



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**Expresión de marcadores de ciclo celular y  
proteínas implicadas en la Enfermedad de Alzheimer  
posterior a una lesión excitotóxica en el hipocampo  
de la rata**

## **TESIS**

**Que para obtener el título de:  
Licenciada en Investigación Biomédica Básica**

**P r e s e n t a**  
**Karina Hernández Ortega**

**Directora de tesis:  
Dra. Ana Clorinda Arias Álvarez**

México, D.F

2006

**ÍNDICE**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	7
<b>I. ANTECEDENTES</b>	9
I.1. INTRODUCCIÓN	9
I.2. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR	12
I.3. REACTIVACIÓN DEL CICLO CELULAR EN NEURONAS POSTMITÓTICAS	14
I.4. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER COMO UN DESORDEN EN LOS MECANISMOS QUE REGULAN LA ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL CEREBRO	16
I.5. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL CICLO CELULAR EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	17
I.6. FOSFORILACIÓN DE TAU Y CDK5	21
I.7. CIRCUITO CORTEZA ENTORRINAL-GIRO DENTADO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	23
I.7.a. ANATOMÍA DEL CIRCUITO ENTORRINAL-GIRO DENTADO DE LA RATA	24
I.7.a.1. EL GIRO DENTADO. TIPOS CELULARES Y ORGANIZACIÓN	24
I.7.a.2. LA CORTEZA ENTORRINAL. TIPOS CELULARES Y ORGANIZACIÓN	25
<b>II. PLANTEAMIENTO EL PROBLEMA</b>	28
<b>III. HIPÓTESIS</b>	29
<b>IV. OBJETIVO GENERAL</b>	29
<b>V. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	30
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	30
VI.1. LESIÓN EXCITOTÓXICA DEL GIRO DENTADO	30
VI.2. OBTENCIÓN DE TEJIDO	31

VI.3. INMUNOHISTOQUÍMICA	32
VI.4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS INMUNO-POSITIVAS	33
VI.5. ESTADÍSTICA	34
VI.6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y ELECTROFORESIS	34
VI.7. INMUNOTRANSFERENCIA	35
<b>VII. RESULTADOS</b>	36
VII.1.EFECTOS NEUROTÓXICOS DEL ÁCIDO KAÍNICO	36
VII.2. EFECTOS DE LA LESIÓN DEL GIRO DENTADO SOBRE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CICLO CELULAR EN EL HIPOCAMPO Y LA CORTEZA ENTORRINAL	39
VII.2.a. EXPRESIÓN DE CICLINA D Y CDK6	41
VII.2.b. EXPRESION DE CDK2 y PCNA	45
VII.2.c. EXPRESIÓN DE CICLINA B	48
VII.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	50
VII.3.a. EXPRESIÓN DE BAX	50
VII.3.b. EXPRESIÓN DE PHF-1	51
VII.3.c. EXPRESIÓN DE PPA	52
VII.4. EXPRESIÓN DE CDK5 Y P35/P25	56
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	59
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	65
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	66

## Lista de Abreviaturas

<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>GD</b>	Giro dentado
<b>LD</b>	Lámina dorsal del giro dentado
<b>LV</b>	Lámina ventral del giro dentado
<b>CP</b>	Capa polimórfica del giro dentado
<b>CE</b>	Corteza entorrinal
<b>AEL</b>	Área entorrinal lateral
<b>AEM</b>	Área entorrinal medial
<b>CA1</b>	Cornu ammonis 1
<b>CA2</b>	Cornu ammonis 2
<b>CA3</b>	Cornu ammonis 3
<b>PPA</b>	Proteína Precursora del Amiloide
<b>A<math>\beta</math></b>	Proteína $\beta$ -amiloide
<b>AK</b>	Ácido Kaínico
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de células en proliferación
<b>PHF-1</b>	Por sus siglas en inglés Paired helical filaments

## RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento neurodegenerativo irreversible caracterizado por un déficit cognitivo progresivo acompañado de marcadores histopatológicos como son: la acumulación extracelular de la proteína  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A), la presencia de agregados intraneuronales de la proteína tau hiperfosforilada, la degeneración sináptica y la pérdida neuronal en regiones específicas del cerebro.

Gran cantidad de estudios señalan que una de las regiones donde parece iniciar el padecimiento corresponde a la corteza entorrinal (CE). Las neuronas de la CE se conectan con el giro dentado (GD) del hipocampo a través de la vía perforante. Evidencias recientes sugieren que la regulación alterada de los contactos sinápticos en neuronas postmitóticas puede conducir a la reentrada a ciclo celular. En aquellas las neuronas que no se rediferencian, la progresión del ciclo celular puede culminar en la muerte celular de tipo apoptótico o en la formación de tau hiperfosforilada y  $\beta$ A. Hasta el momento no se ha desarrollado un modelo animal no-transgénico, que reproduzca ciertas condiciones que lleven a la aparición de los marcadores mencionados. Este tipo de modelo nos permitirá conocer la relación espacio-temporal entre la degeneración sináptica que ocurre al lesionar parte de un circuito neuronal, y la aparición de dichos marcadores en las áreas de proyección.

En el presente trabajo se estudió, si la pérdida de conexiones sinápticas en el circuito CE–GD, es capaz de inducir la expresión de algunos marcadores del ciclo celular y proteínas involucradas en la EA.

Para este trabajo se utilizaron ratas machos adultas, a las cuales se les realizó una lesión excitotóxica con ácido kaínico en el GD. 1d, 7d, 15d y 30d posterior a la lesión, se obtuvo el tejido cerebral y se procesó para inmunohistoquímica. A través del análisis histológico encontramos que la lesión además de inducir muerte neuronal en el GD, de manera tardía conduce a un desarreglo celular de las láminas de la CE acompañado de la aparición de núcleos picnóticos. Por otro lado observamos la expresión, a lo largo del tiempo, de los marcadores de ciclo celular: ciclina D (fase G<sub>1</sub>), cdk6 (fase G<sub>1</sub>), cdk2 (fase S), PCNA (fase S) y ciclina B (G<sub>2</sub> –M), en regiones sinápticamente conectadas (CE-GD). Junto con los marcadores anteriores detectamos la expresión de PHF-1 (reconoce formas fosforiladas de la proteína tau presentes en cerebros de pacientes con EA), cdk5 (cinasa capaz de fosforilar a tau) y PPA en las mismas regiones cerebrales. De manera interesante la mayor expresión de los marcadores de ciclo celular en la CE precede a la aparición más intensa de PHF-1 y PPA. Estos datos apoyan la hipótesis de que la formación de tau hiperfosforilada y  $\beta$ A se asocia con una previa reactivación del ciclo celular. Dado el incremento en los niveles de tau fosforilada y cdk5, resultó interesante valorar la expresión de p35/p25, activador de Cdk5. Por medio inmunotransferencia se detectó un incremento en la formación de p25 conjunto a un decremento en la

presencia de p35, los cuales correlacionan temporalmente con la mayor inmunoreactividad a cdk5. Los datos anteriores sugieren la presencia activa de cdk5 y su posible participación en la fosforilación de tau (reactiva a PHF-1) detectada en este trabajo. En conjunto, nuestros resultados apoyan el planteamiento de que la desaferentación de regiones sinápticamente conectadas induce la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular, tau hiperfosforilada y  $\beta$ A. La conclusión anterior se sustenta por datos en la literatura que apoyan la participación de este mecanismo como parte de la cascada patogénica en la EA.

## I. ANTECEDENTES

### I.1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más frecuente en la vejez caracterizada por un déficit cognitivo progresivo, asociado a pérdida sináptica y muerte neuronal. En la mayoría de los casos la enfermedad es idiopática y tiene como principales factores de riesgo el envejecimiento y el alelo  $\epsilon 4$  del gen polimórfico de la lipoproteína ApoE. En un porcentaje menor al 5% de los casos existe alguna de las varias mutaciones en los genes de la proteína precursora de la  $\beta A$  (PPA, cromosoma 21) o de las presenilinas 1 y 2 (PS-1 y PS-2, cromosomas 14 y 1, respectivamente) (para revisión ver Arias, 1999).

Histopatológicamente la EA se define por la presencia de dos tipos de agregados protéicos, las marañas neurofibrilares y las placas seniles o amiloideas. Las marañas neurofibrilares son inclusiones intraneuronales compuestas principalmente de la proteína asociada a microtúbulos axonales, tau hiperfosforilada, ensamblada en una conformación de filamentos helicoidales apareados (PHF) (Grundke-Iqbal, 1986). Las placas seniles se componen de un depósito extracelular de  $\beta A$ , denominado núcleo de la placa, rodeado por neuritas distróficas y microglía reactiva. La  $\beta A$  deriva del corte proteolítico anormal de la PPA por las  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas (Lichtenthaler, 1999).

Se han propuesto varias hipótesis para entender la fisiopatología de la EA incluyendo la participación de la proteína  $\beta A$ , la hiperfosforilación de tau, la inflamación y el estrés oxidante. Sin embargo, ninguna de ellas explica en su

totalidad la diversidad de alteraciones bioquímicas así como la susceptibilidad diferencial de áreas como el hipocampo y la neocorteza observadas en este padecimiento.

El paralelismo entre la EA y el desarrollo de la corteza cerebral surge por la observación acerca de los cambios cognitivos y funcionales de este padecimiento que corresponden a un patrón regresivo de lo que ocurre en el cerebro durante su desarrollo (Reisberg, 2002). En la EA se van deteriorando, paso a paso, redes neuronales interconectadas que interesantemente corresponden a las áreas ontogénica y filogénicamente más recientes (Arendt, 2000). De manera interesante también estas regiones más dañadas corresponden a lugares de alta plasticidad a lo largo de la vida.

Las señales celulares que controlan la conectividad y la plasticidad sináptica, también permiten el mantenimiento de las neuronas en un estado de diferenciación e impiden la reactivación de mecanismos que lleven a la migración o a la proliferación. Este papel dual de las señales mitogénicas involucradas en morforegulación representan también un riesgo para aquellas neuronas que retienen un alto grado de plasticidad sináptica; de manera aberrante estas señales pueden originar neuroplasticidad alterada que lleve a la aparición de fenómenos que reactivan el ciclo celular. Este proceso de desdiferenciación involucra eventos moleculares que en poblaciones de células capaces de dividirse, puede llevarlas a la transformación celular, pero que al no ser compatible con el estado post-mitótico de las neuronas podría conducir a la

muerte celular programada o a una patología tipo Alzheimer (Arendt, 2000; Nagy, 2000).

## **I.2. REGULACION DEL CICLO CELULAR**

El ciclo celular es un mecanismo altamente conservado por las células eucariotas que permite la proliferación celular. Típicamente el ciclo celular comprende cinco fases:  $G_0$  (estado quiescente),  $G_1$  (primer intervalo), S (síntesis de DNA),  $G_2$  (segundo intervalo) y M (mitosis). La progresión a través de estas fases se regula por la expresión secuencial, activación e inhibición de los complejos de cinasas dependientes de ciclinas (cdks) y sus subunidades activadoras, las ciclinas, así como de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (cdkis) (Grana, 1995; Lees, 1995).

La presencia de estímulos mitogénicos induce la síntesis de ciclinas tipo D, las cuales unen y activan a cdk4 y cdk6; lo anterior permite que las células quiescentes entren a la fase  $G_1$ . En  $G_1$  tardía, se promueve la expresión de la ciclina E, la cual se asocia a cdk2. La actividad del complejo ciclina E/cdk2 permite la transición de  $G_1/S$ . En etapas tempranas de la fase S, la ciclina E es degradada, dejando disponible a cdk2 para unirse a ciclina A. Cuando la duplicación del DNA ha finalizado, la ciclina A forma un complejo con cdc2 (cdk1) y conduce a la célula hacia la fase  $G_2$ . Durante la transición de  $G_2/M$ , la ciclina A es degradada, ahora cdc2 se acopla a la ciclina B. El complejo ciclina B/cdc2 es necesario para la progresión de la mitosis. Hacia el final de la fase M, este

complejo se vuelve inactivo ya que la ciclina B es degradada (Granna, 1995) (Fig. 1).

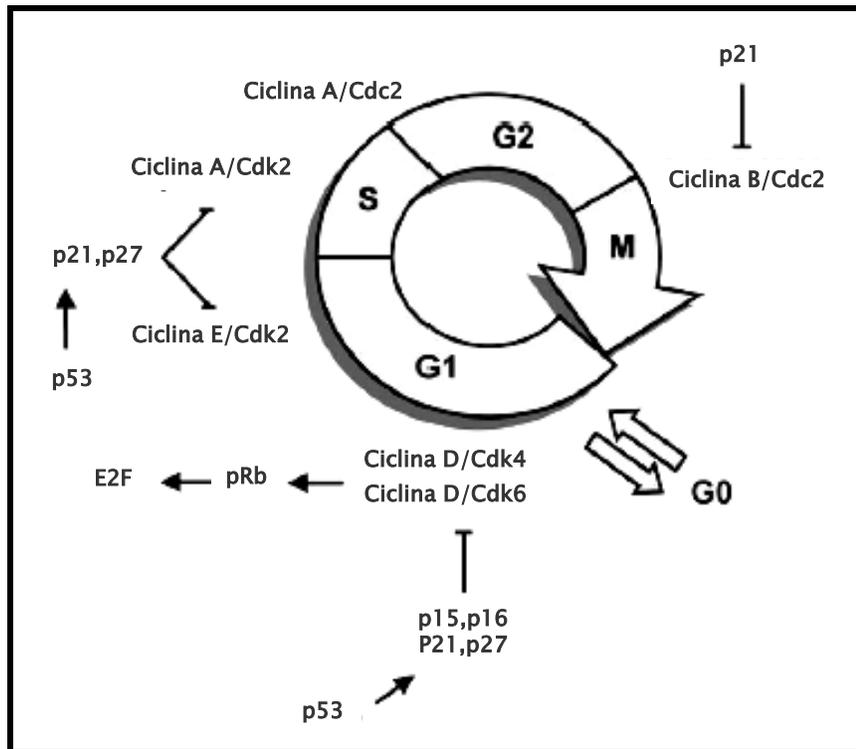


Figura 1. El ciclo celular y sus principales reguladores. La progresión a través del ciclo celular es regulada por los complejos Ciclina/Cdks y sus inhibidores p15,p16,p18, p19 (Familia NK4) y p21, p27 (Familia Kip/Cip). El complejo activo Ciclina D/Cdk4,6 fosforila a la proteína Rb, el cual libera al factor de transcripción E2F que subsecuentemente activa genes requeridos para la fase S. G0: estado quiescente, G1: primer intervalo, S: Replicación de DNA, G2: segundo intervalo y M: mitosis. (Becker, 2004).

La actividad de los complejos ciclina/cdks es inhibida por dos familias de proteínas. Los miembros de la familia de inhibidores Kip/Cip (p21, p27 y p57) regulan principalmente la actividad de los complejos ciclina-cdks de fase G<sub>1</sub> y en menor grado la actividad del complejo ciclina B-cdc2. Por su parte la familia

INK4 (p16, p15, p19 y p18) específicamente inhibe a cdk4 y cdk6 (Fig.1). La actividad de los cdkis, ciclinas y cdk, es regulada a nivel transcripcional, traduccional y de proteólisis (Sherr, 1999). Durante el desarrollo, la regulación a la baja de los niveles de las ciclinas y las cdk, así como la inducción de los cdkis conducen al término del ciclo celular y a la diferenciación.

### **I.3. Reactivación del ciclo celular en neuronas postmitóticas**

Durante el desarrollo en el SNC de los mamíferos, los precursores neuronales proliferan y se diferencian a neuronas dentro de zonas germinales determinadas. Una vez que finalizan el ciclo celular e ingresan a un estado postmitótico, las neuronas migran hacia diferentes destinos y permanecen en un estado terminal diferenciado a lo largo de toda su vida (Yoshikawa, 2000). Existe cierta cantidad de neurogénesis basal que ocurre en la etapa adulta, sin embargo, se restringe a pozas de precursores comprometidos a linaje neural dentro del cerebro (Pevny, 2003).

Hasta hace poco tiempo, se había pensado que las neuronas diferenciadas abandonan el ciclo celular de forma permanente y disminuyen los niveles de proteínas reguladoras del ciclo celular (Okana, 1993). En contraposición a este fundamento, existe una gran cantidad de evidencias que sugieren la capacidad de las neuronas para reentrar al ciclo celular. A pesar de que las neuronas diferenciadas retienen la habilidad de reactivar el ciclo celular, la maquinaria del ciclo celular raras veces conduce a la proliferación, por el contrario típicamente

induce apoptosis (Wartiovaara, 2002). De acuerdo con esta idea, la incidencia de tumores cerebrales de origen neuronal es mínima, sugiriendo la resistencia de las neuronas a la transformación oncogénica (Heintz, 1993). Al respecto se sabe que la sobreexpresión del antígeno T en células de purkinje y neuronas de la retina conduce a la muerte celular acompañada de síntesis de DNA en lugar de promover proliferación celular (al-Ubalbi, 1992; Feddersen, 1992).

La evidencia inicial obtenida *in vivo* que señala a la apoptosis como resultado de la reentrada aberrante al ciclo celular, proviene del análisis de ratones deficientes en la proteína de retinoblastoma (Rb), la cual normalmente interrumpe el ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>. Los ratones Rb<sup>-/-</sup> no son viables, presentan síntesis de DNA junto con apoptosis en el SNC y el SNP (Lee, 1992). Más tarde, por PCR cuantitativo se detectó un aumento en el mRNA de la ciclina D1 en neuronas simpáticas privadas de factor trófico (Freeman, 1994). En conjunto, éstos y otros datos señalan que la activación del ciclo celular puede estar ampliamente ligada a la muerte celular de neuronas diferenciadas. De manera interesante, los mecanismos de apoptosis y ciclo celular incluyen elementos comunes tales como; Rb, E2F y p53, asimismo presentan características morfológicas similares entre las que se encuentran la condensación de la cromatina y el redondeamiento celular (King, 1995). Considerando lo anterior, se ha sugerido una convergencia en los mecanismos de ejecución de estos dos procesos.

Existen varias condiciones que pueden promover la apoptosis relacionada a mecanismos del ciclo celular entre las que se encuentran: la pérdida del soporte trófico, el daño al DNA, la exposición a  $\beta$ A o a excitotoxinas (Becker, 2004). Además, recientemente se ha propuesto que la reentrada aberrante a ciclo celular contribuye a la cascada patogénica de diversas enfermedades neurodegenerativas, como la EA (Busser, 1998; Husseman, 2000).

#### **I.4. La enfermedad de Alzheimer como un desorden en los mecanismos que regulan la organización estructural del cerebro.**

Las regiones más afectadas en la EA comprenden a la formación hipocampal, áreas de asociación neocortical y al núcleo colinérgico del cerebro basal anterior. El funcionamiento de estas áreas está implicado en la regulación de procesos como la memoria y el aprendizaje, procesos que requieren del ajuste en los contactos sinápticos a lo largo de la vida. En el cerebro adulto, esta reorganización de la conectividad neuronal depende de mecanismos de morforegulación. Se ha propuesto que es el proceso continuo de reorganización sináptica el que llega a ser defectuoso en la EA. De esta forma los grupos neuronales que retienen un alto grado de plasticidad y que presuntamente se encuentran en un "estado lábil de diferenciación" son al mismo tiempo más vulnerables a presentar fallas en la regulación de la reorganización sináptica. En la EA, la acumulación de estas fallas podría resultar en alteraciones de la

estructura sináptica que llevan a la desestabilización de las sinapsis, al crecimiento aberrante de procesos sinápticos y finalmente, a una pérdida en el control del estado de diferenciación celular. Esta condición de desdiferenciación se caracteriza por la expresión de proteínas que participan en el desarrollo y la plasticidad sináptica como la proteína de adhesión celular PSA-NCAM, la cual permite el remodelamiento y la sinaptogénesis del hipocampo (Mikkonen, 1999). La reactivación de mecanismos regulados durante el desarrollo puede constituir la transición entre una condición alterada de la organización estructural del cerebro y la "morfodesregulación". El proceso de desdiferenciación involucra fenómenos como la reactivación del ciclo de división celular, o al menos el intento de activación de algunos de los mecanismos implicados en la división celular, evento fisiológicamente incompatible con el estado de maduración morfológica y funcional de las neuronas postmitóticas, por lo que las puede conducir a la muerte (Arendt, 2001) (Fig 2A).

### **I.5. Expresión de proteínas del ciclo celular en la enfermedad de Alzheimer**

En años recientes se han realizado una cantidad considerable de estudios sobre la participación de la reactivación del ciclo celular en la neurodegeneración observada en la EA. La evidencia inicial obtenida del análisis post-mortem de tejido cerebral de pacientes con EA indicó la presencia en niveles elevados de la cinasa cdc2 (M) en el hipocampo (Vicent, 1996). Un artículo posterior reportó la

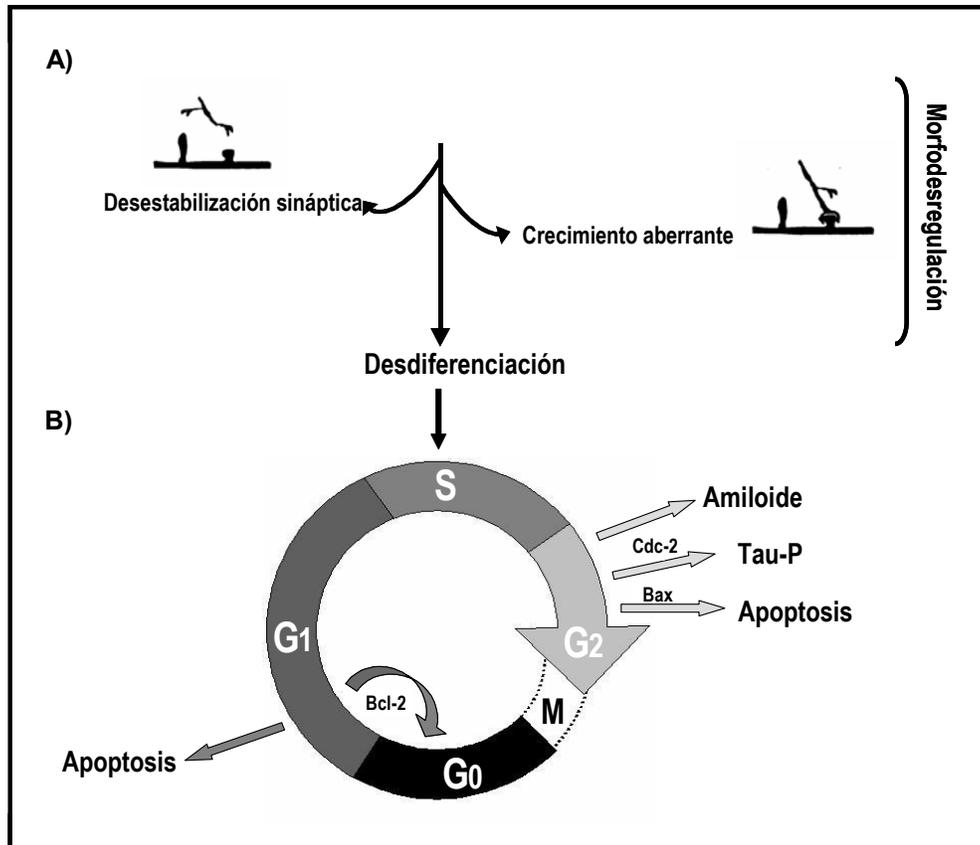


Figura 2. Esquema de la posible progresión patológica hacia ciclo celular resultado de cambios en la plasticidad sináptica. A) En aquellas neuronas que retienen un alto grado de plasticidad sináptica, fallas en la regulación de la reorganización sináptica puede resultar en alteraciones de la estructura y desestabilización sinápticas, al crecimiento aberrante de terminales nerviosas y finalmente, a una pérdida en el control del estado de diferenciación celular (Arendt, 2001). B) El proceso de desdiferenciación involucra fenómenos como la reactivación del ciclo de división celular; en fase G2 aquellas neuronas que expresan altos niveles de Bax activarán el programa de apoptosis, mientras que en el resto de las neuronas se podría favorecer la formación de  $\beta A$  y de Tau fosforilada (Nagy, 1998)

expresión significativa de KI-67 (marcador de células en proceso de división celular, no específico de una fase), ciclina E ( $G_1$ -S) y ciclina B en regiones vulnerables como el hipocampo, la CE y algunas áreas de asociación neocortical en cerebros con EA. En algunos cerebros de individuos controles, también se encontraron células inmunopositivas a estos marcadores pero en menor proporción (Nagy, 1997). Posteriormente, un estudio mostró que la aparición del

complejo ciclina D-cdk4 ( $G_1$ ) y PCNA (S) ocurría en regiones como la CE, el hipocampo y el Núcleo Basal de Meynert donde típicamente ocurre pérdida celular en la EA. Lo anterior sugirió una asociación entre la reactivación del ciclo celular y la muerte celular observada en esta patología (Busser, 1998). Recientemente, por medio de la técnica de FISH, se detectaron algunas neuronas aneuploides en áreas vulnerables de cerebros de pacientes con EA, lo cual se interpretó como una evidencia de duplicación del DNA (Yang, 2001).

Asimismo, existen otros datos que sustentan la participación de elementos del ciclo celular en la formación de marañas neurofibrilares y placas amiloideas. Por estudios *in vitro* se sabe que la cinasa cdc2 ( $G_2$ ) tiene la capacidad de fosforilar a la proteína tau (Ledesma, 1992), condición que contribuye a la formación de marañas neurofibrilares. En un estudio subsiguiente se demostró la capacidad del complejo ciclina B-cdc2 extraído de cerebros de individuos con EA para fosforilar *in vitro* a la proteína tau (Vicent, 1997). En relación a los depósitos de amiloide se ha reportado que la APP se fosforila *in vitro* y en células intactas por la cinasa cdc2 en una manera dependiente del ciclo celular, lo cual se asocia con una producción alterada de fragmentos potencialmente amiloidogénicos que contienen el dominio completo de la  $\beta A$  (Susuki, 1994). El  $\beta A$ , a su vez actúa como una señal proliferante, conduciendo a neuronas primarias cultivadas a entrar a ciclo celular, proceso que eventualmente resulta en la muerte celular (Copani, 1999). Estos datos sugieren que la reactivación del ciclo celular puede propiciar la generación de  $\beta A$ , la cual, a su vez, parece tener

el potencial para mantener la activación del ciclo celular, originándose así un círculo vicioso.

Una hipótesis que integra los datos disponibles hasta el momento sugiere que aún las neuronas de individuos envejecidos sanos pueden reentrar al ciclo celular, pero en este caso la activación de los mecanismos que controlan el ciclo lo interrumpen tempranamente en la fase  $G_1$ . Durante esta fase, si se encuentra la proteína anti-apoptótica Bcl-2 es posible regresar al estado diferenciado, de lo contrario se activará el mecanismo de muerte celular programada, contribuyendo a la pérdida neuronal ligera que acompaña el envejecimiento (West, 1994). En el caso de la EA, los mecanismos reguladores de  $G_1/S$  parecen estar ausentes o presentan fallas y las neuronas pueden avanzar a fases posteriores del ciclo. En el estado  $G_2$ , el mecanismo de rediferenciación ya no es posible, así que la progresión del ciclo puede conducir a diferentes eventos. La observación de la expresión mutuamente exclusiva de Bax, una proteína apoptótica y tau fosforilada positiva al anticuerpo AT8, sugiere que una vez en fase  $G_2$  aquellas neuronas que expresan altos niveles de Bax activarán el programa de apoptosis; mientras que en el resto de las neuronas se podría favorecer la formación de  $\beta A$  y de tau fosforilada (Nagy, 1998) (Fig. 2B).

Si bien los datos anteriores señalan que la reactivación aberrante del ciclo celular está implicada en la patología de la EA, aún se desconocen las causas de esta alteración. En este sentido el dato de la expresión de marcadores de

ciclo celular en el hipocampo, una región en la que ocurre pérdida sináptica anterior a la aparición de marañas neurofibrilares sugiere que la reentrada a ciclo celular puede estar relacionada con la pérdida de conexiones sinápticas (Nagy, 2000).

### **I.6. Fosforilación de tau y Cdk5**

La proteína tau se encuentra localizada principalmente en los axones (Binder, 1985) donde se asocia con los microtúbulos permitiéndoles una mayor estabilidad, promoviendo la polimerización de la tubulina, y suprimiendo su despolimerización (Cleveland, 1977). La actividad de esta proteína se regula por su grado de fosforilación. En condiciones normales tau contiene 2-3 moles de fosfato por mol de proteína, sin embargo, en pacientes con EA se presenta una hiperfosforilación de hasta 10-12 moles de fosfato (Ksiezak-Reding, 1992). La hiperfosforilación de tau disminuye su capacidad de unión a microtúbulos, asimismo promueve su autoagregación formando los filamentos helicoidales apareados (FHAs), los cuales se asocian dando lugar a las marañas neurofibrilares (Alonso, 1996). Dichas alteraciones inducen muerte neuronal ya que afectan el flujo axoplásmico, la morfología y el funcionamiento de las neuronas (Trojanoski, 1993).

El incremento en la fosforilación de tau en los cerebros de pacientes con EA, se cree que puede deberse a una elevada actividad de proteína cinasas y/o a una disminución en la actividad de proteína fosfatasas. En particular, tres clases

de cinasas han mostrado ser capaces de fosforilar *in vitro* a tau de manera similar a la observada en los FHA además de estar presentes en las marañas neurofibrilares: MAPKs, cdk5 (cdc2 y cdk5) y GSK3 $\beta$  (Drewes, 1992; Ledesma, 1992; Mandelkow, 1992).

Cdk5 pertenece a la familia de cinasas dirigidas por prolinas que fosforilan residuos de serina y treonina, su secuencia presenta una gran homología a la de cdc2, una ciclina de ciclo celular clásica. A pesar de esta similitud, no se ha identificado una función para cdk5 en la regulación del ciclo celular. De forma similar a otras cdk5, cdk5 en estado monomérico no tiene actividad enzimática y requiere asociarse con una subunidad reguladora para su activación. Los activadores neuronales p35 y p39, regulan temporal y espacialmente la expresión activa de cdk5 (Tsai, 1994). Bajo condiciones fisiológicas normales el complejo cdk5/p35 interviene en la citoarquitectura y la integridad sináptica del SNC (Ohshima, 1996; Morabito, 2004). En contraste, bajo algunas condiciones neurotóxicas, el activador p35 sufre un corte proteolítico por la calpaína para generar p25. El complejo cdk5/p25 lleva a una alteración en la actividad de cdk5 y promueve neurodegeneración a través de diferentes vías (Lee, 2000; Cruz, 2003). Se ha reportado que p25, se acumula en neuronas de pacientes con EA. Esta acumulación correlaciona con un incremento en la actividad de cdk5 y con un aumento en la fosforilación de tau en el sitio de inmunoreactividad a PHF-1 (Ser 396/404) (Patrick, 1999).

## **I.7. Circuito corteza entorrinal-giro dentado en la enfermedad de Alzheimer**

La corteza entorrinal (CE) y el hipocampo son componentes esenciales del sistema de memoria del lóbulo temporal medial. La CE conecta a la neocorteza con el hipocampo, esencialmente conduce información sensorial multimodal hacia el GD (Squire ,1991). En concordancia con la observación de que la pérdida de memoria es un síntoma prominente en la EA, diversos estudios histopatológicos han implicado de manera temprana a ambas estructuras en la patología de esta enfermedad (Hyman, 1984; Braak, 1997; Van Hoesen, 1991). Considerando que las marañas neurofibrilares no se distribuyen homogéneamente a lo largo del cerebro, Braak y Braak (1997) formularon una escala temporal de degeneración neurofibrilar que comprende seis diferentes etapas. De acuerdo con esta escala, en las etapas iniciales I y II, las alteraciones se concentran en la corteza transentorrinal y la CE. Posteriormente el proceso patológico se extiende hacia el hipocampo en las etapas III y IV. Finalmente en las etapas V y VI la mayoría de las áreas de asociación neocortical se ven afectadas, incluso en fases avanzadas de la etapa VI algunas áreas sensoriales primarias también se afectan. Por otro lado, las placas seniles se presentan inicialmente en la región perirrinal, desde donde se extienden hacia regiones adyacentes y hacia el hipocampo, cabe mencionar que la vía perforante es ampliamente afectada por los estos depósitos. Eventualmente, los depósitos de  $\beta$ A alcanzan todas las áreas corticales (Braak, 1997). Otro dato que alude a la

vulnerabilidad del circuito CE-GD es la pérdida significativa de contactos sinápticos observada en la capa molecular del GD (Dekosky, 1996), la cual correlaciona con la conocida pérdida celular en la lámina II de la CE, la principal proyección excitadora a esta área (Hyman, 1984; Gómez-Isla, 1996).

Es en el hipocampo y la CE donde se ha detectado la expresión más importante de proteínas reguladoras del ciclo celular (Nagy, 1997; Busser, 1998), lo que sugiere una asociación entre la reexpresión aberrante de proteínas del ciclo celular y la aparición de marcadores de la EA (Nagy, 2000). Los datos anteriores sustentan el planteamiento acerca de que el circuito más vulnerable en la corteza cerebral de individuos con EA es la proyección que se origina en la CE y termina en el GD (Mann, 1988).

### **I.7.a. Anatomía del circuito CE-GD de la rata**

#### **I.7.a.1. El Giro Dentado. Tipos celulares y organización**

La formación hipocampal comprende seis diferentes estructuras; el GD, el hipocampo; subdividido en tres regiones (CA1, CA2 y CA3), el subículo, el presubículo, el parasubículo y la CE. El GD comprende tres capas: la capa molecular, relativamente libre de células, la capa granular y la capa polimórfica también conocida como hilus o CA4 (Fig. 3A). La capa molecular está ocupada por las dendritas de células granulares, células en canasta, células polimórficas y terminales axónicas de origen diverso. Dentro de la capa molecular se

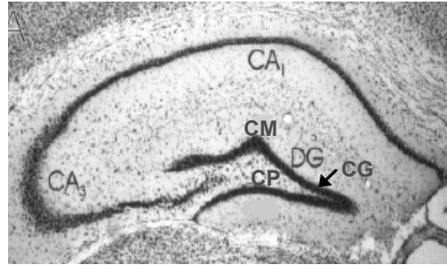
encuentran la célula en canasta multipolar o de cuerpo triangular cuyo axón contribuye al plexo en canasta dentro de la capa de células granulares y la célula "chandelier" o axo-axónica, considerada como un control inhibitorio secundario de las células granulares (Ribak, 1983; Halasy, 1993). La capa granular está formada principalmente por columnas densas de células granulares, las cuales son glutamatérgicas (Boss, 1985; West, 1988). En la parte profunda de esta capa se localizan células en canasta, la mayoría de las cuales son GABAérgicas y algunas otras son inmunoreactivas a parvalbúmina (Amaral, 1995). Finalmente, en la capa polimórfica se encuentran las células musgosas glutamatérgicas, las células fusiformes y las multipolares de tipo GABAérgico (Ribak, 1985).

Las células granulares del GD dirigen sus axones a las células piramidales de CA3, dando lugar a las fibras musgosas, sin embargo, antes de llegar a CA3, envían colaterales a las células musgosas y en canasta de la capa polimórfica (Claiborne, 1986). Las fibras musgosas son glutamatérgicas aunque algunas también presentan péptidos opiáceos como la dinorfina. En cuanto a las aferencias inhibitorias, las células granulares reciben proyecciones de las células musgosas en canasta de tipo GABAérgico.

### **I.7.a.2. La Corteza Entorrinal. Tipos celulares y organización**

El surco rinal señala aproximadamente el borde lateral de la CE. Esta estructura se ha dividido en seis capas (Fig, 3B). La primera contiene neuronas

**A)**



**B)**

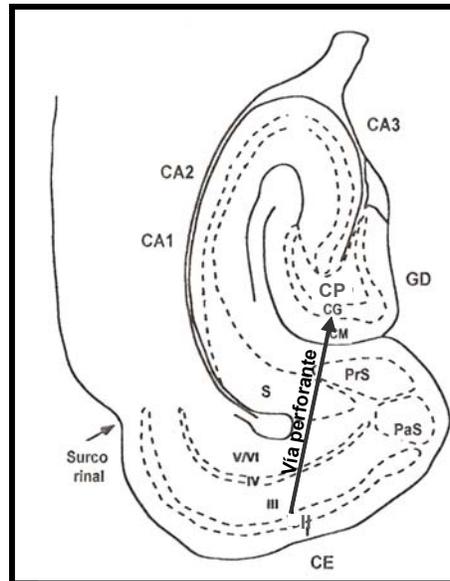


Figura 3. Circuito CE-GD. A) Fotomicrografía de una sección coronal de hipocampo teñido con Nissl. En el GD se señalan la capa molecular (CM), la capa de células granulares (CG) y la capa polimórfica (CP). B) Esquema de un corte horizontal de la formación hipocámpal para señalar la vía perforante. S, subículo; PrS, presubículo; PaS, parasubículo.

GABAérgicas, células estrelladas y horizontales que proyectan al GD y al hipocampo, así como neuronas que proyectan a las dendritas de células de la capa II (Germroth, 1989). La mayor población dentro de la capa II son las células estrelladas; sus fibras constituyen principalmente la vía perforante. En esta capa, también se encuentran células piramidales, multipolares y

horizontales; cuyas fibras contribuyen a la vía perforante (Köhler, 1986; Lingenhohl, 1991). En la capa III el tipo celular prominente es la célula piramidal con proyecciones a CA1 y subículo, sus colaterales axónicas se dirigen a las capas III y I de la CE. Además, en esta capa se presentan células multipolares, estrelladas, fusiformes, bipolares y horizontales que parecen contribuir a la vía perforante (Köhler, 1986; Lingenhohl, 1991). La lámina *dissecans* o capa IV tiene como principal característica ser una capa sin células, sin embargo, en algunas regiones esta capa contiene parches de células. La capa V muestra una división estructural. La lámina Va es una banda larga y densa de neuronas piramidales cuyas dendritas apicales ascienden verticalmente a las capas más superficiales (I y II) y sus axones terminan en las capas profundas de la materia blanca. La lámina Vb está menos densamente poblada, en la región rostral presenta una pérdida de células piramidales pequeñas y células polimórficas; mientras que caudalmente adquiere una apariencia columnar (Köhler, 1986; y Lingenhohl, 1991). La capa VI presenta una población celular heterogénea y una organización columnar similar a la de la capa V. Existe una variedad de neuronas en las capas Vb y VI, las cuales se han dividido en: células que influyen a células de las capas Vb o VI, células cuyas colaterales axónicas inciden sobre la columna vertical de células en las capas I –III y células con axones dirigidos a las áreas profundas de la materia blanca. Algunas de estas células pueden contribuir a las proyecciones dirigidas a GD e hipocampo (Köhler, 1986., Lingenhohl, 1991).

La CE puede dividirse en dos áreas: el área entorrinal lateral (AEL) y el área entorrinal media (AEM). Es en la CE donde se origina la principal aferencia hacia el GD y una aferencia prominente hacia el hipocampo y subículo. El término vía perforante incluye a todas las proyecciones de la CE hacia el hipocampo. Las denominadas fibras de la vía perforante provienen principalmente de neuronas localizadas en la capa II y III; una pequeña fracción de esta proyección se origina en las capas profundas (IV-VI). De acuerdo con el uso cotidiano, en este trabajo, dicho término se refiere únicamente a las aferencias hacia el GD. La vía perforante inerva de manera laminar al GD: las fibras originadas en el AEL llegan al tercio exterior de la capa molecular y las fibras del AEM finalizan en el tercio medial de la capa molecular. Esta vía inerva mayoritariamente a células granulares glutamatérgicas y en menor proporción a neuronas GABAérgicas positivas a parvalbúmina. A diferencia de las células del subículo y la región de CA1, las células del GD no envían proyecciones de regreso hacia la CE (Amaral, 1995).

## **II. PLANTEAMIENTO EL PROBLEMA**

Gran cantidad de estudios señalan la susceptibilidad temprana de la vía CE/hipocampo en la EA. Otras evidencias recientes sugieren que la regulación alterada en los contactos sinápticos puede conducir a la expresión aberrante de reguladores del ciclo celular, tau hiperfosforilada y  $\beta$ A. Hasta el momento no se ha desarrollado un modelo animal no transgénico, que reproduzca la pérdida sináptica temprana que ocurre en la EA y que lleve a la aparición de los marcadores mencionados. En el presente trabajo se estudiará la relación espacio-temporal entre la desconexión sináptica que ocurre al lesionar el GD y la expresión de dichos marcadores en áreas interconectadas de circuito CE/GD.

### **III. HIPÓTESIS**

La pérdida de conexiones sinápticas en regiones interconectadas (circuito CE-GD), es un estímulo capaz de inducir la aparición de algunos marcadores de la EA, particularmente ciertas proteínas del ciclo celular, tau fosforilada y acumulación de proteína  $\beta$ A.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la expresión espacio-temporal de marcadores específicos de diferentes etapas de ciclo celular, tau reactiva a PHF-1 y APP/A4, posterior a una lesión excitotóxica dentro del circuito CE-GD.

## **V. OBJETIVOS PARTICULARES**

1) Realizar una lesión excitotóxica con ácido kaínico (AK) en el GD de la rata y analizar los cambios histológicos a lo largo de 24 horas, 7, 15 y 30 días por tinción de Nissl, tanto en el GD con en la CE.

2) Estudiar por inmunohistoquímica la expresión espacio-temporal de diferentes marcadores de ciclo celular: ciclina D (marcador de  $G_0$ - $G_1$ ) cdk6 (marcador de  $G_1$ ), cdk2 (marcador de  $G_1$ -S), PCNA (marcador de S), ciclina B (marcador de  $G_2$ -M), y de cdk5, PHF-1 (tau), PPA en CE y GD a 24 h, 7, 15 y 30 días posterior a la lesión del GD.

3) Determinar los cambios en la expresión p35/p25 (activador de cdk5), posterior a la lesión excitotóxica del GD y en la zona de proyección de CE.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **VI.1. Lesión excitotóxica del giro dentado**

En este estudio se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (250-300 g). Se mantuvieron en cajas de acrílico con alimento y agua *ad libitum*, en un ciclo de luz/oscuridad 12/12hrs. Al momento de la cirugía, los animales se anestesiaron con una mezcla de halotano al 4% en 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> y se colocaron en el estereotáxico. La lesión excitotóxica se indujo inyectando unilateralmente 1 µL de ácido kaínico 1mM (1 nmola), disuelto en amortiguador de fosfatos (PB 10 mM pH 7.4) directamente en el GD siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1986): anteroposterior (AP) -4.1 lateromedial (LM) -2.4 y dorsoventral (DV) -3.3, por medio de una bomba de microinyección a la velocidad de 1 µl/min. Durante la inyección las ratas se mantuvieron con un nivel de anestesia bajo (0.5% de halotano); 2min después de haber terminado la inyección la aguja fue retirada y se suturó la piel. Los animales se regresaron a sus cajas con agua y comida *ad libitum* y fueron sacrificados en los tiempos que se mencionan a continuación.

### **VI.2. Obtención de tejido**

Después de 24 h, 7, 15 y 30 días de la lesión del GD, las ratas se anestesiaron por medio de una sobredosis de pentobarbital de sodio i.p., y se perfundieron

transcardialmente con 250 ml de solución salina (0.9%) seguido por 250 ml de una solución de paraformaldehído (4%) en amortiguador de fosfatos (PB 0.1 M, pH 7.4). Los cerebros se removieron y se colocaron durante 24 h en la solución de paraformaldehído. Posteriormente se transfirieron a gradientes de sacarosa (20 % 24 hrs y 30 % 48 hrs) y se obtuvieron secciones coronales de 40 $\mu$ m en un crióstato a -20°C. Las secciones recolectadas se utilizaron para tinción de Nissl e inmunohistoquímica con los diferentes anticuerpos que se mencionan a continuación.

### **VI.3. Inmunohistoquímica**

Las rebanadas de 40 $\mu$ m se conservaron en PB (0.1M, pH 7.4), hasta el momento de ser procesadas. Primeramente se colocaron durante 30 min en una solución que contenía 0.25% tritón X-100 y 0.3% H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> disueltos en amortiguador salino de fosfatos (PBS), con el objetivo de permeabilizar la membrana celular y bloquear peroxidasas endógenas. Posteriormente las rebanadas permanecieron toda la noche a 4°C, en una solución de bloqueo (albúmina 5% en PBS). Enseguida se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C (ver Tabla 1 de anticuerpos utilizados). Al término de este tiempo las rebanadas se lavaron con PBS (3 veces, cada uno de 5min) y se incubaron con el anticuerpo secundario biotilado correspondiente (kit ABC, VECTOR), por espacio de 2 h a temperatura ambiente. Para continuar

se repitió el esquema de lavados ya mencionado y se incubaron con el reactivo avidina/biotina (AB) (kit ABC, VECTOR), por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron (3 veces) y se adicionó 3,3'tetrahidrocloruro de diaminobenzidina como sustrato cromógeno para revelar la reacción (kit peroxidasa substrate, VECTOR). Los controles negativos consistieron en eliminar el anticuerpo primario del procedimiento.

**Tabla 1. Lista de anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Marca</b>
<i>Monoclonales</i>		
Anti-Ciclina D1	1:600	Zymed Laboratories Inc
Anti-Bax	1:600	"
anti-Cdk6	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Inc
anti-PCNA	1:600	"
anti-Cdk2	1:500	"
anti-Cdk5	1:500	"
anti-Ciclina B	1:500	Transduction laboratories
PHF-1 (P-Ser396-404)	1:100	Donado Dr. P. Davies
<i>Policlonal</i>		
anti-PPA/4 (I-17)	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Inc

#### **VI.4. Análisis histológico y cuantificación de células inmuno-positivas**

Por cada sujeto, una sección correspondiente al GD y otra correspondiente a la CE fue evaluada para cada marcador. El conteo de células positivas se realizó tanto del lado ipsilateral a la lesión como del contralateral. En la sección correspondiente al GD, se seleccionaron dos campos de la lámina dorsal, dos campos de la lámina ventral y un campo de la capa polimórfica.; mientras que en la sección perteneciente a la CE se seleccionaron dos campos. El número de células inmunopositivas fue contado en los campos definidos a una amplificación de 40X. Se evaluaron de 3 a 5 animales por cada marcador.

#### **VI.5. Estadística**

Los resultados de la cuantificación de células positivas representan el promedio de 4-6 experimentos independientes  $\pm$  error estándar (ES). El conteo de células inmunopositivas en las diferentes regiones analizadas fue analizado con la prueba estadística ANOVA con comparaciones *post-hoc* de la prueba de Bonferroni/Dunn.

#### **VI.6. Extracción de proteínas y electroforesis**

El hipocampo y la CE fueron homogenizados en un amortiguador para lisis compuesto por: tris-HCl 50mM pH 7.5, NaCl 150mM, NP-40 1%, DOC 0.5% 0.5%, y mezcla de inhibidores de proteasas (complete<sup>tm</sup>, Roche). Las muestras fueron centrifugadas a 14,0000 rev/min durante 60min a 4°C. El sobrenadante obtenido se dializó con una membrana de corte entre 12 a 14KDa (SPECTRA/POR), durante 24h a 4°C. Se recolectaron las muestra dializadas y se cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry modificado. Posteriormente las muestras se almacenaron a 20°C hasta su uso.

Para la detección de P35/p25 se utilizó un gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Se cargaron 80µg de proteína total, por condición, disuelta en buffer de carga en condiciones reductoras con 2-β-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.05% y SDS 10% (p/V). Las muestras se hirvieron durante 5min a 95°C. El gel se corrió a 25mA, en buffer de corrida (tris –base, tricina y SDS pH 8.3).

## **VI.7. Inmunotransferencia**

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa que se bloqueó con una solución de PBS-leche descremada al 5% durante 2h a 37°C. La membrana se incubó durante 48h con el anticuerpo policlonal p35 C-19 (1:300) (Santa Cruz Biotechnology,Inc) que reconoce el c-terminal de p35 y p25. Posteriormente se lavó con PBS 3 veces durante 5min. La membrana de nitrocelulosa fue incubada por 2h a 37°C, con IgG anti-conejo (1:1000) (vector,

Burlingame,CA). Para revelar la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó el kit de ABC-biotina-avidina-peroxidasa (Vector, Burlingame,CA), utilizando como sustrato 3-3'-diaminobencidina disuelta en PBS con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los controles negativos se realizaron al eliminar de la incubación el anticuerpo primario. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como un control de carga de proteínas.

## **VII. RESULTADOS**

### **VII.1. Efectos neurotóxicos del ácido kaínico**

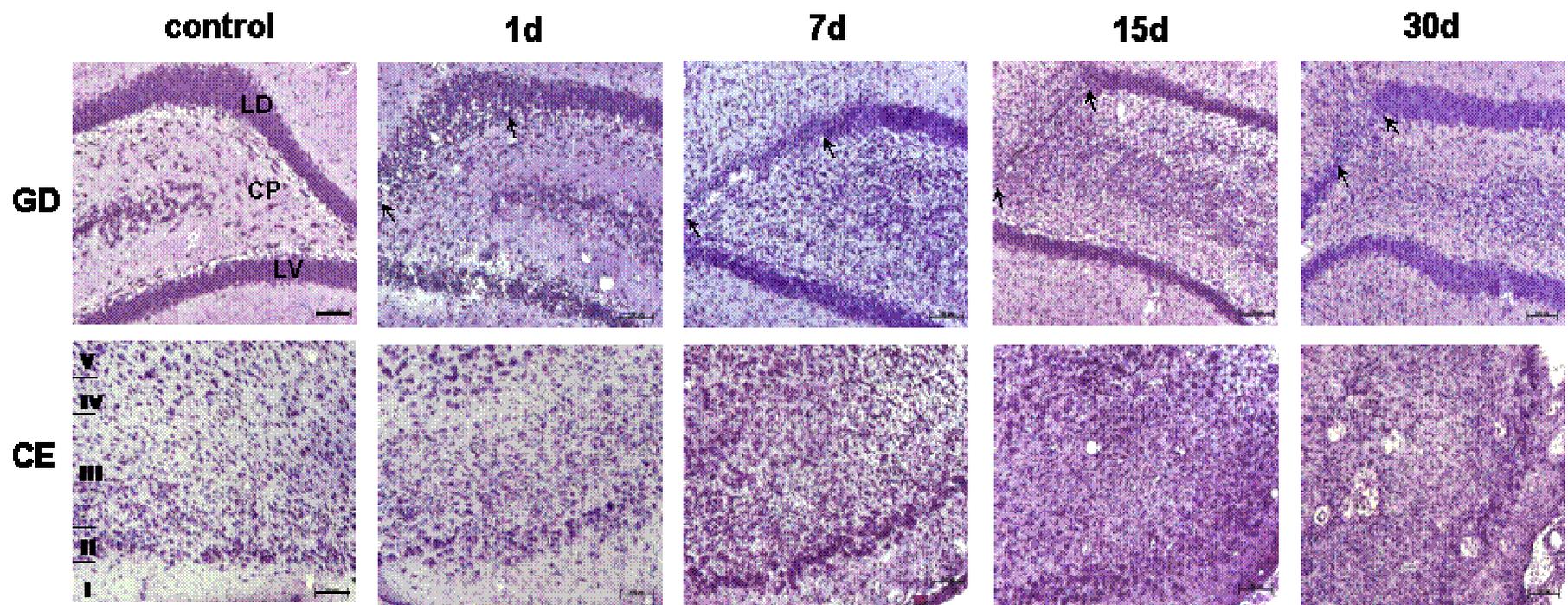
Las ratas inyectadas con AK en el giro dentado mostraron cambios conductuales tales como: inmovilidad seguida de hiperactividad, temblores conocidos como "sacudidas de perro mojado" y en algunos casos convulsiones, las cuales se presentaron dentro de los primeros 60 min posteriores a la recuperación de la anestesia.

La neurotoxicidad inducida por AK se evaluó a través del análisis de histología convencional de secciones coronales del cerebro de las ratas, correspondientes al GD y la CE teñidas con violeta de cresilo, las cuales fueron comparadas con las de sujetos control. Las áreas lesionadas se identificaron por la presencia de núcleos picnóticos, los cuales se observaron abundantemente en la capa granular del GD y en menor proporción en CA1, CA3 y en la CE. El análisis detallado de la lesión mostró que el área medial de la lámina superior del GD fue la más afectada, por lo que la descripción del curso temporal se enfocó en esta zona. En paralelo se analizó el patrón celular de la CE para detectar posibles efectos de la lesión sobre dicha región. Como se muestra en la Fig.4 desde el primer tiempo de análisis histológico, es decir 24 h posterior a la lesión, se observó una gran cantidad de núcleos picnóticos en la capa granular del GD. La presencia de núcleos picnóticos fue disminuyendo a lo largo del tiempo resultando en un adelgazamiento evidente de la capa granular. Conjuntamente

dentro de la capa molecular adyacente al área de lesión se detectó una infiltración creciente de células pequeñas, cuyo máximo fue a los 15d, después de los cuales disminuyó. La estirpe celular se sugiere podría ser glial, de acuerdo con datos de inmunohistoquímica para la proteína fibrilar acídica glial (GFAP, Fig. 5).

De manera interesante, 30 días después de la lesión, la capa granular comienza a repoblarse, pues se observó un engrosamiento de la misma, y áreas de lesión más pequeñas (Fig. 4). Además de los cambios en la lámina granular, el hilus del GD sufrió un desarreglo estructural detectado a partir de los 7d después de la inyección con AK que persistió hasta el último tiempo estudiado (30 d).

El análisis de las secciones de CE correspondientes a 1d posterior a la lesión, no mostró diferencias en el arreglo de las capas celulares con respecto a los controles. Luego de 7d posterior a la inyección, en la CE se detectó un desarreglo de las capas celulares acompañado de una invasión de células pequeñas que se incremento a lo largo del tiempo; al igual que las células infiltradas en la capa molecular su origen es glial (Fig. 5). En la CE además de los cambios anteriores, se observó picnosis celular y adelgazamiento progresivo del tejido. Todos los efectos del AK se presentaron en el GD y la CE del hemisferio ipsilateral a la lesión, por su parte el arreglo celular del GD y la CE contralaterales no se modificó con respecto a los sujetos control.

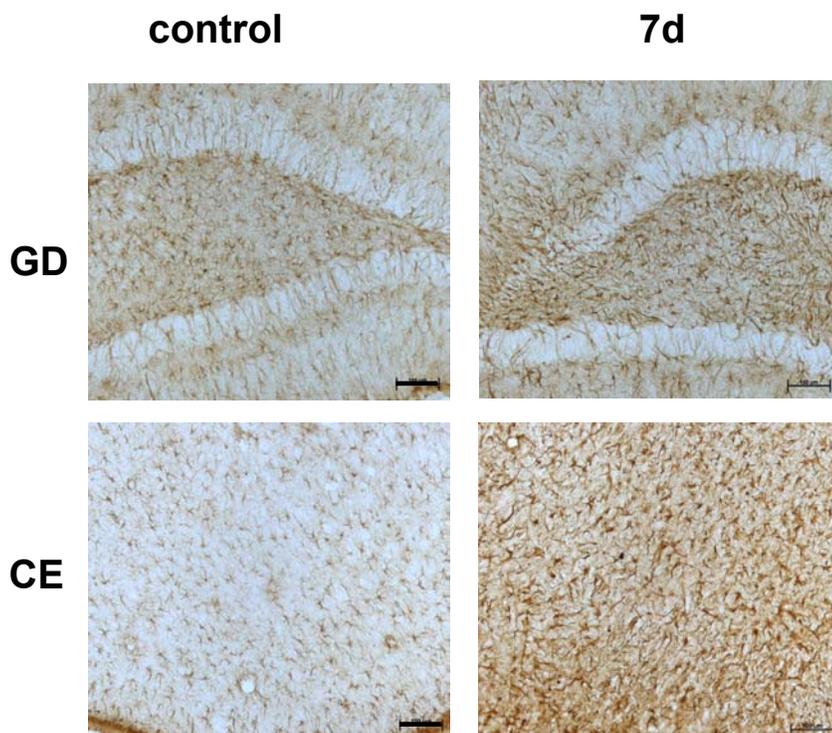


**Figura 4.** Curso temporal de la neurotoxicidad inducida por AK en el GD y su efecto en CE. Tinción de Nissl en cortes coronales del GD y CE. Las flechas señalan el área de lesión en el GD. Control: contralateral a la lesión. Escala: barra = 100 $\mu$ m. LD: lámmina dorsal; CP: capa polimórfica; LV: lámmina ventral. En CE se señalan las capas corticales.

La inmunotinción para GFAP mostró astrocitos positivos de forma estelar, con cuerpos celulares pequeños y finos procesos citoplásmicos en el GD y la CE de los sujetos control. Los animales tratados con AK presentaron un incremento en la marca de GFAP en el GD y la CE a lo largo del tiempo. El análisis a una mayor magnificación de estas células positivas a GFAP mostró un acentuado amplificación de estas células positivas a GFAP mostró un acentuado alargamiento de los cuerpos celulares y un engrosamiento de los procesos, características típicas de un fenotipo activado (Fig. 5). De acuerdo con el curso temporal, a los 30d se observó una reaparición de astrocitos estelares, así como una disminución de los astrocitos activados.

## **VII.2. Efectos de la lesión del giro dentado sobre la expresión de marcadores de ciclo celular en el hipocampo y la corteza entorrinal**

Con el propósito de evaluar el efecto de la lesión en el GD sobre la expresión de marcadores de ciclo celular en el GD y la CE, se realizó un estudio inmunohistoquímico que reveló cambios temporales en los niveles de ciclina D (Fig. 6) y cdk6 marcadores de fase G<sub>1</sub> (Fig. 7); cdk2 (Fig. 8) y PCNA (Fig. 9) proteínas involucradas en la fase S y ciclina B (Fig. 10) regulador de la fase M.



**Figura 5.** Expresión de GFAP en GD y CE posterior a la lesión con AK. Inmunohistoquímica para GFAP en secciones coronales del GD y CE obtenidas 7d posterior a la lesión. Control: contralateral a la lesión. Escala: barra =100 $\mu$ m.

En general, el GD de ratas controles presentó un número muy reducido de células ligeramente inmunoreactivas a los diferentes anticuerpos marcadores para proteínas de ciclo celular. Específicamente en la zona subgranular y en la capa polimórfica (CP) se contaron alrededor de 4 y 2 células positivas respectivamente. Cabe mencionar que la inmunoreactividad observada en el GD de estos animales controles reveló una marca positiva exclusivamente localizada en el citoplasma y en ningún caso se observó en el núcleo. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de inmunoreactividad para ninguna de las

proteínas estudiadas entre las ratas no inyectadas y las inyectadas con vehículo. Así mismo, la formación hipocampal del hemisferio contralateral a la lesión no mostró cambios significativos en la inmunotinción respecto a las ratas no inyectadas, por lo que se decidió considerarla como control para fines de comparación (Fig. 6A y 7A).

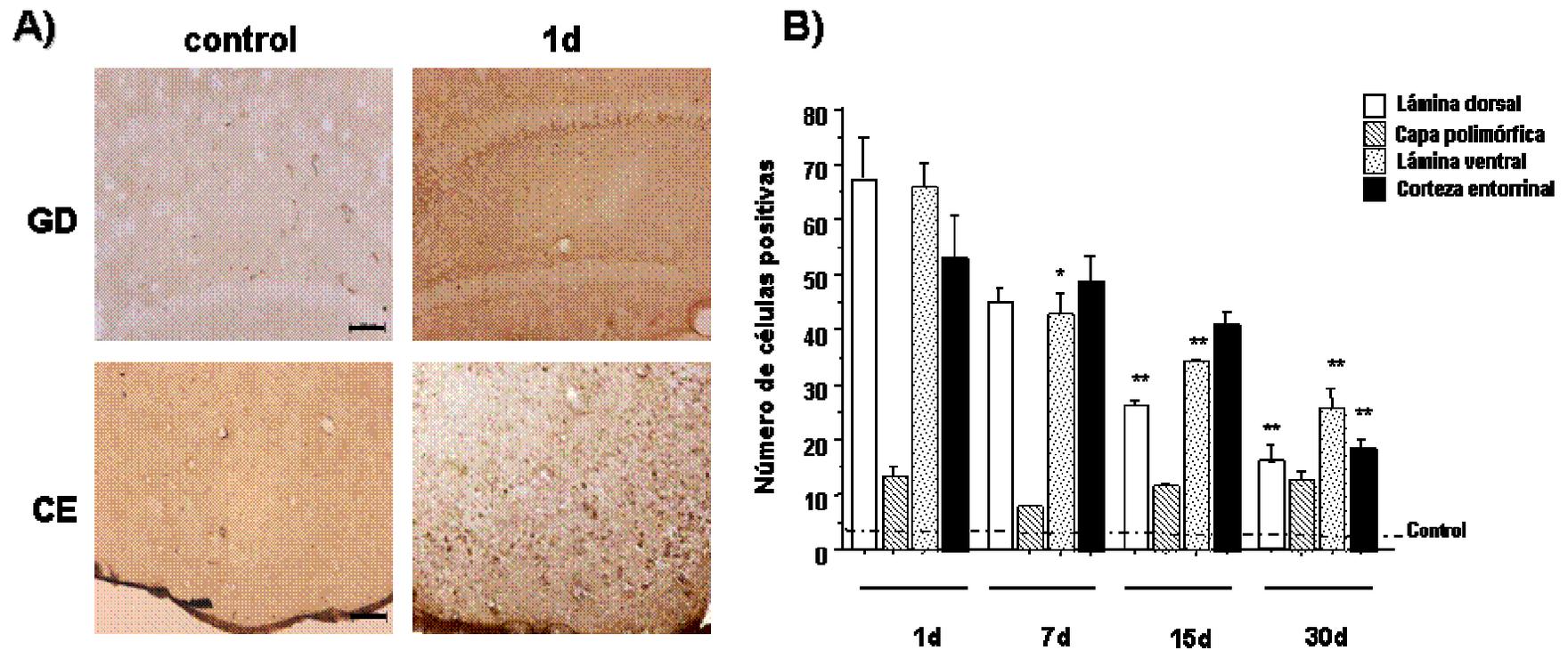
En síntesis, la inyección de AK indujo la expresión de los marcadores de ciclo celular en la CE, principalmente en la lámina II aunque en menor grado en las láminas III y IV. Conjuntamente se detectó un incremento significativo en la cantidad de células positivas a dichos marcadores en la lámina dorsal (LD) y lámina ventral (LV) del GD. En el grupo lesionado el marcaje positivo además de localizarse en el citoplasma y procesos celulares, en algunos casos se observó aparentemente en el núcleo. En las áreas de CA1 y CA3 también afectadas por la inyección de AK se observó marcaje positivo para las proteínas de ciclo celular, sin embargo, no fueron detalladas en el presente trabajo.

### **VII.2.a. Expresión de ciclina D y cdk6**

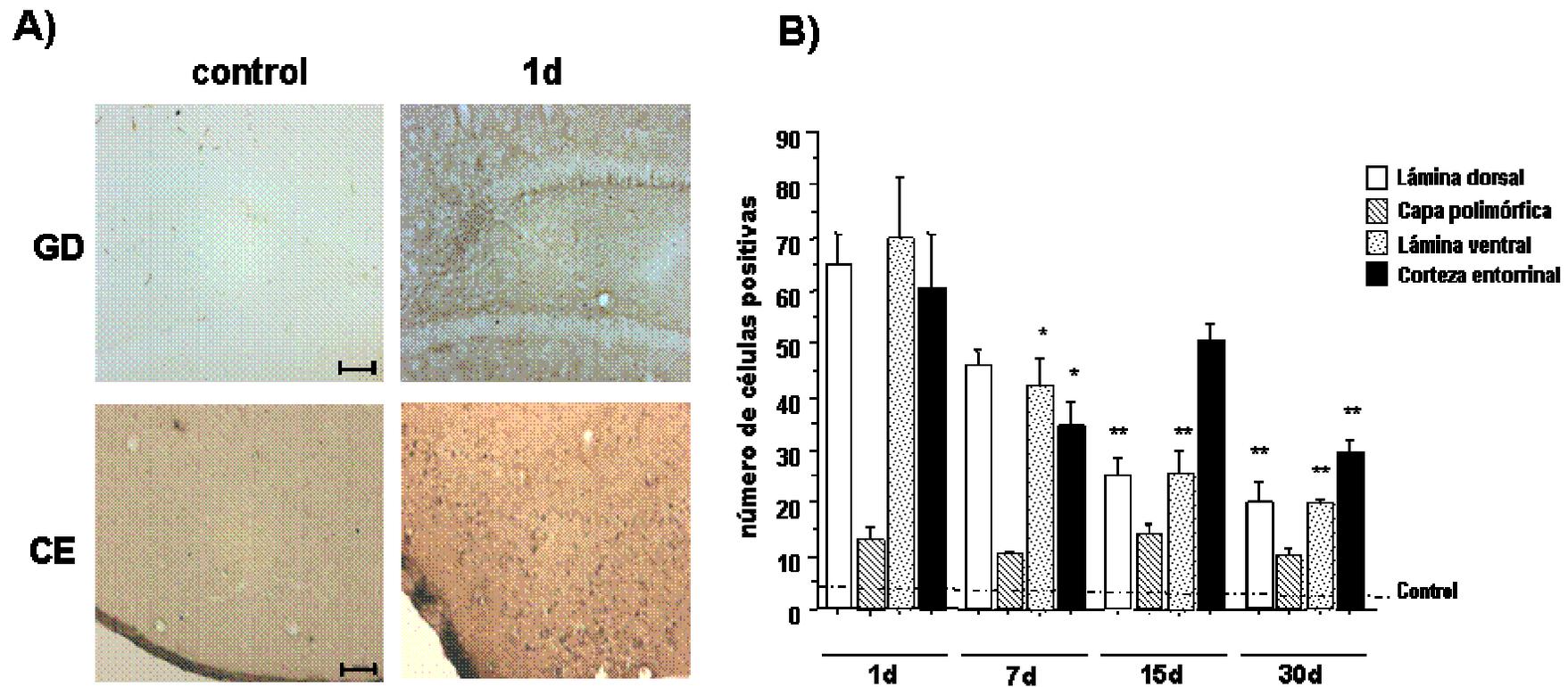
Se observaron cambios temporales en la expresión de cdk6 y ciclina D después de la lesión del GD. Un día posterior a la lesión se presentó el mayor número de células positivas a ciclina D en la LV ( $66 \pm 4.3$ ), la LD ( $67 \pm 7.1$ ) del GD y en la CE ( $53 \pm 8$ ). A partir de los 7d posterior a la inyección de AK se hizo evidente una disminución en el nivel de expresión de ciclina D en el GD, la cual

se acentuó a los 30d, momento en el que alcanzó valores promedio de  $15.6 \pm 0.3$  células positivas en la LD y de  $25.3 \pm 3.7$  en la LV, ambos estadísticamente diferentes respecto al valor de 1d ( $p < 0.005$ ). Aunque la disminución en el número de células inmunopositivas a ciclina D en la CE a lo largo del tiempo post-inyección de AK fue más lento, a los 30d después de la lesión llegó hasta un promedio de  $18.3 \pm 1.7$ , casi 3 veces menor y estadísticamente diferente al de 1d (Fig. 6B).

Por otro lado, los niveles más altos de cdk6 detectados, se presentaron 1d posterior a la lesión: específicamente el número de células positivas en la LD, la LV y la CE fue de  $65.3 \pm 5.5$ ,  $70 \pm 11.5$  y  $60.3 \pm 10.3$ , respectivamente (Fig. 7B). Luego de 7d después de la inyección de AK se observó una disminución de cdk6 en la LV y la LD del GD, la cual a partir de los 15d es estadísticamente diferente respecto a 1d. En la CE la cantidad de células positivas a cdk6 se redujo a los 7d posterior a la lesión, consecutivamente a los 15d se observó un incremento sin embargo este no fue estadísticamente significativo. Finalmente, a los 30d después de la lesión el promedio de células que expresaron cdk6 en la CE fue de  $29.7 \pm 1.9$ , lo que representa una disminución del 50% comparado con lo obtenido a 1d posterior a la lesión (Fig. 7B). La expresión de estas proteínas aumentó ligeramente respecto al control en la CP del GD, sin embargo, no se detectaron variaciones significativas en esta zona a los tiempos evaluados (Figs. 6B y 7B).



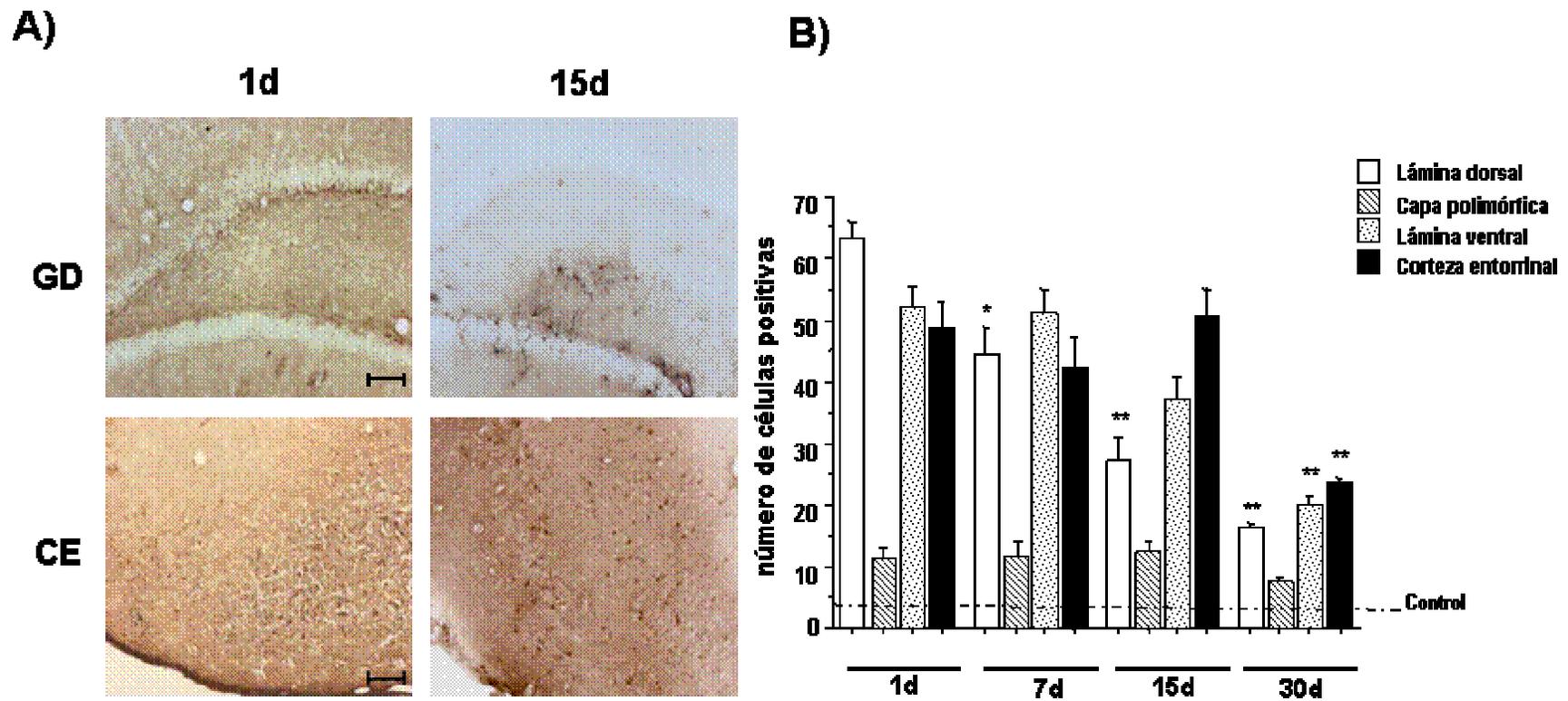
**Figura 6.** Expresión de ciclina D posterior a la lesión con AK. **A)** Inmunohistoquímica para ciclina D en secciones coronales del GD y CE obtenidas 1d posterior a la lesión. Control: contralateral a la lesión. Escala: barra = 100µm. **B)** Cuantificación de las células positivas a ciclina D en CE, lámina dorsal, capa polimórfica y lámina ventral del GD. Los datos representan el promedio ± ES (n=3-5 animales) \*p<0.05, \*\*p<0.005 con respecto a 1d.



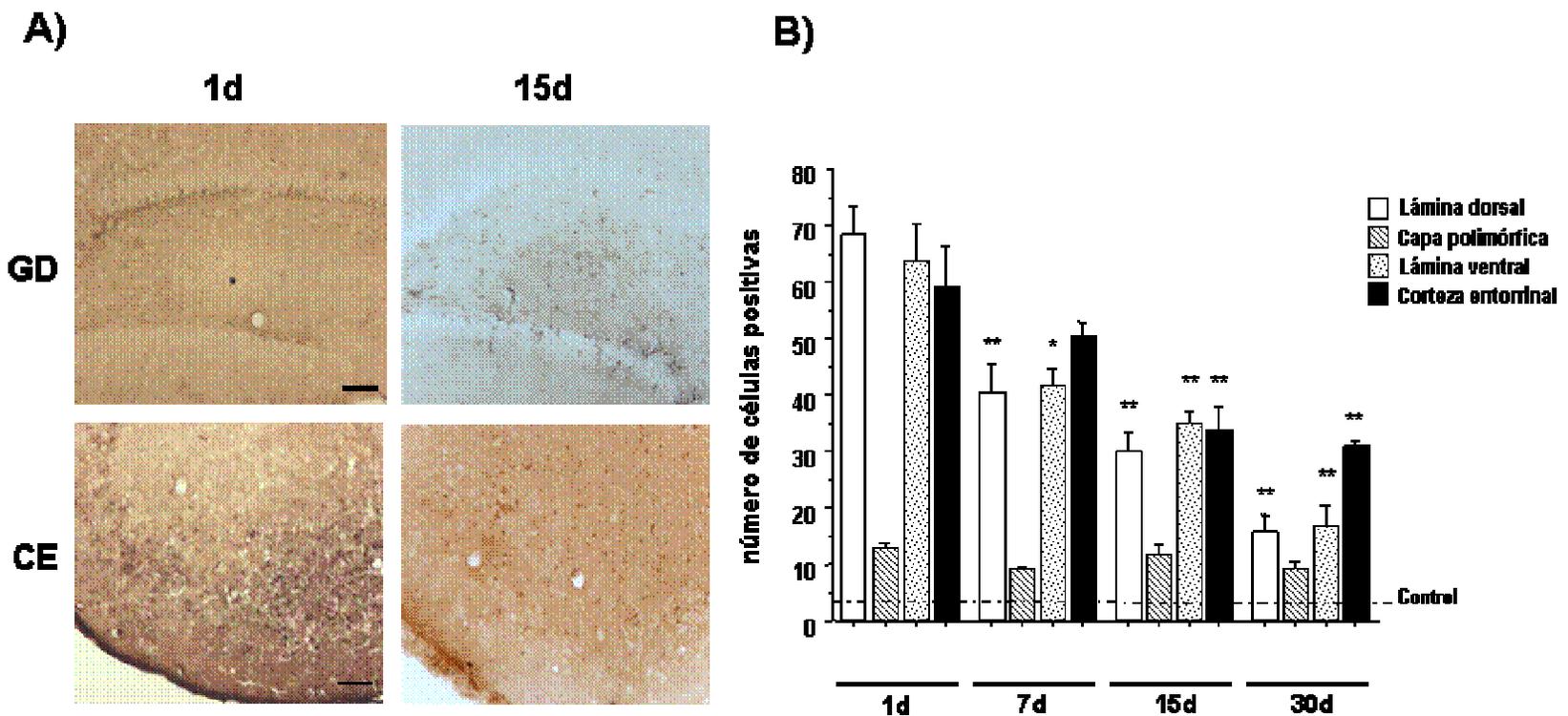
**Figura 7.** Expresión de *cdk6* en GD y CE posterior a la lesión con AK. **A)** Inmunohistoquímica de *cdk6* en secciones coronales de GD y CE obtenidas 1d posterior a la lesión. Control: contralateral a la lesión. Escala: barra =100 $\mu$ m. **B)** Cuantificación de células positivas a *cdk6* en CE , lámina dorsal, capa polimórfica y lámina ventral del GD. Los datos representan el promedio  $\pm$  ES (n = 3-5 animales). \* $p < .05$ ; \*\* $p < .005$  con respecto a 1d .

### **VII.2.b. Expresión de cdk2 y PCNA**

El incremento en la expresión de cdk2 y PCNA posterior a la inyección de AK presentó diversos cambios en los tiempos evaluados (Figs. 8 y 9). Después de 1d de la lesión, se encontró en la LD la mayor cantidad de células positivas a cdk2 ( $63.4 \pm 2.6$ ), consecutivamente se detectó un decremento gradual que a los 30d llegó a un promedio de  $16.3 \pm 0.3$ , casi 4 veces menor que el correspondiente a 1d. Durante los primeros 15d después de la lesión el número de células positivas a cdk2 presentes en la LV y en la CE se mantuvo elevado, con ligeras modificaciones estadísticamente no significativas, sin embargo fue hasta los 30d cuando disminuyó a un 50% respecto al promedio obtenido a 1d (Fig.8B). De manera similar a los marcadores primeramente descritos, el mayor número de células positivas a PCNA en la LD ( $68.4 \pm 4.9$ ), la LV ( $63.6 \pm 6.8$ ) y la CE ( $59.2 \pm 6.9$ ) se presentó 1d después de la inyección de AK. La LD y la LV mostraron cursos temporales similares. A partir de los 7d después de la lesión ocurrió una disminución progresiva en la expresión de PCNA en la LD y la LV, que a los 30d alcanzó promedios de  $15.6 \pm 2.9$  y  $16.6 \pm 3.8$ , respectivamente, ambos estadísticamente diferentes del correspondiente a 1d ( $p < 0.005$ ). La expresión de PCNA en la CE mostró un decremento significativo a partir de los 15d posterior a la lesión ( $p < 0.005$ ), sin embargo, este no llegó a ser de un 50%, como en el caso de cdk2 (Fig 9B). A pesar de que la expresión de Cdk2 y PCNA en la CE se incrementó sutilmente luego de la lesión, ésta permaneció casi constante a lo largo del tiempo en el que se realizó el análisis (Fig. 8B y 9B).



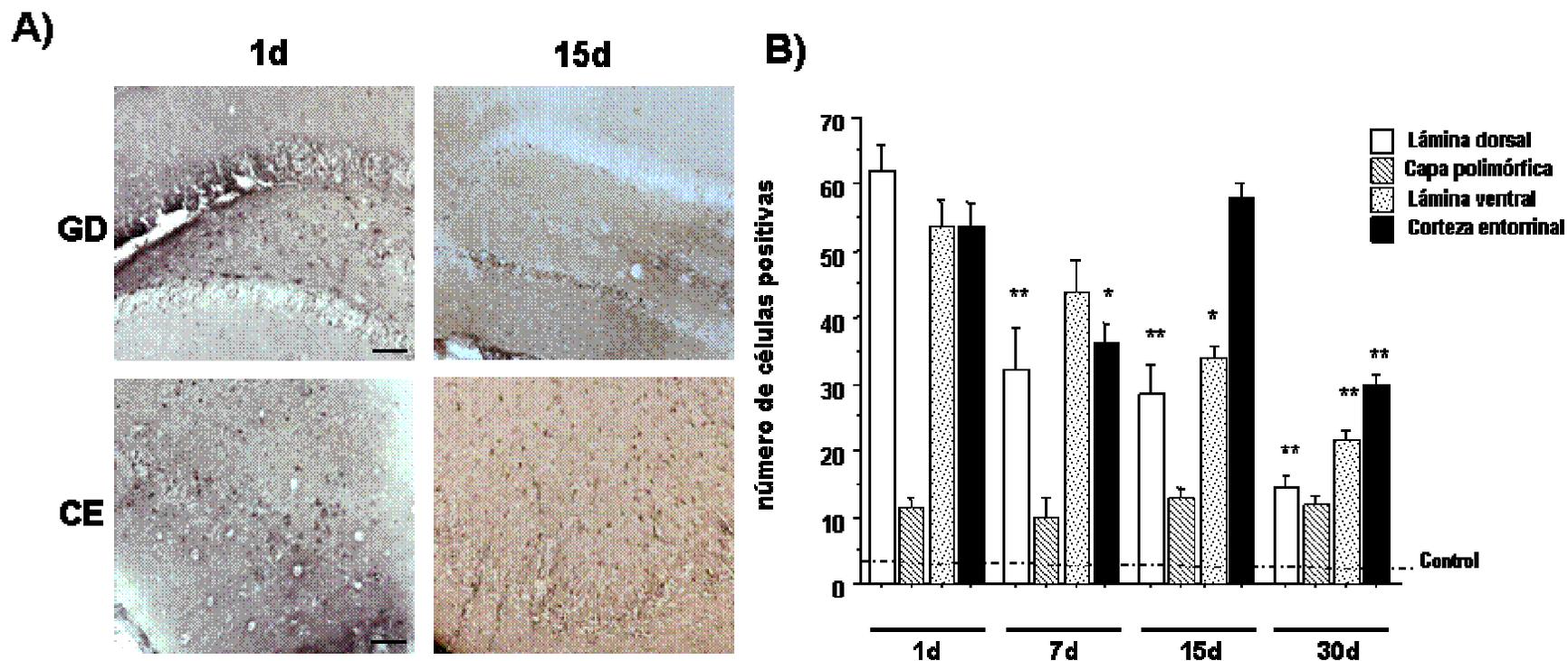
**Figura 9.** Curso temporal de la expresión de *cdk2* posterior a la lesión con AK. **A)** Inmunohistoquímica para *cdk2* en secciones coronales de GD y CE obtenidas 1d y 15d posterior a la inyección de AK. Escala: barra = 100 $\mu$ m **B)** Cuantificación de células positivas a *cdk2* en CE, lámina dorsal, capa polimórfica y lámina ventral del GD. Los datos representan el promedio  $\pm$  ES (n = 3-5 animales) 1d \* p<.05; \*\*p<.005.



**Figura 8.** Curso temporal de la expresión de PCNA posterior a la lesión con AK. **A)** Inmunohistoquímica para PCNA en secciones coronales de GD y CE. Escala: barra = 100µm. **B)** Cuantificación de células positivas a PCNA en CE, lámina dorsal, capa polimórfica y lámina ventral del GD. Los datos representan el promedio ± SEM (n = 3-5 animales) \*p<.05; \*\*p<.005 con respecto a 1d.

### **VII.2.c. Expresión de ciclina B**

La expresión de ciclina B inducida por la lesión en el GD en las regiones estudiadas también presentó cambios a lo largo del tiempo valorado (Fig. 10). A 1d posterior a la lesión, se detectó la mayor cantidad de células positivas a ciclina B en la LD ( $61.8 \pm 4.2$ ) y en la LV ( $53.6 \pm 4.0$ ). Posteriormente en estas áreas ocurrió un decremento en las células positivas a ciclina B, el cual fue significativo a partir de los 7d en la LD ( $p < 0.005$ ) y luego de 15d en la LV ( $p < 0.05$ ). A 30d después de la lesión el número de células que expresaban ciclina B en la LD fue 4 veces menor y en la LV solo 2 veces menor, ambos comparados con el valor obtenido 1d posterior a la lesión (Fig. 10B). A 1d después de la lesión en la CE se obtuvo un promedio de células positivas a ciclina B de  $53.6 \pm 3.6$ , sin embargo, este disminuyó significativamente a los 7d ( $p < 0.05$ ). Posteriormente se presentó un incremento significativo que alcanzó un valor similar al promedio correspondiente a 1d. Finalmente a los 30d la cantidad de células positivas a ciclina B se redujo casi 50% respecto a 1d (Fig.10B). La expresión de ciclina B en la CP de la lesión se incrementó sutilmente luego de la inyección de AK, sin embargo esta se mantuvo a lo largo del tiempo en el que se realizó el análisis.



**Figura 10.** Curso temporal de la expresión de ciclina B posterior a la lesión con AK. **A)** Inmunohistoquímica para ciclina B en secciones coronales de GD y CE a diferentes tiempos posterior a la lesión. Escala: barra = 100µm. **B)** Cuantificación de células positivas a ciclina B en CE, lámina dorsal, capa polimórfica y lámina ventral del GD. Los datos representan el promedio ± ES (n = 3-5 animales) 1d \* p<.05; \*\*p<.005.

### **VII.3. Expresión de proteínas implicadas en la enfermedad de Alzheimer**

Considerando el planteamiento acerca de que en la EA la reentrada a ciclo celular de neuronas postmitóticas es un evento que acompaña a la fosforilación de tau, la acumulación de proteína  $\beta$ A y/o a la muerte celular de tipo apoptótico (Nagy, 2000), nosotros supusimos que en nuestro modelo la reexpresión de marcadores de ciclo celular podría acompañarse de eventos similares. Para explorar lo anterior, se realizó inmunohistoquímica en secciones de cerebro de ratas lesionadas y ratas control con anticuerpos para proteínas que se han implicado en la muerte apoptótica como Bax (Fig.11) y en la EA como tau fosforilada (PHF-1) (Fig.12) y PPA (Fig.13).

#### **VII.3.a. Expresión de Bax**

La lesión del GD indujo la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax en células del GD y la CE. La marca positiva a Bax se localizó principalmente en el soma, aunque también se presentó en procesos celulares (Fig. 11A). En el GD y la CE control no se observó inmunoreactividad positiva a Bax. La mayor expresión de Bax en la LD y la CE se presentó 1d posterior a la lesión, teniendo como promedio de células positivas  $49.3 \pm 3.8$  y  $59.3 \pm 2.4$ , respectivamente. Luego de 7d de la lesión las células positivas a Bax disminuyeron significativamente ( $p < 0.005$ ). 30d posterior a la lesión el promedio de células positivas a Bax en la LD ( $14.6 \pm 4.1$ ) y la CE ( $14.3 \pm 2.3$ ) llegó a ser entre 3 y 4 veces menor comparado

con el obtenido a 1d posterior a la lesión. La expresión de Bax posterior a la lesión detectada en la LV se mantuvo a lo largo del tiempo, a los 7d se detectó un incremento, sin embargo, no fue significativo. De igual forma en la CP, el ligero incremento en la expresión de Bax posterior a la lesión no presentó cambios significativos durante el periodo en el que se realizó el análisis (Fig.11B)

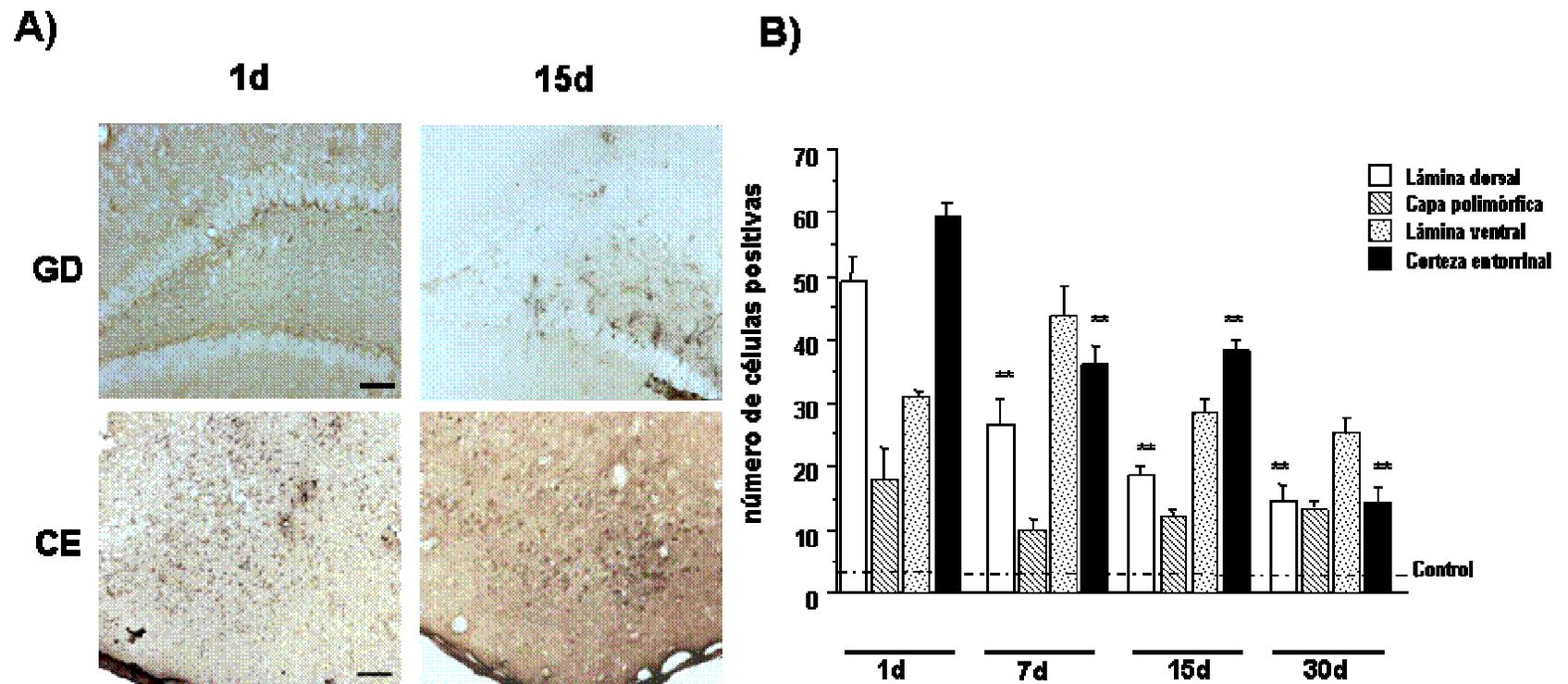
### **VII.3.b. Expresión de PHF-1**

Para evaluar en este modelo la inducción de marcadores de la EA, se analizó la inmunoreactividad para la proteína tau fosforilada y para la PPA, tanto alrededor del sitio de lesión como en la CE. La presencia de tau fosforilada en residuos que aparecen en la EA se analizó por medio de la inmunoreactividad para PHF-1, anticuerpo que reconoce los residuos fosforilados de Ser-P-396/404. Las secciones cerebrales de animales controles teñidas con PHF-1 mostraron una distribución de tinción en el hipocampo, preferentemente restringido al neuropilo y no en cuerpos neuronales. Las fibras inmunopositivas a PHF-1 fueron evidentes en el *estratum oriens* de la región CA3 y en la capa polimórfica del hilus. No se observó inmunoreactividad específica para PHF-1 en la CE de ratas control ni en las inyectadas con vehículo. En el GD 24h después de la inyección con AK, la inmunoreactividad para PHF-1 fue más intensa e incluyó cuerpos neuronales (Fig. 12A). El mayor número de neuronas positivas a PHF-1 en la LD se presentó 1d después de la lesión ( $45.8 \pm 3.2$ ). El análisis posterior indicó que a partir de los 7d la cantidad de células positivas se redujo significativamente ( $p < 0.005$ )

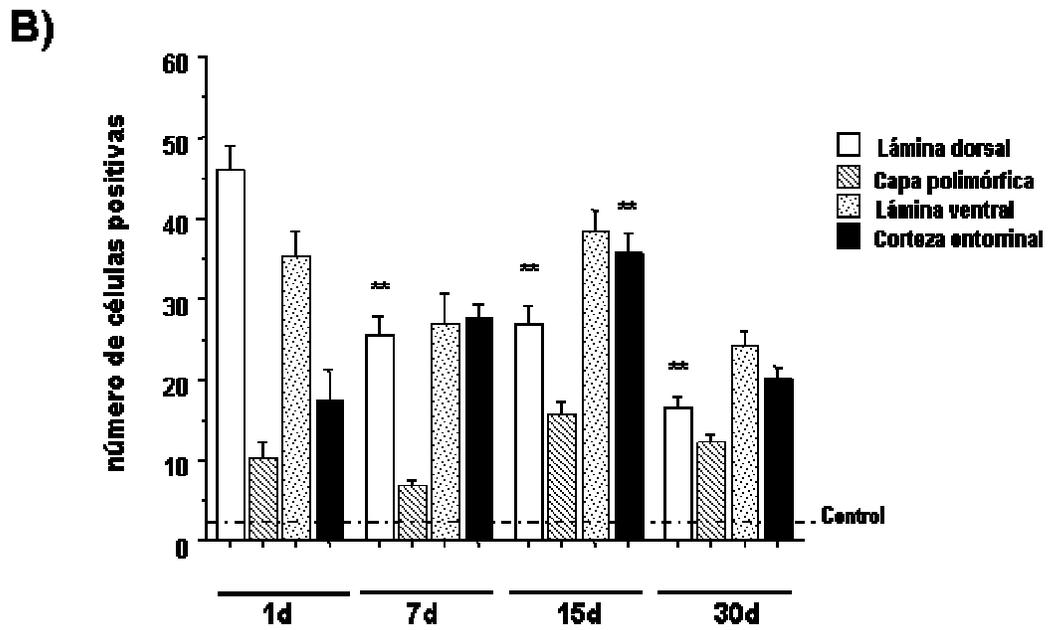
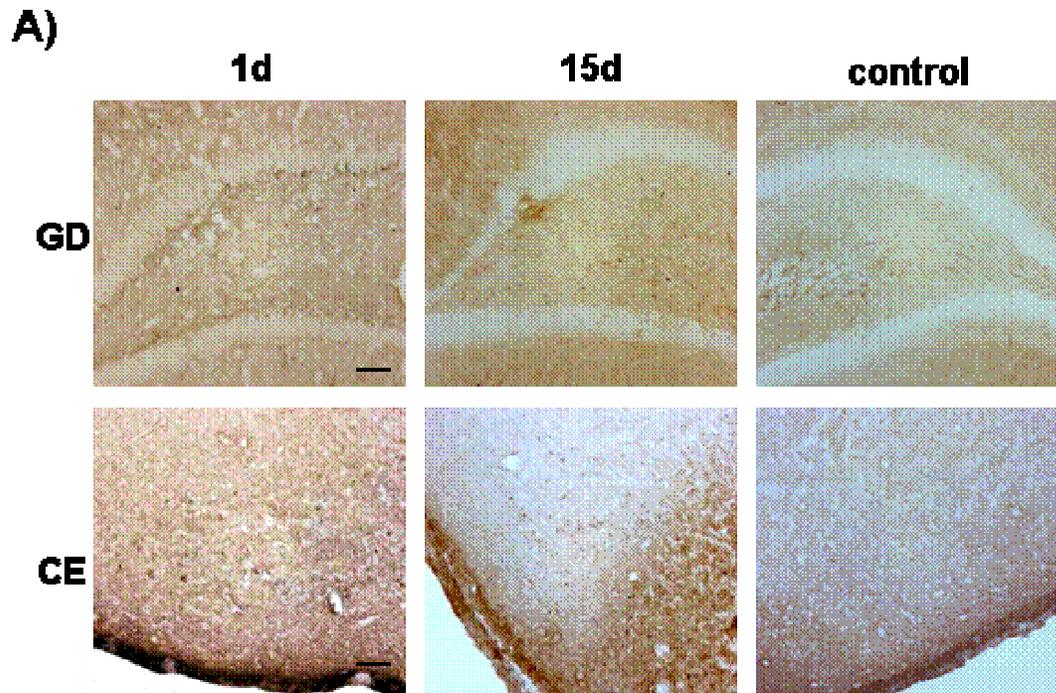
respecto a 1d. Finalmente a los 30d el promedio de células positivas fue de  $16.5 \pm 1.4$ , lo que representa una disminución del 50% en comparación a 1d. El promedio de células positivas a PHF-1 en la LV y la CP 1d después de la lesión fue de  $35.2 \pm 3.3$  y  $10.2 \pm 1.9$  respectivamente. Posterior a este tiempo no se detectaron cambios significativos en el número de células positivas presentes en estas áreas. En la CE la cantidad de células positivas a PHF-1 posterior a la lesión se incremento con el paso del tiempo, alcanzando a los 15d su mayor valor ( $35.5 \pm 2.5$ ). Finalmente a los 30d el número de células positivas en la CE disminuyó hasta valores similares a los obtenidos 1d después de la lesión (Fig.12B).

### **VII.3.c. Expresión de PPA**

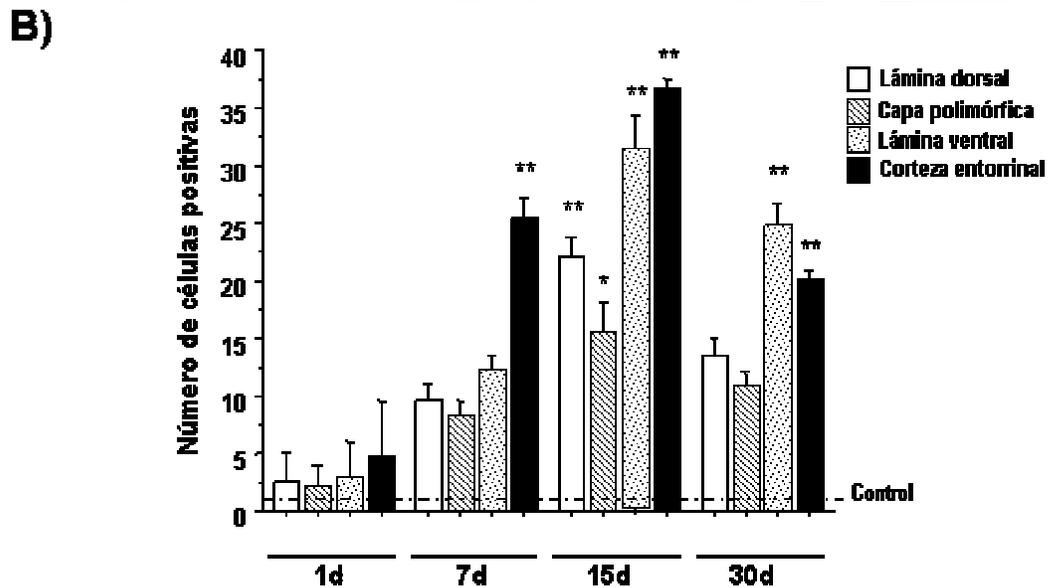
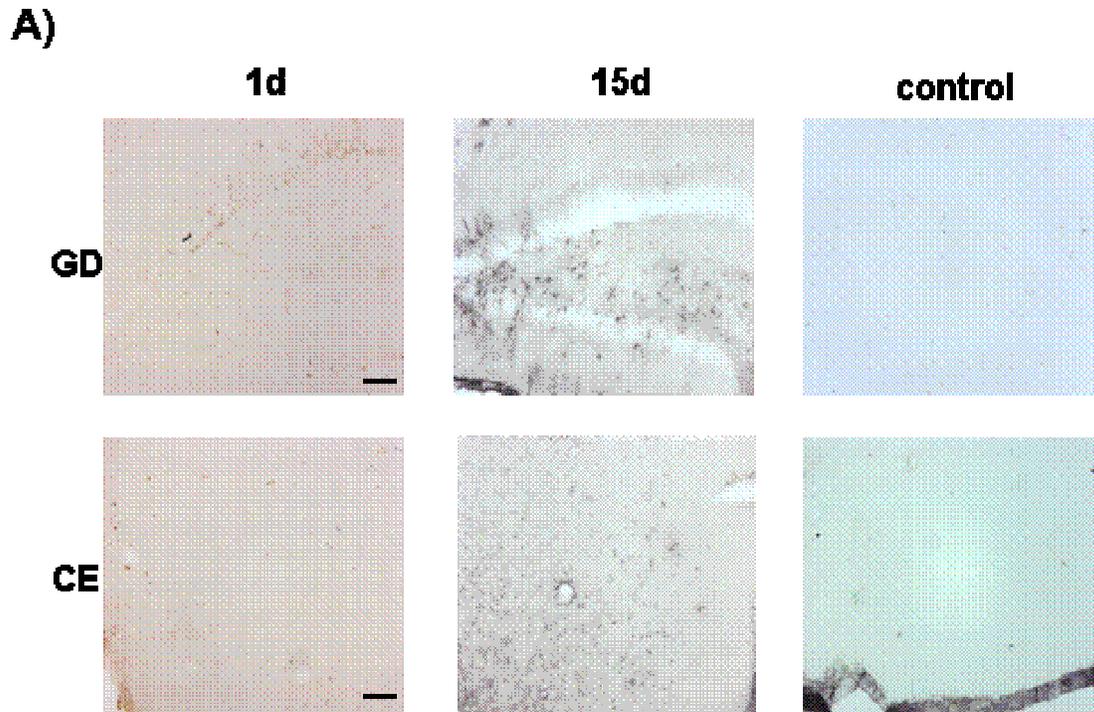
La presencia de células positivas a PPA en el GD y la CE solo se detectó en los tejidos pertenecientes a ratas lesionadas en el GD. El marcaje positivo, además de ocupar el soma, incluyó algunos procesos celulares (Fig.13A). Un día posterior a la lesión se observaron escasas células positivas en algunos tejidos analizados, sin embargo, a los 7d después de la lesión se encontraron de forma regular en todas las regiones analizadas, particularmente en la CE donde aumentaron rápidamente. La mayor cantidad de células positivas observada en LD ( $22 \pm 1.7$ ), LV ( $31.3 \pm 2.8$ ), CP ( $15.3 \pm 2.7$ ) y CE ( $36.6 \pm 0.8$ ) se detectó 7d después de la lesión. Por último, a 30d de la lesión con AK, las células positivas en la CE se redujeron significativamente ( $p < 0.05$ ), mientras que en las áreas restantes solo tendieron a disminuir (Fig.13B)



**Figura 11.** Curso temporal de la expresión de Bax posterior a la lesión con AK. **A)** Inmunohistoquímica para Bax en secciones coronales GD y CE a diferentes tiempos posterior a la lesión. Escala: barra = 100µm. **B)** Cuantificación de células positivas a Bax en CE, lámina dorsal, capa polimórfica y lámina ventral del GD. Los datos representan el promedio ± ES (n = 3-5 animales) \* p<.05; \*\*p<.005 con respecto a 1d.



**Figura 13.** Expresión de PHF-1 en GD y CE posterior a la lesión con AK. **A)** Inmunohistoquímica de PHF-1 en secciones coronales de GD y CE obtenidas 1d y 15d posterior a la inyección de AK. Control: contralateral a la lesión. Escala: barra = 100µm. **B)** Cuantificación de células positivas a PHF-1 en CE, lámina dorsal, capa polimórfica y lámina ventral del GD. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM (n= 3-5 animales) \* p<.05; \*\*p<.005 con respecto a 1d.

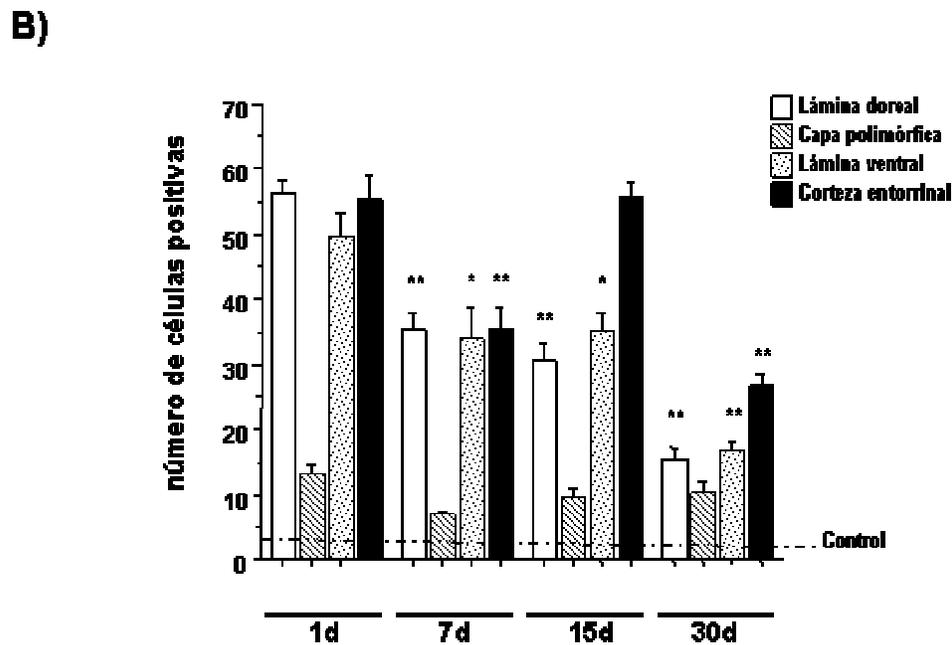
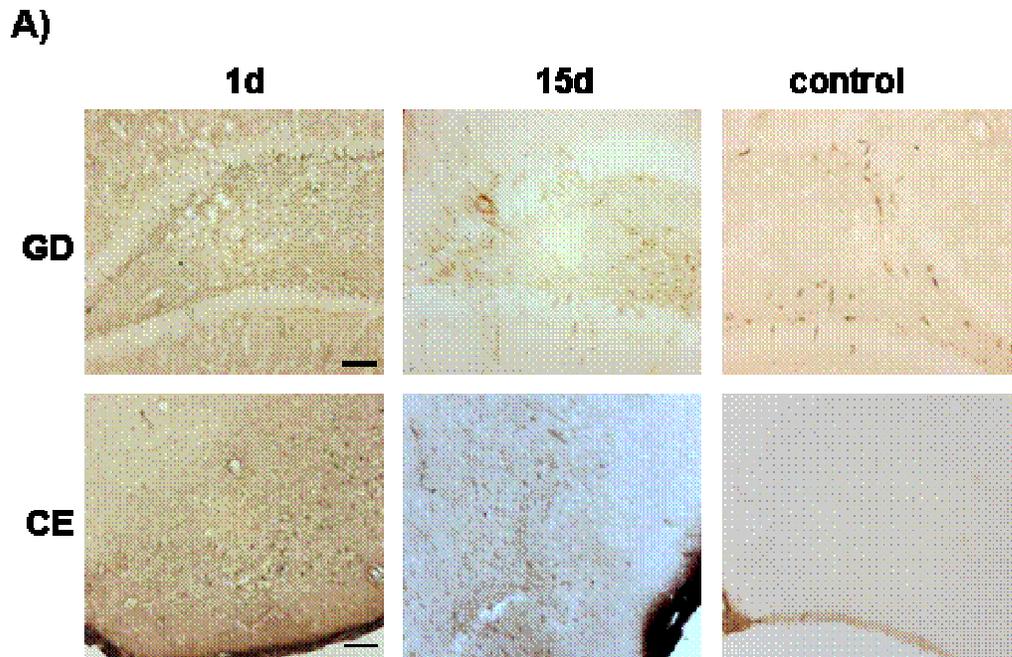


**Figura 14.** Expresión de PPA en GD y CE posterior a la lesión con AK. **A)** Inmunohistoquímica de PPA en secciones coronales de GD y CE obtenidas 1d y 15d posterior a la inyección de AK. Control: contralateral a la lesión. Escala: barra 100µm. **B)** Cuantificación de células positivas a PPA en CE, lámina dorsal, capa polimórfica y lámina ventral del GD. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM (n= 3-5 animales) \* p<.05; \*\*p<.005 con respecto a 1d.

#### **VII.4. Expresión de cdk5 y p35/p25**

Varios estudios han demostrado diversas funciones de la proteína cinasa cdk5 y su activador p35 en neuronas. El complejo cdk5/p25 es capaz de fosforilar tau, alterar el citoesqueleto y promover la muerte neuronal. En este sentido evaluamos la presencia de cdk5 por inmunohistoquímica en el hipocampo y la CE y la expresión del complejo p35/25 por inmunotransferencia.

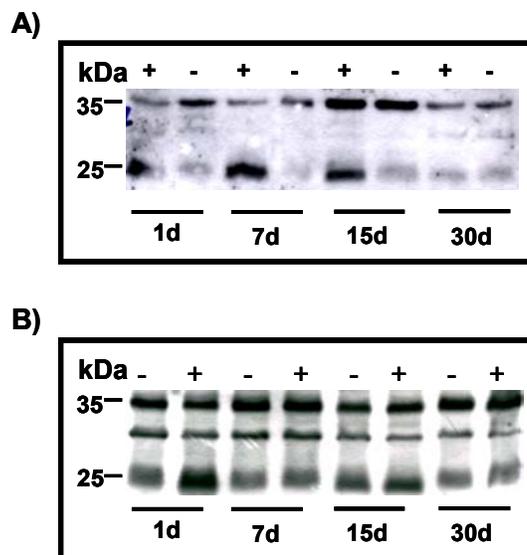
En el GD inyectado con vehículo y en el contralateral a la lesión se observaron varias células positivas a cdk5 en la LD, la LV y la CP (Fig.14A). La marca positiva se localizó en el citoplasma y en los procesos neuronales, aparentemente no se observó en el núcleo. En la CE se detectaron células positivas a cdk5 solo después de la lesión del GD (Fig. 14A). El análisis del curso temporal de la expresión de esta proteína cinasa indicó que a 1d después de la inyección de AK aparece la mayor cantidad de células positivas en la LD ( $56.2 \pm 1.9$ ) y en la LV ( $49.7 \pm 3.5$ ). Luego de 7d posteriores a la lesión, la expresión disminuyó significativamente en la LD y la LV. Esta disminución se acentuó a los 30d alcanzando promedios de  $15.2 \pm 1.7$  y  $16.7 \pm 1.4$  el número de células positivas respectivamente es decir, casi tres veces menor que el correspondiente a 1d. La expresión de cdk5 en la CE se modificó constantemente durante el tiempo del estudio: 1d después de la lesión el promedio de células positivas fue de  $55.2 \pm 3.6$ , y disminuyó significativamente a los 7d (Fig. 14B). Posteriormente, a los 15d de la lesión, la expresión de cdk5 se restauró hasta un



**Figura 12.** Curso temporal de la expresión de cdk5 posterior a la lesión con AK. **A)** Inmunohistoquímica para cdk5 en GD y CE a diferentes tiempos posterior a la lesión. Control: contralateral a la lesión. Escala: barra = 100µm. **B)** Cuantificación de células positivas a cdk5 en secciones de CE, lámina dorsal, capa polimórfica y lámina ventral del GD. Los datos representan el promedio ± ES (n = 3-5 animales) \* p<.05; \*\*p<.005 con respecto a 1d.

nivel semejante al de 1d, sin embargo, este incremento fue seguido de una disminución de alrededor del 50% en las células positivas a cdk5 ( $26.7 \pm 1.5$ ) a los 30d (Fig.14B).

El análisis por inmunotransferencia el complejo activador de cdk5, p35/25 mostró cambios a lo largo del tiempo de post-inyección. En el hipocampo inyectado la aparición de la banda que corresponde a p25 y la disminución de la banda de p35, se observa a tiempos tan tempranos como 24h después de la lesión. La aparición del fragmento p25 permanece elevado a los 7 y 15 d y disminuye a los 30 d post-inyección (Fig 15A). En la CE la aparición de la banda de p25 se inicia a las 24h después de la inyección y posteriormente se mantiene elevado lo que coincide con el incremento en los niveles de tau fosforilada. A los 30 días empieza a disminuir y alcanza valores semejantes al lado no inyectado (Fig. 15B).



**Figura 15.** Western-blot representativo del curso temporal de la expresión de p35/ p25 en H (A) y CE (B) posterior a la lesión en GD con AK. (+) Ipsilateral a la lesión y (-) Contralateral a la lesión (n = 2).

## VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo analizamos la expresión de proteínas de ciclo celular en la neurodegeneración evocada por estrés excitotóxico en el GD, así como el papel de la integridad de un circuito neuronal (CE-GD) en la expresión de algunos reguladores del ciclo celular y en la aparición de proteínas alteradas en la EA.

Varios estudios recientes han sugerido que las neuronas postmitóticas pueden reentrar al ciclo celular previamente a la apoptosis después de un daño neuronal (al-Ubalbi, 1992; Feddersen, 1992) y que en la EA esta reexpresión es un evento frecuente en regiones altamente vulnerables como el hipocampo y la neocorteza cerebral (Vincent, 1997; Nagy, 1997; Busser, 1998; Yang, 2003).

Sin embargo, la pregunta acerca de qué señales mitóticas aberrantes pueden ser las responsables de iniciar y propagar el daño en la EA, todavía no ha podido responderse. Una posibilidad es que la desconexión de áreas sinápticamente acopladas, ocasionada por algún tipo de daño: excitotóxico, metabólico, traumático, etc, origine pérdida del control de la diferenciación, que a su vez sirva como un estímulo para la propagación de señales de muerte celular o la aparición de marcadores típicos de la EA.

Para probar esta hipótesis en el presente trabajo estudiamos el patrón espacio/temporal de la aparición de diferentes proteínas involucradas en el control del ciclo celular y la concomitante aparición de proteínas involucradas en la EA: epítopes fosforilados en tau e incrementos en la producción de PPA. La

aparición de estos marcadores se estudió precisamente en dos de las áreas inicialmente dañadas en la EA: la CE y el hipocampo (Hyman, 1984; Braak, 1997; Van Hoesen, 1991).

En el presente modelo nosotros encontramos la expresión temprana y casi simultánea de 2 proteínas de ciclo celular de fase  $G_1$ : ciclina D1 y cdk6. Estas dos proteínas se expresaron casi con la misma magnitud y al mismo tiempo tanto en el área lesionada (GD) como en área que proyecta ella (CE). Al tiempo que la lesión progresa, la cantidad de células positivas a estos dos marcadores decae significativamente.

En neuronas la reentrada al ciclo celular es seguida por la activación de mecanismos de control en la transición  $G_1/S$  que intentan detener la progresión del ciclo. Bajo condiciones adecuadas, la interrupción en  $G_1$  puede conducir a la re-diferenciación sin consecuencias o alternativamente a la muerte celular de tipo apoptótico. En nuestro modelo la expresión de Bax, una proteína pro-apoptótica ocurrió tanto en GD como en la CE desde tiempos tempranos (24h) y permaneció elevada hasta 15 días después de la lesión, particularmente en la CE. Estos resultados sugieren que parte de las células que expresaron marcadores de  $G_1$  posiblemente activaron mecanismos de muerte apoptótica en las primeras 24 horas. Sin embargo, es posible que después del daño por AK un número considerable de neuronas presenten fallas en el mecanismo regulador  $G_1/S$  ya que, a todos los tiempos estudiados, varias células de GD y CE que no mueren tempranamente, aparentemente continúan su progresión a lo largo del ciclo

celular llegando a expresar marcadores de fase S: PCNA y cdk2. En apoyo a lo anterior se observó el efecto tardío en la expresión de estos marcadores, particularmente de cdk2 en la zona interconectada con el sitio del daño primario, la CE.

Un número considerable de células tanto en GD como en CE expresó un marcador de  $G_2$ , la ciclina B, sugiriendo su progresión en el ciclo celular. De manera interesante, la expresión en altos niveles de este marcador persistió en la CE hasta los 15d, tiempo en que ocurre la expresión más abundante de marcadores de la EA. Ha sido propuesto que en neuronas, al ser incompatibles con la mitosis, la progresión del ciclo celular conduce a su interrupción del ciclo celular en fase  $G_2$ , el cual a su vez, lleva a las neuronas a dos alternativas: o mueren por un mecanismo de muerte programada tipo apoptótica (Busser, 1998) o sobreviven y producen una patología de tipo Alzheimer (Nagy, 1997).

En este estudio nosotros encontramos la aparición a todos los tiempos estudiados de inmunoreactividad para PHF1 y PPA. De manera interesante la aparición de estos marcadores fue mucho más intensa en la CE hacia los 15d post-lesión lo que sugiere que la aparición de estos marcadores se asocia a la activación previa de algunas de las cinasas involucradas en ciclo celular. En este sentido se ha reportado que la fosforilación dependiente de  $G_2$  de la PPA conduce a cambios en el procesamiento de esta proteína, resultando en la producción predominante de fragmentos amiloidogénicos. Por otro lado, se ha descrito que en etapa  $G_2$  existe una preparación de la célula para la mitosis lo que involucra la

activación de varias proteínas cinasas, la inactivación de proteína fosfatasas y la desestabilización del citoesqueleto. En las neuronas maduras que reentran al ciclo celular es posible que al llegar a etapa G<sub>2</sub> se desestabilicen los microtúbulos, aumente la poza de proteína tau libre que la haga más susceptible de fosforilación. Nuestros resultados muestran la aparición de fosfoepítomos de tau (Ser 396/404) que aparecen tanto en neuronas del hipocampo dañado como en el área interconectada, la CE, de manera progresiva en el tiempo, iniciándose a los 24 h y alcanzando el mayor número de neuronas positivas a los 15 días. Recientemente, Mudher (2001) observó tau fosforilada reactiva a AT8 luego de lesionar la CE de rata. En conjunto los datos anteriores sugieren que la pérdida de conexiones entre la CE y el hipocampo observada en etapas tempranas de la EA puede promover la fosforilación de tau.

El epítome reconocido por PHF1 es el principal sitio de fosforilación en tau por la cinasa cdk5 (Baumann, 1993; Flaherty, 2000). Esta cinasa se activa vía p35, el cual en algunas condiciones patológicas tiende a proteolizarse en p25 (Patrick, 1999; Bu, 2002). En el presente trabajo demostramos que además de encontrarse un incremento en la inmunoreactividad para cdk5 que precede en intensidad a la aparición de PHF1-tau, tanto en GD como en CE, este incremento coincide con la presencia en altos niveles de su activador p35/25 en ambas áreas cerebrales. En cerebros de pacientes con EA se ha descrito la acumulación de p25, la cual correlaciona de manera similar con lo reportado en este trabajo, con un aumento en la presencia de cdk5 y con un aumento en la fosforilación de

tau en el sitio de inmunoreactividad a PHF-1 (Patrick, 1999).

Por otro lado, se ha reportado que el AK induce muerte apoptótica en neuronas vulnerables, a través de mecanismos relacionados con la reentrada patológica al ciclo celular. Específicamente se ha reportado que la administración sistémica de AK induce la expresión en altos niveles de ciclina D y de cdk4 en la corteza piriforme, amígdala e hipocampo. El uso de oligonucleótidos antisentido de estas proteínas suprime la muerte de células neuronales inducida por AK (Park, 2000; Ino, 2001). Nosotros, además de detectar la expresión de estos reguladores de fase G1 en el GD posterior a la inyección de AK, observamos marcadores de fases posteriores del ciclo celular (cdk2, PCNA, ciclina B) sugiriendo su participación en la neurodegeneración inducida por AK. Asimismo reportamos la aparición de tau fosforilada y PPA en el GD ipsilateral a la lesión con AK, esta última coincide con la previa descripción de un aumento en la inmunoreactividad a PPA glial en la corteza cerebral de rata posterior a un tratamiento sistémico con AK (Shoham, 1997). Aunque en nuestro modelo el tipo de células que expresan a la PPA no fue determinado con exactitud, una cantidad considerable de células positivas a esta proteína presentaron un fenotipo de células gliales. Por otro lado, nosotros observamos en extractos de hipocampo un incremento en la formación de p25 posterior a la inyección con AK. En este sentido se ha descrito que agonistas glutamatérgicos entre ellos el AK inducen la proteólisis de p35 a través de la activación  $Ca^{2+}$ -dependiente de calpaína, en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata (Kerokoski,

2004).

Los datos obtenidos en este trabajo referente a los efectos en GD de la inyección de AK, apoyan y complementan descripciones previas relacionadas a la neurodegeneración evocada por AK. Por su parte, las observaciones correspondientes a la CE probablemente se derivan de la pérdida de conectividad con el GD, no así de la acción directa del AK.

Si bien el curso temporal utilizado en este estudio permitió detectar el incremento en la expresión de los marcadores de interés, se concentró principalmente en su etapa final (excepto PPA). Para conocer la dinámica inicial de dicho aumento se requiere de un análisis a tiempos más cortos, es decir anterior a las primeras 24 hrs.

La presencia de células positivas a marcadores de ciclo celular en regiones interconectadas (CE-GD) posterior a una lesión excitotóxica del GD sugiere que la desaferentación de un circuito neuronal es un estímulo que induce en algunas neuronas la reentrada al ciclo celular. En este sentido, aunque la mayoría de las células positivas a estos marcadores exhibieron un fenotipo neuronal, es necesario aclarar su estirpe celular y averiguar si aquellas células que expresan los marcadores de ciclo celular igualmente presentan proteínas alteradas características de la EA. Cabe mencionar que la sobrerregulación de proteínas relacionadas con el ciclo celular observada en este trabajo, no es directamente conclusiva de reactivación del ciclo celular, este punto requeriría de un análisis más detallado de las vías activadas por estos reguladores. De hecho ha sido

sugerido que varias de las moléculas relacionadas con la progresión en el ciclo de división celular pueden desempeñar algunas otras funciones todavía no bien descritas.

Nuestro modelo se sustenta en la pérdida de conectividad dentro del circuito CE-GD, como una de las posibles causas que llevan a la reactivación del ciclo celular y la consecuente relación con el desarrollo de una patología tipo Alzheimer. Si bien, de manera general los datos de este modelo *in vivo* correlacionan con observaciones anteriores obtenidas del análisis post-mortem de cerebros de pacientes con EA y modelos *in vitro*, es indispensable realizar análisis más detallados que contribuyan a la comprensión de parte de la cascada patogénica de la EA.

## **IX. CONCLUSIONES GENERALES**

- La inyección de AK además de generar muerte neuronal en el GD, de manera tardía conduce a un desarreglo celular de las láminas de la CE acompañado de la aparición de núcleos picnóticos.
- La lesión del GD indujo la expresión de diversos marcadores de ciclo celular (ciclina D, cdk6, cdk2, PCNA y ciclina B) y de proteínas asociadas a la EA (tau fosforilada y PPA) en regiones interconectadas del circuito CE-GD.
- La mayor expresión de tau fosforilada y PPA en la zona interconectada con el sitio del daño primario, la CE, es precedida por la aparición de proteínas implicadas en el ciclo celular.
- La fosforilación de tau observada en este trabajo se asocia con un incremento en la formación de p25, conjuntamente a una mayor inmunoreactividad para la cinasa cdk5.
- De manera general, la pérdida de conectividad entre dos regiones conectadas sinápticamente parece ser capaz de inducir la expresión de reguladores del ciclo celular y aumentar los niveles de tau fosforilada y PPA.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- al-Ubaldi, M. R., Hollifield, J. G., Overbeek, P. A., Baehr, W. Photoreceptor degeneration induced by the expression of 40 simian virus large tumor antigen in the retina of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1992, 89: 1194–98.
- Amaral, D. G. y Kurz, J. An analysis of the origins of the cholinergic and non cholinergic septal projection to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol*, 1985. 240: 37-59.
- Amaral, D. G. y Witter, M. P. Hippocampal Formation. The rat nervous system. Academic Press. U.S.A. 1995.
- Arendt, Th. Alzheimer's disease as a loss of differentiation control in a subset of neurons that retain immature features in the adult brain. *Neurobiol Aging* 2000, 21:783-796.
- Arias C. Enfermedad de Alzheimer. En *Enfermedades neurodegenerativas , Mecanismos celulares y moleculares*. FCE, 1999. México D. F. pp 133-66.
- Baumann K, Mandelkew EM, Biernat J, Piwnica-Worms H y Mandelkew E. Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases Cdk2 and Cdk5. *FEBS Lett*, 1993, 336: 417-24.
- Becker, E. B. E. y Bonni, A. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Prog Neurobiol* 2004, 72: 1-25.
- Binder LI, Frankfurter A, y Rebhun LI. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol*, 1985. 101:1371-78.
- Boss, B. D., Peterson, G. M. y Cowan, W. M. On the number of neurons in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res*, 1985. 338: 144-150.
- Busser J, Geldmacher DS y Herrup K.- Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal death in Alzheimer's disease brain. *J. Neurosci* 1998,18: 2801-07.
- Braak H, y Braak E. Frequency of stages in Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging*, 1997. 18: 351-57.
- Clairborne B. J., Amaral D.G. y Cowan, W. M. A light and electron microscopic analysis of the mossy fiber of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 1986. 246: 435-458.
- Cleveland, DW., Hwo, SY., Kirschner MW. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol*, 1977.116:227-47.

- Cruz JC, Tseng HC, Goldman Ja, Tsai LH. Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron*, 2003. 40: 471-83.
- Dekosky ST, Scheff SW, Styren SD. Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration*, 1996. 5: 417-21.
- Drewes, G., Linchtenberg-Kraag, B., Mandelkow E.M., Biernat, J., Doree, M., Mandelkow, E. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into Alzheimer-like state. *EMBO J*, 1992. 11:2131-38.
- Feddersen, R.M., Ehlenfeldt, R., Yunis, W.S., Clark, H.B., Orr, H.T. Disrupted cerebellar cortical development and progressive degeneration of Purkinje cells in SV40 T antigen transgenic mice. *Neuron* 1992, 9: 955–66.
- Germroth, P. Schwerdtfeger, W. K. Buhl, E. H. Morphology of identified entorhinal neurons projecting to the hippocampus: a light microscopical study combined retrograde tracing and intracellular injection. *Neurosci*, 1989. 30: 683-691.
- Gómez-Isla T, Price JL, Mckeel DW, Morris JC, Grodwdon JH, Hyman BT. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 1996. 16: 4491-500.
- Grana, X. y Reddy, E. P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclins dependent kinases (CDKs) growth supresor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs). *Oncogene*, 1995; 11: 211-19.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y-C, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule associated protein T (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83:4913- 17.
- Halasy, K. y Somogyi, P. Subdivisions in the multiple GABAergic innervation of granule cells in the dentate gyrus in the rat hippocampus. *Euro J Neurosci*, 1993. 5: 411-429.
- Heintz, N. Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem. Sci.* 1993, 18: 157–59.
- Husseman, J.W., Nochlin, D., Vincent, I. Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging*. 2000, 21: 815–28.

- Hyman, BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease : cell specific pathology isolated the hippocampal formation. *Science*, 1984. 11168-70.
- Ino H, Chiba T. Cyclin dependent kinase 4 and Cyclin D1 are required for excitotoxin-induced neuronal cell death *in vivo*. *J neurosci*, 2001. 21:6088-6094.
- Kerokoski P, Suuronen T, Salminen A, Soininen H, Pirttilä T. Both N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors mediate glutamate-induced cleavage of the cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activator p35 in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, 2004. 368:181-5.
- King, K.L., Cidlowski, J.A., 1995. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J. Cell Biochem* 1995, 58: 175–80.
- Köhler, C. Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain : The medial entorhinal area. *J Compar Neurol*, 1986. 246: 149-169.
- Ksiezak-Reding H., Liu W.K., Yen Sh. Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res*, 1992. 597(2):209-19.
- Laurberg, S. y Sorensen, K. E. Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fasciae dentatae and subfield CA3). *Brain Res*, 1981. 212: 287-300.
- Ledesma, M.D., Correas, I., Avila J., y Díaz-Nido, J. Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. *FEBS Lett*, 1992. 308: 218-24.
- Lee, E.Y., Chang, C.Y., Hu, N., Wang, Y.C., Lai, C.C., Herrup, K., Lee, W.H., Bradley, A. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature*, 1992. 359: 288–94.
- Lee MS, Know YT, Li M, Peng J, Tsai LH. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 calpain. *Nature*, 2000. 405: 360-64.
- Lichtenthaler SF, Wang R, Grimm H, Uljon SN, Masters CL, Beyreuther K. Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease gamma-secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999. 39:494-505.
- Lingenhohl, K. y Finch, D. Morphological characterization of entorhinal neurons in vivo: soma-dendritic structure and axonal domains. *Exp Brain Res*, 1991. 84: 57-74.

- Mandelkow, E.M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J.R., Mandelkow, E. Glicogen synthase kinase 3 and the Alzheimer like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett*, 1992.314:315-321.
- Mann DM, Esiri MM. The site of the earliest lesions of Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 1988. 318: 789-90.
- Mikkonen M, Soininen H, Tapiola T, Alafuzoff I, Miettinen R. Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease: changes in highly polysialylated NCAM immunoreactivity in the hippocampal formation. *Eur J Neurosci* 1999; 11:1754-64.
- Morabito M, Sheng M, Tsai LH. Cyclin dependent kinase 5 phosphorylates the N-terminal domain of the postsynaptic density protein PSD-95 in neurons. *J Neurosci* 2004, 24: 2590-97.
- Mudher AK, Yee B, Smith AD, Perry VH. Deafferentation of hippocampus results in the induction of AT8 positive granules in the rat. *Neurosci Lett*, 2001. 301: 5-8.
- Nagy, Z., Esiri, M.M., Cato, A.M., Smith, A.D. Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1997b, 94: 6-15.
- Nagy Zs. Cell cycle regulatory failure in neurons: cause and consequences. *Neurobiol. Aging* 2000, 21: 761-69.
- Nagy Zs. The last neuronal division: a unifying hypothesis for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, 2005. 9: 531-41.
- Okano, H.J., Pfaff, D.W., Gibbs, R.B. RB and Cdc2 expression in brain: correlations with 3H-thymidine incorporation and neurogenesis. *J. Neurosci* 1993,13: 2930-38.
- Oshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Pant HC, Martin LJ, Kulkarni AB. Targeted disruption of the cyclin dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 11173-78.
- Park D, Obeidat A, Giovanni A, Greene L. Cell cycle regulators in neuronal death evoked by excitotoxic stress: implications for neurodegeneration and its treatment. *Neurobiol Aging*, 2000. 21: 771-781.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion de p35 a p25 desregulates Cdk5 and promotes neurodegeneration. *Nature* 1999, 402: 615-22.

- Paxinos, G. Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney; Academic Press. 1986.
- Pevny, L., Rao, M.S. The stem-cell menagerie. Trends Neurosci 2003, 26: 351–59.
- Ribak, C. E. y Seress, L. Five types of basket cells in the hippocampal dentate gyrus: a combined golgi and electron microscopic study. J Neurocytol, 1983. 12: 576-597.
- Ribak, C. E. Seress, L. Y Amaral, D. G. The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. J Neurocytol, 1985. 14: 835-857.
- Seress, L. y Ribak, C. E. Direct commissural connections to the basket cells of the hippocampal dentate gyrus cells: anatomical evidence for feed- forward inhibition. J Neurocytol, 1984. 13: 215- 225.
- Sherr, C. J. Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1 phase progression. Genes Dev, 1999; 13: 1501-12.
- Shoham S, Ebstein RP. The distribution of  $\beta$ -amiloid precursor protein in rat cortex after systemic kainite-induced seizures. Exp Neurol, 1997. 147: 361-76.
- Squire LR y Zola-Morgan S. The medial lobe memory system. Science, 1981. 253: 1380-86.
- Susuki T, Oishi M, Marshak D, Czernik A, Nairn A y Greengard P.- Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein. The EMBO J 1994,13: 1114-22.
- Trojanoski J, Schmidt M, Shin R-W, Bramblett G, Rao D, Lee V-P. PHF(A68): from pathological marker to potential mediator of neuronal dysfunction and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. Clin Neurosci, 1993. 1: 184-9.
- Tsai LH, Delalle I, Caviness VS Jr, Chae, T., Harlow E. p35 is a neuronal specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. Nature 1994, 371:419-23.
- Van Hoesen GW, Hyman BT y Damasio AR. Entorhinal cortex pathology in Alzheimer's disease. Hippocampus, 1991. 1:1-8.
- Vincent I, Jicha G, Rosado M y Dickson D.- Aberrant expression of mitotic Cdc2/Cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. J. Neurosci 1997, 17: 3588-98.

- Wartiovaara, K., Barnabe-Heider, F., Miller, F.D., Kaplan, D.R. N-myc promotes survival and induces S-phase entry of postmitotic sympathetic neurons. *J. Neurosci*, 2002, 22: 815–24.
- West, M. J., Coleman, P. D. y Flood, D. G. Estimating the number of granule cells in the dentate gyrus with the dissector. *Brain research*, 1988. 845: 92-96.
- Yang Y, Geldmacher DS, Herrup K. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer´s disease. *J Neurosci*, 2001. 21: 26661-68.
- Yoshikawa, K. Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons. *Neurosci. Res* 2000, 37: 1–14.