



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**CAMBIOS EN LOS PATRONES DE O-GLICOSILACIÓN TIPO MUCINA EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

IVAN EMMANUEL RAMOS MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA

FACULTAD DE MEDICINA

DR. ROBERTO ARREGUIN ESPINOSA DE LOS MONTEROS

INSTITUTO DE QUÍMICA

MÉXICO, CD. MX. ABRIL DE 2018



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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 9 del departamento de Bioquímica de la facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Edgar Zenteno Galindo y financiado por CONACyT (0129932) y PAPIIT-DGAPA (IN213818).

Agradecimientos.

Agradezco el apoyo a CONACyT por la beca otorgada, número de registro de becario 422504.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo por sus enseñanzas.

Al comité tutor:

- Dra. Selva Rivas Arancibia
- Dr. Roberto Arreguin Espinosa de los Monteros

A los miembros de jurado:

- Dr. Julio Morán Andrade
- Dr. Gabriel Roldán Roldán
- Dr. Luis Felipe Jiménez García
- Dr. Jorge Guevara Fonseca

A mis padres **Amalia Martínez** y **Juan Ramos**, porque no hay mayor gracia ni riqueza en el mundo que el amor de tus padres.

Abreviaturas.

aa	aminoácido
ALL	Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i>
APP	Proteína precursora de amiloide
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
A β	Amiloide beta
A β 25-35	Amiloide beta 25 a 35
CA1	<i>Cornu Ammonis 1</i>
Con A	Lectina <i>concanavalina A</i> de <i>Cannavalia ensiformis</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
GFAP	Proteína fibrilar-glial ácida
GlcNAc	N-acetil-glucosamina
GalNAc	N-acetil-galactosamina
IL-1 β RA	Antagonista del receptor de interleucina 1 beta
iNOs	Óxido nítrico sintasa inducible
KDa	kilodalton
MNs	Marañas neurofibrilares
NMDA	Receptor de N-metil-d-aspartato
PNs	Placas neuríticas
PNA	Lectina de <i>Arachis hyogaea</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa

Índice.

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
La enfermedad de Alzheimer.....	3
Proteína amiloide β	4
Modelo de toxicidad de A β 25-35.....	5
La glicosilación en el SNC.....	6
Lectinas endógenas en microglía.....	9
Neuroinflamación en la EA.....	10
Antecedentes.....	11
Hipótesis.....	13
Objetivos.....	13
Materiales y Métodos.....	14
Animales.....	14
Cirugía Estereotáxica.....	14
Lectinas y anticuerpos.....	14
Inmunohistoquímica.....	15
Tinción Hematoxilina- Eosina.....	15
Resultados.....	16
A β 25-35 induce cambios en la glicosilación.....	16
Tinción de hematoxilina-eosina.....	18
Inhibición competitiva de ALL y digestión con tripsina.....	19
Identificación del tipo celular reconocido por ALL y neuroinflamación.....	19

Detección de apoptosis.....	20
Cinética con A β 25-35 y glicosilación.....	22
Discusión.....	24
Conclusiones.....	27
Perspectivas.....	27
Bibliografía.....	28
Publicación.....	33

Resumen.

La enfermedad de Alzheimer es la demencia más común en edad adulta teniendo como marca distintiva la acumulación de placas de amiloide β ($A\beta$) y los ovillos neurofibrilares de proteínas Tau. El $A\beta$, en particular el péptido 25 al 35 ($A\beta_{25-35}$), es la región neurotóxica que induce respuesta inflamatoria en cerebro. Por otra parte, la glicosilación extracelular se ha asociado con inflamación y apoptosis. En este trabajo se tuvo como objetivo identificar cambios en el perfil de glicosilación generados por la inyección de $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo de rata utilizando histoquímica de lectinas. Nuestros resultados indican que $A\beta_{25-35}$ [100 μ M] induce el aumento del reconocimiento principalmente con la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) (específica para Gal β 1, 3 GalNAc1, 0 Ser/Thr). Concanavalina A, jacalina y PNA no mostraron diferencias entre grupos. El tratamiento del tejido con tripsina o adicionando GalNAc inhibe el reconocimiento de ALL. La administración del antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1RA) disminuyó el marcaje de ALL en ratas tratadas con $A\beta_{25-35}$. La inmunohistoquímica con anti-NeuN sugiere que las células reconocidas por ALL son neuronas, además el incremento en hipocampo de la reactividad de anti-GFAP y anti-CD11b nos indica astrogliosis y microglía activada en grupo con $A\beta_{25-35}$. Las neuronas ALL positivas mostraron presencia de citocromo C en el citosol y caspasa 3 activa en el citosol y núcleo. Estos resultados sugieren que existe una relación directa entre la O-glicosilación reconocida por ALL y la muerte neuronal, siendo las proteínas O-glicosiladas un mediador importante entre la inflamación y la muerte neuronal.

Abstract

Amyloid- β ($A\beta$) plays a relevant role in the neurodegenerative process of Alzheimer's disease (AD). The 25-35 peptide of amyloid- β ($A\beta_{25-35}$) induces the inflammatory response in brain experimental models. Mucin-type O-glycosylation has been associated with inflammation of brain tissues in AD, thus in this work, we aimed at identifying changes in the glycosylation profile generated by the injection of $A\beta_{25-35}$ into the CA1 of the hippocampus of rats, using histochemistry with lectins. Our results indicate that 100 μ M $A\beta_{25-35}$ induce increased recognition of the *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) (specific for Gal β 1,3-GalNAc α 1,0-Ser/Thr); whereas concanavalin A (Con A) (specific for α -Man) showed no differences among treated and control groups of rats. Jacalin and peanut agglutinin (Gal β 1,3GalNAc α 1,0-Ser/Thr) showed no recognition of brain cells of control or treated rats. After 6-h treatment of the tissue with trypsin or with 200 mM GalNAc, the interaction with ALL was inhibited. Immunohistochemistry showed positive anti-NeuN and ALL-recognition of neurons; however, anti-GFAP and anti-CD11b showed no co-localization with ALL. The ALL+ neurons revealed the presence of cytochrome C in the cytosol and active caspase 3 in the cytosol and nucleus. Administration of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) to $A\beta_{25-35}$ -treated rats diminished neuroinflammation and ALL recognition. These results suggest a close relationship among over-expression of mucin-type O-glycosylation, the neuroinflammatory process, and neuronal death.

Introducción.

La enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer es la demencia más común que se caracteriza por neurodegeneración progresiva que afecta neocorteza, área entorrinal, amígdala y el hipocampo, dando como resultado una disminución en la memoria, lenguaje y capacidad de abstracción. Hasta el momento el diagnóstico de esta enfermedad es post-mortem, por la presencia de las dos alteraciones típicas de la EA que son las marañas neurofibrilares (MNs) y las placas neuríticas (PNs) (Fig.1) (Alzheimer's Association, 2017). Las MNs se conforman por agregados de la proteína tau fosforilada, que es una proteína asociada a microtúbulos esencial para la dinámica del citoesqueleto, en neuronas promueve el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos necesario para el transporte axonal. En condiciones patológicas la proteína tau está altamente fosforilada disminuye su afinidad por los microtúbulos y tiende a autoagregarse en el soma de las neuronas dando como resultado las MNs (Hampel et al., 2010). En el caso de las PNs tiene dos componentes; el núcleo proteico formado por fibras entrelazadas de oligómeros de amiloide beta ($A\beta$) y un componente celular de neuritas distróficas, microglia activada y astrocitos reactivos. Las PNs miden aproximadamente 50 μm por lo que son visibles al microscopio de luz teñidas con rojo Congo (Stewart y Radford, 2017). En la actualidad existen varias teorías que explican la etiología de la EA, entre las más aceptadas está la teoría que postula al $A\beta$ como factor desencadenante de la enfermedad. Otra teoría atribuye el proceso neurodegenerativo a la fosforilación de Tau y la teoría colinérgica que básicamente atribuye la enfermedad a una disminución de las sinapsis colinérgicas. En la actualidad la más aceptada y ampliamente estudiada es la teoría amiloidogénica, tomando la fosforilación de tau y pérdida de sinapsis como consecuencias del daño ocasionado por el $A\beta$ (Sanabria et al., 2017).

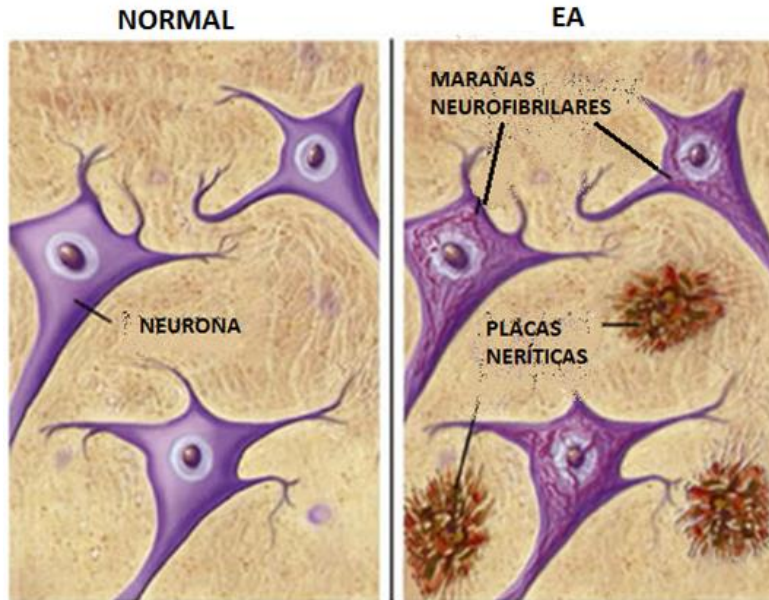


Fig 1. Las lesiones características de EA son las placas neuríticas y marañas neurofibrilares.

Proteína amiloide β .

La proteína precursora del amiloide (APP) es una proteína integral de membrana de 695 a 770 aa. En el sistema nervioso actúa en procesos como la sinaptogénesis, la adhesión celular y el metabolismo de metales (Zhang et al., 2011). El APP es blanco de diversas proteasas, particularmente las α , β y γ -secretasa, estas secretasas están relacionadas en la generación del péptido amiloide β que tiene la capacidad de autoagregación y que está presente en la EA. Específicamente la β -secretasa realiza un corte en la porción intracelular de la APP que genera un péptido soluble de la porción NH₂ terminal, la porción que permanece anclada a la membrana es el sustrato de la γ -secretasa, la cual vuelve a cortar la porción N-terminal dando origen al amiloide β 1-42. Aunque siempre se producen en mayor proporción péptidos 1-40 aa ($A\beta$ 1-40) que péptidos de $A\beta$ 1-42, este último es considerado tóxico y desencadenante de la EA gracias a su capacidad de agregación (Bolshette et al., 2014).

El procesamiento del PPA por las secretasas genera el péptido A β 25-35 (GSNKGAIIGLM). El fragmento A β 1-42 ha tomado gran relevancia en estudios sobre la toxicidad del A β (Kubo et al., 2002). El A β 25-35 tiene propiedades citotóxicas similares al péptido A β 1-42. Por lo que se considera que la secuencia del A β 25-35 representa la región biológicamente activa del A β (Clementi y Misiti, 2005). La secuencia 25-35 es esencial en la formación de láminas β de la forma fibrilar del amiloide y por otra parte, tiene la capacidad de formar estructuras oligoméricas de diferentes tamaños. Tales oligómeros son capaces de insertarse en la membrana celular y ocasionar alteraciones en la homeostasis celular que pueden llevar a muerte celular (Fig. 2) (Parvathenani et al., 2000).

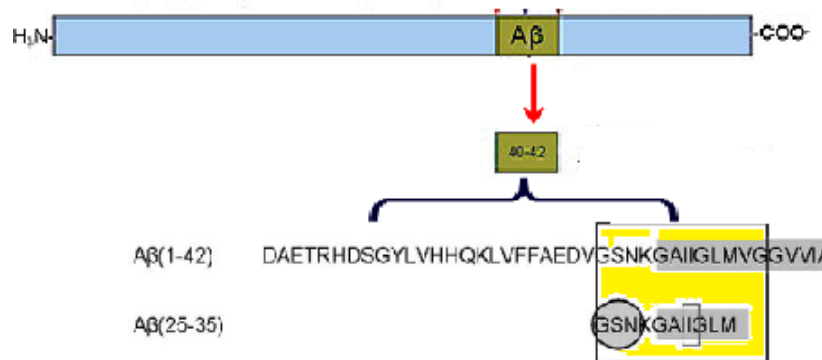


Fig 2. La fracción 25-35 del amiloide β es la región responsable de su neurotoxicidad y es capaz de agregar por sí sola.

Modelo de toxicidad de A β 25-35.

El mecanismo por el cual el A β 25-35 genera toxicidad es por la interacción de la metionina 35 con metales como Fe y Cu, lo cual produce peróxido de hidrógeno por reacción de Fenton, esto favorece la producción de otros intermediarios como hidroxi-nonenal y fosfolípidos lipoperoxidados. Los radicales libres afectan la estructura secundaria de las proteínas, afectan la integridad de las membranas favoreciendo cambios en la osmolaridad, además de inducir la liberación de

mediadores de la inflamación (Bayer et al., 2001). Diversos estudios en cultivos celulares y modelos animales muestran que induce la muerte de neuronas glutamatérgicas y colinérgicas, además de provocar retracción dendrítica y axonal en las neuronas en general (Millucci et al., 2010). También provoca la inhibición de los procesos de neurogénesis en áreas como el giro dentado del hipocampo (Wang et al., 2015) y causa un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares que modifican los potenciales de acción excitables en cultivos neuronales de hipocampo (Kim and Rhim, 2011). La inyección de A β 25-35 en hipocampo de ratas induce la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , lo que provoca aumento en los niveles de óxido nítrico y estrés oxidativo por la activación de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) culminando en muerte neuronal. Pruebas conductuales en el laberinto radial de ocho brazos o laberinto acuático de Morris muestran disminución severa en la adquisición de memoria a largo y a corto plazo en animales inyectados con A β 25-35 en hipocampo (Díaz et al., 2012)

La glicosilación en el SNC.

La glicosilación es la modificación pos-traducciona l más abundante en la célula, aproximadamente el 50% del proteoma humano se encuentra glicosilado (Apweiler et al., 1999). Los tipos más usuales son la N-glicosilación y la O-glicosilación. La N-glicosilación se inicia en el retículo endoplasmático rugoso, donde la N-acetil glucosamina (GlcNAc) se une al grupo amino de asparagina (Fig. 3). La O-glicosilación ocurre en aparato de Golgi, mediante el enlace entre la N-acetil-galactosamina (GalNAc) y Ser o Thr. A este tipo de O-glicosilación se le conoce como tipo mucina. Otro tipo de O-glicosilación se da en los preteoglicanos donde el primer azúcar es la xilosa que va ligado a serina o treonina. Para que se lleve a cabo la glicosilación es necesaria la acción secuencial de glicosiltransferasas que se encuentran por lo general en retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi. Estas glicoproteínas son un componente importante de la membrana y la matriz extracelular. A esta red de carbohidratos expuesta sobre las células se le

conoce como glicocálix, la cual juega un papel indispensable en las interacciones intercelulares (Varki et al., 2009).

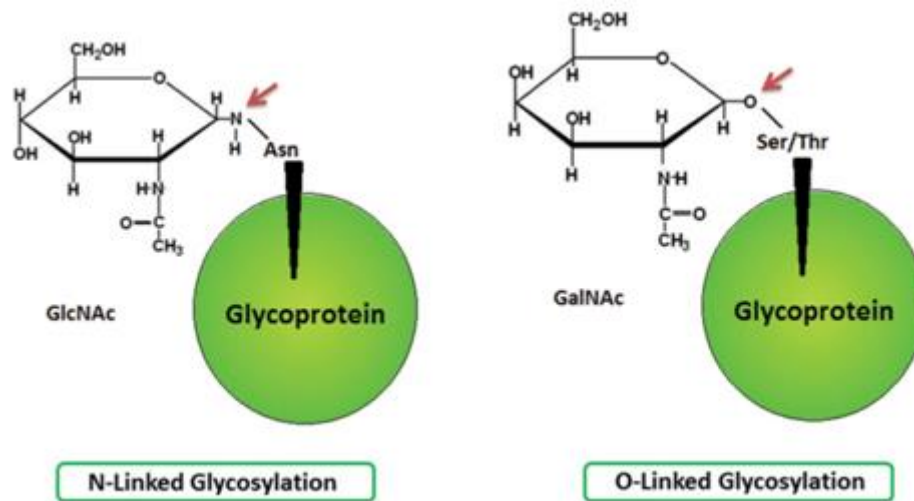


Fig 3. La N-glicosilación y la O-glicosilación son los tipos más usuales de glicosilación, la flecha indica el enlace glicosídico.

El sistema nervioso se caracteriza por las complejas redes de interacciones entre las neuronas y células de la glía en diversos procesos, tal como la neurogénesis, inflamación y muerte celular. Se ha observado que muchas de estas interacciones son reguladas por la interacción entre glicoproteínas y lectinas endógenas que son capaces de reconocer de manera específica los glicanos de estas glicoproteínas (Kleene y Schachner, 2004). Las neuronas son células de origen ectodérmico y tienen la capacidad de transmitir potenciales eléctricos por sus membranas, lo que constituye el impulso nervioso. La estructura básica de la neurona son el soma, el axón y el árbol dendrítico (Brady et al., 2011). Las neuronas expresan numerosas glicoproteínas que le permiten interactuar con otras neuronas y con otros tipos celulares presentes en el sistema nervioso, por lo que la glicosilación es necesaria para el desarrollo y funcionamiento de sistema nervioso (Linnartz y Neumann, 2013). Por ejemplo en el desarrollo del sistema nervioso y en la plasticidad sináptica participan estructuras sacarídicas de la membrana de las neuronas compuestas por cadenas de ácido siálico unidos por enlaces $\alpha 2, 8$ (PSA), el cual es sintetizado por

las polisialiltransferasas (ST8sialIV y STsialII), para formar una cadena de cerca de 200 residuos de ácido siálico en la proteína de adhesión celular neuronal (NCAM). El PSA puede actuar inhibiendo las interacciones homofílicas de NCAM al proporcionar cargas negativas a las moléculas y favoreciendo las interacciones heterofílicas con proteínas que reconocen carbohidratos, es decir con propiedades de lectina (Der Ohe et al., 2002). La importancia de la glicosilación de NCAM con PSA se mostró con la inyección de endoglicosidasa N en hipocampo de rata, la eliminación de PSA por esta enzima alteró la migración neuronal y de la glia, afectando los procesos de memoria y aprendizaje espacial (Muller et al., 1996).

Las neuronas también se caracterizan por tener un alto porcentaje de estructuras oligomanosídicas en sus membranas celulares, estos oligomanósidos se encuentran en proteínas N-glicosiladas como L1 y el receptor de NMDA que son particularmente abundantes en los sitios donde ocurre la sinapsis. La presencia de oligomanósidos en la glicoproteína L1, le permiten interactuar con NCAM, al bloquear experimentalmente esta interacción utilizando oligomanosidos solubles hay disminución del crecimiento de las neuritas y afecta la formación de sinapsis en el hipocampo (Cornelia et al., 1998, Schmid y Maness, 2008). El sistema nervioso se caracteriza por una expresión predominante de ácido siálico (Sia) en posición $\alpha 2,3$, sobre la expresión de Sia $\alpha 2,6$. En general la función del ácido siálico es dar carga negativa a la superficie de la neurona e impedir uniones inespecíficas, pero también está involucrado en interacciones lectina-glicoproteína como el caso de la interacción entre L1 y CD24, la cual es importante durante el crecimiento de las neuritas, para que L1 se pueda unir a CD24 es necesario la presencia de Sia $\alpha 2,3$ (Kleene et al., 2001). Los glicosaminoglicanos son estructuras sacarídicas comunes en sistema nervioso, están formados por cadenas largas de disacáridos compuestos por ácido glucurónico y el otro puede GalNAc o GlcNAc. Los glicosaminoglicanos van unidos a una proteína a través del enlace entre una xilosa y Ser, a este complejo se le conoce como preotoglicano. En el sistema nerviosos se han encontrado todos los glucosaminoglicanos, sin embargo los más abundantes son el condroitin sulfato y el heparán sulfato (Cui et al., 2013). Sindecano- 3 es un

preotoglicano con alto contenido de heparán sulfato, el cual juega un rol importante en los procesos de plasticidad neuronal en hipocampo (Kaksonen et al., 2002).

Lectinas endógenas en microglía.

La microglía tiene varias moléculas en su membrana con propiedades lectínicas que le permiten reconocer glicoproteínas de células neuronales o de la misma microglía. Se han agrupado estas lectinas endógenas de acuerdo a su especificidad y homología como galectinas, selectinas o Siglec. Las galectinas son lectinas endógenas capaces de reconocer el disacárido N-acetil lactosamina. A la fecha se han identificado 15 en diferentes tipos celulares, las cuales están relacionadas con procesos de autoinmunidad y cáncer (Bacigalupo et al., 2013). En el sistema nervioso se ha observado expresión de galectina 1 en la microglía después de un proceso inflamatorio. Se le atribuye un papel anti inflamatorio al unirse con O-glicanos de CD 45 y retenerlo sobre la membrana celular y a la vez retener su actividad su actividad inhibitoria (Starossom et al., 2012). Mientras galectina 3 tiene un papel proinflamatorio en la microglía, funcionando a modo de citocina, aumentando su expresión después de isquemia cerebral o un traumatismo (Fig. 4) (Rotshenker, 2009, Satoh et al., 2011). Los Siglec pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas y son lectinas endógenas de unión a ácido siálico. Por lo general los Siglec están involucrados en procesos inhibitorios que regulan la inmunidad innata, como es el caso de CD33 (siglec -3) que se expresa en monocitos y microglía, la expresión de CD33 en microglía inhibe la fagocitosis de detritos neuronales después de un traumatismo, lo que previene la producción de radicales libres y la exacerbación del proceso inflamatorio (Claude et al., 2013). Las selectinas son moléculas que reconocen glicoproteínas sialiladas o fucosiladas y solamente tienen un sitio de unión a carbohidratos. Se han encontrado principalmente en endotelio, leucocitos y plaquetas, donde juegan un papel importante en la iniciación de la respuesta inflamatoria (Chase et al., 2012). Las células de la microglía expresan selectina L constitutivamente, pero después de un traumatismo aumentan

su expresión, llevando a la producción de citocinas proinflamatorias (Harting et al., 2008).

Todas estas lectinas son parte de la compleja red de interacciones en el sistema nervioso que favorecen la interacción entre las neuronas y la microglia en condiciones patológicas (Linnartz et al., 2012).

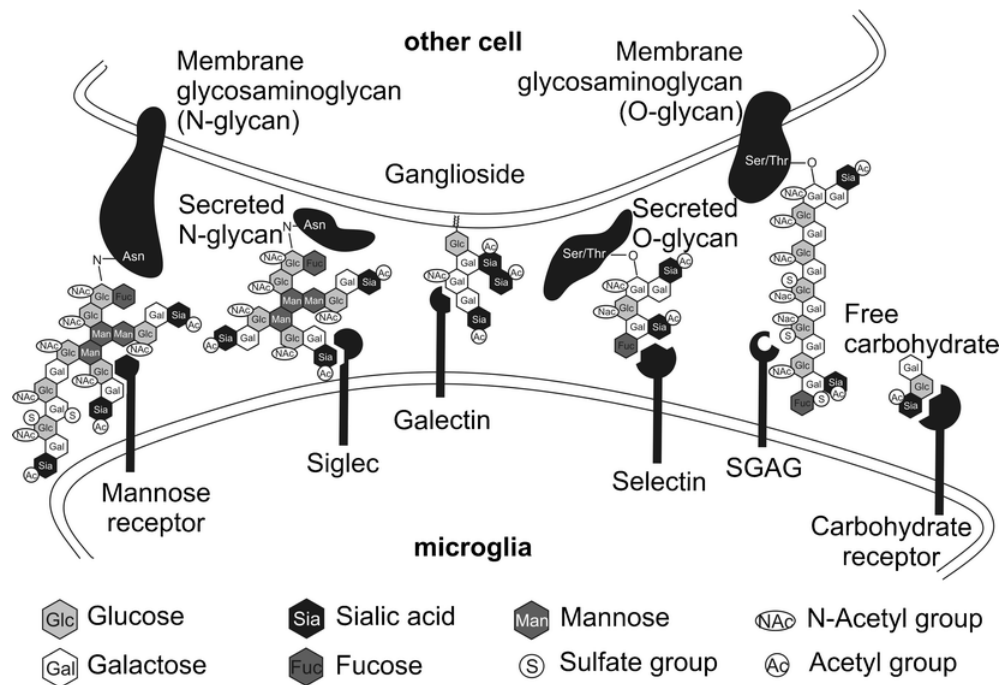


Fig 4. Esquema resumiendo las interacciones proteína-carbohidratos en la microglía en condiciones normales y patológicas.

Neuroinflamación en la EA.

Las células del sistema inmune como la microglia y macrófagos son un componente de las PNs por lo que desde hace tiempo se ha reportado que la inflamación juega un papel importante del proceso neurodegenerativo de la enfermedad de Alzheimer. Estudios recientes han demostrado la relación directa entre los agregados de A β la inflamación, ocasionando activación de la microglia y astrogliosis. (Cai et al., 2014). En la activación de la microglia participan receptores tipo Toll (TLRs), en especial con TLR2 y TLR4 que a su vez inducen la fagocitosis del A β . Altos niveles de estos

TLRs se han observado en cerebros de pacientes con EA y modelos animales (Su et al., 2016). En estados tempranos de la enfermedad resulta favorable la eliminación del A β , pero conforme avanza la enfermedad se vuelve un factor importante en el proceso de neurodegeneración al secretar moléculas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , MCP-1 y otras moléculas que favorecen la producción de radicales libres y la activación de iNOS que a su vez estimula la formación de nuevo A β (Bagyinszky et al., 2017). El aumento en las concentraciones de estas citocinas no solo desencadena muerte neuronal a largo plazo, si no también afecta directamente procesos como la plasticidad neuronal y potenciales a largo plazo (LTP), ambos procesos esenciales en la consolidación de la memoria. Registros electrofisiológicos in vitro han mostrado que la IL-1 β inhibe los LTP en hipocampo ya que las neuronas piramidales expresan receptor de IL-1 β tipo 1 (Prieto y Cotman, 2017).

Antecedentes.

Estudios histológicos utilizando lectinas de cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer mostraron cambios en los patrones de glicosilación con respecto a controles sanos (Tabla 1), sin embargo el tipo de glicosilación que mostró mayor diferencia fue la O-glicosilación de tipo mucina, la cual se encuentra asociada principalmente a placas neuríticas, lo que indica que en la EA existe un incremento significativo en la producción de proteínas O-glicosiladas tipo mucina. Estas glicoproteínas se encuentran asociadas al componente celular de placas neuríticas, lo cual se demostró utilizando microscopia electronica con el marcaje positivo de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) y anticuerpos anti-amiloide β 1-42 (Tabla 1) (Guevara et al., 1998). En estudios posteriores se realizó la caracterización bioquímica de estas glicoproteínas utilizando ALL en homogenizados de cerebros con EA. En el *lectin blot* solo se observó la sobreexpresión de una glicoproteína de 90 Kda, la cual comparte homología del 32% con KIAA0310 y del 42 % con mucina gástrica (Espinoza et al., 2003). Aunque la función de esta glicoproteína no ha sido

descubierta se observó que está asociada a procesos característicos de la EA como la plasticidad reactiva y agregados de proteína tau fosforilada (Guevara *et al.*, 2004).

Por otra parte, en modelos animales de ratas la administración de A β 25-35 intrahipocampalmente provoca cambios en los patrones de sialilación, aumentando la expresión de Sia α -2,6 y Sia 2,8 en el hipocampo de las ratas tratadas en la región del giro dentado del hipocampo. (Limon *et al.*, 2011). Como se comentó anteriormente en numerosas enfermedades inflamatorias crónicas se han observado cambios en la glicosilación y dado que en la EA existe un componente inflamatorio importante, el modelo de neuroinflamación por A β 25-35 nos permite estudiar la secuencia cronológica de la inflamación y la glicosilación en hipocampo.

Tabla 1. Positividad a diversas lectinas en cerebros de EA. NP, placas neuríticas; NFT, marañas neurofibrilares y LPF; depósitos de lipofucsina.

Structure	Lectins							
	LCA	ConA	LPA	MAA	SNA	MRL	ALL	PNA
NP	+	-	+	-	+	+++	++++	±
NFT	-	-	+	+	±	++++	++	±
LPF	+	-	-	-	+	-	+++	-
Neurons	-	+	+	+ ^a	+	+	+	+
Vessels	+	+	+	+	+	+	+	+
Glial-like cells	-	+	+	+	+	+	+	±

Hipótesis.

El proceso inflamatorio en ratas administradas con A β 25-35 en CA1 de hipocampo modifica los patrones de glicosilación en neuronas de la región de CA1. Al modificarse estos patrones de glicosilación la interacción neurona-microglía puede verse afectada ocasionando apoptosis en las neuronas.

Objetivos.

- i. Detectar cambios en la glicosilación de ratas administradas con A β 25-35 en CA1 de hipocampo.
- ii. Detectar astrogliosis y microglía activada en la región de CA1 de ratas administradas con amiloide β 25-35.
- iii. Identificar células en apoptosis de ratas administradas con A β 25-35 y colocalizarlas con lectinas.
- iv. Evaluar los cambios de glicosilación en diferentes lapsos de tiempo.

Materiales y Métodos.

Animales.

Se usaron ratas Wistar macho adultas (250-260 g), sin restricciones de agua ni alimento y todas las condiciones ambientales controladas de luz- oscuridad (12h: 12h), temperatura y humedad. En todo el estudio se cumplió con lo establecido con la guía Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Mexicana 062. Los animales fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Cirugía Estereotáxica.

Los animales (n=8) fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40mg/kg) marca Sedalphorte, después se colocaron en el aparato estereotáxico, se realizó una incisión anteroposterior sobre el cráneo. Las coordenadas para el hipocampo son: anteroposterior -3.5 mm; lateral ± 2.8 mm respecto a bregma y profundidad de -3 mm respecto a la duramadre (16). El péptido amiloide $\beta 25-35$ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) se preparó a una concentración de 100 μM en solución salina estéril y se incubó a 37° C por 36 horas. Se inyectó 1 μl de A $\beta 25-35$ en la región CA1 y al grupo control solución salina (n=8). Un tercer grupo fue tratado con 1 μl de IL-1RA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 10 minutos previos a la administración de A $\beta 25-35$ en la misma región del cerebro. Las ratas se sacrifican con una sobre dosis de pentobarbital sódico después de 5, 10 y 30 días.

Lectinas y anticuerpos.

Se usaron lectinas biotiniladas de concanavalina A (Con A) (Sigma), jacalina (Vector Labs, CA, USA), y PNA (Vector Labs). En el caso de ALL fue aislada por cromatografía de afinidad y marcada con el kit-biotin de Pierce Chemical (Rockford, IL). Los anticuerpos usados fueron anti-CD11b (ABCam, Cambridge UK), anti-NeuN (ABCam), anti-GFAP (ABCam), anti-caspasa 3 activa (ABCam), y citocromo C (Santa Cruz, Dallas TX, USA). Todos los carbohidratos fueron obtenidos de Sigma.

Inmunohistoquímica

Las ratas fueron perfundidas con solución salina, después se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Los cerebros se deshidrataron e incluyeron en bloques de parafina con el procesamiento histológico estándar. Se realizaron cortes coronales de 4 μm de espesor en un micrótopo Leica RM2125 (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Los tejidos una vez hidratados fueron bloqueados incubando 30 min con BSA al 2% libre de IgG, después se permabilizaron con 0.2% Triton X-100 (Sigma). Todos los anticuerpos se diluyeron 1:100 en PBS con 1% BSA. DAPI fue usado como marcador nuclear. Los conteos fueron realizados con el objetivo de 40x en microscopio de fluorescencia Leica DM/LS (Leica Microsystems, Wetzlar, GmbH, Germany).

Tinción Hematoxilina- Eosina.

Los tejidos coronales de 4 μm de espesor fueron montados en laminillas silanizadas y se deshidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100% a 70%). La tinción con hematoxilina de Harris fue por 5 minutos y la eosina por 3 minutos. Se usó resina sintética como medio de montaje y se observó al microscopio de campo claro.

Resultados.

A β 25-35 induce cambios en la glicosilación.

Por histoquímica utilizando Con A se identificaron varios tipos celulares en la región CA1, la marca se observó tanto en citoplasma y membrana celular sin embargo, no hubo diferencias entre el grupo con A β 25-35 y el control. La lectina ALL tuvo reactividad principalmente en la región CA1 del hipocampo de las ratas inyectadas con A β 25-35, marcando la membrana celular y el citoplasma donde se observó un patrón vesicular. En el caso de Jacalina hubo baja reactividad y sin diferencias entre ambos grupos (fig.1).

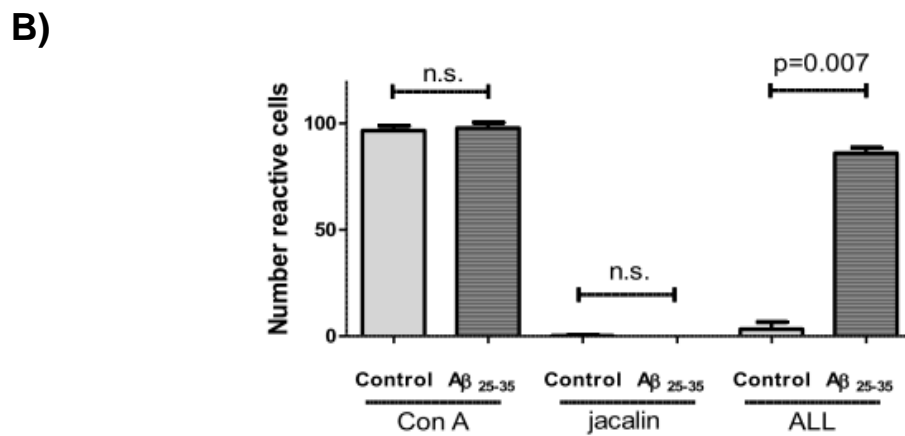
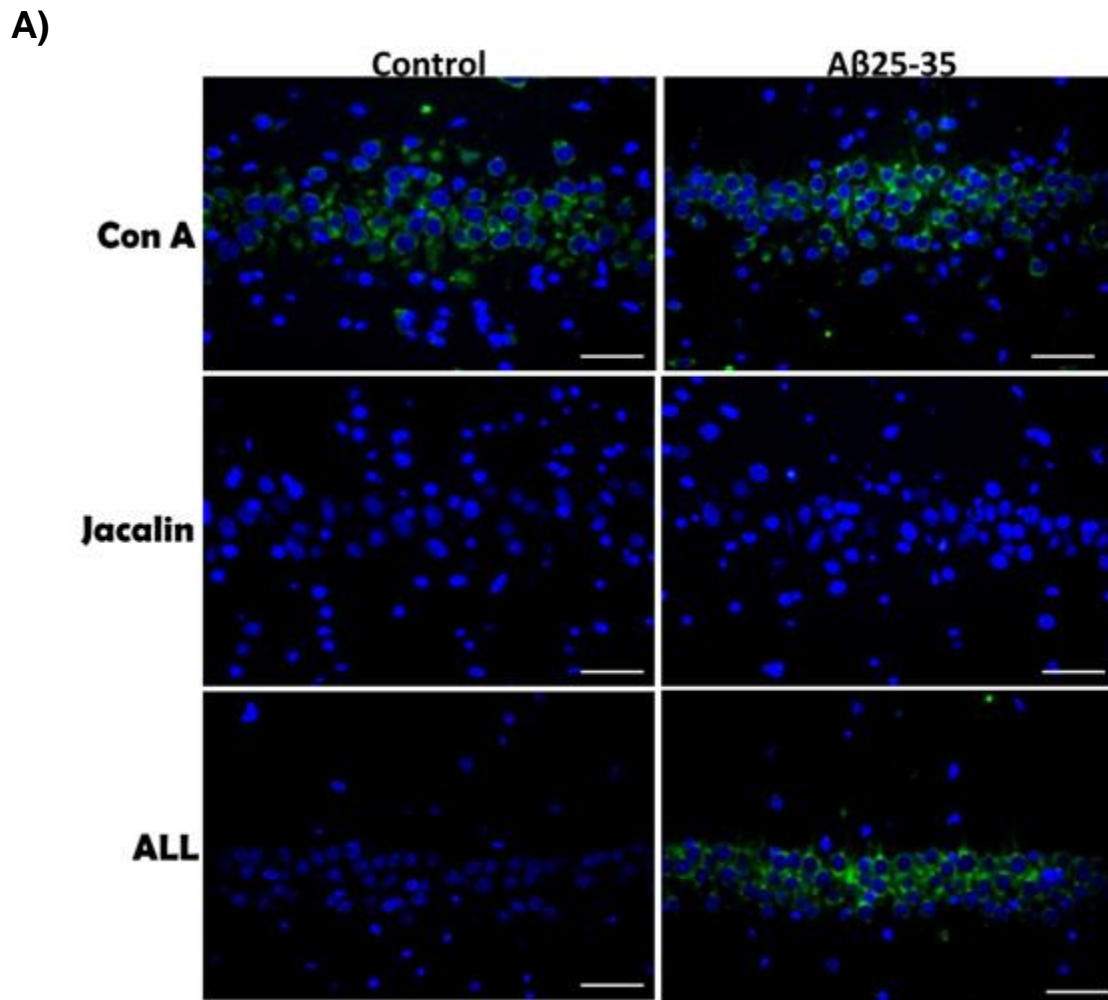


Fig. 1. La inyección de 1 μ l de A β 25-35 en CA1 de hipocampo de rata induce cambios en la O-glicosilación tipo mucina (ratas sacrificadas a los 10 días. n=8 por grupo). A) Microfotografías 40x que muestran reactividad a diferentes lectinas en color verde; B) graficas que muestran el número de células reactivas para cada lectina. Los datos corresponden al promedio \pm SE (prueba de Mann-Whitney) Barra de escala 15 μ m.

Tinción de hematoxilina-eosina.

Para evaluar la muerte neuronal se observó al microscopio de campo claro las muestras de cerebro teñidas con hematoxilina-eosina, en las cuales se pudo observar que el hipocampo de ratas tratadas con A β 25-35 muestra mayor número de células con núcleo picnótico y citoplasma eosinofílico, principalmente en las células piramidales de la región de CA1- El daño ocasionado se extendió a las áreas adyacentes de CA2 y GD, donde también se encontraron células neuronales y glía muertas (fig.2).

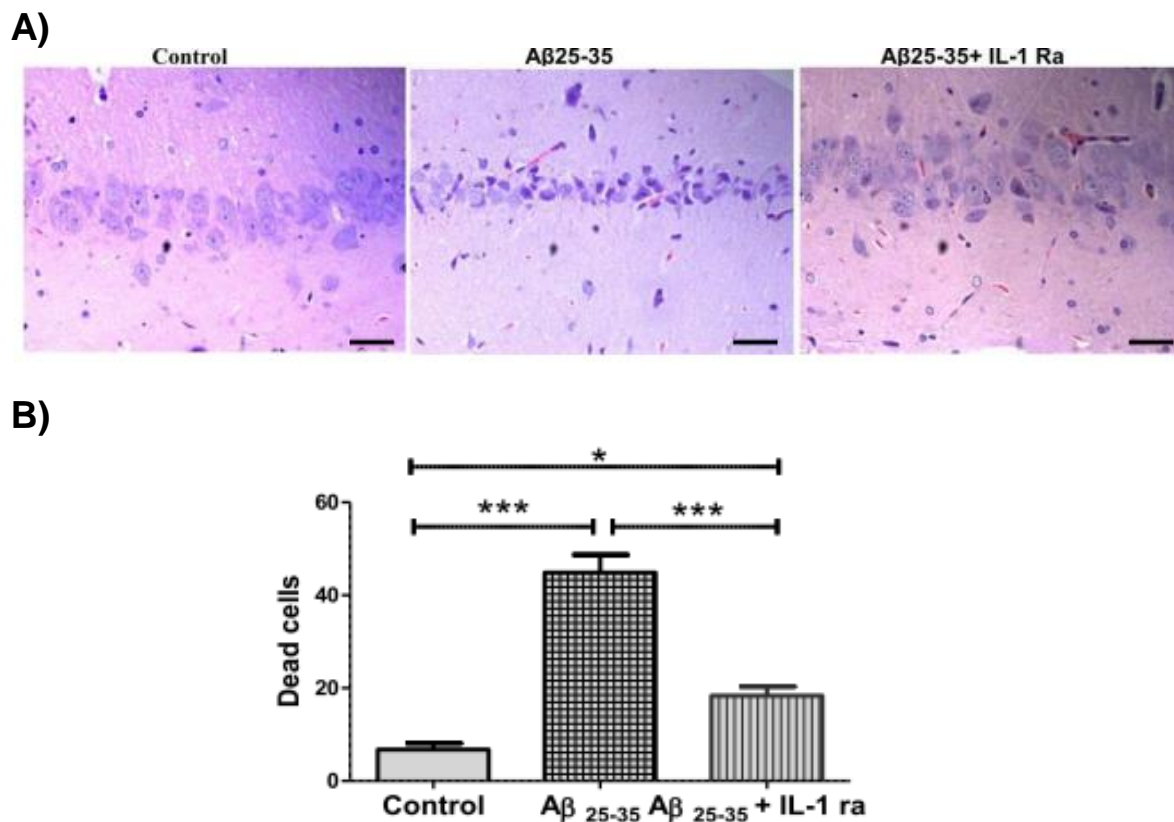


Fig. 2. A) Tinción de H&E de la región de CA1 de hipocampo de ratas tratadas con A β 25-35 (ratas sacrificadas a los 10 días. n=8 por grupo) y el grupo control, B) número de células con señales de muerte (Cariorexix, picnosis y cariolisis) después de 10 días de la inyección. Los datos corresponden al promedio \pm SE (ANOVA con prueba de Tukey * p <0.1, *** p <0.001) Barra de escala 15 μ m.

Inhibición competitiva de ALL y digestión con tripsina.

Cuando se incubaron con 200 mM de diversos azúcares (GalNAc, Gal, Glu, GluNAc, Fuc, Man, etc.), se observó que el único azúcar que inhibió el marcaje de ALL fue GalNAc. Este resultado también fue comprobado por hemaglutinación de eritrocitos. Los tejidos que también fueron incubados con tripsina (1mg/ml) tuvieron pérdida del marcaje de ALL en el hipocampo (fig. 3).

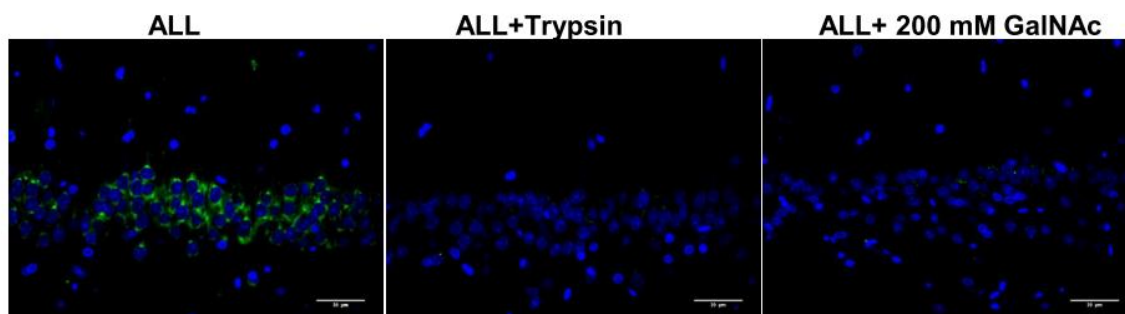
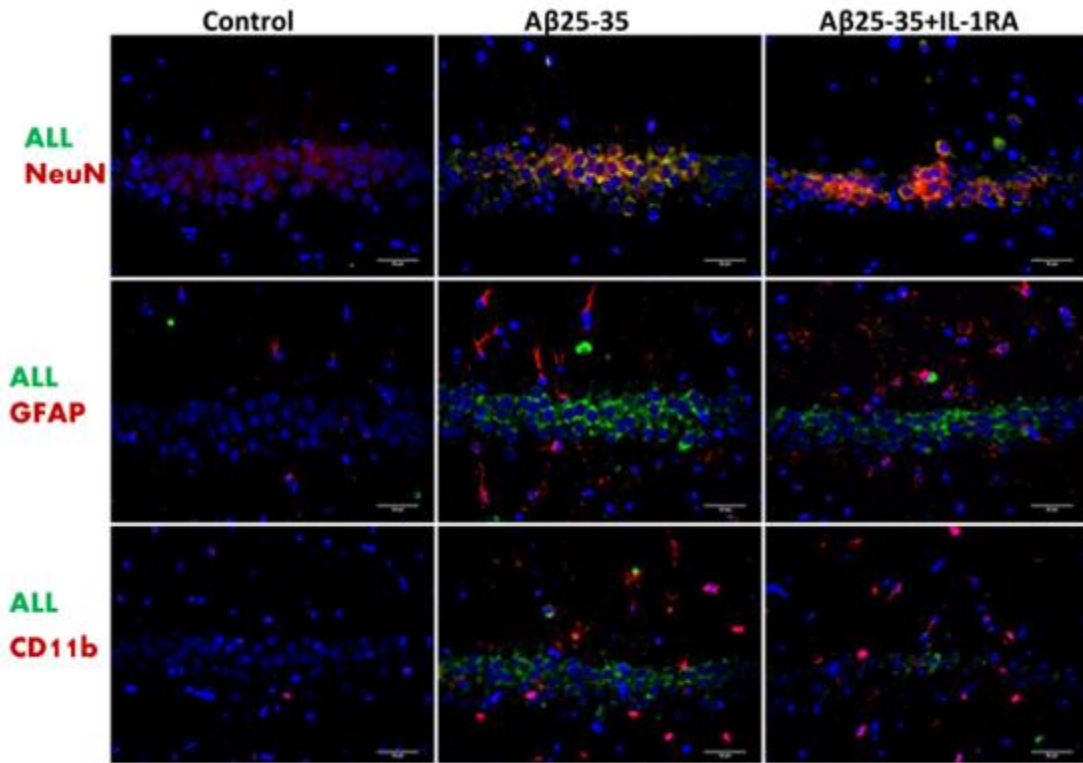


Fig. 3. Hipocampo de ratas tratadas con A β 25-35 y sacrificadas a los 10 días.(n=8 por grupo) que fueron incubadas con ALL, ALL + GalNAc y ALL en tejidos que fueron tratados con tripsina por 3 horas previamente. Barra de escala 15 μ m.

Identificación del tipo celular reconocido por ALL y neuroinflamación.

En el ensayo de inmunohistoquímica con anticuerpos y con lectina de ALL se observó que las células reconocidas por ALL no fueron positivas al marcaje con anti-CD 11b ni con anti-GFAP, pero cuando se utilizó anti-NeuN prácticamente el 100% de células ALL positivas fueron positivas a NeuN. También se pudo observar un incremento de más del 100% en la inmunoreactividad a los anticuerpos anti-CD11b y anti-GFAP en la región de CA1 de ratas tratadas con A β 25-35. El grupo A β 25-35 +IL-1Ra mostró menor reconocimiento de la lectina de ALL con respecto al grupo tratado con A β 25-35 solamente. Este efecto también fue el mismo para CD-11 y GFAP (fig. 4).

A)



B)

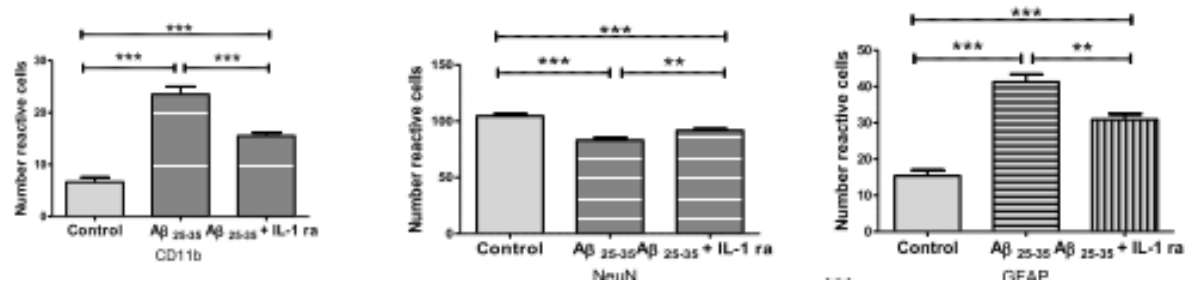


Fig. 4. Neuroinflamación inducida por la inyección de 1 μ l de A β 25-35 (ratas sacrificadas a los 10 días. n=8 por grupo) A) fotomicrografías que muestran la inmunoreactividad a diferentes anticuerpos en rojo (GFAP, NeuN y CD 11b) B) número de células positivas a cada anticuerpo. Datos corresponden al promedio \pm SE (ANOVA con prueba de Tukey *p<0.1, ***p<0.001) barra de escala 15 μ m.

Detección de apoptosis.

En el grupo de ratas sacrificadas a los 10 días con A β 25-35 hubo reactividad a los anticuerpos caspasa 3 y citocromo C, mientras en el inyectado con solución salina

no se apreció marca alguna de anti- caspasa 3 y el anti- citocromo marco solamente mitocondrias. También se pudo observar que las neuronas positivas a ALL también fueron positivas para citocromo C en citosol y caspasa 3 en el grupo con A β 25-35, sin embargo el número de neuronas reactivas a estos anticuerpos y a ALL fue menor en el grupo de A β 25-35+IL-1RA (Fig. 5).

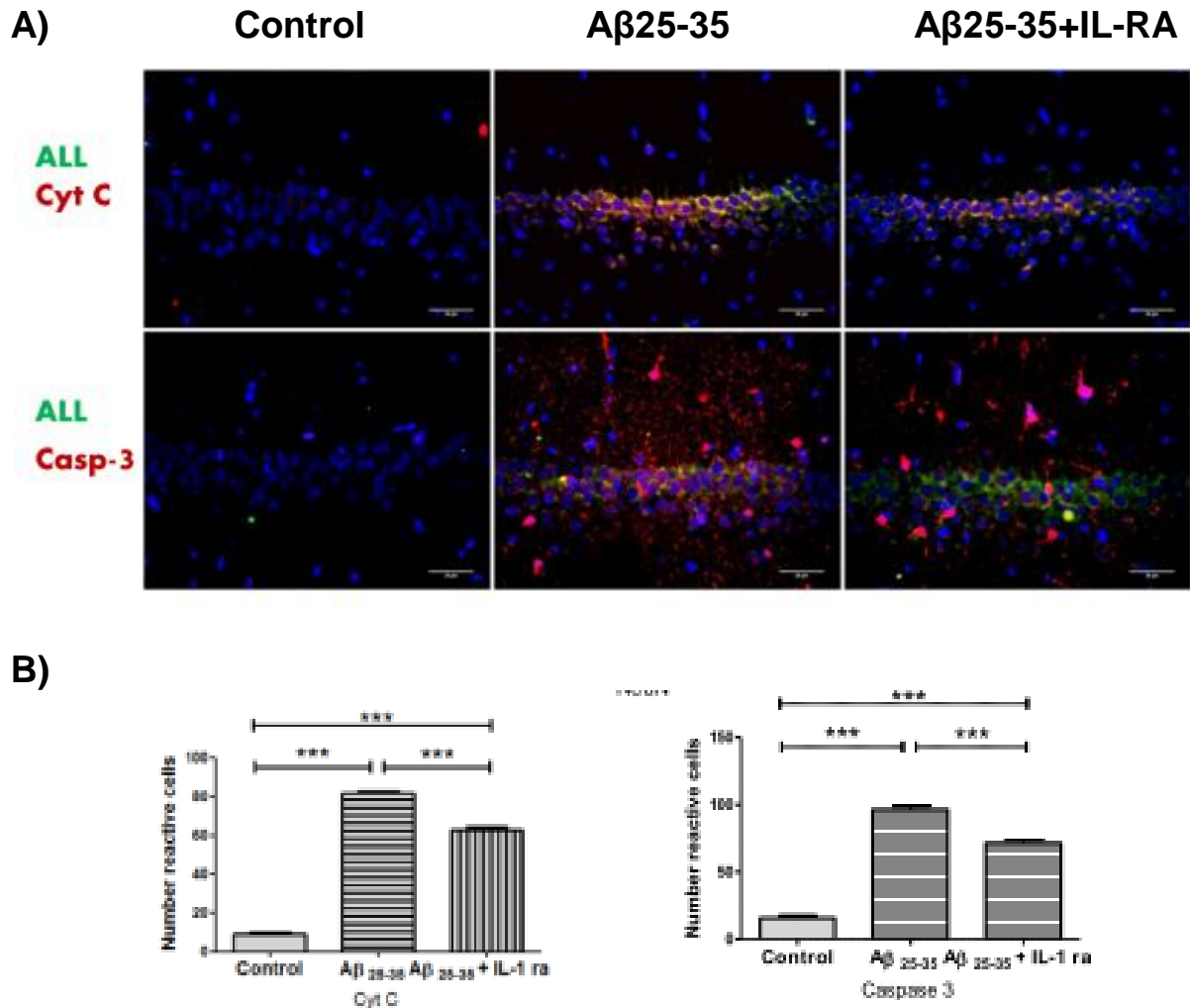


Fig.5. Apoptosis por la inyección de 1 μ l de A β 25-35. A) microfotografía que muestran la inmunoreactividad a diferentes anticuerpos en rojo (citocromo C y caspasa 3 activa) y ALL en verde. B) número de células positivas a anti-caspasa 3 y citocromo C en citoplasma en la región de CA1 de hipocampo. Datos corresponden al promedio \pm SE (ANOVA con prueba de Tukey * p <0.1, *** p <0.001) barra de escala 15 μ m.

Cinética con A β 25-35 y glicosilación.

Con la idea de explorar la expresión la glicosilación a través de tiempo un grupo se sacrificó al cabo de 5 días, en el que se observó pocas células positivas a ALL y también pocas células muertas, principalmente en la región próxima a la inyección del A β 25-35. En el grupo que se sacrificó a los 30 días se encontraron pocas células marcadas por ALL, en comparación con el grupo de 10 días, sin embargo en este grupo todas neuronas piramidales presentaba cariorrexis y picnosis, característica de células muertas por apoptosis (Fig. 6).

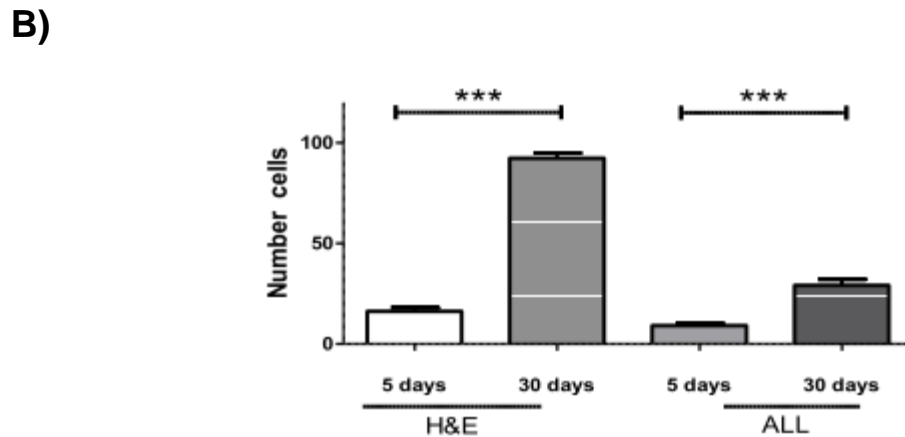
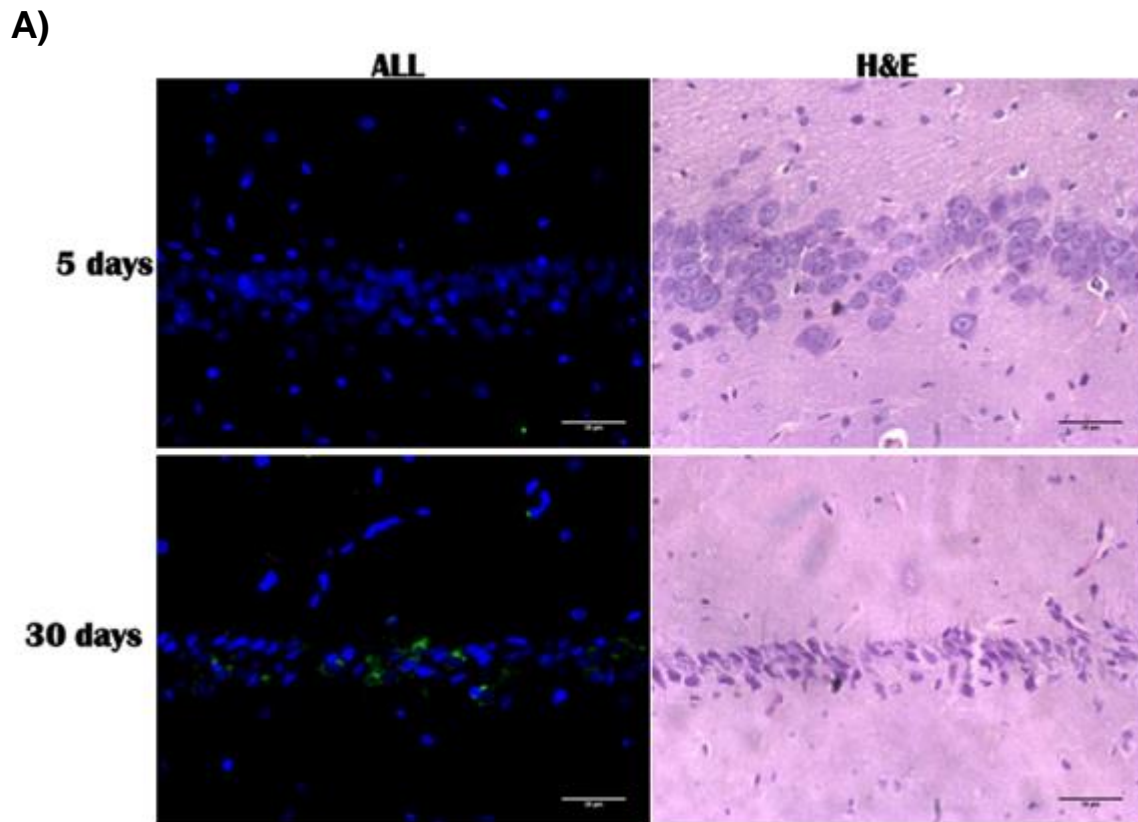


Fig. 6. La inyección de 1 μ l de A β 25-35 en la región de CA1 ocasiona muerte neuronal que se va exacerbando con el tiempo (N= 8). A) Microfotografía de tinción H&E de hipocampo y fluorescencias con ALL de ratas tratadas con sacrificadas A β 25-35 a los 5 y 30 días, B) número de células muertas para H&E y número de células positivas ALL. Datos corresponden al promedio \pm SE (barra de escala 15 μ m).

Discusión.

Al amiloide β se le atribuye el papel central en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, la cual culmina en un proceso neurodegenerativo de muerte y pérdida de funcionalidad neuronal, proceso que se estima puede tomar aproximadamente 20 años entre la aparición de oligómeros de $A\beta$ y los primeros síntomas de pérdida de memoria (Meda et al., 2004). Se sabe que durante este periodo ocurre una serie de eventos como neuroinflamación y estrés oxidativo que exacerban el daño y ocasiona muerte neuronal sin embargo, aunque se conoce la coexistencia de todos estos procesos, no se ha reportado la secuencia exacta de eventos de como el $A\beta$ desencadena la neurodegeración (Karran et al., 2016).

En este trabajo nosotros usamos como modelo de la EA la inyección de $A\beta_{25-35}$ en la región de CA1 de hipocampo. En este modelo no se desarrollan PNs ni MNFs, pero las ratas desarrollan diversas alteraciones bioquímicas, morfológicas e inflamatorias similares a lo reportado en pacientes con EA (Millucci et al., 2010), por lo que este modelo permite estudiar la secuencia temporal del proceso neurodegerativo ocasionando por el amiloide β y dilucidar otros mecanismos que han sido poco estudiados en SNC.

La glicosilación es una modificación post-traducciona que puede verse afectada por la inflamación, además de jugar un papel importante en la apoptosis (Cagnoni et al., 2016). En el modelo de inyección $A\beta_{25-35}$ se desencadena un proceso inflamatorio por lo que nosotros nos dimos a la tarea de buscar cambios en los patrones de glicosilación y ver si estos cambios están relacionados con el proceso de muerte neuronal. Para evaluar posibles cambios en los diferentes tipos de glicosilación se usaron diferentes lectinas; como Con A, una lectina de unión a manosa que reconoce principalmente N-glicosilaciones.

La Con A mostró una alta reactividad en hipocampo en ambos grupos, por lo que no se pudieron observar diferencias en cuanto número e intensidad de marcaje. La lectina de jacalina mostró resultados similares. Por otro lado la única lectina que mostró diferencia significativa fue ALL, donde observamos que ratas inyectadas con $A\beta_{25-35}$ y sacrificadas a los 10 días tienen mayor reconocimiento en la región de

CA1. Cabe mencionar que el marcaje de ALL también se observó en las regiones de CA2 y GD lo que nos lleva suponer que el efecto de 1 μ l A β 25-35 a 100 μ M se extiende a otras partes del hipocampo.

Resulta interesante la diferencia en marcaje entre la jacalina y ALL, ambas específicas para Gal β 1,3-GalNAc α 1,0-Ser/Thr. Esta diferencia radica en que existe una sutil diferencia entre ellas. Mientras ALL reconoce el grupo OH en el carbono 4 y el grupo N-acetil en el carbono 2 de la GalNAc (Hernández et al., 2004), La jacalina reconoce el grupo OH del carbono 2, 3 y 4 de la Galactosa. Además la presencia de ácido siálico en posición terminal inhibe su reconocimiento (Sastry et al., 1986; Sharma et al., 1998). La estructura terciaria de las proteínas también afecta la disposición de las cadenas de oligosacáridos ocasionando que lectinas con afinidad similar reconozcan diferentes proteínas. Para comprobar la especificidad de ALL se realizó el ensayo de inhibición incubando con 200 mM de GalNAc, Gal, Glu, GluNAc, Fuc, Man, etc., el único azúcar que inhibió el marcaje de ALL fue GalNAc, este resultado también se comprobó por hemaglutinación de eritrocitos. El ensayo de digestión incubando con tripsina (1mg/ml) durante 3 hrs también ocasionó pérdida del marcaje de ALL en el hipocampo, lo que indica que el receptor de ALL es de naturaleza proteica y fue digerido por acción de la tripsina.

En estudios previos se ha observado que tanto el amiloide β completo (1-42) como el fragmento 25-35 provoca la activación de la microglía y aumenta los niveles de citocinas proinflamatorias (Diaz et al., 2012), lo cual concuerda con nuestros resultados donde observamos el aumento de la expresión de CD11b y GFAP en hipocampo de ratas tratadas con A β 25-35. Los ensayos de doble marcaje por inmunohistoquímica mostraron que la astrogliosis y la activación de la microglia ocurren al mismo tiempo que la expresión de proteínas O-glicosiladas reconocidas por ALL. El marcador de neuronas maduras NeuN nos permitió comprobar que las células ALL positivas son neuronas de la región de CA1 de hipocampo.

La positividad a anticuerpos anti- caspasa 3 activa y citocromo C en citosol de las células positivas a ALL, nos permite suponer que estas neuronas entraron en la vía intrínseca de apoptosis, donde un paso inicial es el escape de citocromo C al citosol. El ensayo con IL-1ra disminuyó el proceso inflamatorio y la muerte neuronal, lo que

concuenda con estudios previos (Díaz et al., 2012), La administración de IL-1RA también resultó en la disminución del marcaje de ALL en CA1 de hipocampo, es decir que la expresión de proteínas O-glicosiladas en la membrana celular de las neuronas fue menor que en ratas tratadas con únicamente con A β 25-35. Esto evidencia una correlación positiva entre la neuroinflamación y la O-glicosilación tipo mucina. Existen reportes acerca de cómo la inflamación llega a modificar la expresión de glicosiltransferasas y por lo tanto la glicosilación de proteínas en retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Dewald et al., 2016), Esto nos lleva a suponer que existe una relación directa entre la inflamación y el aumento de la O-glicosilación en neuronas, dando como resultado un aumento en las glicoproteínas de la membrana celular de las neuronas.

La microglía expresa lectinas endógenas que pueden interactuar con las glicoproteínas en la membrana celular de las neuronas. Este es el caso de la galectina 1, una lectina de unión a galactosa, que se le ha atribuido un rol anti-inflamatorio en un modelo de esclerosis múltiple, al unirse con O-glicanos de CD 45 y retener su actividad inhibitoria en neuronas (Starossom et al., 2012; Rotshenker 2009). En el caso de daño por isquemia o traumatismo la microglia expresa galectina 3, la cual tiene un efecto proinflamatorio propiciando la diferenciación de la microglia a un fenotipo M1 (Sato et al., 2011).

Considerando que el ambiente inflamatorio induce cambios en la expresión de glicosiltransferasas y por lo tanto cambios en los patrones de glicosilación de las neuronas. Estos cambios permiten el reclutamiento de microglía u otras células del sistema inmune (Espinosa et al., 2003), lo que favorece la neurodegeneración. Por lo anterior consideramos que la glicosilación podría ser un nuevo blanco terapéutico, quedando como perspectiva futuros ensayos enfocados a la inhibición de la O-glicosilación tipo mucina en neuronas

Conclusiones.

- La inyección de A β 25-35 en la región CA1 de hipocampo modifica los patrones de glicosilación tipo mucina en neuronas piramidales.
- El aumento de la glicosilación tipo mucina en CA1 está asociada a astrogliosis y activación de la microglía.
- Las neuronas O-glicosiladas de CA1 son positivas a marcadores de apoptosis.
- La expresión de proteínas O-glicosiladas es mayor a los 10 días y decae su expresión con el tiempo.

Perspectivas.

- Caracterización bioquímica del receptor de ALL por electroforesis y por lectin blot.
- Identificación del receptor de ALL por MALDI-TOF.
- Evaluar el efecto de Benzil-GalNAc, un inhibidor de O-glicosilación en ratas administradas con A β 25-35.
- Medir la expresión de las glicosiltransferasas en ratas administradas con A β 25-35.

Bibliografía.

Alzheimer's Association. Alzheimer's Association Report 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2011; 7: 208–244

Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1473: 4–8

Bacigalupo M, Manzi M, Rabinovich G, Troncoso M. Hierarchical and selective roles of galectins in hepatocarcinogenesis, liver fibrosis and inflammation of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 8831-8849

Bagyinszky E, Giau V, Shim K, Suk K, Kim S. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *J Neurol Sci.* 2017 May 15; 376: 242-254

Bayer TA, Wirths O, Majtenyi K, Hartmann T, Multhaup G, Beyreuther K. Key factor in Alzheimer's disease: beta-amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport. *Brain Pathol* 2001; 11: 1-11

Bolshette N, Thakur K, Bidkar A, Trandafir C, Kumar P, Gogoi R. Protein folding and misfolding in the neurodegenerative disorders: a review. *Rev Neurol.* 2014; 170(3):151-61

Brady S, Siegel G, Albers R, Price D. *Basic Neurochemistry, Eighth Edition.* USA Academic Press 2011; Capitulo 1.

Cagnoni A.J., Perez Saez J.M., Rabinovich G.A., Mariño K.V Turning-off signaling by Siglecs, selectins and galectins: chemical inhibition of glycan-dependent interaction in cancer. *Front Oncol* 2016 13

Cai Z, Hussain M, Yan L. Microglia, Neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci.* 2014; 124(5): 307-321

Chase S, Magnani J, Simon S. E-selectin ligands as mechanosensitive receptors on neutrophils in health and disease. *Ann Biomed Eng.* 2012; 40: 849-59

Claude J, Linnartz-Gerlach B, Kudin A, Kunz W, Neumann H. Microglial CD33-Related Siglec-E Inhibits Neurotoxicity by Preventing the Phagocytosis-Associated Oxidative Burst. *The Journal of Neuroscience* 2013; 46: 18270 –18276

Clementi M, Misiti F. Substitution of methionine 35 inhibits apoptotic effects of Abeta(31-35) and Abeta (25-35) fragments of amyloid-beta protein in PC12 cells. *Med Sci Monit* 2005; 11(11): 381-385

Cornelia P, Griffith L, Langeb R, Schachner M, Hertleind B, Traub O, Schmitz B. Tyrosine and serine phosphorylation of the neural cell adhesion molecule L 1 is implicated in its oligomannosidic glycan dependent association with NCAM and neurite outgrowth. *European Journal of Cell Biology* 1998; 75; 97-106

Cui H, Freeman C, Jacobson G, Small D. Proteoglycans in the Central Nervous System: Role in Development, Neural Repair, and Alzheimer's Disease. *IUBMB Life* 2013; 65: 108-20

Diaz A, Limon D, Chávez R, Zenteno E, Guevara J. A β 25-35 injection into the temporal cortex induces chronic inflammation that contributes to neurodegeneration and spatial memory impairment in rats. *J Alzheimers Dis.* 2012; 30(3):505-522

Guevara J., Espinosa B, Zenteno E, Vázquez L, Luna J, Perry G, Mena R. Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer Disease. *J. Neuropathol Exp Neurol.* 1998; 57: 905-914

Hampel H, Blennow K, Shaw LM, Hoessler YC, Zetterberg H, Trojanowski JQ. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 2010; 45(1): 30-40

Harting M, Jimenez F, Adams S, Mercer D, Cox C. Acute, regional inflammatory response after traumatic brain injury: Implications for cellular therapy. *Surgery* 2008; 144: 803–813.

Hernández P, Debray H, Jaekel H, Garfias Y, Jiménez Md del C, Martínez-Cairo S, Zenteno E. Chemical characterization of the lectin from *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* by 2-D proteome analysis. *Glycoconj. J.* 18;2001: 321-329

Hernández, P., Tetaert, D., Vergoten, G., Debray, H., del Carmen Jimenez, M., Fernández, G., Agundis, C., Degand, P. & Zenteno, E. (2004) Specificity of *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin for O-glycopeptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1674, 282-290.

Kaksonen M, Pavlov I, Vootele V, Lauri S, Hienola A, Riekkari R, Lakso M, Taira T, Rauvala H. Syndecan-3-Deficient Mice Exhibit Enhanced LTP and Impaired Hippocampus-Dependent Memory. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2002; 21; 158–172

Karran, E., De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem* 2016

Kim S, Rhim H. Effects of amyloid- β peptides on voltage-gated L-type Ca (V) 1.2 and Ca (V) 1.3 Ca(2+) channels. *Mol Cells* 2011; 32(3): 289-294

Kleene R, Schachner M. Glycans and Neural Cell Interactions. *Nature Reviews Neuroscience* 2004; 5; 195-208

Kleene R, Yang H, Kutsche M, Schachner M. The Neural Recognition Molecule L1 Is a Sialic Acid-binding Lectin for CD24, Which Induces Promotion and Inhibition of Neurite Outgrowth. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 21656-21663

Limon D, Ramirez, E, Diaz A, Mendieta L, Mayoral M, Espinosa B, Guevara J, Zenteno E, Alteration of the sialylation pattern and memory deficits by injection of Amyloid 25–35) into the hippocampus of rats. *Neuroscience Letters* 2011; 495: 11–16

Linnartz B, Neumann H. Microglial Activatory (Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif) and Inhibitory (Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif)-Signaling Receptors for Recognition of the Neuronal Glycocalyx. *GLIA* 2013; 61: 37–46

Linnartz B, Bodea L, Neuman H. Microglial carbohydrate-binding receptors for neural repair. *Cell Tissue Res* 2012; 349; 215–227

Meda L., Baron P., Prat E., Rossi F. Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with beta-amyloid 25-35. *J Neuroimmunol* 93 2004; 45-52

Millucci L, Ghezzi L, Bernardini G, Santucci A. Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35. *Curr Protein Pept Sci.* 2010; 11:54-67

Muller M, Wang C, Skibo G, Toni N, Cremer H, Calaora V, Rougon G, Kiss J. PSA–NCAM Is Required for Activity-Induced Synaptic Plasticity. *Neuron* 1996; 17: 413–422

Parvathenani L, Calandra V, Roberts S, Posmantur R. cAMP delays beta-amyloid (25-35) induced cell death in rat cortical neurons. *Neuroreport.* 2000; 10:2293-2297

Prieto GA, Cotman C. Cytokines and cytokine networks target neurons to modulate long-term potentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017; 34: 27-33

Rotshenker S. The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease. *J Mol Neurosci.* 2009;39: 99-103

Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverría I, Monge-Bonilla C. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's disease: An Update. *Ann Neurosci.* 2017; 24 : 46-54

Sastry M, Banarjee P, Patanjali S, Swamy M, Swarnalatha G, Surolia A. Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (beta-D-Gal(1----3)D-GalNAc). *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 11726-11733.

Satoh K, Niwa M, Goda W, Binh N, Nakashima N, Takamatsu M y Hara A. Galectin-3 expression in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia, and its inhibition by hypothermia. *Brain Research* 2011; 1382: 266-274

Sharma V, Srinivas V, Adhikari P, Vijayan M, Surolia, A. Molecular basis of recognition by Gal/GalNAc specific legume lectins: influence of Glu 129 on the specificity of peanut agglutinin (PNA) towards C2-substituents of galactose. *Glycobiology.* 1998; 8:1007-1012.

Schmid R, Maness P. L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. *Curr Opin Neurobiol.* 2008; 18: 245–250.

Starossom S, Mascanfroni I, Imitola J, Cao L, Raddassi K, Hernandez S, Bassil R, Croci D, Cerliani P, Delacour D, Wang Y, Elyaman W, Khoury S, Rabinovich G. Galectin-1 Deactivates Classically Activated Microglia and Protects from Inflammation-Induced Neurodegeneration. *Immunity* 2012; 37: 249–263

Stewart K, Radford S. Amyloid plaques beyond A β : a survey of the diverse modulators of amyloid aggregation. *Biophys Rev.* 2017 1-15

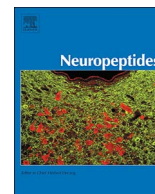
Su F, Bai F, Zhou H, Zhang Z. Microglial toll-like receptors and Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun.* 2016; 52: 187-198

Varki A, Cummings R, Esko J, et al. *Essentials of Glycobiology.* 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press (2009); Capitulo 3

Von Der Ohe M, Wheeler S, Wuhrer M, Harvey D, Liedtke S, Mühlenhoff M, Gerardy-Schahn R, Geyer H, Dwek R, Geyer R, Wing D, Schachner M. Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM. *Glycobiology* 2002; 12: 47-63

Wang C, Chen T, Li G, Zhou L, Sha S, Chen L. Simvastatin prevents β -amyloid(25-35)-impaired neurogenesis in hippocampal dentate gyrus through α 7nAChR-dependent cascading PI3K-Akt and increasing BDNF via reduction of farnesyl pyrophosphate. *Neuropharmacology* 2015; 97: 122-32

Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 2011; 4(3): 1-13



Neuroinflammation induced by amyloid β 25–35 modifies mucin-type O-glycosylation in the rat's hippocampus



Ivan Ramos-Martinez^{a,d}, Pamela Martínez-Loustalot^a, Liliana Lozano^a, Tarik Issad^b, Daniel Limón^c, Alfonso Díaz^e, Armando Perez-Torres^f, Jorge Guevara^a, Edgar Zenteno^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Mexico

^b CNRS, Département d'Endocrinologie, Métabolisme et Cancer, Institut Cochin, 75014 Paris, France

^c Laboratorio de Neurofarmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

^d Posgrado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04510, Mexico

^e Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

^f Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Alzheimer's disease
Neuroinflammation
Mucin-type glycosylation
Lectin
Apoptosis

ABSTRACT

Amyloid- β ($A\beta$) plays a relevant role in the neurodegenerative process of Alzheimer's disease (AD). The 25–35 peptide of amyloid- β ($A\beta$ 25–35) induces the inflammatory response in brain experimental models. Mucin-type O-glycosylation has been associated with inflammation of brain tissues in AD, thus in this work, we aimed at identifying changes in the glycosylation profile generated by the injection of $A\beta$ 25–35 into the CA1 of the hippocampus of rats, using histochemistry with lectins. Our results indicate that 100 μ M $A\beta$ 25–35 induce increased recognition of the *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) (specific for Gal β 1,3-GalNAc α 1,0-Ser/Thr); whereas concanavalin A (Con A) (specific for α -Man) showed no differences among treated and control groups of rats. Jacalin and peanut agglutinin (Gal β 1,3GalNAc α 1,0-Ser/Thr) showed no recognition of brain cells of control or treated rats. After 6-h treatment of the tissue with trypsin or with 200 mM GalNAc, the interaction with ALL was inhibited. Immunohistochemistry showed positive anti-NeuN and ALL-recognition of neurons; however, anti-GFAP and anti-CD11b showed no co-localization with ALL. The ALL⁺ neurons revealed the presence of cytochrome C in the cytosol and active caspase 3 in the cytosol and nucleus. Administration of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) to $A\beta$ 25–35-treated rats diminished neuroinflammation and ALL recognition. These results suggest a close relationship among over-expression of mucin-type O-glycosylation, the neuroinflammatory process, and neuronal death.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia in the aged adult; the histopathological lesions identifying AD are amyloid plaques and neurofibrillary tangles (Alzheimer's Association, 2011). Amyloid- β , particularly, its 25–35 peptide ($A\beta$ 25–35) is considered responsible for its neurotoxicity (Benilova et al., 2012; Kubo et al., 2002; Pike et al., 1995). This peptide is characterized by its high aggregating capacity that confers toxicity and its administration to rat brains causes memory damage and free radicals production (Cuevas et al., 2009; Stepanichev et al., 2005; Zhang et al., 2012). Recent studies have shown that inflammation plays a central role in AD and in the neurodegeneration induced by $A\beta$ 25–35, which induces release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α , whereas

administration of the IL-1 β receptor antagonist (IL-1RA) diminishes neuronal death (Diaz et al., 2012).

Glycosylation is one of the most important modifications of proteins and lipids; the cell surface glycoconjugates play important roles in a variety of biological functions, including cell-cell interactions, bacterial adhesion, and cell signaling (Kleene and Schachner, 2004). In the central nervous system (CNS), diverse processes such as neurogenesis, inflammation, and neurodegeneration seem to be mediated by glycoproteins that interact with diverse endogenous lectins, like galectins, Siglecs, and selectins, present in the microglia and astrocytes (Linnartz et al., 2012; Lozano et al., 2017). There are two types of glycosylation: N-glycosylation by the addition of N-acetylglucosamine (GlcNAc) to asparagine and O-glycosylation where N-acetylgalactosamine (GalNAc) is linked to serine/threonine (also termed mucin-type O-glycosylation)

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Avenida Universidad 3000, Coyoacán 04510, Mexico.

E-mail address: ezenteno@unam.mx (E. Zenteno).

<https://doi.org/10.1016/j.npep.2017.11.008>

Received 5 May 2017; Received in revised form 17 November 2017; Accepted 17 November 2017

Available online 21 November 2017

0143-4179/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

(Laderach et al., 2010). Glycan structures are modified in pathologic states including cancers and inflammatory diseases; for example, modification of cell glycosylation is promoted by an alteration in the expression of glycosyltransferase (GT) genes. In particular, changes in mucin-type O-glycosylation have been observed in diverse pathologies, like cancer, diabetes, and autoimmune diseases, among others (Schjoldager and Clausen, 2012).

In Alzheimer's disease a significant increase in the production of O-glycosylated proteins (Gal β 1,3GalNAc α 1,0 Ser/Thr or GalNAc α 1,0 Ser/Thr) has been reported, which could be associated with neuritic plaques and meganeurites in brain tissue with AD; these alterations were determined through positive labeling with the *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) (Guevara et al., 1998; Espinosa et al., 2001). In addition, intra-hippocampal administration of the A β 25–35 peptide to rats induced changes in the sialylation pattern; this has been shown using lectins specific for α 2,6-sialic acid (*Sambucus nigra* lectin) and α 2,3-sialic acid (*Maackia amurensis* lectin) (Limon et al., 2011).

Mucin-type O-glycosylation has been suggested to participate in the regulation of apoptosis in lymphocyte T subpopulations in the immune system, through the interaction with endogenous galectins (Toscano et al., 2007). Hence, in this work we attempted to elucidate whether the changes in the glycosylation profile were induced by the injection of A β 25–35 into the CA1 of the hippocampus of rats, and to associate the mucin-type O-glycosylation with neuroinflammation and neuronal death.

2. Material and methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (250–260 g) were used. Rats were housed with water and food *ad libitum* and under controlled environmental conditions of light-darkness (12 h:12 h), temperature, and humidity. We complied with the guidelines established by the Mexican standard on Use of Laboratory Animals, NOM-062, along the whole study. Animals were obtained from the Animal Facilities of the School of Medicine (UNAM).

2.2. Stereotaxic surgery

Rats ($n = 8$ for each experimental condition) were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg, Sedalphorte™); placed on the stereotaxic surgery apparatus, and an antero-posterior incision was made on the skull. Coordinates for the hippocampus were: antero-posterior -3.5 mm; lateral ± 2.8 mm respect to bregma, and depth of -3.0 mm respect to the duramater (Paxinos and Watson, 1998). The amyloid- β 25–35-peptide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was prepared at a concentration of 100 μ M in sterile saline solution (0.9% NaCl) and incubated at 37 °C for 36 h. The experimental group received 1 μ l A β 25–35 in CA1 region, and the control group received saline solution. A group of rats was treated with 1 μ l A β 25–35 and 1 μ l of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA, 20 μ g/ μ l; Sigma) 10 min before receiving A β 25–35 in the same brain region. Rats were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital after 5, 10, and 30 days.

2.3. Lectins and antibodies

Biotinylated lectins used were concanavalin A (Con A) (Sigma), jacalin (Vector Labs, CA, USA), and PNA (*Arachis hypogaea*, peanut lectin, Vector Labs). *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) was purified by affinity chromatography and labeled with biotin from Pierce Chemical (Rockford, IL). The antibodies were anti-CD11b (ABCam, Cambridge UK), anti-NeuN (ABCam), anti-GFAP (ABCam), active anti-caspase 3 (ABCam), and cytochrome C (Santa Cruz, Dallas TX, USA). Carbohydrates were from Sigma.

2.4. Immunohistochemistry

Rats were perfused first with saline solution and, then, their brains were fixed with 4% paraformaldehyde for 24 h and embedded in paraffin. Coronal 4- μ m thick sections were cut in a microtome Leica RM2125 (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). The slides were deparaffinized and rehydrated using conventional histological techniques. Nonspecific binding sites were blocked by incubating in IgG-free bovine serum albumin 2% (Sigma). Afterwards tissues were permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma). All antibodies and lectins were diluted at 1:100 in PBS with 1% BSA. Incubations were made at 4 °C overnight. DAPI was used as nuclear mark. The CA1 immunostained cells of the hippocampus were counted with a Leica DM/LS fluorescent microscope at 40 \times (Leica Microsystems, Wetzlar, GmbH, Germany).

2.5. Specificity of lectin labeling

To confirm the specificity of biotin-ALL interaction with the cells, the lectin (10 μ g/ μ l) was incubated with different monosaccharides at 200 mM, such as Gal, Man, Glc, L-Fuc, GlcNAc, sialic acid, and GalNAc, before being added to tissues in the histochemistry procedure. Moreover, to identify the nature of the ALL-putative receptor, tissues were treated with 1 mg bovine trypsin (Sigma) for 60 to 180 min, and then washed with PBS before adding biotin-ALL in the histochemistry assays.

2.6. Hematoxylin-eosin staining

The brains were immersed in 4% paraformaldehyde and then embedded in paraffin blocks, cut into 5- μ m thick slices. Tissues were mounted on silane-coated slides, paraffin was removed from the sections and they were rehydrated by using conventional histological techniques, then they were stained with hematoxylin (5 min) and eosin (3 min).

3. Results

3.1. A β 25–35 induced glycosylation changes

Histochemistry revealed differences in the reactivity of lectins between control and the A β 25–35-treated rat groups. Positive Con A-labeling was observed in the CA1 cells, in both the A β 25–35 treated and the control groups of rats. ALL (Gal β 1,3 GalNAc α 1,0 Ser/Thr) recognized cells mainly in region CA1 of the hippocampus of rats injected with A β 25–35, the control group did not show reactivity to ALL (Fig. 1A,B). With jacalin and PNA (data not shown) no reactivity was found in either the control or the A β 25–35-treated group. Incubating biotin-ALL with different monosaccharides before the histochemistry assays showed no effect in lectin labeling; however, lectin labeling was strongly diminished with 200 mM GalNAc. Interestingly, after tissue digestion with trypsin prior to ALL labeling, this lectin reactivity was abolished in the tissue from A β 25–35-treated rats (Fig. 1C).

3.2. IL-1RA decreased neuronal death induced by A β 25–35

Neuronal death was determined by using the hematoxylin-eosin (H&E) staining, which revealed that the A β 25–35-treated group presents pyknotic and eosinophilic cells in the CA1 region of the hippocampus, mainly in pyramidal neurons; the effect extended to region CA2. This neurotoxic effect diminished almost 50% in the group treated with IL-1RA, where a lower number of dead cells was observed; in addition, these cells showed pyknotic nuclei that were not fragmented yet (karyorrhexis). The control group did not show a significant number of dead cells, only some neurons with an eosinophilic cytoplasm (Fig. 2A, B).

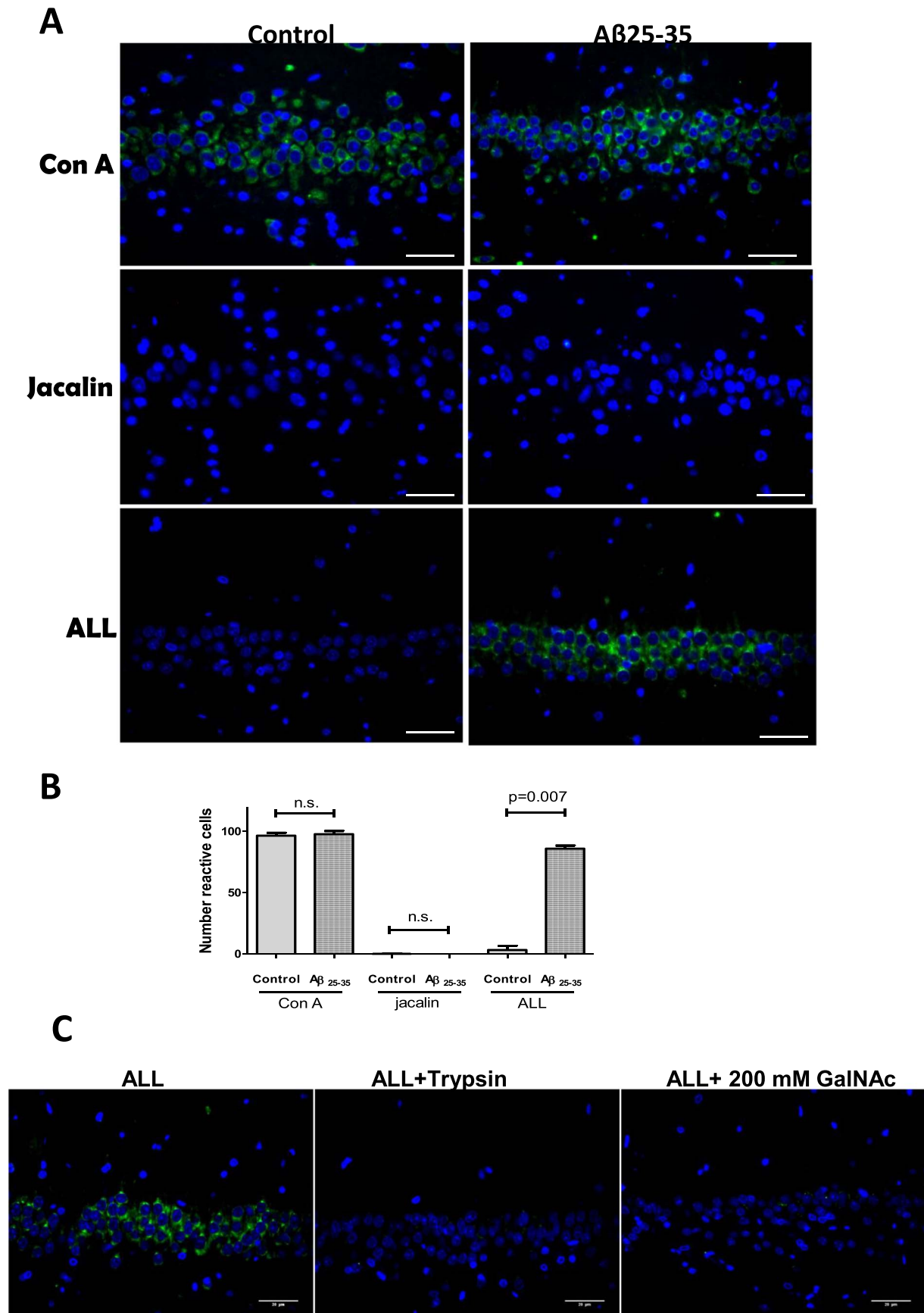


Fig. 1. Injection of 1 μ l A β 25–35 in the CA1 subfield of the hippocampus of rats induced mucin-type O-glycosylation (rats euthanized at 10 days, $n = 8$ per group). A) Photomicrographs 40 \times of reactivity to different lectins in green color. B) Number of reactive cells to different lectins (scale bars 15 μ m). C) Photomicrographs incubated of A β 25–35-treated rats with ALL + trypsin and ALL + 200 mM GalNAc, Number of reactive cells to different lectins (scale bars 20 μ m). Data correspond to the mean \pm SE. (Mann-Whitney test, n.s. = not significant.) (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

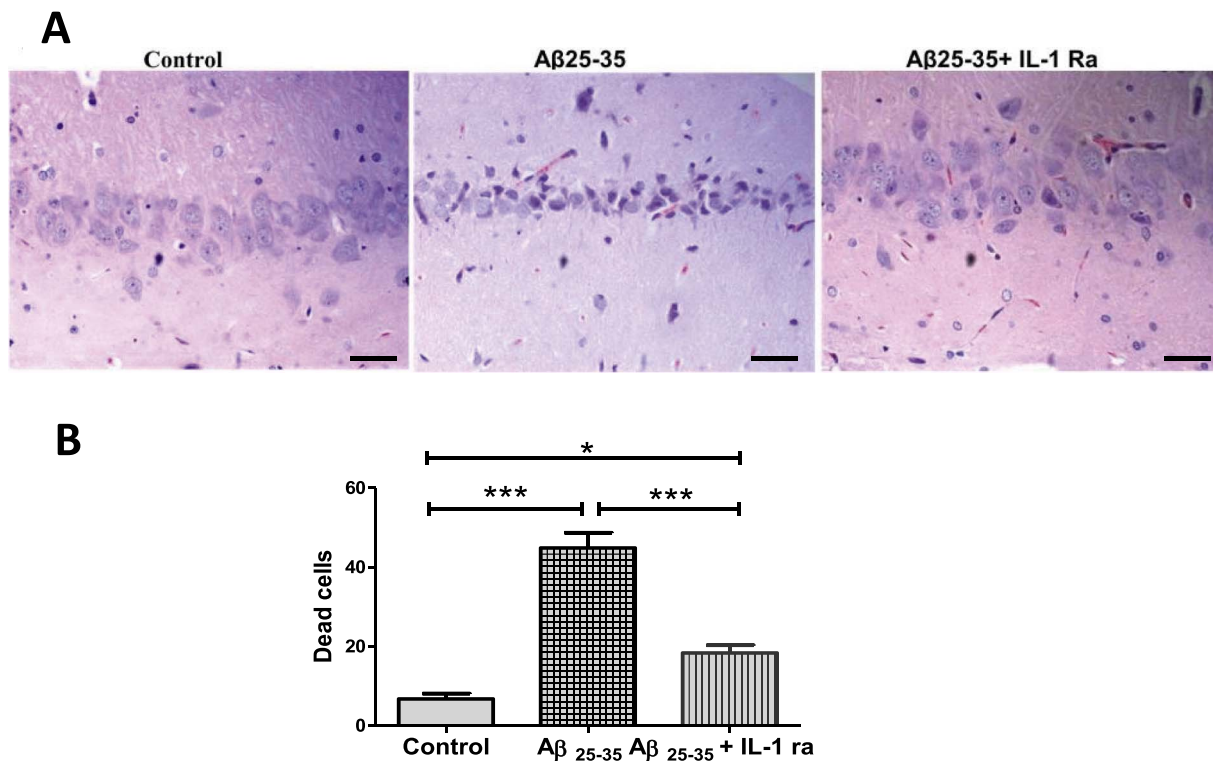


Fig. 2. Hippocampus of Aβ_{25–35}-treated rats euthanized at 10 days ($n = 8$ per group) A) H&E staining of rats with Aβ_{25–35}, Aβ_{25–35} + IL-1RA, and control. B) Number of cells with signals of death (karyorrhexis, pyknosis, and karyolysis) in region CA1 of the hippocampus (scale bars 15 μm). Data correspond to the mean ± SE. (ANOVA with a Tukey post-test. * $p < 0.1$, *** $p < 0.001$.)

3.3. Identification of the cellular type recognized by ALL and neuroinflammation

Immunohistochemistry with antibodies and ALL revealed that cells recognized by ALL were not positive to anti-CD 11b or anti-GFAP; when anti-NeuN was used, practically 100% of ALL-positive cells were also recognized by anti-NeuN in the Aβ_{25–35}-treated group. Increased immunoreactivity to anti-CD 11b (380%) and anti-GFAP (260%) antibodies was observed in CA1 cells of the hippocampus of rats treated with Aβ_{25–35}. The Aβ_{25–35} + IL-1RA group showed lower recognition by ALL with respect to the group treated only with Aβ_{25–35}; this effect was the same for CD-11b and GFAP (Fig. 3A).

3.4. Detection of caspase 3 and cytochrome C

The Aβ_{25–35}-treated group showed positive labeling by antibodies against caspase 3 and cytochrome C in the cytosol, whereas the group receiving saline solution showed no reaction to anti-caspase 3; anti-cytochrome C labeling was observed in mitochondria. The cytosol of ALL + neurons was positive to anti-cytochrome and caspase 3 in the group treated with Aβ_{25–35}; however, the number of neurons reactive to these antibodies and to ALL was lower in the Aβ_{25–35} + IL-1RA group (Fig. 3A,B).

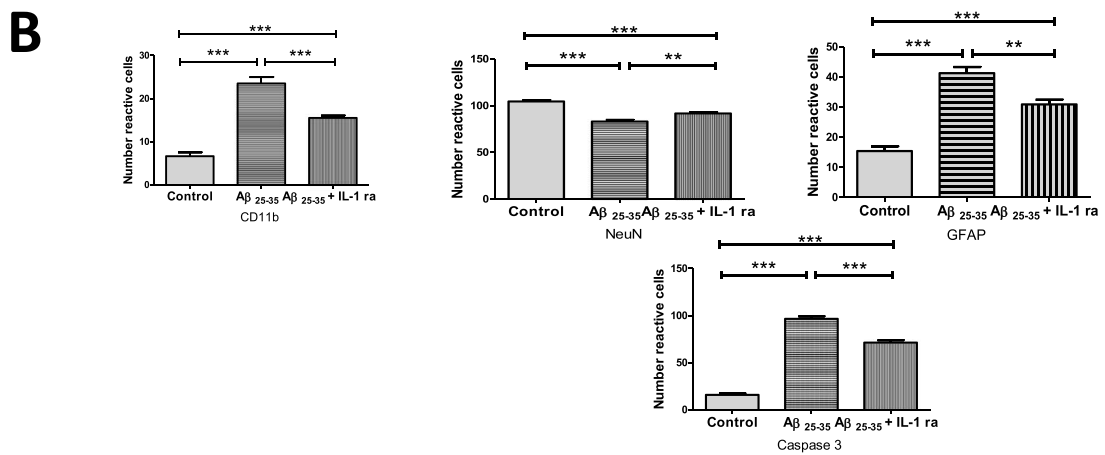
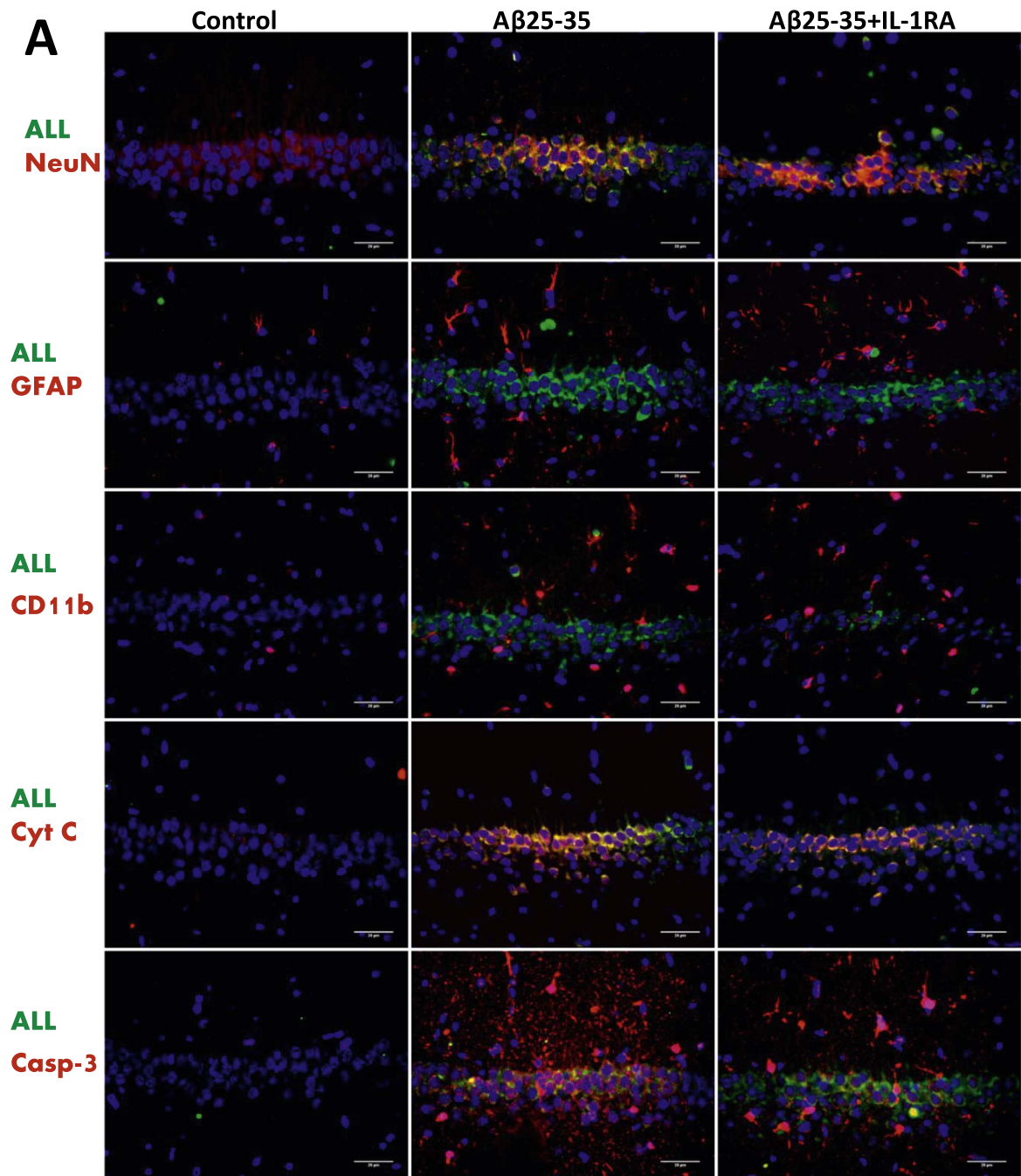
3.5. Histological examinations and evaluation of glycosylation through time

One group of rats was euthanized at 5 days after Aβ_{25–35} injection; in this group, few ALL-positive cells as well as few dead cells were observed, mainly in the region close to the Aβ_{25–35} injection site. In the group euthanized at 30 days, few ALL-positive cells were found, as compared to the 10-days group; however, in this group all pyramidal neurons presented karyorrhexis and pyknosis, characteristic of cell death by apoptosis (Fig. 4A, B).

4. Discussion

Amyloid β plays a relevant role in the development of AD, which seems to favor neurodegenerative processes and loss of neuronal functionality; this process has been estimated to span along 20 years from the appearance of Aβ oligomers to the first symptoms of memory loss (Karran and De Strooper, 2016). It is known that during this period, a series of events like neuroinflammation and oxidative stress occur that exacerbate the damage and cause neuronal death. However, although the coexistence of all these processes is known, the exact sequence at which Aβ causes neurodegeneration has not been reported yet (Diaz et al., 2012; Meda et al., 2004).

Inflammation is also known to modify the glycosylation pattern of glycolipids and glycoproteins. It is well known that the glycosylation of acute-phase proteins is subjected to marked changes during acute and chronic inflammation (Cagnoni et al., 2016; Limon et al., 2011). Based on the aforementioned data, we searched for alterations in the glycosylation pattern in the brain of rats treated with Aβ_{25–35}. Ten days after injecting the CA1 region of the hippocampus, we observed higher labeling with the *Amaranthus leucocarpus* lectin than in the brain of the control group of rats receiving saline solution. These results suggest that the Aβ_{25–35} injection induces neuroinflammation and over-expression of mucin-type O-glycosylated proteins (Dewald et al., 2016). It is interesting to note that jacalin or PNA did not recognize cells in region CA1 of the hippocampus of Aβ-challenged rats. Although jacalin, PNA, and ALL showed closely related specificities, ALL recognizes OH in C4 and N-acetyl in C2 of GalNAc (Hernández et al., 2001, 2004), whereas jacalin recognizes OH in C2, C3, and C4 of Gal and N-acetyl groups and in C2 from GalNAc. PNA recognizes the OH- in C4 from Gal; interestingly, the presence of sialic acid in the mucin-type O-glycans inhibits recognition by this lectin (Sastry et al., 1986; Sharma et al., 1998). Specificity of ALL recognition of CA1 neurons was confirmed by sugar-competition assays, incubating the lectin with diverse monosaccharides and identifying that only 200 mM GalNAc inhibited the interaction of



(caption on next page)

Fig. 3. Neuroinflammation induced by the injection of 1 μ l A β 25–35 (euthanized at 10 days, $n = 8$ per group). A) Photomicrographs showing immunoreactivity to different antibodies (GFAP, NeuN, CD11b, cytochrome C, and caspase 3) in red, and to ALL in green. B) The number of positive cells to each antibody per group and number of cytochrome C-positive cells in the cytoplasm of region CA1 of the hippocampus (scale bars 20 μ m). Data correspond to the mean \pm SE. (ANOVA with a Tukey post-test. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.) (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

ALL with the recognized tissues. We also performed tissue digestion with trypsin before ALL labeling, this process also induced loss of ALL reactivity, suggesting that the ALL receptor is of protein nature and the interaction is due to its lectin property. Expression of ALL receptors was observed in regions CA1 and CA2.

In previous studies, it has been observed that both the A β 1–42 protein and the fragment 25–35 induce activation of the microglia and increased levels of pro-inflammatory cytokines (Diaz et al., 2012, 2014). Our results indicate the increased presence of CD11b and GFAP positive cells, these findings confirm that A β 25–35 injection favors the inflammatory process in the hippocampus of rats and increases expression of O-glycosidically-linked proteins in neurons that are specifically recognized by ALL. These data were confirmed by the co-reactivity to NeuN and ALL. The glycoproteins recognized by ALL could be involved in the inflammatory process triggered by A β 25–35.

Furthermore, the presence of caspase 3 and cytochrome C in the cytosol of ALL+ neurons suggests that these cells are undergoing apoptosis; hence, ALL could be recognizing a putative receptor related to cellular death, as has been suggested (Urrea et al., 2011).

As shown in this work, IL-1RA diminished the inflammatory process and neuronal death, which agrees with a previous study by Diaz et al. (2012). This study reported that IL-1 RA exerts a neuroprotective effect, as it diminishes the activation and proliferation of glia and diminishes the expression of pro-inflammatory IL-1 β and TNF- α cytokines, possibly avoiding the loss of spatial memory (Dewald et al., 2016). ALL recognition in neurons was lower in the rats treated with A β 25–35 + IL-1RA than in rats treated with A β 25–35 alone, this allows suggesting a close relationship between inflammation and O-glycosylation of glycoproteins. Endogenous lectins are expressed in the microglia or astrocytes, galectin 1 has been suggested to possess an anti-inflammatory

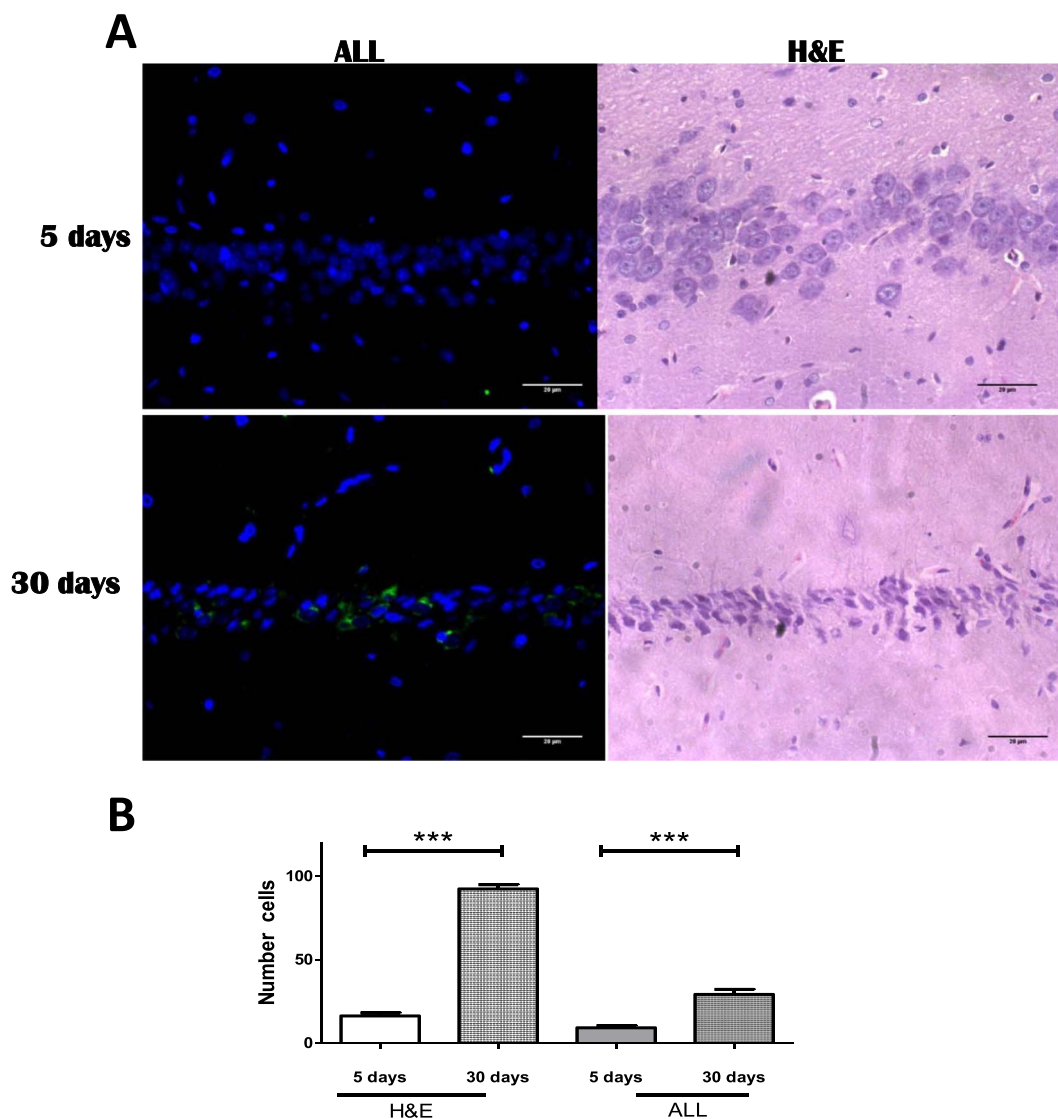


Fig. 4. Injection of A β 25–35 in region CA1 induces neuronal death that exacerbates with time. A) Photomicrographs with H&E staining and fluorescence with ALL in green of the hippocampus of rats treated with A β 25–35 euthanized on days 5 and 30 ($n = 8$ per group). B) Number of dead cells and recognized by ALL in rats treated with A β 25–35 euthanized on days 5 and 30 ($n = 8$ per group). Data correspond to the mean \pm SE. (ANOVA with a Tukey post-test. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.) (Scale bars 20 μ m.). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

role (Rotshenker, 2009; Starossom et al., 2012). Whereas galectin 3 in the microglia has a pro-inflammatory role during cerebral ischemia or traumatic injury (Satoh et al., 2011). Considering that the neuroinflammatory environment seems to induce changes in the expression of neuronal glycotransferases, which allows for modifications of the glycosylation patterns, the possibility that the recruited astrocytes and microglia cells participate by inducing, through cytokines, the change of the glycosylation pattern of neurons should not be ruled out (Espinosa et al., 2003). Our results suggest that mucin-type O-glycosylated proteins recognized by ALL participate in the neuroinflammatory process exacerbating the neurodegenerative process. Even more, the O-glycosylated proteins recognized by ALL could also be considered as a potential neuroinflammatory marker.

Acknowledgments

This article is part of the requirements for the doctoral degree of Ivan Emmanuel Ramos Martínez in the *Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)* and received fellowship 422504 from CONACYT. This work was partially supported by grants from the Graduate Biological Sciences Division of the School of Medicine UNAM, PAPIIT (IN204315, IN214117); CONACYT (0129932) and ECOS France-Mexico (M09S02)-CONACYT (189453).

References

- Alzheimer's Association, 2011. Alzheimer's association report 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 7, 208–244.
- Benilova, I., Karran, E., De Strooper, B., 2012. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* 15, 1–9.
- Cagnoni, A., Perez, J., Rabinovich, G., Mariño, K., 2016. Turning-off signaling by Siglecs, selectins and galectins: chemical inhibition of glycan-dependent interaction in cancer. *Front. Oncol.* 6, 109.
- Cuevas, E., Limon, D., Perez, F., Diaz, A., Ortega, L., Zenteno, E., Guevara, J., 2009. Antioxidant effects of epicatechin on the hippocampal toxicity caused by amyloid-beta 25-35 in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 616, 122–127.
- Dewald, J., Colomb, F., Bobowski-Gerard, M., Groux-Degroote, S., Delannoy, P., 2016. Role of cytokine-induced glycosylation changes in regulating cell interactions and cell signaling in inflammatory diseases and cancer. *Cell* 5, 43.
- Diaz, A., Limon, D., Chávez, R., Zenteno, E., Guevara, J., 2012. AB 25-35 injection into the temporal cortex induces chronic inflammation that contributes to neurodegeneration and spatial memory impairment in rats. *J. Alzheimers Dis.* 30, 505–522.
- Diaz, A., Rojas, K., Espinosa, B., Chavez, R., Zenteno, E., Limon, D., Guevara, J., 2014. Aminoguanidine treatment ameliorates inflammatory responses and memory impairment induced by amyloid-beta 25-35 injection in rats. *Neuropeptides* 48, 153–159.
- Espinosa, B., Zenteno, R., Mena, R., Robitaille, Y., Zenteno, E., Guevara, J., 2001. O-glycosylation in sprouting neurons in Alzheimer disease, indicating reactive plasticity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 441–448.
- Espinosa, B., Guevara, J., Hernández, P., Slomianny, M., Guzman, A., Martínez-Cairo, S., Zenteno, E., 2003. Characterization of an O-glycosylated plaque associated protein from Alzheimer disease brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 34–41.
- Guevara, J., Espinosa, B., Zenteno, E., Vázquez, L., Luna, J., Perry, G., Mena, R., 1998. Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 905–914.
- Hernández, P., Debray, H., Jaekel, H., Garfias, Y., Jiménez, Md.C., Martínez-Cairo, S., Zenteno, E., 2001. Chemical characterization of the lectin from *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* by 2-D proteome analysis. *Glycoconj. J.* 18, 321–329.
- Hernández, P., Tetaert, D., Vergoten, G., Debray, H., del Carmen Jimenez, M., Fernández, G., Agundis, C., Degand, P., and Zenteno, E., 2004. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin for O-glycopeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1674, 282–290.
- Karran, E., De Strooper, B., 2016. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J. Neurochem.* 139, 237–252.
- Kleene, R., Schachner, M., 2004. Glycans and neural cell interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 195–208.
- Kubo, T., Nishimura, S., Kumagai, Y., and Kaneko, I., 2002. In vivo conversion of race-mized beta-amyloid ([D-Ser 26]A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J. Neurosci. Res.* 70, 474–483.
- Laderach, D., Compagno, D., Toscano, M., Croci, D., Dergan-Dylon, S., Salatino, M., Rabinovich, G., 2010. Dissecting the signal transduction pathways triggered by galectin-glycan interactions in physiological and pathological settings. *IUBMB Life* 62, 1–13.
- Limon, D., Ramirez, E., Diaz, A., Mendieta, L., Mayoral, M., Espinosa, B., Guevara, J., Zenteno, E., 2011. Alteration of the sialylation pattern and memory deficits by injection of Amyloid 25–35 into the hippocampus of rats. *Neurosci. Lett.* 495, 11–16.
- Linnartz, B., Bodea, L., Neumann, H., 2012. Microglial carbohydrate-binding receptors for neural repair. *Cell Tissue Res.* 349, 215–227.
- Lozano, L., Guevara, J., Lefebvre, T., Ramos-Martinez, I., Limon, D., Diaz, A., Ceron, E., Zenteno, E., 2017. Effect of amyloid-B (25–35) in hyperglycemic and hyper-insulinemic rats, effects on phosphorylation and O-GlcNAcylation of tau protein. *Neuropeptides* 63, 18–27.
- Meda, L., Baron, P., Prat, E., Rossi, F., 2004. Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with beta-amyloid 25-35. *J. Neuroimmunol.* 93, 45–52.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th ed. Academic Press, London, UK.
- Pike, J., Walencewicz-Wasserman, A., Kosmoski, J., Cribbs, D., Glabe, C., Cotman, C., 1995. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem.* 64, 253–265.
- Rotshenker, S., 2009. The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease. *J. Mol. Neurosci.* 39, 99–103.
- Sastry, M., Banarjee, P., Patanjali, S., Swamy, M., Swarnalatha, G., Surolia, A., 1986. Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (beta-D-Gal(1–3)D-GalNAc). *J. Biol. Chem.* 261, 11726–11733.
- Satoh, K., Niwa, M., Goda, W., Binh, N., Nakashima, N., Takamatsu, M., Hara, A., 2011. Galectin-3 expression in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia, and its inhibition by hypothermia. *Brain Res.* 1382, 266–274.
- Schjoldager, K., Clausen, H., 2012. Site-specific protein O-glycosylation modulates pro-protein processing — deciphering specific functions of the large polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 2079–2094.
- Sharma, V., Srinivas, V.R., Adhikari, P., Vijayan, M., Surolia, A., 1998. Molecular basis of recognition by Gal/GalNAc specific legume lectins: influence of Glu 129 on the specificity of peanut agglutinin (PNA) towards C2-substituents of galactose. *Glycobiology* 8, 1007–1012.
- Starossom, S., Mascanfroni, L., Imitola, J., Cao, L., Raddassi, K., Hernandez, S., Bassi, L.R., Croci, D., Cerliani, P., Delacou, R.D., Wang, Y., Elyaman, W., Khoury, S., Rabinovich, G., 2012. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity* 37, 249–263.
- Stepanichev, M., Moiseeva, Y., Lazareva, N., Gulyaeva, N., 2005. Studies of the effects of fragment (25–35) of Beta-amyloid peptide on the behavior of rats in a radial maze. *Neurosci. Behav. Physiol.* 35, 511–518.
- Toscano, M., Bianco, G., Ilarregui, J., Croci, D., Correale, J., Hernandez, J., Zwirner, N., Poirier, F., Riley, E., Baum, L., Rabinovich, G., 2007. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat. Immunol.* 8, 825–834.
- Urrea, F., Zenteno, E., Avila-Moreno, F., Sanchez-Garcia, F.J., Zuñiga, J., Lascrain, R., Ortiz-Quintero, B., 2011. *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) enhances anti-CD3-dependent activation of murine T cells and promotes cell survival. *Immunol. Investig.* 40, 113–129.
- Zhang, L., Yu, H., Zhao, X., Lin, X., Tan, C., Cao, G., Wang, Z., 2012. Neuroprotective effects of salidroside against beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurochem. Int.* 57, 547–555.