1988; Getchell *et al.*, 1984).

El EO es una región en donde se lleva a cabo la formación de nuevas neuronas (neurogénesis) a lo largo de toda la vida (Graziadei y Graziadei, 1979; Calof *et al.*, 2002; Mackay-Sim y Chuah, 2000; Hanh, 2005). Estas nuevas neuronas derivan de las células basales globosas (células *stem*), las cuales producen continuamente las nuevas neuronas sensoriales a través de su división mitótica. Estas células se encuentran en la parte más basal dentro del epitelio nasal.

Las células *stem* del EO sufren una lenta división asimétrica, la cual da como resultado una célula *stem* que permite el mantenimiento de la población de células *stem*, y una célula de amplificación rápida que presenta un destino neuronal (Mackay-Sim y Kittel, 1991) (Fig. 18).

Las NSO muestran una dendrita apical, la cual presenta un nodo de múltiples cilios, que se proyecta hacia la mucosidad que recubre el EO, donde tiene contacto directo sobre las moléculas odoríferas. Basalmente, presentan un axón, que proyecta a través de la placa cribiforme para hacer sinapsis con las células mitrales del bulbo olfatorio. Éstas se comunican por la vía del nervio olfatorio (nervio craneal I) hacia la corteza entorrinal, hacia algunas regiones del cerebro involucradas con las emociones y la memoria como la amígdala y el hipocampo. Varios tipos de interneuronas modulan la actividad de las células mitrales, las cuales incluyen las periglomerulares, las de cepillo y algunas granulares.

Las últimas son interneuronas dopaminérgicas/GABAérgicas que están implicadas en procesos de señalización y modulación neuronal (Trombley y Shepherd, 1993; Brunig *et al.*, 1999).

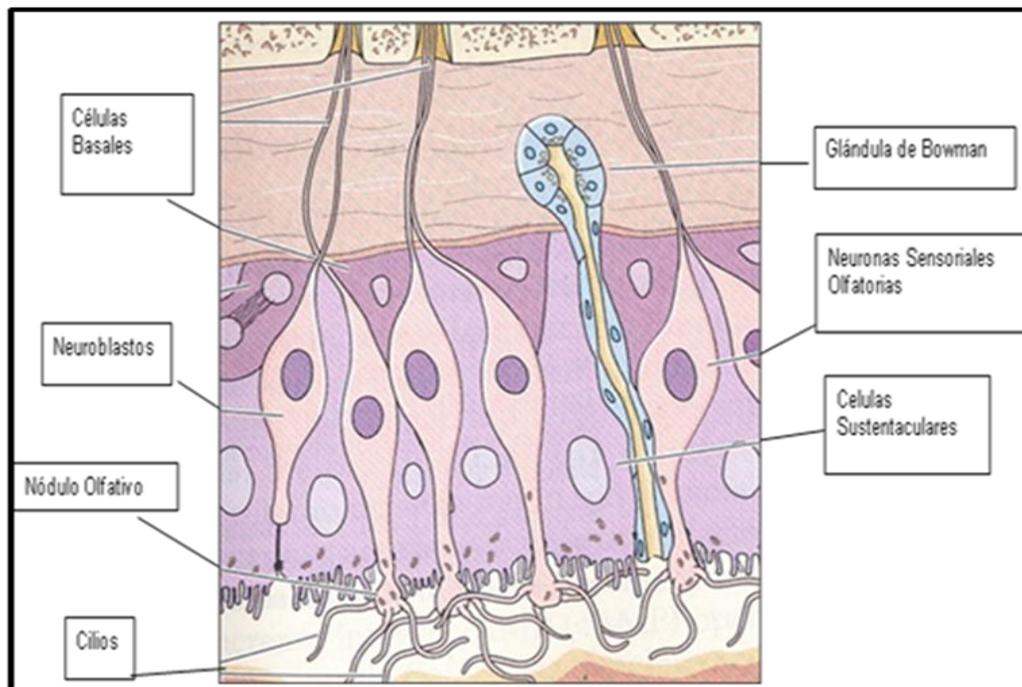


Fig. 18. Ilustración esquemática del Epitelio Olfatorio humano que muestra los diferentes tipos celulares, los cuales constituyen un epitelio pseudoestratificado. El Epitelio Olfatorio contiene neuronas en diferentes etapas de diferenciación: neuronas sensoriales olfatorias ciliadas, neuronas en desarrollo, células basales (globosas, multipotenciales) y células sustentaculares (soporte). Las neuronas sensoriales olfativas desarrollan cilios que se extienden hacia la cavidad nasal, mientras el axón sin mielina forma sinapsis con las células mitrales del bulbo olfatorio. Adaptado de Purves, D. (2001)

## **8.1. Funcionamiento de las neuronas sensoriales olfativas**

Las NSO presentan receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G, que son los responsables de activar el estímulo odorífero. Estos receptores están acoplados a una proteína de unión de nucleótidos de guanina, ( $G_{olf}$ ) que una vez activada, estimula la actividad de la adenilato ciclasa para producir el segundo mensajero monofosfato de adenosina cíclico ( $AMP_c$ , por sus siglas en inglés) (Lowe *et al.*, 1989). Otro mecanismo de acción de algunas moléculas odoríferas también puede activar el monofosfato de guanina cíclico ( $GMP_c$ , por sus siglas en inglés) (Doty, 2001). Además, la evidencia indica que algunos olores también pueden activar a la fosfolipasa C para producir trifosfato de inositol ( $IP_3$ , por sus siglas en inglés), el cual podría estar modulando la vía del  $AMP_c$  a través de la actividad de la fosfoinositol 3 cinasa (Zhainazarov *et al.*, 2001).

## **8.2. Epitelio olfatorio como modelo de investigación en EA.**

La disfunción olfatoria es un acontecimiento común en el envejecimiento, una señal temprana y común en varias enfermedades neurodegenerativas. Aproximadamente el 90% de los pacientes con Alzheimer presenten microsmia o anosmia (Doty, 2003). Se ha observado un deterioro olfativo y cambios neuroanatómicos en las porciones centrales del sistema olfativo en los pacientes diagnosticados con EA, por lo que se realizan ensayos olfativos para auxiliar en su detección (Bacon Moore *et al.*, 1999), ya que se ha observado que dichos pacientes presentan un rendimiento menor en la prueba de identificación de olores (McCaffrey *et al.*, 2000; Rezek, 1987).

Los mecanismos subyacentes a dichas pérdidas aún no son comprendidos; sin embargo, se cree que las bases neuropatológicas de la disfunción olfatoria de EA se deben principalmente a la acumulación de la proteína tau en el bulbo olfatorio y en las cortezas sensoriales olfativos primarios del cerebelo (Attems *et al.*, 2006). En general, se acepta que la neuropatología clásica de la EA ocurre dentro de la corteza entorrinal muy temprano en su desarrollo (Mesholam *et al.*, 1998); asimismo, algunos

estudios indican que existe la presencia de MN dentro de estructuras asociadas al sistema olfatorio, tales como el bulbo olfatorio, el tracto olfatorio medial y el núcleo olfatorio anterior (Kovacs 2004). También se ha encontrado a la proteína tau en un estado de hiperfosforilación en biopsias y autopsias del epitelio olfatorio (EO) y en neuronas olfativas de pacientes con EA (Talamo *et al.*, 1989; Tabaton *et al.*, 1991; Reyes *et al.*, 1993; Yamagishi *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1993; Arnold *et al.*, 1998).

Algunos estudios demuestran alteraciones en las NSO de pacientes con EA. Se ha observado que expresan agregados de la proteína tau en sus axones cuando estos están distroficados (Talamo *et al.*, 1989; Tabaton *et al.*, 1991; Trojanowski *et al.*, 1989), y esto se ha correlacionado con el déficit de olfacción encontrado en los pacientes con EA (Lee *et al.*, 1993).

Ya que las NSO tienen un desarrollo relacionado con el sistema nervioso central. El estudio de estas células puede contribuir al tratamiento o prevención de esta enfermedad. La exposición al medio ambiente de las NSO hace que estas neuronas sean vulnerables a lesiones debido a agresiones provenientes de toxinas, agentes infecciosos y traumatismos.

Sin embargo, a diferencia del sistema nervioso central, las NSO son capaces de ser restituidas después de una lesión. Este proceso de reemplazo comienza con una población de células precursoras multipotenciales, que se someten a sucesivas etapas de diferenciación hasta llegar a la maduración completa. Se sabe que el ciclo de vida de estas células es en promedio de 30 a 120 días (Astic y Saucier, 2001). Las NSO se relacionan con el sistema nervioso central y son accesibles a través de la cavidad nasal, por lo que se pueden conseguir con una mínima invasividad para el estudio de pacientes vivos.

Las investigaciones de los procesos celulares que subyacen a la capacidad regenerativa de los componentes periféricos y centrales del sistema olfativo están dando lugar a nuevos enfoques terapéuticos en el tratamiento de lesiones de la médula espinal (Huang *et al.*, 2003), los accidentes cerebrovasculares (Parents, 2003) y en la corrección o la prevención de las enfermedades neurodegenerativas.

Existen estudios en donde se obtuvieron cultivos de NSO mediante biopsias y autopsias del EO, como son los de Lanza *et al.*, (1994), Feron *et al.*, (1998), Jafek *et al.*, (1997) y Lane *et al.*, (2002), en los que se obtuvieron cultivos celulares y piezas intactas del EO utilizando la microdissección.

Por otra parte, se han utilizado NSO obtenidas de biopsias para estudiar alteraciones en la señalización intracelular en pacientes vivos con diferentes condiciones psiquiátricas, entre las que se encuentran el trastorno bipolar (alteraciones en la señalización del calcio intracelular) (Hahn *et al.*, 2005) y la esquizofrenia (alteraciones en la adhesión y en la proliferación) (Feron *et al.*, 1999).

Se han realizado autopsias y biopsias de EO de pacientes con EA (Wolozin *et al.*, 1993), para establecer, en investigaciones prematuras, descripciones sobre la presencia de neuritas distróficas inmunorreactivas a tau y filamentos helicoidales pareados en la lámina propia adyacente a la capa epitelial en sujetos con EA, pero no en sujetos control (Tabaton *et al.*, 1991). Sin embargo, Arnold *et al.*, (2010) observan agregados de la proteína tau hiperfosforilada tanto en el soma como en neuritas distróficas, en pacientes y en sujetos control, siendo más evidentes en los primeros.

Por su parte, Benitez-King *et al.*, (2011) establecieron un método para la obtención de precursores neuronales obtenidos mediante una exfoliación nasal, desarrollando condiciones de cultivo para producir una población de precursores neuronales con una rápida proliferación. Estas células pueden obtenerse sin daño permanente a la zona donante; por lo tanto, representan una fuente accesible en pacientes vivos. Además, la expansión de éstas en cultivo proporciona una población de células específicas para realizar estudios genéticos y farmacológicos junto con la evaluación de diferentes patologías.

## 9. Planteamiento del problema

Debido a que la etiología, el desarrollo, la evolución y el desenlace de un síndrome demencial pueden ser muy variados, el manejo terapéutico debe ser muy distinto según el caso. Por esto, es de suma importancia un diagnóstico preciso, ya que esto permitiría planear de manera adecuada la atención y cuidado del paciente, lo que preverá sus necesidades. Muchas características que presenta el epitelio olfatorio lo hacen altamente relevante en el entendimiento de la neurodegeneración/regeneración. Primero, al ser vulnerable a la exposición ambiental e infecciosa, el sistema olfatorio tiene la propiedad única del continuo reemplazo de sus neuronas sensoriales bajo condiciones fisiológicas normales y después de daños.

Segundo, las neuronas receptoras que residen en la periferia se relacionan con el desarrollo del sistema nervioso; ya que son accesibles de manera relativamente no invasiva vía biopsia en sujetos vivos, son un modelo óptimo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas. Es primordial que existan más estudios de las funciones celulares dentro del epitelio olfatorio de pacientes con EA para tratar de entender la alteración del metabolismo celular y algunas vías de señalización que estén causando la neuropatología propia de la enfermedad.

## **VI. HIPÓTESIS**

Ya que la GSK-3 $\beta$  participa en la hiperfosforilación de la proteína tau y la melatonina es capaz de disminuir los niveles de fosforilación de tau, entonces la melatonina inhibirá a la GSK-3 $\beta$  y en consecuencia disminuirá la cantidad de tau fosforilada.

## **VII. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el efecto de la melatonina sobre la actividad de la GSK-3 $\beta$ , así como en los niveles de tau fosforilada, en neuronas obtenidas del epitelio olfatorio de pacientes con demencia tipo Alzheimer y de sujetos controles.

## **VIII. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Caracterizar las marañas neurofibrilares en los precursores neuronales obtenidos de pacientes con Alzheimer y en voluntarios por medio de microscopia de fluorescencia.
- Obtención del patrón de isoformas de la proteína tau por electroforesis bidimensional (IEF/SDS page) y por inmunodetección
- Determinar los niveles de tau fosforilada en los precursores neuronales obtenidos de pacientes con demencia y en voluntarios por medio de ensayos tipo ELISA.
- Determinar los niveles de GSK-3 $\beta$  total y el estado de inactivación (fosforilación en la ser-9) de la enzima por medio de ensayos tipo ELISA
- Evaluar el efecto de melatonina sobre los niveles de tau fosforilada
- Evaluar el efecto de la melatonina sobre la inactivación de la GSK-3 $\beta$  y la actividad de la GSK-3 $\beta$  en los precursores neuronales obtenidos de pacientes con demencia y en voluntarios sanos con la técnica de ELISA.

## IX. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

El medio de cultivo y el suero fetal bovino se adquirieron de la compañía *Gibco BRL* (Grand Island, NY, USA). El antibiótico utilizado para complementar el medio de cultivo se compró en la empresa *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA). El anticuerpo monoclonal hecho en ratón (anti-tau-1), que reconoce el epítotope 189-207 cuando las serinas 199 y 202 no están fosforiladas, se obtuvo de *Millipore Corporation*, (Billerica, MA, USA). El anticuerpo policlonal hecho en conejo (MAPT); el cual reconoce a la proteína tau en las serinas 396-404 cuando éstas están fosforiladas se adquirió de *Lifespan Biosciences Inc.* (Seattle, WA, USA). El anticuerpo (PAb) que reconoce a la GSK-3 $\beta$  cuando la serina 9 está fosforilada (Phospho-GSK-3 $\alpha/\beta$  (Ser21/9)) se compró en *Cell Signaling Technology Inc.* (Beverly, MA, USA). El anticuerpo hecho en conejo GSK-3 $\beta$  (H-76) que reconoce los aminoácidos 345-420 del C-terminal y el anticuerpo policlonal hecho en cabra tau c-17 que reconoce los 17 aminoácidos del C-terminal se adquirieron por *Santa Cruz Biotechnology, inc* (Delaware Avenue Santa Cruz, CA, USA). El anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína y el acoplado a una peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés) se consiguieron en *Jackson Immunoresearch* (West Grove, PA, USA). La fosfatasa alcalina de mucosa intestinal bovina, la proteína tau recombinante tau-441 y el sustrato o-fenilendiamida (OPD por sus siglas en inglés) fueron obtenidas de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA). El conjugado HRP-estreptavidina se adquirió en *Jackson Inmuno Research*. El resto de los reactivos se compró en *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA).

### 2. Sujetos

Los participantes fueron reclutados en la clínica de Geriatria del Instituto Nacional de Psiquiatria (INPRFM). Los diagnósticos fueron llevados a cabo por psiquiatras especialistas en demencias tipo Alzheimer de acuerdo al criterio del *Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales IV* (1994) y los criterios definidos

por el NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association). Para evaluar la demencia se utilizó la prueba de detección *Mini Mental State Examination* (MMSE), la cual mide la orientación, el registro de la información, la atención, el cálculo, el recuerdo, el lenguaje y la construcción. Para todos los participantes se obtuvo un consentimiento informado por escrito antes de su participación en el estudio, previamente aprobado por el comité de ética de la institución. Los datos sociodemográficos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla. 2. Datos socio demográficos de los donadores de epitelio olfatorio

Sujeto	Edad (años)	Género m/f	Diagnóstico	Tiempo de enfermedad (años)	Tratamiento actual	Comorbilidad
<b>Demencias n=7</b>						
P1	69	M	EA	2	Escitalopram	Diabetes-Hipertensión
P2	62	F	EA II	5	Citalopram-seroquel	
P3	73	F	Demencia mixta	3	Mirtazapina-remeron-fidelipina-med.prot 3	Hipertensión
P4	66	F	EA	2	Citalopram-hidialclozida	Hipotiroidismo
P5	72	F	EA	3	Citalopram-med-protocolo	Diabetes-Hipertensión
P6	53	F	EA	2	Metformina-metropolol-carbamazepina	
P7	72	F	Demencia semántica	1	Sertralina	
<b>Controles n=10</b>						
C1	60	F	ND	0	Insulina	Diabetes
C2	63	M	ND	0	Ninguno	
C3	60	F	ND	0	Ninguno	
C4	81	F	ND	0	Almetec concor melatonina	Hipertensión
C5	60	M	ND	0		
C6	61	F	ND	0	Mexformina/novotiral /pravastatina	Alergias
C7	65	F	ND	0	Ninguno	
C8	55	F	ND	0	Rivotril/paroxetina	
C9	68	F	ND	0	Difenol/omeprazol/libertrin	Hipertensión Enf. Cardiovasculares
C10	60	f	ND	0	Glucosamina/ complejo b	

M indica masculino, F, femenino, EA Enfermedad de Alzheimer, P paciente, C control, ND no demenciado

### 3. Obtención de la muestra

Los precursores neuronales se obtuvieron por medio de una exfoliación de la cavidad nasal de los sujetos voluntarios sanos y de los pacientes reclutados en la clínica de Psicogeriatría del INPRFM. Las células se rasparon por medio de un cepillo especial de 2.4 cm de longitud y 3 mm de diámetro, mediante movimientos circulares para poder exfoliar las células de la pared lateral y el tabique de la cavidad nasal.

Las células que se adhirieron al cepillo se depositaron en un tubo *ependorf* en el que se disgregaron mecánicamente. Posteriormente, las células disociadas se sembraron en frascos de 25 cm<sup>2</sup> (250,000 cel/frasco) (FIG.19).

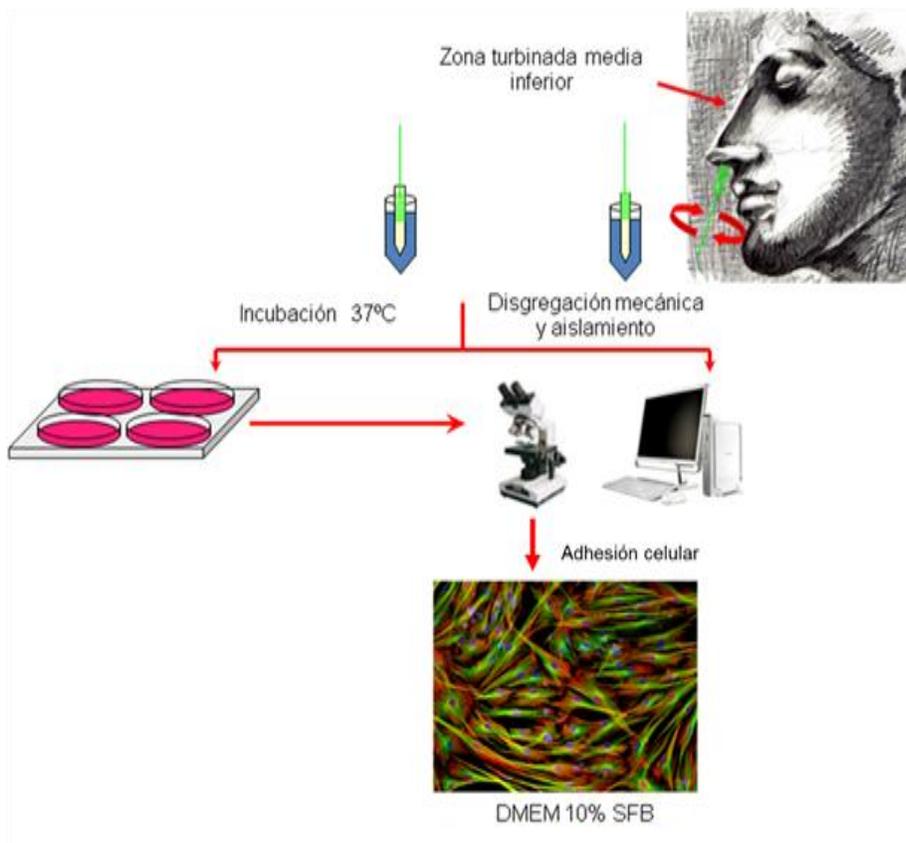


Fig. 19. Dibujo esquemático del procesamiento de exfoliación. La imagen muestra un dibujo esquemático del procedimiento de exfoliación. Las células se obtuvieron de la región anterior de la zona turbinada lateral del septum y la pared lateral de la cavidad nasal. Después de la disociación mecánica, las células fueron cultivadas en DMEM 10% de Suero fetal bovino.

#### **4. Cultivo celular**

Las células se cultivaron en *Dulbecco's modified Eagle* (DMEM-F12) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 4 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de estreptomicina y 100 IU/ml de penicilina. Este medio promueve la proliferación y la selección a un estirpe neuronal (Benítez-King *et al.*, 2011).

Las células se incubaron a 37°C en una atmosfera húmeda de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 15 días de incubación, las células se adhirieron y se expandieron en el fondo de la botella de cultivo hasta alcanzar una confluencia del 80% al treintavo día de incubación. Inmediatamente después, fueron desprendidas del sustrato con una solución de tripsina al 0.25% y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0.03% en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (NaCl 0.136M, KCl 2.6 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76 M pH 7.4) durante 3 minutos y posteriormente se resembraron en 3 botellas nuevas.

#### **5. Crio-preservación**

Los precursores neuronales obtenidos por exfoliación se cultivaron hasta el pasaje 5. En cada uno de ellos, las células se crio-preservaron de acuerdo al método descrito por Di Benetto *et al.* (1989) y se almacenaron en el banco de células del departamento de Neurofarmacología del INPRFM.

Una vez que se alcanzó el 80% de confluencia dentro de las botellas de 25 cm<sup>2</sup>, se retiró el medio de cultivo del frasco y las células se desprendieron de la superficie de la botella con una solución de tripsina al 0.25%, con EDTA al 0.03% en PBS durante 3 minutos. Posteriormente, se adicionaron 2 ml de medio DMEM-F12 y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2 ml de medio DMEM con 20% de SFB y 7% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se distribuyeron en 2 crio-viales. A continuación se congelaron a -20°C. Algunas muestras se ingresaron en contenedores de nitrógeno líquido para formar parte del banco celular.

## 6. Inmunofluorescencia de doble marcaje

Las células almacenadas en el banco del departamento de Neurofarmacología del INPRFM se descongelaron y se cultivaron en botellas *Falcon* de 25 cm<sup>2</sup> (800,000 células/botella). Cuando los cultivos alcanzaron una confluencia del 80%, los precursores neuronales se desprendieron de la superficie de la botella con una solución de EDTA al 0.03% con tripsina al 0.25% en PBS. Después se sembraron a una densidad de 10,000 células/cm<sup>2</sup> sobre cubreobjetos de vidrio redondos de 1.2 cm de diámetro y se cultivaron por cuatro días.

Al finalizar el tiempo de incubación, los precursores neuronales se fijaron por 15 minutos con para-formaldehído al 4% diluido en una solución amortiguadora de citoesqueleto, la cual está constituida por: NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 mM MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM EGTA 2 mM, glucosa 50 mM y 5 mM (pH 6.1). Posteriormente, se permeabilizaron con una solución de tritón X-100 al 0.1% en PBS durante 15 minutos. Los sitios inespecíficos se bloquearon con una solución de albúmina al 1% en tritón al 0.1% diluido en PBS durante 30 minutos.

Para estudiar la presencia de las marañas neurofibrilares en los cultivos de los precursores neuronales, las células fijadas y permeabilizadas se incubaron durante toda la noche a 37 °C con una fosfatasa alcalina de mucosa intestinal de bovino, (60u/ml) diluida en una solución amortiguadora de incubación, conformada por: Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), EGTA 0.1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (1 mg/ml), aprotinina (10 µg/ml), leupeptina (20 µg/ml) y pepstatina (20 µg/ml); con el fin de lograr la remoción de los grupos fosfato de las proteínas y obtener una mayor inmunodetección del anticuerpo tau-1 (Papasozomenos, 1989). Al finalizar el tiempo de incubación, los precursores neuronales se incubaron durante toda la noche a 4 °C con un anticuerpo primario anti-tau-1, el cual reconoce a la proteína tau en el epítipo 189-207 cuando las serinas 199 y 202 no están fosforiladas. A continuación se adicionó un segundo anticuerpo igGs hecho en cabra anti-ratón acoplado a fluoresceína durante 2h a temperatura ambiente.

Los microfilamentos de actina se tiñeron con faloidina rodaminada 40 nM durante 40 minutos y los núcleos se tiñeron con 4, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 20 nM durante 5 minutos. Finalmente, las preparaciones se montaron sobre cubreobjetos en 20µl de medio de montaje *PVA/DABCO*.

Las células teñidas se observaron con un objetivo de 60X en un microscopio invertido NIKON de epifluorescencia, que fueron fotografiadas con una videocámara digital NIKON OS-2 Mu. Estas imágenes se procesaron con el software Nis-Elements. AR 3.0 de Nikon para la posterior cuantificación de las poblaciones celulares.

Se contaron las células que presentaron marañas en 5 campos escogidos al azar por duplicado; el número total de células por campo se determinó mediante la tinción con DAPI. El número absoluto se normalizó considerando a la población total como el 100%, que posteriormente se sometió a un análisis de histogramas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM valores).

## **7. Obtención de los extractos de proteína**

Las células almacenadas en el banco del departamento de Neurofarmacología del INPRFM se descongelaron y se cultivaron en botellas *Falcon* de 25 cm<sup>2</sup> (800,000 células/botella). Cuando alcanzaron una confluencia del 80%, las células se rasparon en presencia de 300µl/caja de solución amortiguadora de lisis (RIPA), que se constituye por deoxicolato de Na 0.25%, EDTA 5 mM, NP40 1%, PMSF 2mM, aprotinina, leupeptina 35 µg/ml y pepstatina 35 µg/ml, triton x 100 al 1%, Tris HCl 50 mM, ortovanadato de Na 0.2 mM.

Posterior al raspado, las células se colocaron en tubos *ependorf* para lisarlas con un ultrasonicador de *cole-parmer 40* durante 30 segundos. A continuación se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos. La pastilla se desechó y se utilizó solo el sobrenadante. Posteriormente, se determinó la concentración de proteína con el método de Lowry (1971). Los sobrenadantes se conservaron a 70 °C hasta su utilización.

## **8. Separación de proteínas por electroforesis unidimensional**

Este procedimiento se realizó para comprobar la especificidad de los anticuerpos que reconocen a la proteína tau y a la enzima GSK-3 $\beta$ . Las proteínas de los homogenizados se solubilizaron en una solución amortiguadora de 0.5 M de Tris HCl pH 6.8 10% glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol al 0.5%, (por cada 950  $\mu$ l de buffer se adicionaron 50 $\mu$ l de azul de beta-mercaptoetanol). Posteriormente, se calentaron las muestras a 95°C durante 4 minutos e inmediatamente después se procedió a separarlas en geles de poliacrilamida al 10%. Las muestras se corrieron durante 40 minutos, con una solución amortiguadora de Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS a 200V, 120 $\mu$ A y potencia de 24W. Se utilizaron los marcadores de peso molecular *Precision Plus Protein Prestained Standards (Bio-Rad)*.

## **9. Inmunodetección de la proteína tau y de la enzima GSK-3 $\beta$**

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con una cámara de transferencia *mini-transblot Bio-Rad* por medio de solución amortiguadora de transferencia, constituida por: 25 mM de Tris-HCl, 190 mM de glicina y 20% de metanol bajo las siguientes condiciones: 100 V, 350  $\mu$ A y potencia 50 W de acuerdo al método de Towbin (Towbin *et al.*, 1979). Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con TBS (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl) y leche al 3% durante 1 hora. Seguidamente, las membranas se incubaron con los anticuerpos que reconoce a la GSK-3 $\beta$ . El anticuerpo (GSK-3 $\beta$  (H-76): sc-9166) el cual reconoce los aminoácidos 345-420 del extremo C-terminal y el anticuerpo GSK-3 $\beta$  (ser9) el cual reconoce a la enzima solo cuando se encuentra fosforilada la serina 9, se utilizaron a una dilución 1/100.

El anticuerpo tau-1, que reconoce a la proteína tau en el epítotope 189-207 cuando las serinas 199 y 202 no están fosforiladas, se incubó a una concentración de 10  $\mu$ g/ml. Debido a que el anticuerpo tau-1 solo reconoce a la proteína cuando esta se encuentra en un estado defosforilado, se removieron los grupos fosfato de las proteínas mediante la incubación con una fosfatasa alcalina de mucosa intestinal bovina (60u/ml) (Papazosomenos 1989), lo que da como resultado el reconocimiento

de la cantidad total de tau. Todos los anticuerpos se incubaron durante toda la noche a 8°C. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a HRP a una dilución 1/2500 y se incubó durante 1 1/2 hrs.

Finalmente, la reacción de quimioluminiscencia se realizó con un estuche comercial, *Western Blotting Luminol Reagent*, (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); a continuación, las membranas fueron colocadas en un estuche de autoradiografía y se revelaron durante 1 minuto. Las películas (autoradiogramas) se capturaron con un escáner plano de *Bio Rad* (GS-800 calibrated Densitometer) y se analizaron los resultados con el “*Software Quantitive ONE*”.

## **10. Separación electroforética en geles de 2D (isoelectroenfoque/ SDS PAGE)**

El proceso se siguió de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante (*2-D Electrophoresis Principles and Methods*) de Bio-rad.

Como paso inicial, se llevó a cabo la preparación de las muestras con la ayuda del *kit Readyprep 2D de Bio-Rad*. Se colocaron 100 µl del homogenizado de proteína en un *tubo eppendorf* con 300 µl del agente precipitante 1 (*Readyprep Bio-Rad*). La mezcla se agitó y se incubó durante 15 minutos a 4°C; al término de este lapso se colocaron 300 µl de la solución precipitante 2 (*Readyprep Bio-Rad*) y se agitó con un mezclador tipo *vortex*. A continuación, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Se colocaron 40 µl de la solución de lavado 1 (*Readyprep Bio-Rad*) y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos. Ya desechado el sobrenadante se colocaron 25µl de agua ultrapura (*Readyprep Bio-Rad*) y se agitó durante 20 segundos. Posteriormente, se agregó 1 ml de la solución de lavado 2 (*Readyprep Bio-Rad*), pre-enfriada a -20°C y 5 µl del aditivo de lavado 2, se mezclaron con un agitador tipo *vortex* durante 1 minuto y se incubó a -20°C durante 30 minutos, removiendo cada 10 minutos. Después del periodo de incubación, la muestra se centrifugó al máximo de velocidad por 5 minutos, se removió el sobrenadante y se recuperó la pastilla.

Para la separación de las proteínas por punto isoeléctrico (isoelectroenfoque). Una vez preparadas las muestras de proteína, se procedió a realizar la rehidratación de las tiras IPG de 7 cm de longitud (ReadyStrip Bio-rad). La pastilla de proteína precipitada se resuspendió en 130  $\mu$ l de una solución amortiguadora de rehidratación, la cual está constituida por: 9.8 M Urea 4% de CHAPS 50 mM, Ditiotreitól (DTT) 2 mM, tributilfosfina 0.02% Bio-lytes, 0.001 azul de bromofenol; luego, se agitó para lograr una resuspensión completa. Posteriormente, para eliminar los residuos no disueltos, se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos. Ya rehidratadas las muestras, se colocaron 125  $\mu$ l a lo largo de uno de los carriles de la base de enfoque y se colocó cuidadosamente la tira IPG de gradiente inmobilizado de pH de 7 cm sobre la muestra esparcida en el carril con la cara del gel hacia abajo (en contacto con la muestra). Finalmente, se puso, sobre las tiras, 1ml de aceite mineral sobre cada carril para evitar la evaporación de la muestra y se incubaron durante 14 horas a temperatura ambiente (TA).

Las muestras se corrieron en un equipo *Protean Cell IEF (Bio-Rad)* en las siguientes condiciones: 1) pendientes de voltaje lento, 2) rehidratación activa sin pausa durante 16 horas. (Tabla 3)

Condiciones de corrimiento	Voltaje (V/Hr)	Tiempo (min)	Pendiente de voltaje
Paso 1	250	20	Lineal
Paso 2	4,000	120	Lineal
Paso 3	4,000	10,000	Rápido

Tabla. 3. Condiciones de corrimiento para la separación por punto isoeléctrico de las proteínas del homogenizado de los precursores neuronales.

Ya separadas las muestras por punto isoeléctrico, se colocaron en una solución amortiguadora de equilibrio que se constituye por 6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl, 20% glicerol, 130 mM DTT, durante 10 minutos con agitación. Posteriormente se adicionó la solución de equilibrio (6 M urea SDS 0.375 M tris-Hcl 20% glicerol 135 mM DTT) durante 10 minutos en agitación constante.

Posterior al equilibrio, las tiras se colocaron en la cámara de electroforesis y se procedió a separarlas por peso molecular en geles de poliacrilamida al 10% (Ver apartado H). Las muestras se corrieron durante 40 min a 200 V 120  $\mu$ A y potencia 24 W. Se utilizaron marcadores de peso molecular *Precision Plus Protein Prestained Standards (Bio-Rad)*.

## **11. Inmunodetección de las isoformas de la proteína tau**

Las proteínas separadas por peso molecular y punto isoelectrico se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa como se describió anteriormente (apartado I). Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con TBS (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl) y leche al 3% durante 1 hora.

Posteriormente, dichas membranas se incubaron con el anticuerpo anti-tau c17 a una dilución de 1:100 durante toda la noche a 8°C. Se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a HRP a una dilución 1/2500 y se incubó durante 1:30 h. Seguidamente, la reacción de quimioluminiscencia se realizó con un estuche comercial, (*Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology, Inc.*). Las membranas ya con el luminol se colocaron en un estuche de autoradiografía y se revelaron durante 1 minuto. Las películas (fluorografías) se capturaron con un escáner plano de *Bio Rad (GS-800 Calibrated Densitometer)* y se analizaron los resultados con el *Software Quantitive ONE*.

## **12. Determinación de la cantidad relativa de tau y GSK-3 $\beta$ por el método de ELISA**

La proteína se adhirió sobre placas de poliestireno de 96 pozos (NUNC-Immuno module). Se aplicaron 20  $\mu$ g de proteína del homogenizado de los precursores neuronales en 100  $\mu$ l de solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M, constituida por Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> 0.03 M y NaHCO<sub>3</sub> 0.07 M (pH 9.6), durante toda la noche a 8°C. Se bloquearon los sitios inespecíficos, agregando 200  $\mu$ l de solución de bloqueo (PBS + 1% BSA) durante toda la noche también a 8°C. Para la inmunodetección de la proteína tau se utilizaron los anticuerpos MAPT el cual reconoce a la proteína tau

cuando esta fosforilada en las serinas 396-404 y el anticuerpo tau-1, que reconoce a la proteína tau en el epítotope 189-207 cuando las serinas 199 y 202 no están fosforiladas. Ambos anticuerpos se incubaron a una concentración de 1 µg/ml en solución de bloqueo durante toda la noche a 8 °C con agitación constante.

En otros experimentos, con el fin de lograr la inmunodetección de la proteína tau en su totalidad, ya que el anticuerpo primario anti-ratón (tau-1) solo reconoce a la proteína tau en el epítotope 189-207 cuando las serinas 199 y 202 no están fosforiladas, las muestras, una vez adheridas, se incubaron con una fosfatasa alcalina de mucosa intestinal bovina, (60 u/ml) durante 5 horas a 37°C, esto para poder lograr la remoción de los grupos fosfato de las proteínas y obtener una mayor inmunodetección del anticuerpo tau-1 (Papasozomenos 1989). A continuación, se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución de bloqueo (PBS+ 1% BSA) durante toda la noche a 8°C con agitación constante. Al finalizar el bloqueo, las muestras se incubaron con el anticuerpo anti-ratón tau-1 (2 µg/ml) toda la noche a 8°C con agitación constante.

Posteriormente, los pozos se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBS- *Tween* (0.1%) y se agregaron los anticuerpos secundarios biotinilados correspondientes (biotina-anti IgG 100 µl) a una dilución de 1:10,000 y se incubaron 1h a temperatura ambiente (TA). Las muestras se lavaron 3 veces durante 5 minutos PBS- *Tween* (0.1%). A continuación, para formar el complejo necesario en las tinciones de inmunoperoxidasas, se colocó una solución de un conjugado de estreptavidina-HRP en una solución de bloqueo a una dilución de 1: 10,000 y se incubaron 30 minutos a TA. Por último, se revelaron colocando 100 µl del sustrato o-fenilendiamida (OPD) durante 30 minutos a TA para obtener una coloración amarilla. Se detuvo la reacción agregando 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 N).

Las muestras se examinaron en un lector de microplacas Benchmark Biorad a 490 nm. En cada ensayo se incluyó una placa con una serie de diluciones estándar de la proteína tau humana recombinante (tau441 SIGMA) (5-100 pg) (4 repeticiones por dilución).

### **13. Cuantificación de la proteína tau y la enzima GSK-3 $\beta$ en los cultivos tratados con melatonina**

Las células se incubaron en las condiciones previamente mencionadas (apartado D). Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%, los precursores neuronales se cultivaron con 4 diferentes concentraciones de melatonina durante 6 horas.

Se preparó una solución de melatonina concentrada  $1 \times 10^{-2} \text{M}$  disuelta en etanol y se aforó con medio DMEM; a partir de esta solución, se hicieron diluciones para obtener concentraciones de  $10^{-5} \text{M}$ ,  $10^{-7} \text{M}$ ,  $10^{-9} \text{M}$  y  $10^{-11} \text{M}$ . Una vez obtenidas las concentraciones correspondientes, las células se incubaron durante 6 horas en una atmósfera húmeda de 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$ . Al finalizar la incubación, se obtuvieron homogenizados (apartado G). Finalmente se determinó la cantidad de tau y los niveles de la enzima GSK-3 $\beta$  por el método de ELISA (apartado L).

### **14. Determinación de la actividad de la GSK-3 $\beta$ Incubación de melatonina y LiCl en cultivo celular**

Para la determinación de la actividad enzimática, cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%, en 8 días, los precursores neuronales se incubaron con vehículo (etanol), melatonina  $10^{-7} \text{M}$  (ver apartado M) cloruro de litio (LiCl) (20mM) que es un inhibidor específico de la GSK-3 $\beta$  y cloruro de litio + melatonina durante 6 horas en atmósfera húmeda de 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$ .

Al finalizar la incubación, las células se rasparon en presencia de 300  $\mu\text{l}$ /caja de solución amortiguadora de lisis la cual está constituido por: 25 mM Tris-HCl, 3 mM (EDTA), 3 mM (EGTA), 50 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 0.27 M Sacarosa, 100 nM ácido ocaídoico, 5 mM pirofosfato de sodio, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, inhibidores de proteasas (aprotinina, leupeptina 35  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y pepstatina 35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) pH 7.4.

Se determinó la actividad de GSK-3 $\beta$  utilizando homogenizados como fuente de la cinasa (ver apartado N.1.). El ensayo para medir actividad de GSK-3 $\beta$  se basa en la capacidad para incorporar [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato radiactivo a partir de [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP a los sustratos endógenos presentes en los homogenizados totales.

La actividad de la GSK-3 $\beta$  se determinó utilizando 5 $\mu$ g de proteína del homogenizado como fuente de enzima. Se realizaron mezclas de reacción utilizando una solución amortiguadora constituida por 30 mM Tris, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM EGTA, y 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 20  $\mu$ M ATP y 25  $\mu$ Cu/ml  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (300 Ci/mMol) como donador de grupos fosfato en un volumen de total 25  $\mu$ l. La reacción se inició por la adición de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP. Después de 30 minutos de incubación se paró la reacción con ácido fosfórico 300 mM, se tomaron alícuotas de 23  $\mu$ l y se aplicaron en papel de fosfocelulosa. Se dejaron secar las muestras y se lavaron durante 10 minutos 3 veces con ácido fosfórico a 0.075M.

A continuación, los papeles de fosfocelulosa se dejaron secar y fueron puestos en frascos, a los que se adicionó 5 ml de líquido de centelleo *Sigma Fluor*. Finalmente se midió la incorporación de <sup>32</sup>P en el homogenizado adsorbido en el papel de fosfocelulosa mediante un contador de centelleo líquido Beckman Coulter LS6500 (Witt y Roskoski 1975).

## 15. Análisis estadístico

Los datos de la determinación del número de precursores neuronales con Marañas Neurofibrilares, la determinación de los niveles de GSK-3 $\beta$  y los datos de la actividad de la GSK-3 $\beta$  fueron analizados por la prueba Kruskal-Wallis ANOVA no paramétrica. Los datos de la determinación de los niveles de tau fosforilada y los datos del efecto de la melatonina sobre la fosforilación de tau y GSK-3 $\beta$  se analizaron mediante la prueba t de Student (para datos independientes). Las comparaciones se realizaron con respecto al grupo control y/o vehículo respectivamente. Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SEM P <0.05 se consideró como significativa

## X. RESULTADOS

### 1. Caracterización de las Marañas Neurofibrilares

Debido a que la formación de las Marañas Neurofibrilares (MN) (agregados intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada) es uno de los principales marcadores histopatológicos de la EA, estas se caracterizaron en los precursores neuronales obtenidos mediante exfoliación nasal de pacientes con EAI y II, así como de pacientes con otras demencias y de sujetos control sanos. Se observó la proteína tau fosforilada en el epítotope ser 199-202, que es un epítotope fosforilado en las MN (Lovestone y Reynolds, 1997). Los precursores neuronales de los sujetos control mostraron acumulaciones pequeñas y difusas de tau. La inmunoreactividad al anticuerpo tau-1 apareció de manera punteada, con una distribución homogénea tanto en el soma como dentro de las neuritas. Por su parte, en las células de los pacientes, la inmunoreactividad al anticuerpo se observó como acumulaciones grandes, densas y empaquetadas de la proteína tau. Estas inclusiones y/o agregados se tiñeron con mayor intensidad y fueron de mayor tamaño en las células de los pacientes que en las de los sujetos control. También son más frecuentes y abundantes en sujetos con EA que en ancianos normales (Fig.20).

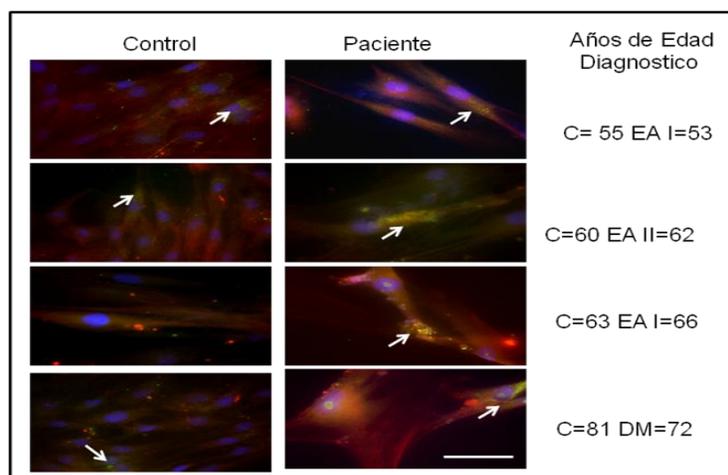


Fig. 20. Caracterización de las Marañas Neurofibrilares en los precursores neuronales. Las células de los pacientes con diferentes tipos de demencias fueron descongeladas y sembradas en cajas Petri. Después de 7 días en cultivo, se fijaron y se procesaron por la técnica de inmunofluorescencia (ver apartado IX. F.). La inmunoreactividad al anticuerpo tau-1 se observa en color verde. Los filamentos de actina fueron teñidos con faloidina rodamina (rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul). Las flechas indican la presencia de las MN. C= control; EA I= Enfermedad de Alzheimer etapa I; EA II= Enfermedad de Alzheimer etapa II DM= Demencia Mixta.

La figura 21 muestra el porcentaje del número de MN encontradas en los precursores neuronales. Se comparó el porcentaje de células con marañas presentes en sujetos control de diferentes edades (55, 60, 63 y 81 años) y en pacientes con EA (53, 62, 66, 72 años). Se encontró que existe un incremento de células afectadas conforme a la edad de los sujetos. El anciano de 81 años presentó un incremento del 181%, 300% y del 80% en comparación con los sujetos control de 55, 60 y 63 años. Asimismo el individuo de 72 años presentó un aumento del 44% y 52% con respecto de los pacientes de 53 y 62 años. Al comparar los sujetos control con los pacientes que tenían edad semejante, se observó un mayor porcentaje de células con marañas en los pacientes con EA etapa I (EAI) de 53 años con respecto del sujeto control de 55; lo que marcó una diferencia del 70%. Se encontró una diferencia significativa en el número de células con marañas en el paciente diagnosticado con EA etapa II (EAI) con respecto del sujeto control de edad semejante: este incremento fue del 300%.

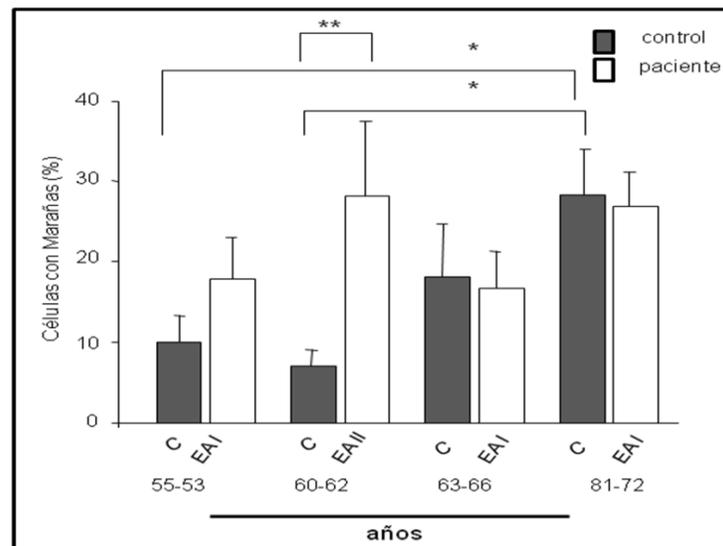


Fig. 21. Determinación del número de precursores neuronales con Marañas Neurofibrilares. Las células del epitelio olfatorio se cultivaron por 4 días. Posteriormente, se fijaron y tiñeron con el anticuerpo Tau-1. Las células que presentaron marañas se contaron en 5 campos escogidos al azar por duplicado. El número total de células por campo se determinó con la tinción de los núcleos por DAPI. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar y son el porcentaje del número de células con marañas determinadas en 4 sujetos control y en 4 pacientes (n = 4). El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control (\*).  $p < 0.049$  (\*\*)  $p < 0.012$ . (prueba de ANOVA). C= control; EA I= Enfermedad de Alzheimer etapa I; EA II= Enfermedad de Alzheimer etapa II.

## 2. Caracterización del patrón de isoformas de tau expresada en los precursores neuronales

Debido a que la proteína tau hiperfosforilada es el principal componente de las MN, nos propusimos estudiar los patrones de las diferentes isoformas fosforiladas expresadas en las células obtenidas de los exfoliados nasales de los pacientes con EA. La figura 22 muestra el patrón de proteínas separadas por electroforesis en 2D teñidas con azul de Coomassie. Se muestra la comparación entre 2 pacientes con EA y 2 sujetos control del mismo género y edad semejante. En todos los casos se hallaron 8 manchas que se encuentran entre los pesos moleculares de 52kDa y 75kDa y los pH de 5 a 7 (cuadros rojos), los cuales concuerdan con las áreas dentro del punto isoeléctrico y el peso molecular que presentan las 6 diferentes isoformas de la proteína tau (Buee et al., 2000). Las manchas obtenidas tuvieron un peso molecular y un pI aproximado de **1)** 64 kDa, pI 5.3; **2)** 58 kDa, pI 5.4; **3)** 62 kDa, pI 5.8; **4)** 76 kDa, pI 5.8; **5)** 68 kDa, pI 5.8; **6)** 70 kDa, pI 6.0 **7)** 70 kDa, pI 6.3 **8)** 62 kDa, pI 6.3. Las manchas de proteínas se tiñeron de manera más marcada, además de observarse de mayor tamaño en los gels de los pacientes comparadas con las de los sujetos control con edad semejante y mismo género (Fig. 22 A y B).

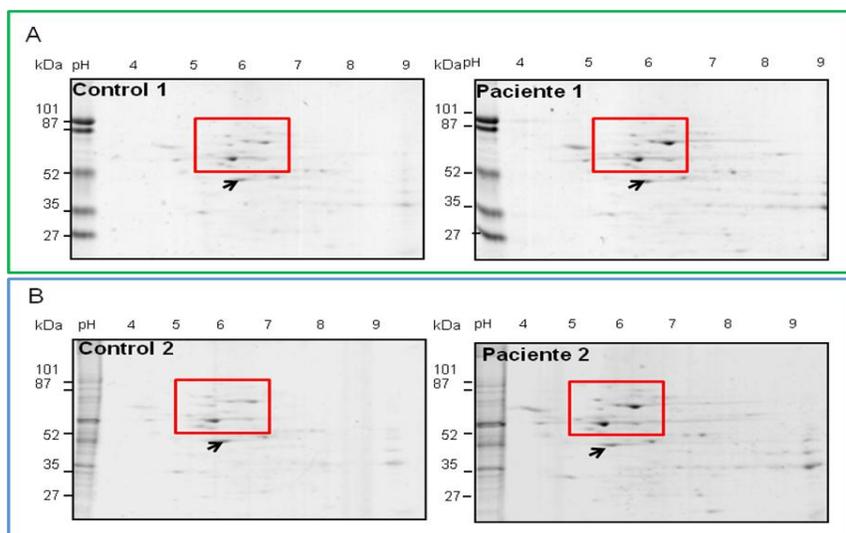


Fig. 22. Caracterización del patrón de proteínas de los precursores neuronales separadas por electroforesis bidimensional. Gels de 2D (isoelectroenfoque/SDSPAGE) teñidos con azul de Coomassie de dos control y de dos pacientes con EA. A: patrón de proteínas de sujeto control 1 y paciente 1 B: patrón de proteínas control 2 paciente 2. Los cuadros muestran las manchas encontradas dentro de los pesos moleculares y los puntos isoeléctricos que presenta tau. Las flechas muestran la mancha de actina (control de carga).

Para el reconocimiento de las isoformas de la proteína tau, se realizó una inmunodetección con el anticuerpo tau C-17, el cual detecta a la proteína en los 17 aminoácidos del dominio C-terminal, que se encuentra conservada en las 6 isoformas.

La figura 23 muestra la comparación del patrón de isoformas de la proteína tau entre un sujeto control y un paciente con EA; en el paciente se halló una mayor cantidad de isoformas en comparación con los del sujeto control, que presentó 3 isoformas con pesos moleculares y pI de **1:** 68kDa y pI de 5.8; **2:** 70kDa y pI 6.1; **3:** 68kDa y pI 6.2, mientras que en el paciente se encontraron 5 con un peso molecular y un pI aproximado de **1:** 68 kDa y un pI 5.8; **2:** 70kDa y pI de 6.0; **3:** 70kDa y pI 6.1; **4:** 70kDa y pI 6.2 y **5:** 70kDa y pI 6.3. La inmunoreactividad al anticuerpo se observa de manera más intensa en las muestras del paciente con EA; también las isoformas encontradas en él presentan un mayor peso molecular y pI más básicos con respecto del sujeto control.

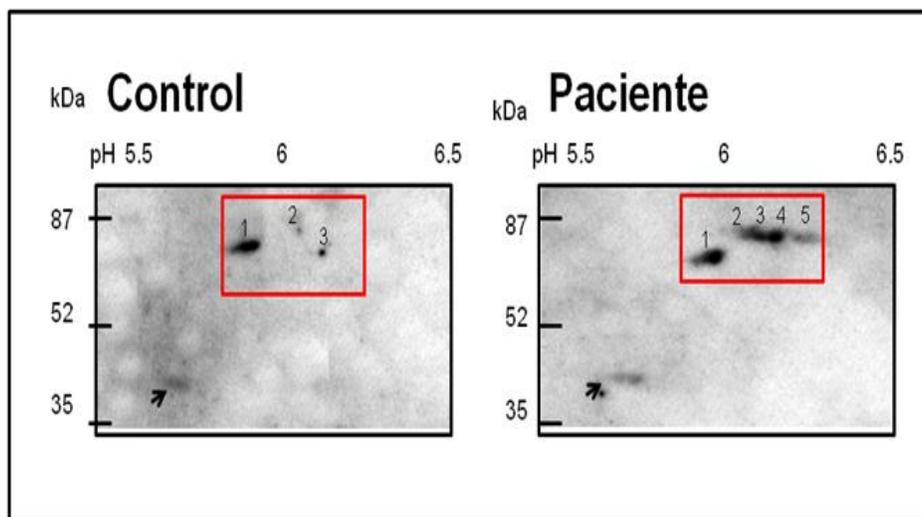


Fig. 23. Caracterización en dos dimensiones de las isoformas de la tau. Inmunodetección de la proteína tau separada por electroforesis bidimensional de un sujeto control y un paciente con EA. En el eje vertical se muestran los pesos moleculares (kDa). En el eje horizontal se muestran los puntos isoeléctricos. Los cuadros rojos muestran las diferentes isoformas de tau. Los números representan las isoformas encontradas. En el sujeto control se encontraron 3 isoformas mientras que en el paciente se encontraron 5. Las flechas muestran la mancha de actina (control de carga).

### 3. Validación de los anticuerpos contra tau y GSK-3 $\beta$

Para demostrar la especificidad de los anticuerpos que reconocen a la proteína tau y a la enzima GSK-3 $\beta$ , se realizó una inmunodetección. La figura 24 muestra el reconocimiento del anticuerpo anti-GSK-3 $\beta$  ser 9, que reconoce a esta enzima cuando se encuentra fosforilada. El anticuerpo reconoció una banda de proteína de peso molecular de 52 kDa. La inmunodetección con el anticuerpo GSK-3 $\beta$  (H-76), que reconoce a la enzima en los aminoácidos 345-420 del C-terminal que están presentes en la enzima total, encontró una banda de 52 kDa, que fue detectada con mayor intensidad en comparación con la reconocida por el anticuerpo anti-GSK-3 $\beta$  ser 9 (Fig. 24). Se observaron 3 bandas con pesos moleculares de 69, 60 y 47 kDa que fueron reconocidas por el anticuerpo tau-1, el cual marca la presencia de la proteína tau cuando las ser 199-202 no están fosforiladas (tau defosforilada ser 199-202). Con el fin de detectar a la proteína tau total, las muestras se incubaron con una fosfatasa alcalina para remover los grupos fosfato de las ser 199-202. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo tau-1. Después del procedimiento, se observaron 3 bandas con pesos moleculares de 69, 60 y 47 kDa; pero, la remoción de los grupos fosfatos incrementó la inmunoreactividad al anticuerpo (Fig. 24).

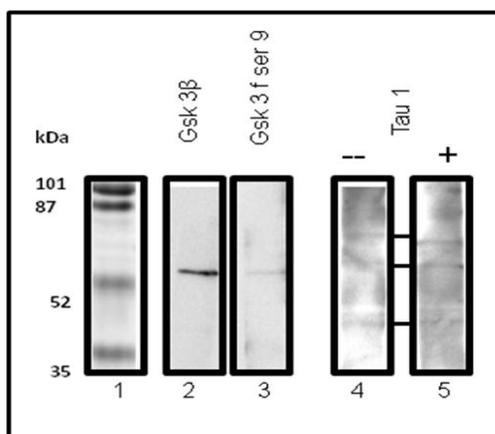


Fig. 24. Inmunodetección de los anticuerpos específicos contra GSK-3 $\beta$  y tau. La proteína de los homogenizados se separó por peso molecular mediante una electroforesis y posteriormente se realizó una inmunodetección con los anticuerpos anti-GSK-3 $\beta$  (H-76) anti-GSK-3 $\beta$  (ser9) y el tau-1. **1.** Bandas con diferentes pesos moleculares. **2.** Inmunodetección de la enzima GSK-3 $\beta$  total. **3.** Inmunodetección de la GSK-3 $\beta$  fosforilada en la ser 9. **4.** Inmunodetección de la tau defosforilada en las ser 199-202 **5.** Inmunodetección de la proteína tau total. (+) Muestras tratadas con fosfatasa alcalina (-) muestras sin fosfatasa alcalina.

#### **4. Establecimiento de las condiciones para la cuantificación de los niveles de tau defosforilada y tau fosforilada**

Con el fin de cuantificar los niveles de tau defosforilada y la tau fosforilada, se establecieron condiciones específicas para el uso de la técnica de ELISA mediante la utilización del anticuerpo MAPT que reconoce a la proteína tau fosforilada en las ser 396-404 y el anticuerpo tau-1 que sólo reconoce a la tau en el epítotope 189-207 cuando las ser 199 y 202 no están fosforiladas (tau defosforilada).

Debido a las condiciones especiales de detección del anticuerpo tau-1, se removieron los grupos fosfatos de las proteínas y posteriormente se incubaron con el anticuerpo. De esta forma se logró obtener el reconocimiento de la proteína tau total en los residuos de ser 199-202.

Para establecer la concentración óptima de proteína de trabajo, se realizaron curvas con diferentes concentraciones, equivalentes a 5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{g}$  de los homogenizados obtenidos de los precursores neuronales de un sujeto control. En la figura 25 se presentan las absorbancias obtenidas para cada una de las concentraciones, también se muestra el ajuste por mínimos cuadrados.

Los resultados apuntan que existe una relación proporcional directa entre la concentración de proteína y la absorbancia. Con el fin de obtener la corrección debida al blanco, se obtuvo el promedio de las absorbancias obtenidas de 8 pozos adicionales que contenían todos los reactivos de la prueba de ELISA, excepto la proteína (0 $\mu\text{g}$ ). Posteriormente se restó este valor a todas las absorbancias obtenidas.

Para cada anticuerpo se realizaron 8 curvas en dos ensayos independientes. Se demostró la especificidad y la reproducibilidad de este método, ya que los coeficientes de correlación de las curvas están dentro del rango de  $r = 0.94-0.97$ .

El coeficiente de variación intraensayo es <3% y el coeficiente interensayo <10%. Se determinó que la concentración óptima de trabajo era 20  $\mu\text{g}$  de proteína, porque estuvo a la mitad de la curva y se obtuvo un incremento significativo en la inmunodetección del anticuerpo tau-1.

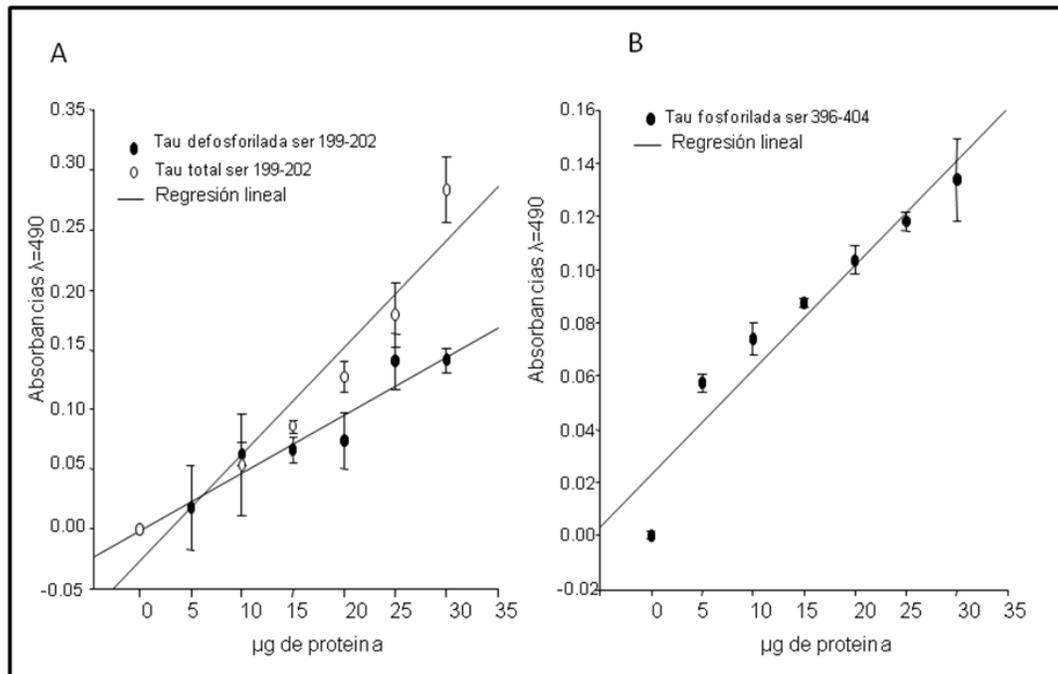


Fig. 25. Curva estándar para la obtención de la concentración óptima de proteína para la técnica de ELISA. La proteína de los homogenizados se adhirió sobre placas, se bloquearon los sitios inespecíficos y se incubaron con los anticuerpos que reconocen a la proteína tau en las ser 199-202 y las ser 396-404. Se muestra la relación entre absorbancia ( $\lambda$  490 nm) y la concentración de proteína **A**. Los círculos blancos muestran la Inmunodetección del anticuerpo tau-1 en preparaciones tratadas con fosfatasa alcalina, (tau total), los puntos negros muestran la Inmunodetección al anticuerpo tau-1 en preparaciones que no fueron tratadas con fosfatasa alcalina (tau defosforilada). **B**. muestra la Inmunodetección al anticuerpo MAPT que reconoce a la tau en la serinas 396-404 fosforiladas. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 8 determinaciones realizadas en dos ensayos independientes.

Para obtener los valores cuantitativos de los niveles de fosforilación de la tau en las ser 199-202 en cada ensayo, se realizaron curvas de calibración con una serie de diluciones conocidas de la proteína tau recombinante de humano (tau441 SIGMA) (5-100  $\mu\text{g}$ ) y se incubaron con el anticuerpo tau-1 (ser 199-202). Estas curvas nos permitieron interpolar los valores de las absorbancias obtenidas en la cuantificación de la fosforilación de tau y de esta manera medimos su concentración en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

La figura 26 muestra el promedio de 8 valores de absorbancias realizados en dos ensayos independientes. Se muestran dos curvas estándar representativas y el ajuste de la recta de cada una. Se realizó la corrección debida al blanco restando el promedio de las 8 absorbancias obtenidas de pozos sin proteína. Los coeficientes de correlación de las curvas estándar estaban dentro del rango de  $r = 0.96-0.98$  (16 curvas). El coeficiente de variación intra e interensayo es de 1.12% y 9.5% respectivamente.

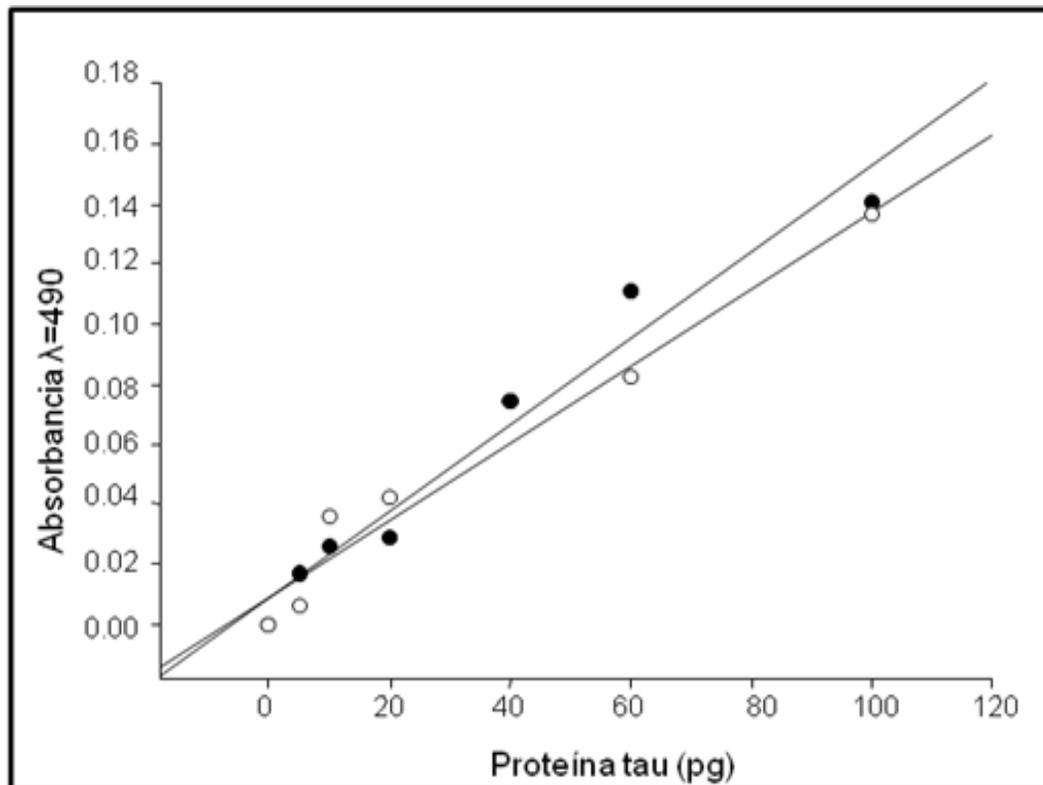


Fig. 26. Curvas de calibración de la proteína tau recombinante de humano. La proteína tau se adhirió sobre placas, se bloquearon los sitios inespecíficos y se incubaron con el anticuerpo anti tau-1. Se muestran curvas representativas usadas para la sustitución de las absorbancias y así obtener las concentraciones en pg/ $\mu$ l de la proteína tau fosforilada. Se observa la relación entre absorbancia ( $\lambda$  490 nm) y la concentración de proteína tau recombinante comercial (tau 441 sigma). Se muestran diferentes diluciones de la proteína tau recombinante humana (5 a 100pg). Los puntos negros son los valores obtenidos en un ensayo. Los puntos blancos son los valores obtenidos en otro ensayo independiente. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 4 determinaciones realizadas por ensayo.

## **5. Determinación de los niveles de tau defosforilada y tau fosforilada**

Para determinar los niveles de tau defosforilada (epitope 189-207; ser 199-202) y la tau fosforilada en las ser 199-202 y 396-404: sitios fosforilados en las MN (Otvos, *et al.*, 1994), se utilizaron 7 pacientes reclutados y diagnosticados en la Clínica de Geriátrica del Instituto Nacional de Psiquiatría: 4 pacientes femeninos con EA, 1 masculino con EA, 2 femeninos con otras demencias (mixta y semántica) y 10 sujetos control (8 femeninos y 2 masculinos). En la figura 27 se muestra la proporción de la proteína tau defosforilada normalizada entre la cantidad de proteína tau total en homogeneizados de progenitores neuronales del EO de pacientes con EA, sujetos control y con otras demencias. Se encontró una mayor proporción de tau defosforilada en el epitope 189-207 en los sujetos control femeninos, con respecto de los masculinos; esta diferencia fue del 13%. Asimismo, se obtuvo un 13% más en la proporción de tau defosforilada en el epitope 189-207 en los sujetos control femeninos en comparación con los pacientes del mismo sexo. El paciente masculino con EA obtuvo los valores más altos de tau defosforilada, en tanto que en los sujetos con otras demencias no se encontraron diferencias significativas comparadas con los controles.

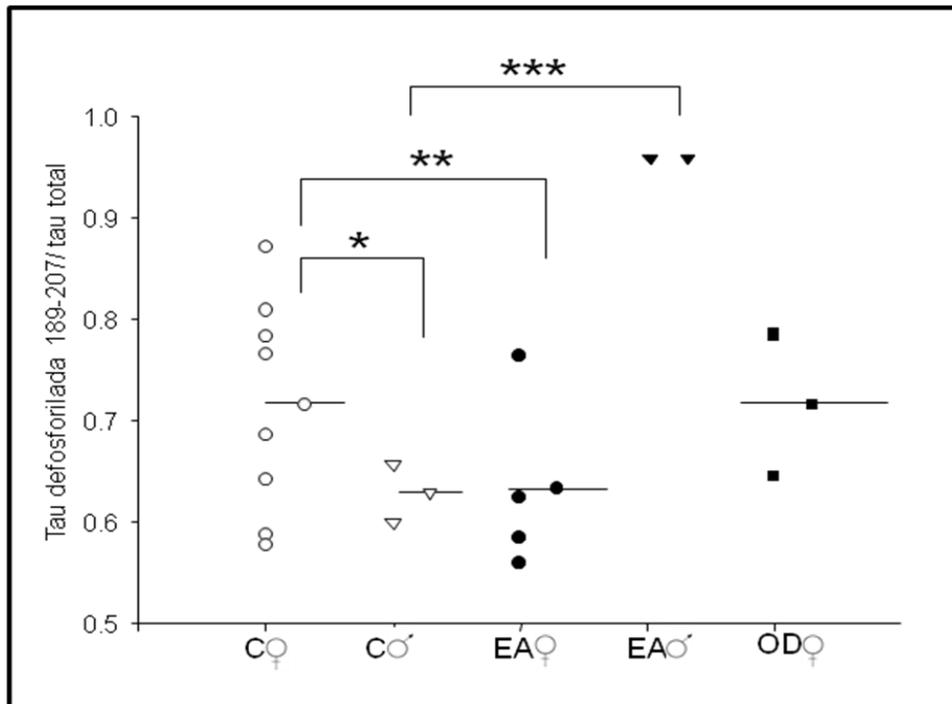


Fig. 27. Cantidad de tau defosforilada en el epitope 189-207 determinada en homogeneizados de progenitores neuronales, obtenidos del epitelio olfatorio de pacientes con EA. La proteína se adhirió sobre placas, se bloquearon los sitios inespecíficos, se incubaron con el anticuerpo anti tau-1 y se procesaron con la técnica de ELISA. La gráfica muestra la comparación de la cantidad de la tau defosforilada, normalizada por la cantidad de tau total encontradas en sujetos control femenino (●), en sujetos control masculino (▼), en pacientes femenino con EA (■), en un paciente masculino con EA (◆) y en pacientes con Otras Demencias (▲). Los resultados son la media  $\pm$  SEM de cuatro determinaciones realizadas por duplicado. \*  $P < 0.022$ ; \*\*  $P < 0.013$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ . (Prueba de t)

Para la obtención de la cantidad de tau fosforilada en las ser 199-202 se restó la cantidad de tau defosforilada reconocida con el anticuerpo tau-1 menos el monto de tau total reconocida por el mismo anticuerpo, después de tratar las muestras con una fosfatasa alcalina (como se describe en el apartado IX. L). La figura 28 muestra la relación de tau fosforilada en el epitope ser 199-202 normalizada entre la cantidad de tau total. Se encontró una mayor proporción de tau fosforilada en los pacientes femeninos con EA comparada contra los sujetos control femeninos; esta diferencia fue del 32%. A su vez, se observó un 30% más en las proporciones de tau fosforilada determinadas en los sujetos control masculinos con respecto de los femeninos. El paciente masculino obtuvo los valores más altos de tau fosforilada, mientras que en los sujetos con otras demencias, se encontró una diferencia del 2% con respecto de los sujetos control femeninos.

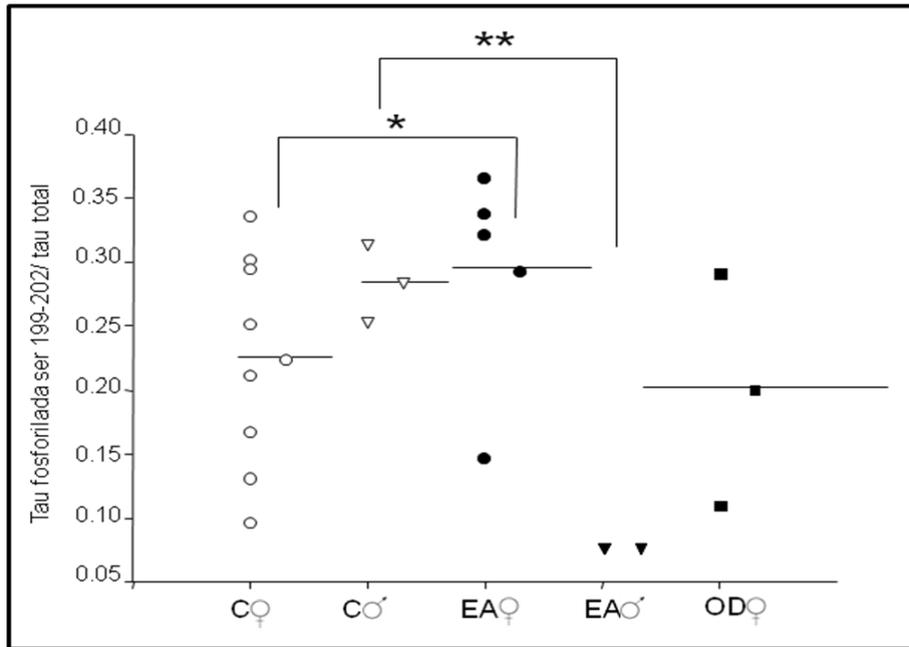


Fig. 28. Cantidad de tau fosforilada en las ser 199-202 determinada en homogeneizados de progenitores neuronales obtenidos del epitelio olfatorio de pacientes con EA. La proteína se adhirió sobre placas, se bloquearon los sitios inespecíficos y se incubaron con el anticuerpo anti tau-1. Para la obtención de la cantidad de tau fosforilada en las ser 199-202 se restó la cantidad de tau defosforilada de la cantidad de tau total. La gráfica muestra la comparación de la cantidad de la tau fosforilada, normalizada por la cantidad de tau total encontrada en sujetos control femenino (●), en sujetos control masculino (▼), en pacientes femenino con EA (■), en un paciente masculino con EA (◆) y en pacientes con Otras Demencias (▲). Los resultados son la media  $\pm$  SEM de cuatro determinaciones realizadas por duplicado. \*  $P < 0.020$ ; \*\* $P < 0.007$  (Prueba de t).

Asimismo se determinaron las absorbancias obtenidas mediante la inmunodetección con el anticuerpo que reconoce a la tau fosforilada en las ser 396-404. En la figura 29, se observa la inmunodetección de la tau fosforilada en las ser 396-404 determinadas en homogeneizados de progenitores neuronales obtenidos del EO de pacientes con EA, otras demencias y de sujetos control. Se encontraron valores mayores de absorbancia en los pacientes femeninos con Alzheimer comparados contra los sujetos control del mismo sexo. Esta diferencia fue del 20%. En el paciente con EA se observó una diferencia significativa del 54% con respecto del sujeto control masculino. Los pacientes con otras demencias obtuvieron un 6% más en la proporción de tau fosforilada con respecto de los sujetos control femeninos.

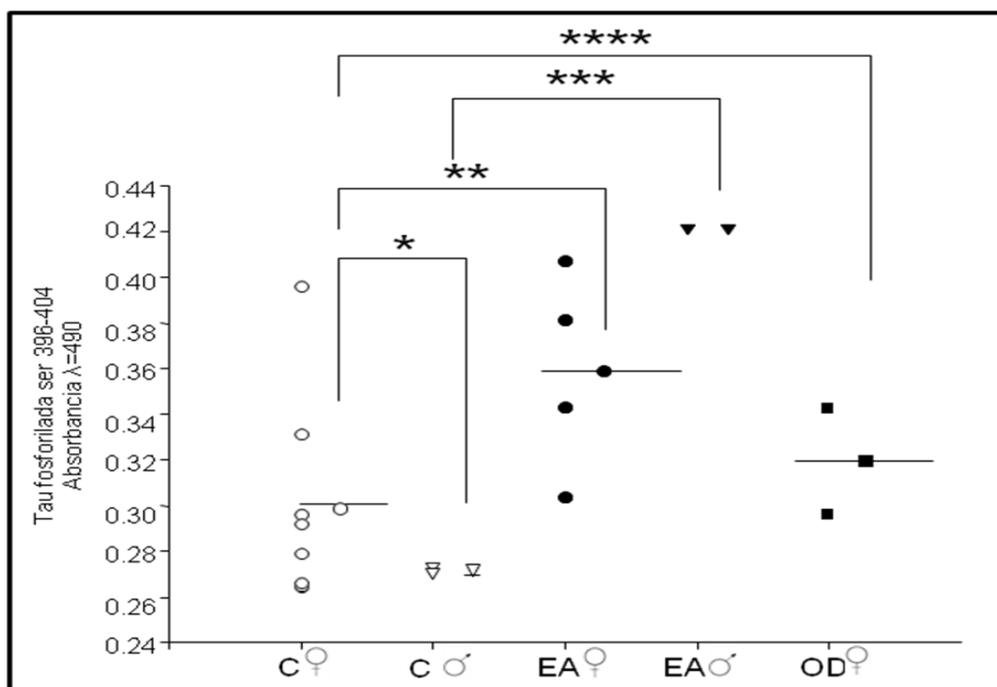


Fig. 29. Determinación de las absorciones obtenidas mediante la inmunodetección con el anticuerpo que reconoce a la tau fosforilada en la ser 396-404 en homogeneizados de progenitores neuronales obtenidos del epitelio olfatorio de pacientes con EA. La proteína se adhirió sobre placas, se bloquearon los sitios inespecíficos y se incubaron con el anticuerpo MAPT. La gráfica muestra la comparación de la inmunodetección de la proteína tau fosforilada en las ser 396-404 encontradas en sujetos control femenino (●), en sujetos control masculino (▼), en pacientes femenino con EA (■), en un paciente masculino con EA (◆) y en pacientes con Otras Demencias (▲). Los resultados son la media  $\pm$  SEM de cuatro determinaciones realizadas por duplicado. \* $P < 0.033$ ; \*\* $P < 0.001$ ; \*\*\* $P < 0.003$  \*\*\*\* $P < 0.025$  (Prueba de t).

Las cantidades de tau fosforilada en las ser 199-202 y 396-404 se analizaron en función de la edad, género y diagnóstico de la enfermedad.

Se compararon 4 sujetos control femeninos de diferentes edades (55, 60, 60 y 68 años) contra 4 pacientes femeninos diagnosticados con EA con edades similares (53, 62, 61 y 72 años). En los pacientes con Alzheimer femeninos se observó una mayor cantidad de tau fosforilada en el epítipo ser 199-202 comparados con los sujetos control (Fig. 30 A); esta diferencia fue del 90%. Además, se observó una mayor inmunodetección de la tau fosforilada en las ser 396-404 en los pacientes femeninos con Alzheimer comparados con los sujetos control femeninos; esta diferencia fue del 24% (Fig. 30B).

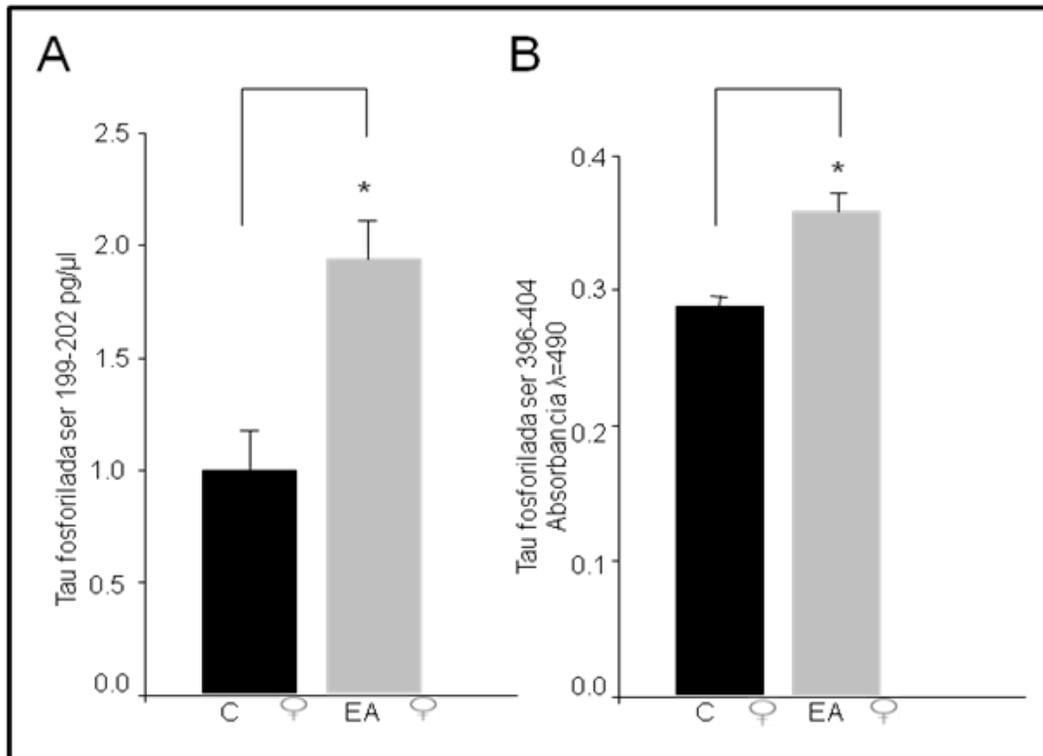


Fig. 30. Determinación de la cantidad de tau fosforilada en las ser 199-202 y ser 396-404 en pacientes femeninos con EA. **A.** La gráfica muestra la comparación de la cantidad de la tau fosforilada en las ser 199-202(pg/μg) de 4 sujetos control contra 4 pacientes con EA con edades semejantes. **B.** muestra los valores de absorbancia obtenidos en la inmunodetección del anticuerpo con tau que reconoce la fosforilación en las ser 396-404 de cuatro sujetos control femeninos y cuatro pacientes femeninos con EA. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 8 determinaciones realizadas en dos ensayos independientes. \* ( $P < 0.001$ ) (prueba de t no pareada).

Se analizó la cantidad de tau fosforilada en la ser 199-202 de un paciente masculino de 69 años y se comparó con dos sujetos control de edades semejantes (63 y 65 años). Hubo una menor cantidad de tau fosforilada en el paciente masculino en comparación con los controles de su mismo sexo; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 31 A). De la misma manera, se observó una mayor inmunodetección de la tau fosforilada en la ser 396-404 en el paciente con EA masculino en comparación con los sujetos control de edad semejante, del mismo sexo; esta diferencia fue del 54% (Fig. 31 B).

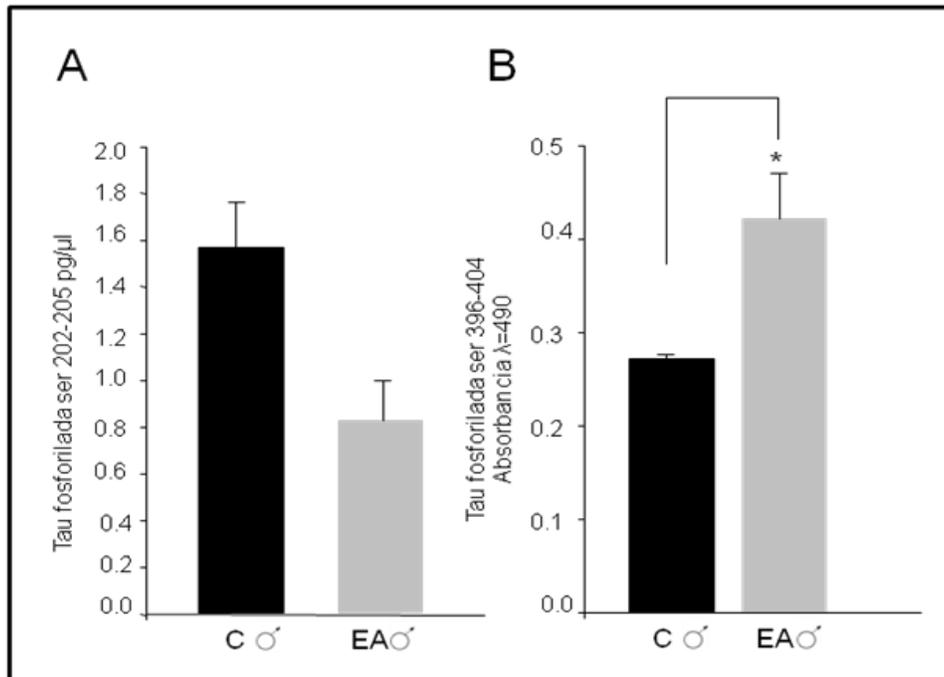


Fig. 31. Determinación de la cantidad de tau fosforilada en las ser 199-202 y ser 396-404 en pacientes masculinos con EA. **A.** Comparación de la cantidad de la tau fosforilada en las ser 199-202 (pg/μg) entre un paciente masculino con EA y 2 sujetos control masculino con edad semejante. **B.** muestra los valores de absorbancia obtenidos en la inmunodetección del anticuerpo con tau que reconoce la fosforilación en las ser 396-404 de 2 sujetos control masculino y 1 paciente masculino con EA. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 8 determinaciones realizadas en dos ensayos independientes. \* ( $P < 0.003$ ) (prueba de t no pareada).

En la figura 32 A se muestra la cantidad de tau fosforilada determinada en los sujetos con diagnóstico de otras demencias (mixta y semántica) ( $n=2$ ) y en los sujetos control con edad semejante y mismo género ( $n=2$ ). Se encontró una diferencia significativa en la inmunodetección de la tau fosforilada en el epítipo ser 396-404 en los pacientes comparados con los controles; ésta fue del 17%. Igualmente, se encontró una mayor cantidad de tau fosforilada en el epítipo ser 199-202 en los pacientes contrastada contra los sujetos control. La diferencia fue de 38%, pero no resultó estadísticamente significativa.

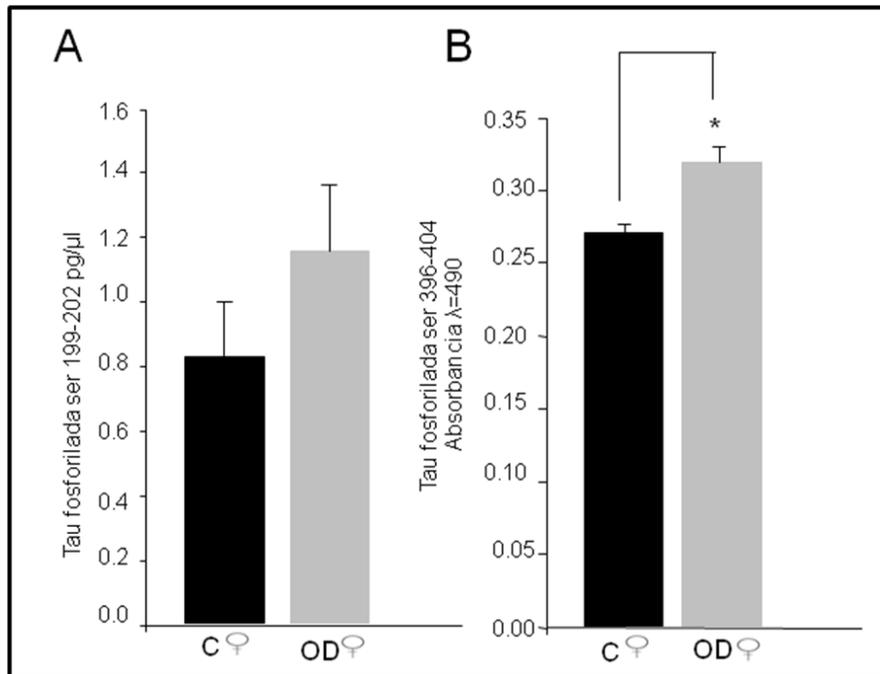


Fig. 32. Determinación de la cantidad de tau fosforilada en los epitopes ser 199-202 y ser 396-404 en pacientes femeninos con diagnóstico de otras demencias. **A.** comparación de la cantidad de la tau fosforilada en las ser 199-202 (pg/μg) entre 2 pacientes femeninos con demencia mixta y demencia semántica y 2 sujetos control femeninos con edad semejante. **B.** muestra los valores de absorbancia obtenidos en la inmunodetección del anticuerpo con tau que reconoce la fosforilación en las ser 396-404 de 2 sujetos control femeninos y 2 pacientes femeninos con demencia mixta y demencia semántica. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 8 determinaciones realizadas en dos ensayos independientes. \* ( $P < 0.003$ ) (prueba de t no pareada).

## 6. Determinación de los niveles de GSK-3 $\beta$ total y GSK-3 $\beta$ inactiva

Para la determinación de los niveles de GSK-3 $\beta$  se realizó la técnica de ELISA mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce a la GSK-3 $\beta$  total en los aminoácidos 345-420 del C-terminal y un otro que reconoce a la GSK-3 $\beta$  cuando la ser 9 está fosforilada (Phospho-GSK-3 $\alpha/\beta$  (Ser21/9)). En la figura 33A se muestra la inmunodetección de la GSK-3 $\beta$  total determinada en homogeneizados de progenitores neuronales obtenidos del EO de una paciente con EAI (60 años), otra con EAI (60 años) y un sujeto control femenino (60 años).

Se encontraron valores menores de absorbancia en los pacientes con EAI y EAll con respecto del sujeto control; la diferencia fue del 30% y 17% respectivamente. Se analizó la cantidad de GSK-3 $\beta$  fosforilada en la ser 9; ya que esta fosforilación es un indicativo del estado de inactivación de la cinasa (Shaw *et al.*, 1997). La figura 33B muestra la proporción de GSK-3 $\beta$  fosforilada en la ser 9 normalizada entre la cantidad de GSK-3 $\beta$  total. No se encontraron diferencias significativas entre el paciente con EAI y el sujeto control. Hay un incremento del 10% en la inactivación de la cinasa en el paciente con EAll en comparación con el sujeto control; pero la diferencia no fue significativa. Se encontró un incremento en la inactivación de la GSK-3 $\beta$  del paciente con EAll en comparación con el paciente con EAI; este incremento fue del 19%.

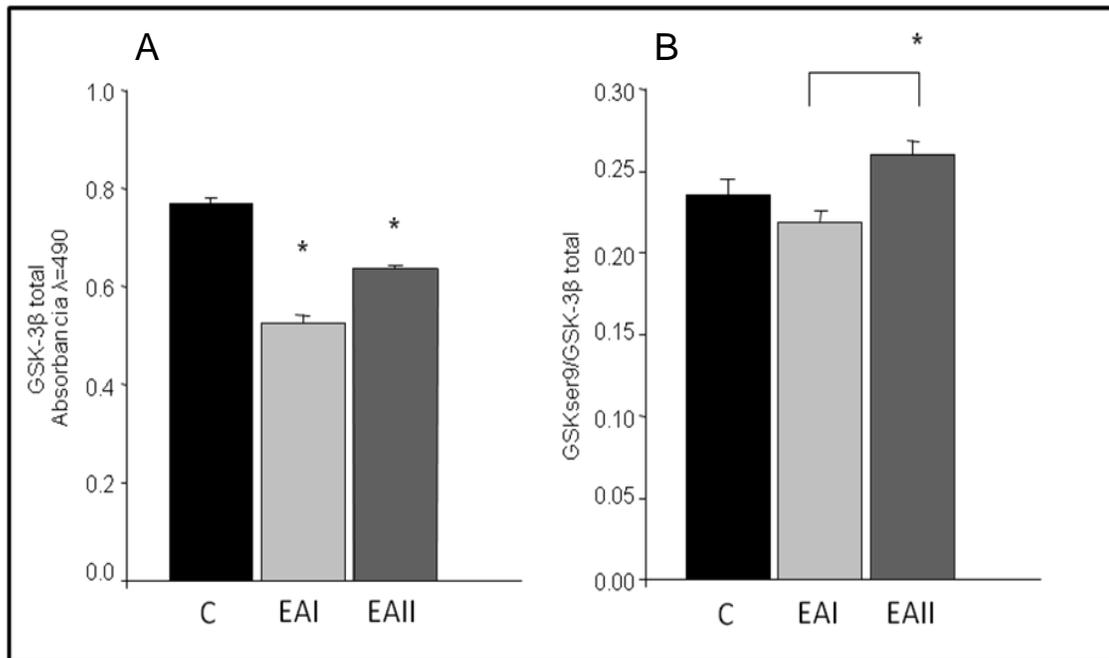


Fig. 33. Determinación de los niveles de GSK-3 $\beta$  total y GSK-3 $\beta$  inactiva en pacientes femeninos con EA etapa I y EA etapa II. **A.** muestra los valores de absorbancia obtenidos en la inmunodetección del anticuerpo que reconoce a la GSK-3 $\beta$  total de un paciente con EA etapa I, un paciente con EA etapa II y un sujeto control, todos de 60 años. **B.** La gráfica muestra la comparación de la cantidad de GSK-3 $\beta$  fosforilada en la ser 9 (encima inactiva), normalizada por la cantidad de tau total encontrada en sujetos control femenino, un paciente con EA etapa I y un paciente con EA etapa II, todos de 60 años. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 8 determinaciones realizadas en dos ensayos independientes. \* (P<0.05) (prueba de ANOVA).

## 7. Efecto de la melatonina sobre la fosforilación de tau

Para estudiar si la incubación con melatonina induce una disminución en la cantidad de tau fosforilada en los cultivos de los precursores neuronales, éstos se incubaron con diferentes concentraciones de melatonina ( $10^{-11}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-5}$  M). La incubación se realizó por 6 horas, lo que indujo un decremento en los niveles de tau fosforilada en las ser 396-404 y 199-202, que son sitios blancos de fosforilación de la GSK-3 $\beta$  (Sperber *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 1997; Muñoz-Montaña *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2003; Plattner *et al.*, 2006).

En la figura 34 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de melatonina sobre los niveles de tau fosforilada en las ser 396-404 y 199-202 en homogeneizados de progenitores neuronales del EO de un paciente con EAI, uno con EAI y un sujeto control con edad semejante y mismo género; se muestra el porcentaje de tau fosforilada. Para el epítopo ser 396-404 (Fig. 34A), en el sujeto control se observó una disminución significativa del 7% en la concentración de  $10^{-9}$  M y en la concentración de  $10^{-7}$  M (7%) comparada con el vehículo. De igual manera, se observó una disminución significativa del 20% en el paciente con EAI en la concentración de  $10^{-7}$  M y una disminución del 17 % en la concentración de  $10^{-5}$  M con respecto del vehículo.

Se observó una disminución en la cantidad de tau fosforilada en el paciente con EAI en la presencia de melatonina en las concentraciones de  $10^{-7}$  M y  $10^{-5}$  M, esta disminución fue del 15% y del 17% respectivamente, sin embargo esta no fue estadísticamente significativa. Para el epítopo ser 199-202 (Fig. 34B), en el sujeto control se observó una disminución significativa en la concentración de  $10^{-7}$  M del 23%. El paciente con diagnóstico de EAI mostró una disminución significativa de 27%, 33% y 28% respectivamente en la cantidad relativa de tau fosforilada determinada en el epítopo 199-202 en los precursores neuronales incubados con concentraciones de  $10^{-11}$  M,  $10^{-9}$  M y  $10^{-7}$  M de melatonina.

En el paciente con EAlI hubo una disminución del 7% a la concentración de  $10^{-7}$  M, la cual no fue significativa. Estos resultados indican que la melatonina es capaz de disminuir los niveles de tau fosforilada en las ser 199-202 y 396-404.

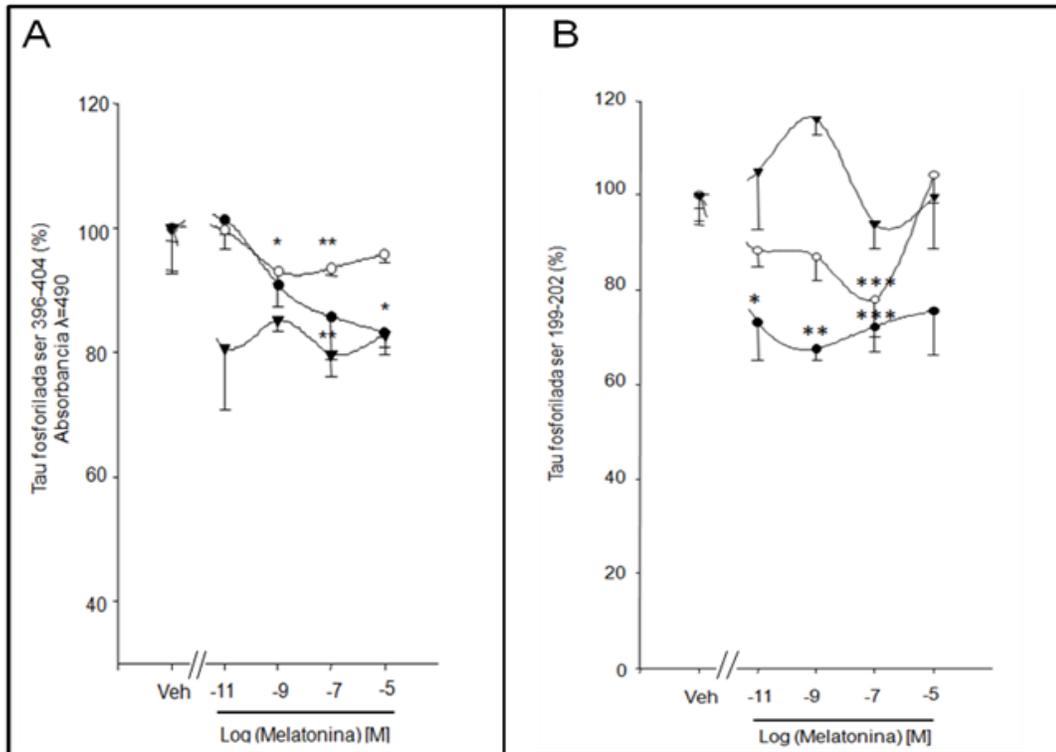


Fig. 34. Efecto de la melatonina sobre la fosforilación de la proteína tau en las ser 399-404 y 199-202. Los precursores neuronales obtenidos del EO se incubaron con melatonina durante 6 horas a diferentes diluciones ( $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  M). Posteriormente, se procesaron mediante la técnica de ELISA con el anticuerpo tau-1 para poder determinar la cantidad de tau fosforilada en las ser 199-202, mientras que se utilizó el anticuerpo MAPT para determinar la cantidad de tau fosforilada en el epitope 396-404. Se realizó una comparación de un paciente con EA etapa I (●), uno con EA etapa II (▼) y un sujeto control (O) de edad semejante y mismo género. Los resultados se expresan como la media + error estándar de 8 determinaciones realizadas en dos ensayos independientes y representan el porcentaje de tau fosforilada tomando como 100 % el promedio obtenido de las mediciones del vehículo. A= control \*P < 0.041; \*\*P < 0.021; EAlI= \*\*P < 0.027; \*P < 0.038. B =control \*\*\*P < 0.011 EAI\* P < 0.034, \*\*P < 0.005, \*\*\*P < 0.016 (prueba t no pareada).

## 8. Efecto de la melatonina sobre la inhibición de la GSK 3 $\beta$

Para evaluar si la melatonina inhibe a la GSK-3 $\beta$  para así disminuir la cantidad de tau fosforilada en las ser 396-404 y 199-202, se determinaron los niveles de GSK-3 $\beta$  fosforilada en la ser 9; ya que representa un índice de inactivación de la GSK-3 $\beta$  (Shaw *et al.*, 1997).

En la figura 35 se muestra la proporción de la GSK-3 $\beta$  fosforilada en la ser 9 normalizada entre la cantidad de la enzima total. Como se aprecia en la figura, existe un incremento significativo en la fosforilación de la ser 9 en presencia de la melatonina, en comparación con la cantidad relativa de esta enzima en presencia del vehículo. La cantidad de GSK-3 $\beta$  fosforilada en la ser 9 determinada en los homogenizados totales obtenidos de pacientes con EAI y EI mostraron un incremento significativo en presencia de  $10^{-11}$  M de melatonina en relación con el vehículo; variación del 19 % y 13%, respectivamente.

El aumento con mayor significancia se observó con una concentración de  $10^{-5}$  M: 27 % para el pacientes con EAI y del 15% para el de EI. Estos resultados indican que la melatonina es capaz de aumentar la fosforilación en la ser 9 de la GSK-3 $\beta$  y de esta manera regular su actividad e inducir un decremento en la fosforilación de tau.

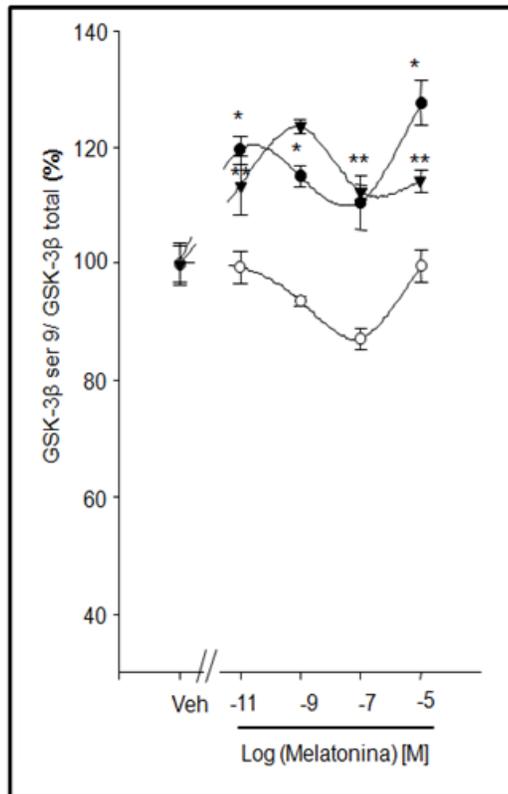


Fig. 35. Efecto de la melatonina sobre la activación de la GSK-3 $\beta$ . Los precursores neuronales se incubaron con melatonina durante 6 horas (10<sup>-11</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup> M). La cantidad de la enzima fosforilada en la ser 9 se determinó por la técnica de ELISA. La gráfica muestra el porcentaje de GSK-3 $\beta$  fos ser 9 normalizada entre la cantidad de GSK-3 $\beta$  total encontrada en un sujeto control (O), un paciente con EA etapa I (●) y un paciente con EA etapa II (▼) de edad semejante y mismo género. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 8 determinaciones realizadas en dos ensayos independientes (\*P<0.001; \*\*P<0.001; \*\*\*P<0.001; P < 0.010; ++P < 0.005) +++P <0.009. (Prueba t no pareada).

## 9. Efecto de la melatonina sobre la actividad de la GSK-3 $\beta$

Con el fin de determinar la participación de la GSK-3 $\beta$  en la fosforilación de la proteína tau en las ser 396-404 y 199-202, los cultivos de los precursores neuronales de un paciente con EA etapa I, uno con EA etapa II y un sujeto control con edad semejante y mismo género se incubaron durante 6 horas con LiCl (20 $\mu$ M), que es el inhibidor específico de la GSK-3 $\beta$ , y con melatonina (10<sup>-7</sup> M). Se determinó la actividad de la GSK-3 $\beta$  en extractos celulares obtenidos de las células tratadas con el inhibidor o la indolamina como fuente de la enzima.

La figura 36A muestra la actividad de la GSK-3 $\beta$  en un sujeto control. Se observó una disminución en la incorporación de P<sup>32</sup> en las células cultivadas con melatonina y litio en comparación con las células incubadas con el vehículo. El decremento en la actividad de la GSK-3 $\beta$  fue mayor en las células incubadas con melatonina (33%) que en las que se usó litio (14%). La actividad de la GSK-3 $\beta$  se redujo un 42% en las células co-cultivadas con melatonina y LiCl con respecto del vehículo. En el paciente con EAI, la actividad disminuyó en un 16% con la presencia de melatonina y en un 6% con la presencia de LiCl; en las células co-cultivadas con melatonina + LiCl fue de 41% menos (Fig. 36B). Existió una disminución en la incorporación de P<sup>32</sup> en las células cultivadas con melatonina y litio en comparación con las células incubadas con el vehículo del paciente con EAI; la disminución fue del 16 % y 40 % respectivamente (Fig. 36C).

Se observó que la inhibición se acentúa con la co-incubación con melatonina y LiCl (57%) (Fig. 36C). Para el sujeto control y para el paciente con EAI, la disminución en la actividad de la GSK-3 $\beta$  fue mayor en las células incubadas con melatonina que en las tratadas con litio. No obstante, para el paciente con EAI, se observó una mayor disminución en las células incubadas con litio que en las tratadas con melatonina (Fig. 36 A, B y C). Se encontró que la actividad de la GSK-3 $\beta$  en pacientes con EA está disminuida en comparación con el sujeto control, esto es más evidente en pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad.

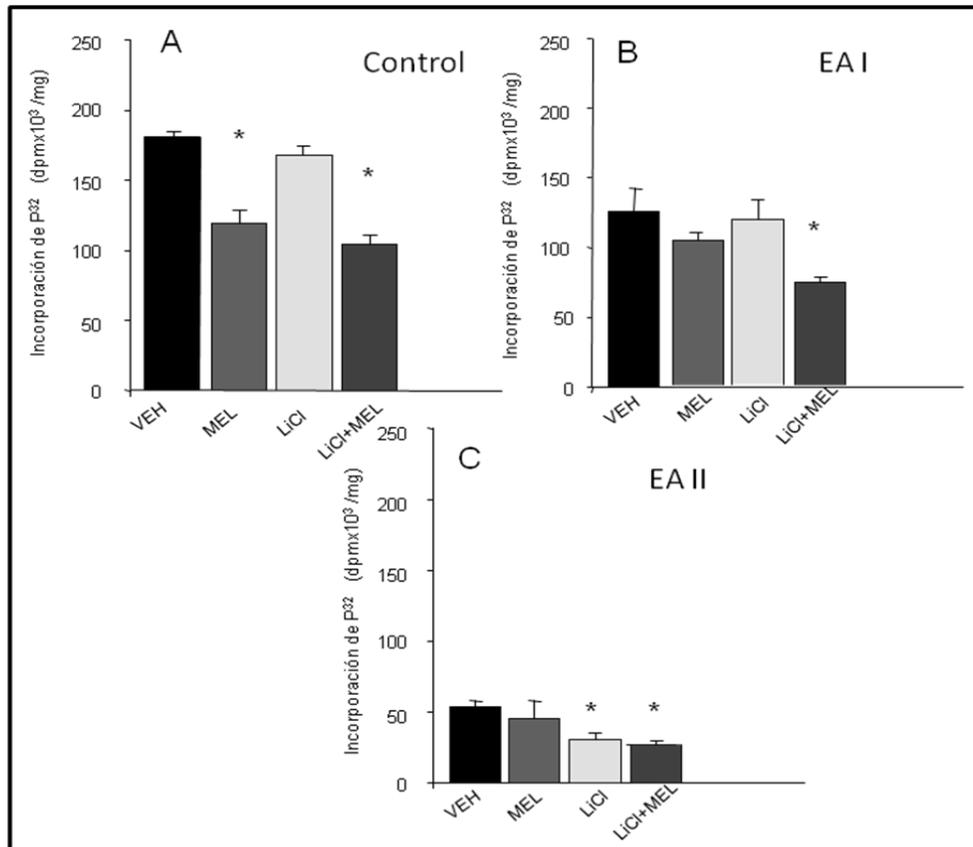


Fig. 36. Determinación de la actividad de la GSK-3 $\beta$  en células tratadas con melatonina y LiCl. Los Precusores neuronales de un sujeto control (A), un paciente con EA etapa I (B) y un paciente con EA etapa II (C) se incubaron con vehículo, melatonina (10<sup>-7</sup> M), LiCl (20 $\mu$ M) y melatonina + LiCl durante 6 horas. La figura muestra la incorporación del P<sup>32</sup> a los sustratos endógenos presentes en los homogenizados totales. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 4 determinaciones realizadas en un ensayo. \*P<0.05. Prueba de ANOVA.

## XI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En la EA se han descrito dos lesiones histopatológicas que forman parte del diagnóstico confirmatorio de la enfermedad: las placas seniles (agregados del péptido amiloide) y las MN (agregados de tau hiperfosforilada), que por limitaciones metodológicas, sólo pueden ser observadas, en su mayoría, en estudios *post mortem* mediante tinciones y análisis por microscopia en autopsias de tejido cerebral de zonas hipocampales y de la isocorteza (Khan y Alkon 2010). La cantidad de MN observadas en la histopatología *post-mortem* del cerebro de los pacientes con EA se ha correlacionado apropiadamente con la severidad y la duración del cuadro demencial (Braak y Braak 1991).

En la EA, la formación de las MN ha sido ampliamente descrita por Braak y Braak (1991) y se caracteriza por desarrollarse en tres etapas: en la primera, las MN están limitadas a regiones de la corteza transentorrinal y el hipocampo; en la segunda, se presentan en regiones del sistema límbico y en la tercera aparecen en las áreas de asociación neocorticales. Sin embargo, Kovacs *et al.*, en 1999, demostraron la presencia de MN dentro de estructuras asociadas con el sistema olfativo, tales como el bulbo olfatorio en etapas muy tempranas de la enfermedad. En algunos casos, encontraron MN en el núcleo olfativo anterior, incluso antes de que se desarrollaran en la corteza entorrinal (Kovacs *et al.*, 2001).

En este estudio, se demostró que los precursores neuronales obtenidos del neuroepitelio olfatorio de pacientes con EA presentan MN tanto en el soma como en las neuritas. Éstas se observaron como inclusiones y/o agregados de la proteína tau que fueron reconocidos con un anticuerpo dirigido contra la tau fosforilada en la ser 199-202, como previamente se describió en muestras de tejido cerebral de pacientes con EA (Papazosomenos, 1989). Encontramos que existe un número mayor de MN, de mayor tamaño, en sujetos con diagnóstico de EA con edades de 53 y 62 años en comparación con las que están presentes en sujetos control con edades semejantes.

También se observó que existe un incremento en el número de MN en relación con la edad de los sujetos. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en un estudio realizado por Arnold *et al.*, en el 2010, donde se observó la presencia de MN en biopsias del neuroepitelio olfatorio obtenidas *post mortem* de pacientes con EA. También se encontraron que estos agregados son más frecuentes y abundantes en sujetos con EA que en ancianos sin la enfermedad.

Estudios previos de caracterización de las MN en el neuroepitelio olfatorio son inconsistentes; ya que varios de ellos han informado de la presencia de MN en el soma y en las neuritas de células neuroepiteliales de biopsias obtenidas *post mortem* de pacientes con EA (Lee *et al.*, 1993; Arnold *et al.*, 1998; Talamo *et al.*, 1989; Reyes *et al.*, 1993); en tanto que Kovacs (1999) sólo las observó en los axones de las neuronas olfatorias de pacientes con EA, pero no en el soma. Sin embargo, otros autores no han podido confirmar estos resultados (Yamagishi *et al.*, 1994; Hock *et al.*, 1998; Kaakkola *et al.*, 1994). Además, Kishikawa *et al.*, en 1994, detectaron MN en adultos jóvenes no dementes, mientras que Hock *et al.*, en 1998, no encontraron estos agregados en el EO de pacientes con EA en etapas tempranas.

Cabe mencionar que todos estos estudios son realizados en biopsias obtenidas *post mortem* o bajo procesos de disección invasivos obtenidos bajo anestesia, por lo que estas variables explicarían los resultados contradictorios, que pueden deberse a artificios introducidos por el deterioro *post mortem* o por el proceso invasivo de disección del tejido y el uso de fármacos para introducir la anestesia.

En este trabajo, encontramos a las MN en células de linaje neuronal derivadas del neuroepitelio olfatorio, el cual es un tejido que tiene un desarrollo relacionado con el SNC. Sin embargo, el neuroepitelio olfatorio está localizado en la periferia del SNC y es capaz de tener una regeneración y/o remplazo continuo durante toda la vida; por lo que es susceptible de ser colectado y propagado para el estudio en pacientes vivos. A la par, la deficiencia en la identificación y discriminación de olores es un síntoma temprano del desarrollo de la enfermedad y estudios anatómicos sugieren que los daños en los mecanismos de olfacción pueden intervenir temprano en el desarrollo de la enfermedad (Serby *et al.*, 199; Ruan *et al.*, 2012).

Se ha observado que la pérdida olfativa encontrada en los pacientes con EA está acompañada por anomalías estructurales del bulbo, las cortezas y epitelio olfatorios (Kovacs, 2004).

Estos cambios podrían estar alterando la organización sináptica normal y dañando el proceso olfativo de los pacientes. Así que en este estudio, se realizó un método para obtener células del epitelio olfatorio mediante una exfoliación nasal sin la utilización de anestesia. Debido a que es un método no invasivo y no ocasiona daño permanente a la zona donante, es un modelo idóneo de ser utilizado para la detección temprana de los marcadores histopatológicos de la EA en pacientes vivos.

Teniendo en cuenta que la proteína tau hiperfosforilada es el principal componente de las marañas neurofibrilares, se consideró prudente caracterizar el patrón de variantes isoeléctricas de tau presentes en homogenizados de los precursores neuronales de pacientes con EA; ya que cada grupo fosfato incorporado a la proteína le confiere una carga negativa, lo que la hace más ácida, disminuye su punto isoeléctrico y aumenta su peso molecular.

La Inmunodetección de la proteína tau, separada por 2D realizada en tejido *post mortem* de pacientes con EA (hipocampo, lóbulo frontal y lóbulo parietal) con anticuerpos que reconocen diferentes epítopes fosforilados de tau, revela un triplete de proteínas con pesos moleculares de 55, 64 y 69 kDa con pI de 5.7-6.1. También se ha encontrado un componente de 72-74 kDa, el cual se ha propuesto como la isoforma completa de tau (Brion *et al.*, 1991; Goedert *et al.*, 1992; Mulot *et al.*, 1994; Sergeant *et al.*, 1997).

Otros estudios que utilizan un anticuerpo que reconoce a la proteína tau en los aminoácidos del carboxilo terminal observaron proteínas con pesos moleculares de 50-55 y 65-70 kDa con un rango de pI de 5 a 9 en tejido cerebral obtenido *post mortem* (Aksenov *et al.*, 2002).

En esta investigación se realizó la inmunodetección de la proteína tau separándola por electroforesis bidimensional con el anticuerpo (Tau-C17), que reconoce los últimos aminoácidos del carboxilo terminal, lo que reveló la presencia

de 3 isoformas en los homogenizados de los sujetos control, mientras que los pacientes con EA presentaron 5. Las isoformas encontradas se ubican entre los pesos moleculares de 67 kDa y 70kDa y los pH de 5.8 a 6.3, concuerdan con las áreas dentro del punto isoeléctrico y el peso molecular que presentan las diferentes isoformas de la proteína tau (Buee et al., 2000). Las encontradas en los pacientes exhiben pesos moleculares más grandes y puntos isoeléctricos más básicos que las de los sujetos control.

Es probable que las variaciones encontradas en la movilidad electroforética en 2D observadas en este estudio se deban a que la mayoría de los trabajos realizados utilizaron anticuerpos que reconocen epitopes de la proteína tau distintos a los usados en la presente investigación.

También las diferencias pueden deberse al tamaño de las isoformas de tau y al grado de fosforilación que tienen; ya que, como se mencionó anteriormente, cada grupo fosfato unido a la proteína le confiere un peso molecular diferente y una carga negativa adicional. Por ejemplo, la isoforma de tau más larga puede conducir a la formación de variantes con pesos moleculares que oscilan desde 68 hasta 72kDa según su grado de fosforilación (Mulot *et al.*, 1994).

Aunque existen muchos sitios de fosforilación que están presentes tanto en la proteína tau soluble como en la que se encuentra formando las MN, hay características bioquímicas que las diferencian. Sergeant *et al.*, en 1995, realizaron un análisis de inmunodetección de las isoformas de tau separadas por electroforesis 2D que reveló que la proteína tau presente en las MN de pacientes con EA es más ácida que proteína tau que no está formando marañas.

Esto concuerda con los resultados que se obtuvieron en este estudio, ya que las isoformas que se encontraron en los homogenizados de los pacientes se observaron dentro de puntos isoeléctricos más básicos y pesos moleculares más grandes comparados con los de los sujetos control, lo que nos indica mayores grados de fosforilación y un número más grande de fosfatos incorporados.

En estudios *in vitro* se ha demostrado que la proteína tau promueve el ensamblaje de la tubulina y estabiliza a los microtúbulos (Cleveland *et al.*, 1977; Goode y Feinstein, 1994). Sin embargo, la hiperfosforilación de tau inhibe ambos procesos (Brandt *et al.*, 1994; Butler y Shelanski, 1986) y promueve la formación de las MN.

Este fenómeno de tau se ha estudiado mediante pruebas inmunológicas como inmunotransferencia y/o ELISA con la utilización de varios anticuerpos que reconocen diferentes epitopes de fosforilación (Lee *et al.*, 1991; Greenberg *et al.*, 1992; Mercken *et al.*, 1992; Seubert *et al.*, 1995; Buée-Scherrer *et al.*, 1996a; Hasegawa *et al.*, 1996; Holzer *et al.*, 1994; Vermersch *et al.*, 1992).

En este sentido, se han realizado estudios en cerebro *post mortem* que demuestran que los niveles de fosforilación de tau se encuentran incrementados en algunas regiones del cerebro (corteza frontal, corteza temporal, cortezas de asociación, áreas del sistema límbico, corteza entorrinal e hipocampo) (Wolozin y Davies, 1987; Bissette *et al.*, 1991; Harrington *et al.*, 1991; Mukaetova-Ladinska *et al.*, 1992; Bramblett *et al.*, 1992; Khatoon *et al.*, 1992; Mercken *et al.*, 1992; Harrington *et al.*, 1994; Holzer *et al.*, 1994; Vermersch *et al.* 1992, 1994); mientras que la concentración de tau normal se encuentra reducida (Bramblett *et al.*, 1992; Mukaetova-Ladinska *et al.*, 1992; Harrington *et al.*, 1994; Delacourte *et al.*, 1999; 1998).

Es bien sabido que la investigación de los mecanismos y el desarrollo de la hiperfosforilación de tau en la EA se ha visto obstaculizada por la inaccesibilidad al tejido neuronal durante el desarrollo de la enfermedad. Por esto, resulta de gran relevancia estudiar procesos de hiperfosforilación y agregación de la proteína tau en pacientes vivos; ya que estas pruebas pueden ayudar a entender el desarrollo de la patología y formar parte del análisis molecular, lo que mejoraría así el diagnóstico presuntivo que actualmente se realiza. Además, podría ser usado como un marcador temprano de la enfermedad.

Este estudio se caracterizó por el uso de un método de ELISA para la cuantificación de los niveles de fosforilación de tau en precursores neuronales obtenidos de pacientes vivos mediante la utilización de dos anticuerpos que reconocen epitopes fosforilados de tau (ser 199-202 y 396-404). Se demostró la especificidad y la reproducibilidad de este método, ya que los coeficientes de correlación encontrados fueron mayores al 0.96. Asimismo, los valores del coeficiente de variación *intra* e *inter* fueron de menores al 3% y 10% respectivamente en todos los ensayos.

Con esta técnica, se encontró una mayor cantidad de tau fosforilada en los pacientes con EA en comparación con los sujetos sanos. Este resultado se asemeja a lo obtenido en estudios previos realizados *post mortem*, que mostraron un aumento de la fosforilación de la proteína tau en homogenizados de cerebros de pacientes con EA (Bramblett *et al.*, 1992; Mukaetova-Ladinska *et al.*, 1992). Se analizaron los epítopes ser 199-202 y 396-404 de la tau, donde la evidencia indica que al estar hiperfosforilados promueven la agregación de la proteína en las MN (Lovestone y Reynolds, 1997).

En 1993, Vandermeeren *et al.*, determinaron los niveles de tau fosforilada en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA mediante la técnica de ELISA, utilizando un anticuerpo que reconoce el epítope fosforilado (ser 199-202). Estos autores se percataron de que los niveles se incrementan significativamente en los pacientes con EA al comparar sus muestras con las de sujetos control. Esto concuerda con los hallazgos encontrados en este análisis, ya que hubo un incremento significativo en la fosforilación de la proteína tau en las ser 199-202 y 396-404 de los homogenizados obtenidos de las exfoliaciones nasales de los pacientes. Se observó que la hiperfosforilación de la proteína tau en estos epitopes se correlaciona con el incremento en la cantidad de MN evidenciadas por inmunocitoquímica.

El estudio del mecanismo y desarrollo de la EA se ha visto obstaculizado al no existir un método que evalúe los cambios histopatológicos en pacientes vivos, a consecuencia de la dificultad de acceso al tejido neuronal. En este estudio, se demostró que los precursores neuronales del epitelio olfatorio de pacientes vivos con

EA presentan características propias de esta enfermedad. Dichas células de linaje neuronal tienen su origen en el desarrollo de SNC, aun así, se ha observado que son capaces de regenerarse a lo largo de toda la vida (neurogénesis).

El neuroepitelio, al estar localizado en la cavidad nasal, es accesible para practicar la recolección; ya que es buen candidato para el desarrollo de cultivos celulares y/o líneas celulares de pacientes vivos. Si bien la presencia de MN es sin duda un rasgo que define a la EA y, como sabemos, están formadas por agregados de la proteína tau hiperfosforilada, podemos concluir que los precursores neuronales obtenidos por exfoliación nasal reflejan los cambios patológicos que ocurren en el cerebro de los pacientes con EA. Los resultados obtenidos sugieren que las MN, el patrón de isoformas fosforiladas de la proteína tau y las concentraciones relativas de tau fosforilada, determinadas en los precursores neuronales del EO, podrían ser utilizados como biomarcadores para el diagnóstico temprano de la EA.

Se ha sugerido que la deficiencia de melatonina desempeña un papel importante en el desarrollo de la EA (Wang y Wang, 2006). Cardinali *et al.*, en el 2002, reportaron que aproximadamente el 45% de pacientes con EA presentan alteraciones del sueño y agitación por la tarde-noche. Esto se debe a que se ha encontrado una disminución de la secreción de melatonina en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esta enfermedad (Wu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1999). De la misma forma, se ha pensado que la administración de melatonina a pacientes con EA contribuye al mejoramiento de la ritmicidad circadiana y memoria (Cohen *et al.*, 2000; Brusco *et al.*, 2000; Cardinali *et al.*, 2002). Igualmente, se ha propuesto que ésta ayuda al retraso de los procesos patológicos de la enfermedad, tales como la formación de MN y placas seniles (Grundman *et al.*, 2002; Matsubara *et al.*, 2003).

En esta tesis se estudió el efecto de la melatonina en la regulación de la fosforilación de tau; dicha sustancia disminuye este proceso en las ser 199-202 y 396-404. Por lo que concuerda con varios estudios donde la melatonina fue capaz de disminuir la fosforilación de tau inducida por wortmanina, caliculina A y ácido ocaidaico (Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Otros estudios indican que también inhibe la actividad de la GSK-3 $\beta$  inducida por la wortmanina, por lo que

reduce los niveles de fosforilación de tau en los epitopes ser 199-202 y 396-404 (Deng *et al.*, 2005). Esto coincide con nuestro trabajo; ya que se encontraron de manera satisfactoria los mismos resultados.

En el presente análisis, se realizó una curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones de melatonina y se observó que, para ambos epitopes, la concentración donde hubo una mayor disminución de fosforilación fue  $10^{-7}$ M. En la mayoría de los estudios realizados se ha demostrado que el decremento de la fosforilación de tau está en el rango  $\mu$ M (Deng *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). En esta investigación se encontró que rangos nM tienen un efecto en la disminución de la fosforilación de tau. De esta forma resulta importante conocer estos estándares debido a que se sabe que las concentraciones fisiológicas en el cerebro se encuentran dentro de estas concentraciones.

Desafortunadamente, el mecanismo por el cual la melatonina disminuye la fosforilación de tau no se conoce a cabalidad. Varios estudios proponen que podría estar previniendo dicho proceso a través de sus efectos antioxidantes y mediante la regulación de la actividad de algunas cinasas y fosfatasas (Deng *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). La eficacia de la melatonina en la inhibición del daño oxidativo ha sido probada en varios modelos de neurodegeneración (Guillemin *et al.*, 2002; Cabrera *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2000; Montilla-Lopez *et al.*, 2002).

También se ha observado que es capaz de inhibir la actividad de algunas enzimas y así regular la fosforilación de tau. Asimismo, disminuye la actividad de la PKA inducida por isoprotenerol, promueve la inactivación de la PPA por medio de la caliculina e inhibe la actividad de la GSK-3 $\beta$  provocada por la wortmanina (Deng *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004).

Estudios previos han demostrado que la GSK-3 $\beta$  fosforila a la proteína tau en los epitopes ser 199-202 (serinas específicas reconocidas por el anticuerpo tau-1) y las ser 396-404 (Lovestone *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2002; Agarwal –Mawal *et al.*, 2003). Li *et al.*, en el 2006, con un modelo químico de degeneración neuronal que

consiste en utilizar a la wortmanina como un activador indirecto de la GSK-3 $\beta$ , observaron que la activación de esta enzima incrementa la fosforilación en el epitope 396-404 de la proteína tau, junto con una reducción en la inmunotinción del anticuerpo tau-1 que reconoce el epitope 189-207, cuando éste no se encuentra fosforilado en las ser 199-202. Sin embargo, poco se sabe sobre la capacidad de la melatonina para actuar como un modulador enzimático; ya sea por interacción directa con la enzima o indirectamente al regular otras proteínas río arriba de la cascada de señalización.

El mecanismo regulatorio por el cual la melatonina disminuye la fosforilación de tau mediante la regulación de algunas enzimas aún no se entiende completamente. Para estudiar si el efecto de la melatonina sobre la disminución en la fosforilación de tau era mediado por la GSK-3 $\beta$ , se evaluó la cantidad de GSK-3 $\beta$  total, el estado de inactivación (fosforilación en la ser-9) y la actividad de la enzima.

La actividad de la GSK-3 $\beta$  puede ser controlada por la fosforilación en la ser 9/21 (Bhat *et al*, 2000; Bijur y Jope 2001). Para corroborar si la disminución en la fosforilación de tau en los cultivos incubados con melatonina que era mediada por la GSK-3 $\beta$ , se analizó el estado de inactivación de esta cinasa mediante el incremento en la fosforilación en la ser 9. Nuestro estudio demostró que la melatonina incrementa la fosforilación en la ser-9 de la GSK-3 $\beta$  y este incremento se correlaciona con la disminución de la fosforilación de tau en el epitope ser 396-404 y 199-202. Estos datos sugieren que la melatonina podría estar jugando un papel importante en el mantenimiento de la actividad fisiológica de la GSK-3 $\beta$ .

Estudios realizados *post mortem* han mostrado los siguientes resultados: en primera instancia sugieren que tanto los niveles como la actividad de la GSK-3 $\beta$  podrían estar incrementados en pacientes con EA. También han evaluado de manera indirecta la actividad de la GSK-3 $\beta$ , ya sea midiendo su nivel de expresión (Pei *et al.*, 1997) o mediante cambios en su estado de fosforilación, ya que representan un indicativo de activación (Leroy *et al.*, 2007). De la misma manera, han mostrado una co-localización de la GSK-3 $\beta$  en las MN en neuronas piramidales del hipocampo (Pei *et al.*, 1997; Pei *et al.*, 1999).

Igualmente, se ha observado un incremento en los niveles de expresión de la GSK-3 $\beta$  total en neuronas que presentan MN (Pei *et al.*, 1999) y se ha encontrado un aumento en los niveles de la forma activa de GSK-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ pTyr216), así como una disminución en la inactiva (GSK-3 $\beta$ p ser 9) (Leroy *et al.*, 2007). También, se ha observado que los niveles de expresión de la GSK-3 $\beta$  están regulados positivamente en neuronas del hipocampo de pacientes con EA (Blalock *et al.*, 2004).

Es relevante explicar que todos estos estudios anteriormente citados son realizados en biopsias obtenidas *post mortem* o en modelos químicos de degeneración neuronal; sin embargo, no hay estudios que evalúen los niveles, la actividad, ni la activación de la GSK-3 $\beta$  en muestras biológicas de pacientes vivos.

En este estudio, se observó que los extractos celulares de los precursores neuronales obtenidos del epitelio olfatorio de pacientes con EA que, como se mencionó anteriormente, son un modelo a modo de espejo que refleja los cambios patológicos presentes en pacientes vivos con EA, presentan una disminución en la cantidad de GSK-3 $\beta$  total comparada con los sujetos control. También se observó que no existen cambios significativos en los niveles de GSK-3 $\beta$  inactiva (fosforilada en la ser 9) en los pacientes con EAI; sin embargo, sí hay una mayor cantidad de tau fosforilada en la ser 9 de los pacientes con EAI, lo que nos indica que hay una mayor cantidad de GSK-3 $\beta$  activa.

Hay pocos estudios que evalúen directamente la actividad de GSK-3 $\beta$  en cerebros de pacientes vivos con EA, ya que técnicamente es difícil medir la actividad enzimática en el tejido cerebral *post mortem*. Algunas investigaciones realizadas en autopsias de pacientes reportan que no existen cambios en actividad de GSK-3 $\beta$  cuando comparan muestras con sujetos control (Pei *et al.*, 1997). Incluso, algunos estudios *post mortem* reportan que la actividad de esta enzima se encuentra reducida en pacientes con EA (Swatton *et al.* 2004).

En nuestro estudio, se hallaron los mismos resultados al contrastar al enfermo con el sujeto control y esta disminución es más evidente en pacientes en etapas avanzadas de dicha enfermedad. Debido a que la actividad de la GSK-3 $\beta$  y la

cantidad total de la enzima en los precursores neuronales se encuentran disminuidas en pacientes con EA, no podemos atribuir completamente la hiperfosforilación de la proteína tau en las ser 199-202 y las ser 396-404 a la actividad de esta enzima.

Sin embargo, es claro que tiene un papel importante en la etiología de la EA. Ya que se ha reportado que dentro de la EA existe un desequilibrio en la acción de diferentes cinasas y fosfatasa (Bue *et al.*, 2000), podemos concluir que otras cinasas están involucradas en la hiperfosforilación de tau en las ser 199-202 y ser 396-404.

Por otra parte, se ha observado que la GSK está involucrada en la producción y formación del péptido amiloide  $\beta$ . Se ha demostrado que la GSK-3 $\alpha$  regula el rompimiento del PPA y, de esta manera, incrementa la formación del péptido amiloide  $\beta$  (Sun *et al.*, 2002; Phiel *et al.*, 2003). Se ha observado que al incubar neuronas con el péptido amiloide  $\beta$  se incrementa la actividad de la GSK-3 $\beta$  a través de la inhibición de la vía de señalización de la cinasa de PI3 y que el bloqueo tanto de la expresión como de la actividad de esta enzima evita la neurodegeneración inducida por este péptido (Takashima *et al.* 1993, 1996; Alvarez *et al.* 1999).

También se ha observado que la GSK-3 $\beta$  fosforila a la proteína precursora amiloide (Aplin *et al.*, 1996, 1997) y que también el péptido A $\beta$  activa esta enzima (Takashima *et al.*, 1995). De igual manera, se ha observado que la neurotoxicidad producida por el péptido A $\beta$  se reduce al colocar un oligonucleótido antisentido de la GSK-3 $\beta$  (Takashima *et al.*, 1993) y al incubarlo con litio (Alvarez *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2000). Asimismo se ha reportado que la activación de la GSK-3 $\beta$  inducida por el péptido A $\beta$  puede aumentar los niveles de fosforilación de la proteína tau, lo que puede contribuir a la acumulación de tau hiperfosforilada y la formación de las MN (Takashima *et al.*, 1996, 1998). Por lo tanto, el péptido A $\beta$  puede contribuir a la activación de la GSK-3 $\beta$ , la cual además fosforila y contribuye a la neurotoxicidad inducida por el péptido, lo cual puede aumentar la fosforilación de tau y contribuir a la muerte neuronal.

La GSK-3 fosforila y activa a la glicógeno sintasa, última enzima en la biosíntesis del glucógeno. Se sabe que el 80% de los pacientes con EA presentan

una desregulación en el metabolismo de la glucosa, un aumento en el estrés oxidativo y una resistencia a la insulina. Estudios de imágenes cerebrales obtenidas por TEP donde se mide la fluorodesoxiglucosa (FDG), utilizada para hacer una valoración del metabolismo de la glucosa en el cerebro, muestran un hipometabolismo en las zonas temporoparietal y frontotemporal en el cerebro del paciente (Blennow *et al.*, 2006).

También se ha reportado que existe un polimorfismo en el promotor de GSK-3 $\beta$  que es un factor de riesgo de la EA. Estas evidencias podrían en parte explicar las alteraciones encontradas en los niveles de GSK-3 $\beta$  en los precursores neuronales de los pacientes con EA. No obstante, estos cambios en el metabolismo cerebral pueden ser en parte por la disfunción y los bajos niveles de GSK-3 $\beta$  encontrados en los precursores neuronales de pacientes con la enfermedad antes mencionada.

Igualmente, se encontró que la melatonina es capaz de promover la fosforilación de la GSK-3 $\beta$  en la ser 9, que es un indicativo de inactivación de la enzima, la concentración donde se observó una mayor inhibición de ésta fue  $10^{-7}$ M, concentración fisiológica de melatonina. También esta sustancia disminuye la actividad de la GSK-3 $\beta$  y esta inhibición se acentúa al incubarla además con LiCl. Por lo que podemos concluir que la melatonina puede proteger a las células del daño inducido por la hiperfosforilación de tau al inhibir la actividad de la GSK-3 $\beta$ . Sin embargo debido a que la cantidad total de la GSK-3 $\beta$  y la actividad de la enzima en los precursores neuronales se encuentran disminuidas en pacientes con EA, no podemos concluir que la disminución de la fosforilación de tau inducida por melatonina se deba únicamente a la inactivación de la GSK-3 $\beta$  si no también a la regulación de la actividad de algunas otras cinasas y fosfatasas.

## XII. REFERENCIAS

- Abe M, Itoh MT, Miyata M, Ishikawa S, Sumi Y. Detection of Melatonin, Its Precursors and Related Enzyme Activities in Rabbit Lens. *Exp. Eye Res.*, 1999; 68: 255-262.
- Agarwal-Mawal A., Paudel H.K. Neuronal Cdc2-like protein kinase (Cdk5/p25) is associated with protein phosphatase 1 and phosphorylates inhibitor-2. *J Biol Chem.* 2001; 276 (26): 23712-23718.
- Agarwal-Mawal A., Qureshi H.Y., Cafferty P.W., Yuan Z., Han D., Loin R., Paudel H.K. 14-3-3 Connects glycogen synthase kinase-3b to Tau within a brain microtubule-associated Tau phosphorylation complex. *J Biol Chem*, 2003; 278: 12722–12728
- Aksenov M. Y., Aksenova M. V., Butterfield D. A., Geddes J. W. Markesbery W. R. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2001; 103 (2): 373-383.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. *Biología molecular de la célula.* Cuarta edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. 1996: 843-924.
- Allison T, Parkin E, Turner A, Hooper N. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 2003; 74: 342-352
- Alonso A.C., Grundke-Iqbal I., Barra H.S., Iqbal K. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 298–303.
- Andersen P., Morris R., Amaral D., Bliss T., O'Keefe J. *The Hippocampus book.* Chapter 2: Historical Perspective by Andersen et al. and Chapter 3 Hippocampal neuroanatomy. Oxford University Press. United States. 2007: 3-115
- Anton –tay F., Ramirez-Rodriguez G., Martinez I., Benitez-King G. In Vitro Stimulation of Protein Kinase C by Melatonin. *Neurochemical Research*, 1998; 23 (5): 601-606
- Arnold S.E., Smutzer G.S., Trojanowski J.Q., Moberg P.J. Cellular and molecular neuropathology of the olfactory epithelium and central olfactory pathways in Alzheimer's disease and schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci.*, 1998; 855: 762-75

- Arnold S. E., Lee E.B., Moberg P.J., Stutzbach L., Kazi H., Han Li-Ying., Lee V., Trojanowski J.Q. Olfactory Epithelium Amyloid- $\beta$  and PHFtau Pathology in Alzheimer's Disease *Ann Neurol.* 2010; 67(4): 462–469.
- Astic L., Saucier D. Neuronal plasticity and regeneration in the olfactory system of mammals: morphological and functional recovery following olfactory bulb deafferentation. *Cell Mol Life Sci.*, 2001; 58 (4): 538-45
- Asuni A. A., Hooper C., Reynolds C. H., Lovestone S., Anderton B. H. and Killick R. GSK3 $\alpha$  exhibits beta-catenin and tau directed kinase activities that are modulated by Wnt. *Eur. J. Neurosci.* 24, 2006; 3387–3392.
- Attems J., Jellinger K.A. Olfactory tau pathology in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Clin Neuropathol.* 2006; 25: 265–271
- Bacon Moore A.S., Paulsen J.S., Murphy C. A test of odor fluency in patients with Alzheimer's and Huntington's disease. *J Clin Exp Neuropsychol.*, 1999; 21 (3): 341-51
- Bamburg J.R., Bloom G.S. Cytoskeletal Pathologies of Alzheimer Disease. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2009; 66(8): 635–649
- Beaulieu-Bonneau S. Hudon C. Sleep disturbances in older adults with mild cognitive impairment. *International Psychogeriatrics*, 2009; 21 (4): 654–666
- Behl C., Davis J.B., Lesley R., Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid  $\beta$  protein toxicity. *Cell*, 1994; 77 (6): 817–827
- Benitez-King G, Hernandez ME, Tovar R, Ramirez G. Melatonin activates PKC-alpha but not PKC-epsilon in N1E-115 cells. *Neurochem Int* 2001; 39: 95–102
- Benitez-King G, Rios A, Martinez A, Anton-Tay F. In vitro inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1290: 191–6
- Benitez-King G., Ramirez G. Protein C/calmodulin: An intracellular signaling system involved in actin. Microfilament rearrangements elicited by melatonin. *Neuro Immuno Modulation.*1999; (6): 448
- Benitez-King G. PKC activation by melatonin modulates vimentin intermediate filament organization in N1E-115 cells. *J Pineal Res* 2000; 29(1):8-14
- Benitez-King G, Túnez I, Bellon A, Ortíz GG, Antón-Tay F. Melatonin prevents cytoskeletal alterations and oxidative stress induced by okadaic acid in N1E-115 cells. *Exp Neurol.* 2003; 182 (1): 151-9

- Benitez-King G., Ramírez-Rodríguez G., Ortíz L., Meza I. The Neuronal Cytoskeleton as a Potential Therapeutical Target in Neurodegenerative Diseases and Schizophrenia *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders*, 2004; 3, 515-533
- Benítez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res.* 2006; 40 (1): 1-9
- Benítez-King G. La melatonina: un coadyuvante potencial en el tratamiento de las demencias de salud mental 2008; 31: 221-228
- Benítez-King G., Ortíz-López L., Jiménez-Rubio G., Ramírez-Rodríguez G. Haloperidol causes cytoskeletal collapse in N1E-115 cells through tau hyperphosphorylation induced by oxidative stress: Implications for neurodevelopment. *Eur J Pharmacol.*, 2010; 644(1-3):24-31
- Benítez-King G, Riquelme A, Ortíz-López L, Berlanga C, Rodríguez-Verdugo MS, Romo F, Calixto E, Solís-Chagoyán H, Jiménez M, Montaña LM, Ramírez-Rodríguez G, Morales-Mulia S, Domínguez-Alonso A. A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *J Neurosci Methods.* 2011;201(1):35-45.
- Bensimon G., Chermat R. Microtubule disruption and cognitive defects: effect of colchicine on learning behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991; 38 (1):141-5
- Bhat R. V., Shanley J., Correll M. P., Fieles W. E., Keith R. A., Scott C. W. Lee C. M. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2000; 97 (20): 11074–11079
- Bijur G. N., Jope R. S. Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276 (40): 37436–37442
- Billingsley ML, Kincaid RL. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J* 1997; 323: 577–91
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* 1985; 101: 1371- 1378
- Bissette G., Smith W. H., Dole K. C., Crain B., Ghanbari H., Miller B., and Nemeroff C. B. (1991) Alterations in Alzheimer's disease-associated protein in Alzheimer's disease frontal and temporal cortex. *Arch. Gen. Psychiat.* 48, 1009-1012.

- Blalock E. M., Geddes J. W., Chen K. C., Porter N. M., Markesbery W. R., Landfield P. W. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *PNAS*. 2004; 101 (7): 2173–2178
- Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and Molecular Mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002; 2, 113-132
- Blennow K, De Leon M J, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006; 368 (9533): 387–403
- Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet* 2003; 2: 605-613
- Bohm K.J., Vater W., Steinmetzer P., Kusnetsov S.A., Rodionov V.I., Gelfand V.I., Unger E. Effect of MAP1, MAP2, and tau proteins on structural parameters of tubulin assemblies, *Acta Histochem. Suppl.* 1990; 39: 357–364
- Bordt SL, McKeon RM, Li PK, Witt-Enderby PA, Melan MA. N1E-115 mouse neuroblastoma cells express MT1 melatonin receptors and produce neurites in response to melatonin. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1499: 257–64
- Bouras C., Hof P.R., Giannakopoulos P., Michel J.P., Morrison J.H. Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: a quantitative evaluation of a one-year autopsy population from a geriatric hospital, *Cereb. Cortex* 1994; 4: 138–150
- Braak H., Braak E. Demonstration of amyloid deposits and neuro-fibrillary changes in whole brain sections, *Brain Pathol.* 1991 1: 213–216
- Braak E, Braak H, Mandelkow EM. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol (Berl)* 1994; 87: 554–67
- Braak H., Braak E. Pathology of Alzheimer's disease. In: Calne D, ed. *Neurodegenerative Diseases*. 1994; 585-614
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991; 82: 239–259.
- Bramblett G. T., Trojanowski J. Q., and Lee V. M. Y. Regions with abundant neurofibrillary pathology in human brain exhibit a selective reduction in levels of binding-competent  $\tau$  and accumulation of abnormal  $\tau$ -isoforms (A68 proteins). *Lab Invest.* 66, 1992; 212-222.

- Brandt R., Lee G. Orientation, assembly, and stability of microtubule bundles induced by a fragment of tau protein. *Cell Motil. Cytoskeleton* 1994; 28: 143 -154
- Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature*. 2006; 443:796-802
- Brion J.P., Couck A.M., Passareiro E., Flament-Durand J. Neuro- fibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study, *J. Submicrosc. Cytol.* 1985; 17: 89–96
- Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2007 Jul; 3 (3):186-91
- Brujin L.I., Houseweart M.K., Kato S., Anderson K.L., Anderson S.D., Ohama E., Reaume A.G., Scott R.W., Cleveland D.W. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*, 1998; 281(5384):1851-1854
- Brunig I., Sommer M., Hatt H., Bormann J. Dopamine receptor subtypes modulate olfactory bulb gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96 (5): 2456-60
- Brusco L.I., Marquez M., Cardinali D.P. Monozygotic twins Alzheimer's disease treated with melatonin: Case report. *J. Pineal Res.* 1998; 25: 260-263
- Brusco LI, Marquez M, Cardinali DP. Melatonin treatment stabilizes chronobiologic and cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuroendocrinol. Lett.* 2000; 21: 39-42
- Brzezinski A., Seibel M.M., Lynch H.J., Deng M.H., Wurtman R.J. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987; 64 (4): 865-7
- Bucciantini M., Giannoni E., Chiti F., Baroni F, Formigli L., Zurdo J., Taddei N., Ramponi G., Dobson C.M., Stefani M. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, 2002; 416 (6880): 507-511
- Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; 33 (1): 95-130.
- Bue´e-Scherrer V., Bue´e L., Hof P.R., Leveugle B., Gilles C., Loerzel A.J., Perl D.P., Delacourte A. Neurofibrillary degeneration in amyotrophic lateral sclerosis /parkinsonism–dementia complex of Guam. Immunohistochemical characterization of tau proteins, *Am. J Pathol.* 1995; 146: 924–932

- Bue´e-Scherrer V., Bue´e L., Leveugle B., Perl D.P., Vermersch P., Hof P.R., Delacourte A. Pathological tau proteins in postencephalitic parkinsonism: comparison with Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders, *Ann. Neurol.* 1997; 42: 356–359
- Buee-Scherrer V., Hof P.R., Bue´e L., Leveugle B., Vermersch P., Perl D.P., Olanow C.W., Delacourte A. Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease, *Acta Neuropathol.* 1996; 91: 351–359
- Buee-Scherrer V., Condamines O., Mourton-Gilles C., Jakes R., Goedert M., Pau B., Delacourte A. AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against Tau proteins found in Alzheimer's disease. *Molecular Brain Research.* 1996; 39: 79-88.
- Burns A, Byrne EJ, Konrad M. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2002; 360: 163–65.
- Burtner KA, Kirschner MW. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J. Cell Biol.* 1991; 115: 717-730
- Butler M, Shelanski ML. Microheterogeneity of microtubule-associated tau proteins is due to differences in phosphorylation. *J Neurochem.* 1986 Nov; 47 (5): 1517–1522.
- Buxbaum J.N., Tagoe C.E. The genetics of the amyloidosis. *Annu Rev Med.* 2000; 51: 543-569.
- Cabrera J, Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Sainz RM, Mayo JC, Garcia JJ, Kim SJ, El-Sokkary G. Melatonin reduces oxidative neurotoxicity due to quinolinic acid: in vitro and in vivo findings. *Neuropharmacology* 2000; 39: 507–14.
- Calhoun ME., Burgermeister P., Phinney AL., Stalder M., Tolnay M., Wiederhold K.H., Abramowski D., Sturchler-Pierrat C., Sommer B., Staufenbiel M., Jucker M. Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein result in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1999; 96 (24): 14088-14093
- Calof A.L., Bunnin A., Crucker C., Kawauchi S., Murray R.C., Shou J., Wu H.H. Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. *Microsc. Res. Tech* 2002; 58: 176-188
- Cardinali D.P., Freire F. Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formations in the hypothalamus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1975; 2 (5): 317–330

- Cardinali DP, Brusco LI, Lloret SP, Furio AM. Melatonin in sleep disorders and jet-lag. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23 Suppl 1: 9–13.
- Cardinali DP, Brusco LI, Liberzuk C, Furio AM. The use of melatonin in Alzheimer's disease. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23: 20-23.
- Carlberg C., Wiesenberg I., The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *Journal of Pineal Research*, 1995; 18 (4): 171–178
- Carr, W.E., Gleeson, R.A., Trapido-Rosenthal, H.G.(1990) The role of perireceptor events in chemosensory processes. *Trends in Neurosci.*13(6), 212-215.
- Caughey B, Baron GS. Prions and their partners in crime. *Nature*. 2006; 443: 803-810
- Chevalier-Larsen E., Holzbaur E.L. Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1762 (11-12):1094-108
- Cho J. H. and Johnson G. V. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J. Biol. Chem.* 278, 2003; 187–193.
- Cleveland D.W., Hwo S.Y., Kirschner M.W. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol.* 1977; 116 (2): 207-25
- Cochen V., Arbus C., Soto M.E., Villars H., Tiberge M., Montemayor T., Hein C., Veccherini M.F., Onen S.H., Ghorayeb I., Verny M., Fitten L.J., Savage J., Dauvilliers Y., Vellas B. Sleep disorders and their impacts on healthy, dependent, and frail older adults. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 2009; 13 (4): 322– 329
- Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem.* 1989; 58: 453-508
- Cohen-Mansfield J, Garfinkel D, Lipson S. Melatonin for treatment of sundowning in elderly persons with dementia: a preliminary study. *Arch Gerontol Geriatr* 2000; 31: 65–76
- Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni GJM. Evidence for Melatonin Synthesis in Mouse and Human Bone Marrow Cells. *J. Pineal Res.*, 2000; 28: 192-202.

- Coon, H.G., Curcio, F., Sacaguchi, K., Brandi, M.L., Swerdlow R.D. (1989) Cell cultures of neuroblasts from rat olfactory epithelium that show odorant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1703-1707
- Corsellis J.A., Bruton C.J., Freeman-Browne D. The aftermath of boxing, *Psychol. Med.* 1973; 3: 270–303
- Dahl AR. The effect of cytochrome P-450-dependent metabolism and other enzyme activities on olfaction. In: Margolis FL, Getchell TV, editors. *Molecular Neurobiology of the Olfactory System*. New York: Plenum Press; 1988. pp. 51–70.
- D'Amato RJ, Zweig RM, Whitehouse PJ, Wenk GL, Singer HS, Mayeux R, Price DL, Snyder SH. Aminergic systems in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1987;22(2):229–36.
- Delacourte A., De´fossez A. Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments, *J. Neurol. Sci.* 1986; 76: 173–186
- Delacourte A., Flament S., Dibe E.M., Hublau P., Sablonnie`re B., He´mon B., Scherrer V., De´fossez A. Pathological proteins Tau 64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease. Demonstration with a panel of antibodies against Tau proteins, *Acta Neuropathol.* 1990; 80: 111–117
- Delacourte A., David J.P., Sergeant N., Bue´e L., Wattez A., Vermersch P., Ghazali F., Fallet-Bianco C., Pasquier F., Lebert F., Petit H., Di Menza C. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease, *Neurology* 52, 1999; 1158–1165.
- Delacourte A., Sergeant N., Wattez A., Gauvreau D., Robitaille Y. Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation *Ann. Neurol.* 43, 1998; 193–204.
- Deng Y.Q., Xu G.G., Duan P., Zhang Q., Wang J.Z. Effects of melatonin on wortmannin-induced tau hyperphosphorylation. *Acta Pharmacol Sin.* 2005; 26: 519–26
- De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci.* 2000; 113: 1857-1870
- Di Benedetto G., Gill J., Lopez-Vidriero MT., Clarke SW. The effect of cryopreservation on ciliary beat frequency of human respiratory epithelium. *Cryobiology* 1989; 26, 328-332

- DiFiglia M., Sapp E., Chase K.O., Davies S.W., Bates G.P., Vonsattel J.P., Aronin N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, 1997; 277 (5334): 1990-1993
- Doghramji K. Melatonin and its receptors: A new class of sleep promoting agents. *Journal of Clinical Sleep Medicine Supplement* 2007; 3 5
- Doraiswamy PM. The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in Alzheimer's disease: therapeutic potential. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2003;3(5):373–8.
- Doty RL. Olfaction. *Annual Review of Psychology*, 2001; 52: 423-52
- Doty, R.L. Odor perception in neurodegenerative diseases. In: Doty RL, editor. *Handbook of Olfaction and Gustation*. 2. New York: Marcel Dekker; 2003. pp. 479–502
- Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci.* 1995 Feb; 16 (2): 50-6
- Eldar-Finkelman H. Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med.* 2002 Mar ;8 (3):126-32.
- Engel T., Goni-Oliver P., Lucas J. J., Avila J. and Hernandez F. Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J. Neurochem.* 2006 99: 1445–1455.
- Facciola, G., Hidestrand M., von Bahr C., Tybring G. Cytochrome P isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2001; 56 (12): 881–888
- Feany M.B., Mattiace L.A., Dickson D.W. Neuropathologic overlap of progressive supranuclear palsy, Pick's disease and corticobasal degeneration, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996; 55: 53–67
- Feron F., Perry C., Hirning M.H., McGrath J., Mackay-Sim A. Altered adhesion, proliferation and death in neural cultures from adults with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 1999;40 (3): 211 – 218
- Feron F., Perry C., McGrath J.J., Mackay-Sim A. New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1998; 124(8): 861-866.
- Ferreira A., Busciglio J., Caceres A., Microtubule formation and neurite growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro: evidence for the involvement of the microtubule-associated proteins, MAP1a, HMW-MAP2 and Tau, *Dev. Brain Res.* 1989; 49: 215–228

- Flament S., Delacourte A., Hemon B., De´fossez A. Direct demonstration of abnormal phosphorylation of Tau microtubular proteins in Alzheimer’s disease, *C.R. Acad. Sci. III* 1989; 308:77–82
- Fleming L.M., Johnson G.V., Modulation of the phosphorylation state of tau in situ: the roles of calcium and cyclic AMP, *Biochem J.* 309 (1995) 41–47.
- Fotuhi M., Hachinski V., Whitehouse, P. J. Changing perspectives regarding late-life dementia. *Nature Reviews Neurology*, 2009; 5 (12): 649–658.
- Frame S., Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J.* 2001 Oct 1; 359 (Pt 1):1-16.
- Fuhrberg B, Hardeland R, Poeggeler B, Behrmann G. Dramatic Rises of Melatonin and 5-Methoxytryptamine in *Gonyaulax* exposed to decreased temperature. *Biol. Rhythm. Res.*, 1997; 28, 144-150.
- Geddes J.F., Hughes A.J., Lees A.J., Daniel S.E. Pathological overlap in cases of parkinsonism associated with neurofibrillary tangles. A study of recent cases of postencephalitic parkinsonism and comparison with progressive supranuclear palsy and Guamanian parkinsonism–dementia complex, *Brain.* 1993; 1 (16): 281–302
- Getchell, T.V., Margolis, F.L., Getchell, M.L. (1984). Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction *Progress in Neurobiology* 23 (4), 317-345
- Ghetti B., Dlouhy S.R., Giaccone G., Bugian O., Frangione B., Farlow M.R., Tagliavini F., Gerstmann–Straussler–Scheinker disease and the Indiana kindred, *Brain Pathol.* 1995; 5: 61–75
- Giannakopoulos P., Hof P.R., Michel J.P., Guimon J., Bouras C. Cerebral cortex pathology in aging and Alzheimer’s disease: a quantitative survey of large hospital-based geriatric and psychiatric cohorts, *Brain Res. Rev.* 1997; 25: 217–245
- Glenner G.G., Wong C.W. Alzheimer’s disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 120 (3): 885-890
- Goedert M., Jakes R., Qi Z., Wang J.H., P. Cohen, Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase, *J. Neurochem.* 65 (1995) 2804–2807

- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neurons*. 1989; 3: 519-526
- Goedert, M, Spillantini M.G., Cairns N.J., Crowther R.A. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms, *Neuron* 8 (1992) 159–168.
- Goode N., Hughes K., Woodgett J.R., Parker P.J. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *J Biol Chem*. 1992; 267: 16878–16888
- Goode BL, Feinstein SC, Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau, *J. Cell Biol*. 1994, 124; 769–782.
- Goto S., Yamamoto H., Fukunaga K., Iwasa T., Matsukado Y., Miyamoto E., Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin by calcineurin, *J. Neurochem*. 45 (1985) 276–283
- Graziadei P.P.C., Monti-Graziadei G.A. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of olfactory sensory neurons, *J. Neurocytol*. 1979; 8: 1-18
- Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI, Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau, *J. Biol. Chem*. 1992, 267; 564–569
- Greenwood J.A., Scott C.W., Spreen R.C., Caputo C.B., Johnson G.V. Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem*. 1994; 269 (6):4373-80
- Griffin J. W., Watson, D. F. Axonal transport in neurological disease. *Ann. Neurol*. 1988; 23: 3-13
- Grimes C.A., Jope R.S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*. 2001; 65 (4):391-426
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y.C., Zaidi M.S., Wisniewski H.M. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments, *J. Biol. Chem*. 1986; 261: 6084–6089
- Grundman M, Grundman M, Delaney P. Antioxidant strategies for Alzheimer's disease. *Proc Nutr Soc* 2002; 61: 191–202.

- Guillemin GJ, Brew BJ. Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. *Redox Rep* 2002; 7:199–206
- Gutierrez L prevalence of Dementia and Mild Cognitive Impairment in subjects 65 years and older in Mexico City. An Epidemiological Survey Actas del 17 World Congress of the International Association of Gerontology. Vancouver Julio 2001
- Hahn, C.G., Han, L.Y., Rawson, N.E., Mirza, N., Borgmann-Winter, K., Lenox, R.H., Arnold S.E. In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.* 2005; 483, 154–163
- Hahn, C.G., Gomez, G., Restrepo, D., Friedman, E., Josiassen, R., Pribitkin, E.A., Lowry, L.D., Gallop, R.J., Rawson, N.E. (2005). Aberrant intracellular calcium signaling in olfactory neurons from patients with bipolar disorder. *Am.J.Psychiatry* 162, 616-618
- Hamre KM, Hyman BT, Goodlett CR, West JR, Van Hoesen GW. Alz-50 immunoreactivity in the neonatal rat: changes in development and co-distribution with MAP-2 immunoreactivity. *Neurosci Lett.* 1989 Apr 10; 98 (3):264-71.
- Hanger D. P., Hughes K., Woodgett J. R., Brion J. P. Anderton B. H. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's diseaselike phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci. Lett.* 1992; 147 (1): 58–62
- Hardeland R., Tan D.X., Reiter R.J. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *Journal of Pineal Research*, 2009; 47 (2): 109–126
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 2006; 38: 313-316.
- Harrington C. R., Mukeatova-Ladinska E. B., Hills R., Edwards P. C., de Garcini E. M., Novak M., and Wischik C. M. Measurement of distinct immunochemical presentations of tau protein in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1991; 5842-5846.
- Harrington C. R., Perry R. H., Per D, E. K., Hurt J., McKeith I. G., Roth M., and Wischik C. M. (1994) Senile dementia of Lewy Body-type and Alzheimer type are biochemically distinct in terms of paired helical filaments and hyperphosphorylated tau protein. *Dementia* 5, 215-218.
- Hasegawa M, Jakes R, Crowther RA, Lee VMY, Ihara Y, Goedert M. Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein, *FEBS Lett.* 1996, 384: 25–30.

- Hauw J.J., Verny M., Delaere P., Cervera P., He Y., Duyckaerts C. Constant neurofibrillary changes in the neocortex in progressive supranuclear palsy. Basic differences with Alzheimer's disease and aging, *Neurosci. Lett.* 1990; 119: 182–186
- Hemmings B.A., Aitken A., Cohen P., Rymond M., Hofmann F. Phosphorylation of the type-II regulatory subunit of cyclic-AMP-dependent protein kinase by glycogen synthase kinase 3 and glycogen synthase kinase 5. *Eur J Biochem.* 1982; 127 (3): 473-81.
- Hensley K., Carney J.M., Mattson M.P., Aksenova M., Harris M., Wu J.F., Floyd R.A., Butterfield D.A. A model for  $\beta$ - amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994; 91 (8): 3270–3274
- Hernández F, Lucas JJ, Cuadros R, Avila J. GSK-3 dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms. *Neurobiol Aging.* 2003 Dec; 24(8):1087-94.
- Hirano A., Malamud N., Elizan T.S., Kurland L.T. Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism–dementia complex on Guam. Further pathologic studies, *Arch. Neurol.* 1966; 15: 35–51
- Hirata F., Hayaishi O., Tokuyama T., Senoh S. In vitro and in vitro formation of two new metabolites of melatonin. *Journal of Biological Chemistry*, 1974; 249 (4): 1311– 1313
- Hock C, Golombowski S, Mullerspahn F, Peschel O, Riederer A, Probst A, Mandelkow EM, Unger J. Histological markers in nasal mucosa of patients with Alzheimer's disease. *Eur. Neurol.* 1998; 40, 31–36.
- Hof P.R., Bouras C., Bue´e L., Delacourte A., Perl D.P., Morrison J.H. Differential distribution of neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of dementia pugilistica and Alzheimer's disease cases, *Acta Neuropathol.* 1992; 85: 23–30
- Hof P.R., Bouras C., Perl D.P., Morrison J.H. Quantitative neuropathologic analysis of Pick's disease cases: cortical distribution of Pick bodies and coexistence with Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol.* 1994; 87: 115–124
- Hof P.R., Bouras C., Perl D.P., Sparks D.L., Mehta N., Morrison J.H. Age-related distribution of neuropathologic changes in the cerebral cortex of patients with Down's syndrome. Quantitative regional analysis and comparison with Alzheimer's disease, *Arch. Neurol.* 1995; 52: 379–391

- Holzer M., Holzapfel H.P., Zedlick D., Bruckner M.K., Arendt T., Abnormally phosphorylated tau protein in Alzheimer's disease: heterogeneity of individual regional distribution and relationship to clinical severity, *Neuroscience* 63, 1994; 499–516.
- Hong M, Lee VM. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons *J Biol Chem.* 1997 Aug 1; 272(31):19547-53.
- Hooper C., Killick R., Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2008; 104 (6): 1433-9.
- Hoshi M., Takashima A., Noguchi K., Murayama M., Sato M., Kondo S., Saitoh Y., Ishiguro K., Hoshino T., Imahori K. Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1996; 93 (7): 2719–2723
- Huang H., Chen L., Wang H., Xiu B., Li B., Wang R., Zhang J., Zhang F., Gu Z., Li Y., Song Y., Hao W., Pang S., Sun J. Influence of patients' age on functional recovery after transplantation of olfactory ensheathing cells into injured spinal cord injury. *Chin Med J.* 2003; 116(10):1488-91
- Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effects of Tryptophan Administration on Circulating Melatonin Levels in Chicks and Rats: Evidence for Stimulation of Melatonin Synthesis and Release in the Gastrointestinal Tract. *Life Sci.*, 1992; 51: 945-953.
- Ikeda S., Kishida M., Matsuura Y., Usui H., Kikuchi A. GSK-3beta-dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin. *Oncogene.* 2000; 19 (4): 537-45.
- Imahori K. and Uchida T. Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem.* 1997; 121 (2): 179–188
- Ingebritsen T.S., Cohen P. The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem.* 1983; 132 (2): 255-61
- Ishiguro, K., Takamatsu, M., Tomizawa, K., Omori, A., Takahashi, M., Arioka, M., Uchida, T., Imahori, K. Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 267, 1992; 10897–108901.
- Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y, Fusama S, Amemiya Y, Sumi Y. Detection of Melatonin and Serotonin Nacetyltransferase and Hydroxyindole-O-methyltransferase in Rat Ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1997; 136: 7-13.

- Jafek B.W., Johnson E.W., Eller P., Murrow B. *Olfactory mucosal biopsy and related histology*. In Seiden, A.M. (ed.), *Taste and Smell Disorders*.1997; 107-127
- Jansen KL, Faull RL, Dragunow M, Synek BL. Alzheimer's disease: changes in hippocampal N-methyl-D-aspartate, quisqualate, neurotensin, adenosine, benzodiazepine, serotonin and opioid receptors--an autoradiographic study. *Neuroscience*. 1990;39(3):613–27.
- Jean-Louis G., Zizi F., Von Gizycki H., Taub H. Effects of melatonin in two individuals with Alzheimer's disease. *Percept. Mot. Skills*. 1998; 87: 331-339
- Jetten, A.M., Kurebayashi, S., Ueda, E. The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2001; 69: 205–247
- Jicha G.A., Weaver C., Lane E., Vianna C., Kress Y., Rockwood J., Davies P. cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in AD. *J Neurosci*. 1999; 19: 7486-7494
- Jiménez-Rubio G., Ugalde O., Ortíz-López L., Ramírez-Rodríguez Kilic U, Kilic E, Reiter RJ, Bassetti CL, Hermann DM. Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res.*, 2005; 38 (1): 67-71
- Jiménez-Rubio G., Benítez-King G., Ortiz-López L. Melatonin Elicits Neuritogenesis and Reverses Tau Hyperphosphorylation in NIE-115 Neuroblastoma Cells Treated with Okadaic Acid. En: Fernández, A.J. ed. *Focus on Neuroblastoma Research*. 2007; 99-117
- Kaakkola S, Palo J, Malmberg H, Sulkava R, Virtanen I. Neurofilament profile in olfactory mucosa of patients with a clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Virchows Arch*. 1994; 424(3):315-9.
- Khan TK, Alkon DL. Early diagnostic accuracy and pathophysiologic relevance of an autopsy-confirmed Alzheimer's disease peripheral biomarker. *Neurobiol Aging*. 2010 Jun;31 (6):889-900.
- Khatoon S., Grundkeqqbal I., and Iqbal K. Brain levels of microtubuleassociate protein r are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmunoslot- blot assay for nanograms of the protein. *J. Neurochem*. 59, 1992;750-753.
- Kidd M. paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature*. 1963; 197 192-193
- Kilic U, Kilic E, Reiter RJ, Bassetti CL, Hermann DM. Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res* 2005; 38: 67–71

- Kim L., Kimmel A.R. GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2000; 10 (5): 508-14
- Kishikawa M, Iseki M, Sakae M, Kawaguchi S, Fujii H. Early diagnosis of Alzheimer's? *Nature.* 1994 (369); 365–366.
- Kiuchi A., Otsuka N., Namba Y., Nakano I., Tomonaga M., Presenile appearance of abundant Alzheimer's neurofibrillary tangles without senile plaques in the brain in myotonic dystrophy, *Acta Neuropathol.* 1991; 82: 1–5
- Kivela A., Kauppila A., Leppaluoto J., Vakkurio O. Melatonin in infants and mothers at delivery and in infants during the first week of life. *Clinical Endocrinology.* 1990; 32 (5): 593–598
- Kosik K.S., Joachim C.L., Selkoe D.J. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 4044–4048
- Kosik KS y Greengerg SM. Tau protein and Alzheimer's disease. En *Alzheimer disease.* Ed. Raven Press New York USA 1994 335-344
- Kovács T, Cairns NJ, Lantos P.L. Amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation in the olfactory bulb in ageing and Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1999; 25, 481–491.
- Kovács T, Cairns NJ, Lantos PL. Olfactory centres in Alzheimer's disease: olfactory bulb is involved in early Braak's stages. *Neuroreport.* 2001; 12, 285–288.
- Kovács T. Mechanisms of olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative disorders. *Ageing Research Review.* 2004: 215–232
- Kowall N.W., Kosi K.S. Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 1997; 22: 639-643
- Landsbury P.T., Lashuel H.A. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature*, 2006; 443 (7113): 774-779
- Lane A.P., Gomez G., Dankulich T., Wang H., Bolger W.E., Rawson N.E. The superior turbinate as a source of functional human olfactory receptor neurons. *Laryngoscope.*, 2002; 112 (7 Pt 1): 1183-9
- Lanza D.C., Deems D.A., Doty R.L., Moran D., Crawford D., Rowley J.C., Sajjadian A., Kennedy D.W. The effect of human olfactory biopsy on olfaction: a preliminary report. *Laryngoscope*, 1994; 104 (7): 837 -840

- Lee J.H., Goedert M., Hill W.D., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Tau proteins are abnormally expressed in olfactory epithelium of Alzheimer patients and developmentally regulated in human fetal spinal cord. *Exp Neurol.*, 1993; 121 (1): 93- 105
- Lee V.M.Y., Balin B.J., Otvos L. Jr., Trojanowski J.Q. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau, *Science* 1991; 251: 675–678
- Leopold D.A., Hummel T., Schwob J.E., Kobal G. Anterior distribution of human olfactory epithelium. *Laryngoscope* 2000; 110: 417-421
- Leroy K., Yilmaz Z. Brion J. P. Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2007; 33 (1): 43–55
- Liu RY, Zhou JN, van Heerikhuize J, Hofman MA, Swaab DF. Decreased Melatonin Levels in Postmortem Cerebrospinal Fluid in Relation to Aging, Alzheimer's Disease, and Apolipoprotein E-Epsilon4/4 Genotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 323–327.
- Li X., Lu F., Tian Q., Yang Y., Wang Q., Wang J.Z. Activation of glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation in rat hippocampus slices in culture. *J Neural Transm.* 2006; 113 (1): 93-102
- Li X., Lu F., Tian Q., Yang Y., Wang Q., Wang J.Z. Activation of glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation in rat hippocampus slices in culture. *J Neural Transm.* 2006; 113 (1): 93-102
- Li XC, Wang ZF, Zhang JX, Wang Q, Wang JZ. Effect of melatonin on calyculin A-induced tau hyperphosphorylation. *Eur J Pharmacol* 2005; 510: 25–30.
- Li SP, Deng YQ, Wang XC, Wang YP, Wang JZ. Melatonin protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from calyculin A-induced neurofilament impairment and neurotoxicity. *J Pineal Res* 2004;36: 186–191.
- Liao H., Li Y., Brautigan D.L., Gundersen G.G. Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau. *J Biol Chem.* 1998; 273 (34): 21901-8
- Liu R. Y., Zhou J. N., van Heerikhuize J., Hofman M. A., Swaab, D. F. Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and apolipoprotein E-ε4/4 genotype. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1999; 84 (1): 323–327

- Liu RY, Zhou JN, van Heerikhuize J, Hofman MA, Swaab DF. Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and apolipoprotein Epsilon4/4 genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 323–7
- Lizcano J. M. Alessi D. R. The insulin-signalling pathway. *Curr. Biol.*, 2002; 12 (7): 236–238.
- Love S., Bridges L.R., Case C.P. Neurofibrillary tangles in Niemann–Pick disease type C, *Brain* 1995; 118: 119–129
- Lovestone S., Hartley C.L., Pearce J., Anderton B.H. Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3b in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neurosci.* 1996; 73: 1145–1157
- Lovestone S y Reynolds CH. The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience* 1997; 78: 309-324
- Lovestone S, Reynolds C H, Latimer D, Davis D R, Anderton B H, Gallo J M, Hanger D, Mulot S, Marquardt B, Stabel S. Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr. Biol.* 1994; 4: 1077–1086.
- Lowe G., Nakamura T., Gold G.H. Adenylate cyclase mediates olfactory transduction for a wide variety of odorants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86 (14): 5641-5
- Lucas J. J., Hernandez F., Gomez-Ramos P., Moran M. A., Hen R. and Avila J. (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J.* 20, 27–39.
- Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2004; 25: 177-195
- Mackay-Sim, A., Chuah, M. Neurotrophic factors in the primary olfactory pathway. *Prog. Neurobiol.* 2000; 62, 527– 559
- Malandrini A., Cavallaro T., Fabrizi G.M., Berti G., Salvestroni R., Salvadori C., Guazzi G.C., Ultrastructure and immunoreactivity of dystrophic axons indicate a different pathogenesis of Hallervorden–Spatz disease and infantile neuroaxonal dystrophy, *Virchows Arch.* 1995; 427: 415–421
- Matsubara E, Shoji M, Murakami T, Kawarabayashi T, Abe K. Alzheimer's disease and melatonin. *Int Congress Series* 2003; 1252: 395–98.

- McCaffrey R.J., Duff K., Solomon G.S. Olfactory dysfunction discriminates probable Alzheimer's dementia from major depression: a cross-validation and extension. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, 2000; 12 (1): 29-33
- McKeith I., Mintzer J., Aarsland D, et al. Dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurology.* 2004; 6 (3):19–28
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology.* 1984 Jul; 34 (7):939-44.
- Menendez-Pelaez A, Howes KA, Gonzalez-Brito A, Reiter RJ. N-Acetyltransferase Activity Hydroxyindole-O-methyltransferase Activity and Melatonin Levels in the Harderian Glands of the Female Syrian Hamster: Changes During the Light: Dark Cycle and the Effects of 6-chlorophenylalanine Administration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987; 145: 1231-1238.
- Mercken M, Vandermeeren M, Lübke U, Six J, Boons J, Vanmechelen E, Van de Voorde A, Gheuens J. Affinity purification of human tau proteins and the construction of a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human tau detection. *J Neurochem.* 1992 Feb; 58 (2):548–553.
- Meredith M. Human vomeronasal organ function: a critical review of best and worst cases. *Chem senses.* 2001; 26 (4): 433-435.
- Meshulam R.I., Moberg P.J., Mahr R.N., Doty R.L. Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Arch Neurol.*, 1998; 55 (1): 84-90
- Miranda S, Opazo C, Larrondo LF, Muñoz FJ, Ruiz F, Leighton F, Inestrosa NC. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2000; 62: 633–48.
- Mishima K., Tozawa T., Satoh K., Matsumoto Y., Hishikawa Y., Okawa M., Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer's type with disturbed sleep-waking. *Biological Psychiatry.* 1999; 45 (4): 417–421
- Montilla-Lopez P, Munoz-Agueda MC, Feijoo Lopez M, Munoz-Castaneda JR, Bujalance-Arenas I, Tunes-Finana I. Comparison of melatonin versus vitamin C on oxidative stress and antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease induced by okadaic acid in neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol* 2002; 451: 237– 43.
- Mucke L. Alzheimer's disease. *Nature*, 2009; 461: 895-897

- Mukaetova-Ladinska E. B., Harrington C. R., Hills R., O'Sullivan A., Roth M., and Wischik C. M. Regional distribution of paired helical filaments and normal tau proteins in aging and in Alzheimer's disease with and without temporal lobe involvement. *Dementia* 3, 1992; 61-69.
- Müller W.E., Eckert A., Kurz C., Eckert G.P., Leuner K. Mitochondrial dysfunction: common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease-therapeutic aspects. *Molecular Neurobiology*, 2010; 41 (2-3): 159–171
- Mulot S.F., Hughes K., Woodgett J.R., Anderton B.H., Hanger D.P., PHF-tau from Alzheimer's brain comprises four species on SDS–PAGE which can be mimicked by in vitro phosphorylation of human brain tau by glycogen synthase kinase-3 beta, *FEBS Lett.* 349, 1994; 359–364.
- Muñoz-Montaña JR, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J. Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett.* 1997 Jul 14; 411(2-3):183-8.
- Nieoullon A. Neurodegenerative diseases and neuroprotection: current views and prospects *J Appl Biomed* 2011; 9: 173–183
- Nowak JZ, Zawilska JB. Melatonin and its physiological and therapeutic properties. *Pharmacy World & Science*, 1998; 20(1): 18-27.
- Ohashi Y, Okamoto N, Uchida K, Iyo M, Mori N, Morita Y. Daily rhythm of serum melatonin levels and effect of light exposure in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Biol Psychiatry* 1999; 45: 1646–52
- Otvos L Jr, Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM. Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res.* 1994 Dec 15; 39 (6):669-73.
- Pagani L, Eckert A. Amyloid- Beta interaction with mitochondria. *International Journal of Alzheimer's disease.* 2011; 925050
- Pan SF, Allen AE. 1986. Extra-pineal Melatonin in the Retina: Its Regulation and Physiological Function, In: *Pineal Research Review*; Reiter RJ; Ed.; Alan R. Liss. New York, USA. vol. 4, pp. 55-59.
- Papasozomenos SC. Tau protein immunoreactivity in dementia of the Alzheimer type. II. Morphology, evolution, distribution, and pathogenetic implications. *Lab Invest.* 1989 Jan; 60 (1): 123–137

- Pappolla M.A., Chyan Y.J., Poeggeler B., Frangione B., Wilson G., Ghiso J., Reiter R.J. An assessment of the antioxidant and the antiamyloidogenic properties of melatonin: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 2000; 107 (2): 203–231
- Parent J.M. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist* 2003; 9 (4):261-72
- Paulus W., Selim M. Corticonigral degeneration with neuronal achromasia and basal neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol.* 1990; 81: 89–94
- Pei J. J., Tanaka T., Tung Y. C., Braak E., Iqbal K. Grundke-Iqbal I. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase- 3 in the Alzheimer disease brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1997; 56 (1): 70–78
- Pei J. J., Braak E., Braak H., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Winblad B. Cowburn R. F. Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1999; 58 (9): 1010– 1019.
- Plattner F, Angelo M, Giese KP. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem.* 2006 Sep 1; 281 (35):25457-65. Epub 2006 Jun 27.
- Plyte S.E., Hughes K., Nikolakaki E., Pulverer B.J., Woodgett J.R. Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1114 (2-3): 147-62
- Pollock N.J., Mirra S.S., Binder L.I., Hansen L.A., Wood J.G., Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease share antigenic determinants with microtubule-associated protein tau, *Lancet.* 1986; 2: 1211
- Price D.L., Wong P.C., Markowska A.L., Lee M.K., Thinakaran G., Cleveland D.W., Sisodia S.S., Borchelt D.R. The value of transgenic models for the study of neurodegenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci.*, 2000; 920: 179-191
- Price JL, Davis PB, Morris JC, White DL. The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1991;12:295–312.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., Lamantia, A-S *Neuroscience.* ed. 2. Sunderland MA: Sinauer Associates, Inc 2001.
- Ramakrishna S., D'Angelo G., Benjamin W.B. Sequence of sites on ATP-citrate lyase and phosphatase inhibitor 2 phosphorylated by multifunctional protein kinase (a glycogen synthase kinase 3 like kinase). *Biochemistry.* 1990; 29 (33): 7617-24

- Rankin C.A., Sun Q., Gamblin T.C. Tau phosphorylation by GSK-3 $\beta$  promotes tangle-like filament morphology *Mol Neurodegener*. 2007; 2: 12
- Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage: mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 2001; 939: 200–15.
- Reiter R. J., Tan D. X., Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Progress in Brain Research*, 2010; 181: 127–151
- Reiter RJ, Tan DX, Terron P, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochimica Polonica*, 2007; 54 (1):1-9.
- Reppert S. M., Weaver D. R., Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, 1994; 13 (5): 1177–1185
- Reppert, S. M. Godson, C. C. Mahle D., Weaver, D. R. Slaugenhaupt, S. A. Gusella J. F. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel(1b) melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995; 92 (19): 8734–8738
- Reyes P.F., Deems D.A., Suarez M.G. Olfactory-related changes in Alzheimer's disease: a quantitative neuropathologic study. *Brain Res Bull.*, 1993; 32 (1):1-5
- Reyes-Prieto B.M., Velázquez-Paniagua M., Prieto-Gómez B. Melatonina y neuropatologías *Rev Fac Med UNAM* 2009; 52 (3)
- Reyes PF, Deems DA, Suarez MG. Olfactory-related changes in Alzheimer's disease: a quantitative neuropathologic study. *Brain Res Bull.* 1993; 32 (1):1-5.
- Rezek D.L. Olfactory deficits as a neurologic sign in dementia of the Alzheimer type. *Arch Neurol.*, 1987; 44 (10): 1030-2
- Roder HM, Fracasso RP, Hoffman FJ, Witowsky JA, Davis G, Pellegrino CB. Phosphorylation-dependent monoclonal tau antibodies do not reliably report phosphorylation by extracellular signal regulated kinase 2 at specific sites. *J Biol Chem* 1997; 272: 4509-4515
- Roger, B., Gerry, H., 2003. Realistic expectations: The management of severe alzheimer disease. *Alzh. Dis. Assoc, Disor.* 17(3): S80-S85.

- Rogers, S. L., Doody, R.S., Mohs, R. C., Friedhoff, L. T., 1998a. Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, double blind placebo-controlled study. Donepezil Study Group (see comments). *Arch. Intern. Med.* 158 (9): 1021-1031.
- Ruan Y, Zheng XY, Zhang HL, Zhu W, Zhu J. Olfactory dysfunctions in neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res.* 2012 Sep;90 (9): 1693-700. doi: 10.1002/jnr.23054. Epub 2012 Jun 5.
- Rubinsztein D.C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, 2006; 443 (7113): 780-786.
- Rubinsztein D.C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. 2006; 443: 780-786.
- Saltiel A. R., Kahn C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 2001; 414 (6865): 799–806
- Schneider, L. S., Farlow, A. R., 1998. Systematic review of the efficacy of rivastigmine for the patients with Alzheimer's disease. *Inter. J. Ger. Psychophar.* 1 (Suppl 1): S26-S34.
- Selkoe D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001; 81 (2): 741-66
- Serby M., Larson, P., Kalkstein, D., 1991. The nature and course of olfactory deficits in Alzheimer's disease. *Am.J. Psychiatr.* 148, 357–359.
- Sergeant N., David J.P., Goedert M., Jakes R., Vermersch P., Bue´e L., Lefranc D., Watez A., Delacourte A., Two-dimensional characterization of paired helical filament-tau from Alzheimer's disease: demonstration of an additional 74 kDa component and age-related biochemical modifications, *J. Neurochem.* 1997; 69: 834–844.
- Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litsersky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski, JQ, Lee V.M.Y. Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau, *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 18917–18922.
- Shaw M, Cohen P, Alessi DR. Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216. *FEBS Lett.* 1997 Oct 27;416 (3): 307-11.

- Skene D.J., Vivien-Roels B., Sparks D.L., Hunsaker J.C., Pévet P., Ravid D., Swaab D.F. Daily variation in the concentration of melatonin and 5 methoxytryptophol in the human pineal gland: effect of age and Alzheimer's disease, *Brain Research*, 1990; 528 (1): 170–174
- Soto C., Estrada L.D. Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol*. 2008; 65 (2):184-9
- Sperber BR, Leight S, Goedert M, Lee VM. Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neurosci Lett*. 1995 Sep 8;197 (2):149-53.
- Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 1997; 388 (6645): 839-840
- Spires T, Hannan A. Molecular mechanisms mediating pathological plasticity in Huntington's disease and Alzheimer's disease. *Journal Neurochem*. 2007; 100: 874-872
- Squire L., Berg D., Bloom F., Du Lac S., Ghosh A., Spitzer N. *Fundamental Neuroscience*. Third Edition. Academic Press, El Sevier. Canadá. 2008: 1048-1055, 1063-1065
- Srinivasan V., Pandi-Perumal S. R., Cardinali D. Poeggeler P., B., Hardeland R., Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Behavioral and Brain Functions*, 2006; 2:15.
- St George-Hyslop PH. Piecing together Alzheimer's disease. *Sci Am.*, 2000; 283 (6): 76–83
- Steiner B., Mandelkow E.M., Biernat J., Gustke N., Meyer H.E., Schmidt B., Mieskes G., Soling H.D., Drechsel D. Kirschner M.W. Phosphorylation of microtubule-associated protein Tau: identification of the site for Ca<sup>2+</sup>-calmodulin dependent kinase and relationship with Tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *Embo J*. 1990; 9: 3539-3544
- Sugden D. Circadian change in rat pineal tryptophan content: lack of correlation with serum tryptophan. *J Neurochem*. 1999; 45 (12): 1646-52
- Sugden D. Circadian changes in the rat pineal tryptophan content: lack of correlation with serum tryptophan. *J Neurochem* 1979; 33: 811-820
- Sun W., Qureshi H.Y., Cafferty P.W., Sobue K., Agarwal-Mawal A., Neufeld K.D., Paudel H.K. Glycogen synthase kinase-3b is complexed with Tau protein in brain microtubules. *J Biol Chem* 2002; 277: 11933–11940

- Swatton J. E., Sellers L. A., Faull R. L. M., Holland A., Iritani S. and Bahn S. (2004) Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2711–2719.
- Swerdlow R.H., Burns, J.M. Khan, S.M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2010; 20 (2): 265– 279
- Tabaton M., Cammarata S., Mancardi G.L., Cordone G., Perry G., Loeb C. Abnormal tau-reactive filaments in olfactory mucosa in biopsy specimens of patients with probable Alzheimer's disease. *Neurology*. 1991; 41: 391–394.
- Talamo B.R., Rudel R., Kosik K.S Lee, V. MY., Neff S., Adelman L., Kauer J.S. Pathological changes in olfactory neurons in patients with Alzheimer's disease. *Nature*, 1989; 337 (6209): 736-9
- Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Plummer B.F., Hardies L.J., Weintraub S., Vijayalaxmi T., Shepherd A.M. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998; 253 (3): 614–620
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan M-T, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R. Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. *Current Topics in medicinal Chemistry*, 2002; 2:181-197.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Kim SJ, El Sokkary GH. Melatonin protects hippocampal neurons in vivo against kainic acid- induced damage in mice. *J. Neurosci. Res.*, 1998; 54: 382-389.
- Tijimes M, Pedraza R, Valladares L. Melatonin in the Rat Testis: Evidence for Local Synthesis. *Steroids*, 1996; 61, 65-68.
- Tiraboschi, P., Hansen, L. A., Alford, M., Masliah, E., Thal, L., Corey-Bloom, J., 2000. The decline in synapses and cholinergic activity is asynchronous in Alzheimer's disease. *Neurology* 55: 1278-1283.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76(9):4350-4.
- Trojanowski JQ, Schuck T, Schmidt ML, Lee VM. Distribution of phosphate-independent MAP2 epitopes revealed with monoclonal antibodies in microwave-denatured human nervous system tissues. *J Neurosci Methods*. 1989 Aug; 29 (2):171-80.
- Trombley P.Q., Shepherd G.M. Synaptic transmission and modulation in the olfactory bulb. *Curr Opin Neurobiol*. 1993; 3:540-7

- Turenne G. A., Price B. D. Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC Cell Biol.*, 2001; 2 12
- Urata Y., Honma S., Goto S., Todoroki S., Iida T., Cho S., Honma K., Kondo T. Melatonin induces  $\gamma$ - glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999; 27 (7-8): 838–847
- Vakkuri O. Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. *Acta Physiol Scand.* 1985; 124 (3): 409-12
- Vandermeeren M., Mercken M., Vanmechelen E., Six J., Vande Voorde A., Martin JJ., Cras P. Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Neurochem.* 1993; 61 (5): 1828-1834
- Vanelli G.B., Enaoli F., Zonefrati R., Kubota Y., Arcangeli A., Bechetti A., Camici G., Barni T., Thiele C.J., Balboni G.C. Neuroblast Long Term Culture from Human Fetal Olfactory Epithelium respond to odors. *The journal of neuroscience.* 1995; 15 (6): 4382-4394
- Vecchierini MF. Sleep disturbances in Alzheimer's disease and other dementias. *Psychologie et NeuroPsychiatrie du Vieillissement*, 2010; 8 (1): 15–23
- Vermersch P, Frigard B., Delacourte A. Mapping of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease: evaluation of heterogeneity using the quantification of abnormal tau proteins, *Acta Neuro- pathol.* 85, 1992; 48–54.
- Vermersch P., Robitaille Y., Bernier L., Wattez A., Gauvreau D., Delacourte A., Biochemical mapping of neurofibrillary degeneration in a case of progressive supranuclear palsy: evidence for general cortical involvement, *Acta Neuropathol.* 87, 1994; 572–577
- Villalpando B. JM Demencias. En D'Hyver e y Gutiérrez-Robledo LM. *Geriatría.México: Editorial El Manual Moderno; 2006 p. 371-390*
- Viña J. Lloret A. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid- $\beta$  peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2010; 20 (2): S527–S533
- Wang Z.J., Liang C.L., Li G.M., Yu C.Y., Yin M. Neuroprotective effects of arachidonic acid against oxidative stress on rat hippocampal slices. *Chem Biol Interact.* 2006; 163(3):207-217
- Wang J., Wang Z. Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. *Acta Pharmacol Sinica.* 2006; 27: 41-49

- Wang Y.P., Li X.T., Liu S.J., Zhou X.W., Wang X.C., Wang J.Z. Melatonin ameliorated okadaic-acid induced Alzheimer-like lesions. *Acta Pharmacol Sin.* 2004; 25: 276–80
- Wang Z.J., Liang C.L., Li G.M., Yu C.Y., Yin M. Neuroprotective effects of arachidonic acid against oxidative stress on rat hippocampal slices. *Chem Biol Interact.* 2006; 163(3):207-217
- Welsh G.I., Wilson C., Proud C.G. GSK3: A Shaggy frog story. *Trends Cell Biol.* 1990; 6 (7): 274-9
- Wischik C, Novak M, Edwards P, Klug A, Tichelaar W, Crowther R. Structural characterization of the core of paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci.* 1988; 85: 4884-4888
- Wisniewski HM, Narang HK, Terry RD. Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *J Neurol Sci* 1976; 27: 173-181
- Witt-Enderby PA, MacKenzie RS, McKeon RM, Carroll EA, Bordt SL, Melan MA. Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000; 46: 28–42
- Wolozin B., Lesch P., Lebovics R., Sunderland T. Olfactory Neuroblast from Alzheimer Donors: Studies on APP Processing and Cell Regulation *Biol Psychiatry*, 1993; 34 (12):824—838
- Wolozin B. and Davies P. (1987) Alzheimer-related neuronal protein A68: specificity and distribution. *Ann. Neurol.* 22, 521-526
- Woodgett J.R. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J.* 1990; 9 (8): 2431-8
- Woodgett JR. Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci STKE.* 2001 Sep 18; 2001(100):re12.
- Wu YH, Feenstra MG, Zhou JN, Liu RY, Torano JS, van Kan HJ, Fischer DF, Ravid R, Swaab DF. Molecular changes underlying reduced pineal melatonin levels in Alzheimer disease: alterations in preclinical and clinical stages. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5898–906
- Wu YH, Swaab DF. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. *J Pineal Res* 2005; 38: 145–52.
- Yamagishi M., Ishizuka Y., Seki K. Pathology of olfactory mucosa in patients with Alzheimer's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, 1994; 103 (6): 421-427

- Yamaguchi H., Ishiguro K., Uchida T., Takashima A., Lemere C. A. Imahori K. Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta Neuropathol.*, 1996; 92 (3): 232–241
- Yamamoto H., Hasegawa M., Ono T., Tashima K., Ihara Y., Miyamoto E., Dephosphorylation of fetal-tau and paired helical filaments-tau by protein phosphatases 1 and 2A and calcineurin, *J. Biochem.* 118 (1995) 1224–1231
- Yang S.D., Song J.S., Hsieh Y.T., Liu H.W., Chan W.H. Identification of the ATP.Mg-dependent protein phosphatase activator (FA) as a synapsin I kinase that inhibits cross-linking of synapsin I with brain microtubules. *J Protein Chem.* 1992; 11 (5): 539-46
- Zhainazarov A.B., Doolin R., Herlihy J.D., Ache B.W. Odor-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase in lobster olfactory receptor cells. *J Neurophysiol.* 2001; 85 (6): 2537-44
- Zheng H, Koo E. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular Neurodegeneration.* 2006; 1 (5): 12-1
- Zhou JN, Liu RY, Kamphorst W, Hofman MA, Swaab DF. Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels. *J Pineal Res* 2003; 35: 125–30

*Páginas Web consultadas*

[www.ahaf.org/alzdis/about/BrainAlzheimer.htm](http://www.ahaf.org/alzdis/about/BrainAlzheimer.htm)

[www.innn.salud.gob.mx](http://www.innn.salud.gob.mx)