



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**Plasticidad reactiva mediada por la expresión de
factores tróficos, glicoconjugados sialilados
anormales y la correlación entre lesiones
histopatológicas y la evaluación neuropsicológica en
la enfermedad de Alzheimer**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Psic. KARLA CARMINA ROJAS SAAVEDRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA

MÉXICO, D.F.

MAYO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

MIEMBROS DEL JURADO:

PRESIDENTE: Dra. Susana Helena Kofman Epstein

VOCAL: Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo

SECRETARIO: Dr. Miguel Angel Jorge Guevara Fonseca

SUPLENTE: Dra. Olga Yaneth Rodríguez Agudelo

SUPLENTE: Dr. Luis Felipe Jiménez García

El trabajo de investigación de esta tesis se realizó en el Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía M.V.S, bajo la dirección del Dr. Miguel Angel Jorge Guevara Fonseca.

Mis estudios de Maestría fueron posibles gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca No. 203415

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ser todo en mi vida, por su dedicación, formación, amor, pilar, motivación, comprensión y entrega. Siempre los llevo conmigo.

A mis hermanos Héctor, Verónica y Abraham por su gran apoyo y por estar siempre a mi lado.

A Sofía por ser una gran luz en éste camino. Te adoro.

Al Dr. Jorge Guevara por ser un gran tutor y sobre todo un gran amigo.

Al Dr. Edgar Zenteno por su guía y apoyo.

Al Dr. Yves Joannette por la colaboración con el proyecto. Gracias por la oportunidad.

INDICE GENERAL

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Abreviaturas.....	3
Capítulo 1: Introducción.....	4
1.1 Enfermedad de Alzheimer.....	4
1.2 Histopatología de la Enfermedad de Alzheimer.....	4
1.3 Evaluación Neuropsicológica.....	6
1.4 Factores tróficos.....	10
1.5 Proteínas de choque térmico (HSPs).....	13
1.6 Glicosilación.....	14
Capítulo 2: Antecedentes.....	16
Capítulo 3: Objetivo General, Objetivos Particulares, Hipótesis.....	19
Capítulo 4: Metodología.....	21
4.1 Parte I. Análisis de la evaluación neuropsicológica de pacientes y obtención de tejido <i>post mortem</i> de la población I.....	21
4.1.1 Consentimiento informado.....	21
4.1.2 Evaluación Neuropsicológica.....	21
4.1.3 Experimentos con tejido cerebral humano.....	23
4.1.4 Obtención y preparación del tejido cerebral humano.....	23
4.1.5 Inmunohistoquímica.....	26
4.1.6 Microscopia Confocal.....	27
4.1.7 Análisis de imágenes.....	27
4.1.8 Estadística.....	28
4.2 Parte II. Análisis a partir de tejido <i>post mortem</i> de la población II.....	28
4.2.1 Manipulación del tejido cerebral humano.....	29
4.2.2 Inmunohistoquímica.....	30

4.2.3 Evaluación de la glicosilación.....	31
4.2.4 Microscopía de Fluorescencia.....	32
Capítulo 5: Resultados.....	33
5.1 Parte I: Resultados del análisis de la evaluación neuropsicológica de pacientes de la población I: Evaluación PENO.....	33
5.1.1 Evaluación Neuropsicológica.....	33
5.1.2 Lesiones Histopatológicas.....	35
5.1.3 Correlación entre la evaluación neuropsicológica y las lesiones histopatológicas.....	42
5.2 Parte II: Resultados obtenidos a partir del análisis de tejido <i>post mortem</i> de la población II.....	48
5.2.1 Expresión de factores tróficos.....	48
5.2.2 Expresión de HSPs.....	49
5.2.3 Glicosilación de proteínas.....	55
Capítulo 6: Discusión.....	61
Capítulo 7: Conclusiones.....	69
Capítulo 8: Perspectivas.....	70
Bibliografía.....	71
Anexos: Técnicas inmunohistoquímicas y soluciones.....	80
ANEXO I: Solución Salina de Fosfatos (PBS), pH 7.4.....	80
ANEXO II: Silano, adherente para tejidos (SIGMA)	80
ANEXO III: Tinción de Hematoxilina – Eosina (HyE).....	81
ANEXO IV: Técnica de Bielschowsky	82

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regiones anatómicas.....	25
Figura 2. Depósitos de amiloide- β	37
Figura 3. Tau hiperfosforilada.....	37
Figura 4. Placa neurítica.....	37
Figura 5. Marañas neurofibrilares.....	37
Figura 6. Neuritas distróficas.....	37
Figura 7. Estructuras meganeuríticas.....	37
Figura 8. Expresión de IGF-IR.....	50
Figura 9. Expresión de IGF-IIR.....	50
Figura 10. Expresión de NCAM-PSA.....	51
Figura 11. Expresión de NCAM-PSA asociada a estructuras meganeuríticas.....	51
Figura 12. Expresión de GAP-43 en asociación a IGR-IIR.....	52
Figura 13. Expresión de NCAM-PSA en asociación a IGF-IIR.....	52
Figura 14. Expresión de HSP27.....	53
Figura 15. Expresión de HSP60.....	53
Figura 16. Expresión de HSP70.....	54
Figura 17. Expresión de HSP90.....	54
Figura 18. Expresión de IGF-IIR en asociación a HSP60.....	56
Figura 19. Expresión de NCAM-PSA en asociación a HSP60.....	56
Figura 20. Expresión de GAP-43 en asociación a HSP90.....	56
Figura 21. Expresión de lectinas en asociación a factores tróficos.....	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones cognitivas y pruebas neuropsicológicas del PENO.....	22
Tabla 2. Información de pacientes con EA evaluados neuropsicológicamente.....	24
Tabla 3. Regiones anatómicas.....	25
Tabla 4. Información de pacientes del grupo II.....	30
Tabla 5. Resultados de la evaluación neuropsicológica para cada paciente.....	34
Tabla 6. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de EM..	44
Tabla 7. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de MNFs.....	44
Tabla 8. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de NDs.....	45
Tabla 9. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de GAP543.....	45
Tabla 10. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de placas positivas a A β	46
Tabla 11. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de placas positivas a A β +Tau.....	46
Tabla 12. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de placas positivas a Tau.....	47
Tabla 13. Expresión de HSPs y su asociación a células gliales y vasos sanguíneos.....	55
Tabla 14. Expresión y asociación de las lectinas y marcadores.....	60

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Deterioro cognitivo evaluado por funciones.....	35
Gráfica 2. Densidad de placas positivas a A β en ambos hemisferios.....	39
Gráfica 3. Cuantificación de la densidad de placas de A β +Tau en ambos hemisferios....	39
Gráfica 4. Cuantificación de la densidad de placas de Tau en ambos hemisferios.....	40
Gráfica 5. Cuantificación de marañas neurofibrilares en ambos hemisferios.....	40
Gráfica 6. Cuantificación de la densidad de neuritas distróficas en ambos hemisferios...	41
Gráfica 7. Cuantificación de la densidad de GAP-43 en ambos hemisferios.....	41
Gráfica 8. Cuantificación de la densidad de estructuras meganeuríticas en ambos hemisferios.....	42

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) se identifica clínicamente por un deterioro de las funciones cerebrales superiores (FCS). Histopatológicamente la EA se caracteriza por la presencia de Placas Neuríticas, Maraños Neurofibrilares y Neuritas Distróficas. Nuestro grupo demostró lesiones con alteraciones sinápticas, denominadas "Estructuras Meganeuríticas" (EM), que se asocian a una desconexión sináptica y a un cambio plástico. Existen evidencias de alteraciones en la glicosilación de proteínas, de IGF-II (Insulin-Growth-Factor-II), GAP-43 (Growth-associated-protein-43KD) y NCAM-PSA (Neuronal-Cell-Adhesion-Molecule-PolySialilated) en las EM. Así como un evento neuroprotector por HSPs (Heat-shock-protein). Nuestro objetivo fue demostrar la correlación entre la plasticidad reactiva y la evaluación neuropsicológica óptima, así como la existencia de un evento neuroprotector y de glicosilación anormal en la EA. Se realizaron técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos contra los diferentes marcadores y microscopía confocal. Se realizó con el sistema IBAS la cuantimetría de las estructuras. La evaluación neuropsicológica se valoró con la batería de pruebas PENO (Procedimiento de Evaluación Neuropsicológica Óptima). La correlación entre los resultados de la evaluación cognitiva y las lesiones histopatológicas se realizó con la prueba estadística de Spearman. El PENO evaluó de manera específica a los pacientes con EA en donde la alteración más evidente es la memoria y el lenguaje. Los casos de EA con alteraciones patológicas (vascular y cuerpos de Lewy) salen del patrón cognitivo típico de EA. El análisis estadístico nos muestra una correlación inversa entre la evaluación neuropsicológica y la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos que utilizamos. Las HSPs y las lectinas se expresan en asociación a los diferentes marcadores inmunohistoquímicos sólo en los casos con EA. El proceso de degeneración y plasticidad es específico en la EA y correlaciona con las FCS. El PENO se puede utilizar como una herramienta neuropsicológica específica y óptima para la evaluación de la EA.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is clinically characterized by a decline of brain superior functions (FCS). Histopathological hallmarks are the neuritic plaques, neurofibrillary tangles and the dystrophic neurites. We have previously demonstrated synaptic alterations in AD brains. Synaptic abnormally enlarged structures found were called "Meganeurite Structures" (MS). MS are linked to a synaptic failure and to plasticity changes. The MS are associated to IGF-II (Insulin-Growth-Factor-II), GAP-43 (Growth-associated-protein-43kDa) and NCAM-PSA (Neuronal-Cell-Adhesion-Molecule-PolySialilated). All of them are neurotrophic factors. We also have been shown evidence of an abnormal glycosylation of proteins related to the MS. The aim of this work was demonstrate a correlation between the reactive plasticity observed in AD and the optimal neuropsychological evaluation. We also aimed demonstrate the neuroprotection and the abnormal glycosylation of proteins associated to AD. We performed a neuropsychological evaluation of AD patients with the PENO test battery (Neuropsychologic Evaluation Optimum Procedure). Analysis of correlation between the cognitive results and the histopathological lesions was compared using the Spearman test. We also did several combinations of immunohistochemistry techniques with specific antibodies, which were visualized by fluorescence and confocal microscopy. IBAS system was used for quantimetry analysis of the pathological structures. PENO test might be specific for AD detecting mainly the memory and language alterations. The AD patients with some other pathologic alterations (Lewy bodies and vascular component) have not had the typical cognitive pattern. Analysis of correlation showed an inverse correlation between the neuropsychological evaluation and the expression of the immunohistochemistry markers. Heat shock proteins and lectins were associated to the different markers only in AD. Reactive plasticity and degeneration are specific for AD. This observation correlates with the cognitive decline of SCF. PENO test battery is a good neuropsychological tool for AD evaluation.

ABREVIATURAS

AcM	Anticuerpo Monoclonal
ALL	Lectina <i>Amaranthus Leucocarpus</i>
APPβ	Proteína Precursora de amiloide- β
DA	Demencia tipo Alzheimer
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EM	Estructuras Meganeuríticas
FCS	Funciones Cerebrales Superiores
FITC	Isotiocinato de Fluoresceína (del inglés: Fluorescein Isothiocyanate)
GAP-43	Proteína de 43 kDa asociada al crecimiento (del Inglés: Growth Association Protein, 43 kDa)
GFAP	Proteína glial ácida fibrilar (del inglés: Glial Fibrillary Acidic Protein)
HSPs	Proteínas de choque térmico (del inglés: Heat Shock Proteins)
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (del Inglés: Insulin Growth Factor I)
IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (del Inglés: Insulin Growth Factor II)
MACs	Moléculas de Adhesión Celular
MNFs	Marañas Neurofibrilares
MMSE	Examen del estado mental mínimo de Folstein (del Inglés: Mini Mental Study of Folstein)
MRL	Lectina <i>Macrobrachium Rosenbergii</i>
NCAM	Molécula de adhesión celular neuronal (del Inglés: Neuronal Cell Adhesion Molecule)
NDs	Neuritis Destróficas
PBS	Solución salina de fosfatos (del inglés: Phosphate Buffered Saline)
PENO	Protocolo de evaluación neuropsicológica óptima (del Francés: Protocole d'Évaluation Neuropsychologique Optimale)
PET	Tomografía por emisión de positrones (del inglés: Positron Emission Tomography)
PNs	Placas Neuríticas
PSA	Ácido Polisiálico (del inglés: PolySialic Acid)
RMf	Resonancia Magnética Funcional
SNC	Sistema Nervioso Central
SPSS	Programa estadístico informático para las Ciencias Sociales (del Inglés: Statistical Package for the Social Sciences)
WGA	Lectina <i>Triticum vulgaris</i>

Capítulo I

INTRODUCCION

1.1 Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa de carácter multifactorial asociado a factores de riesgo. Destacan el envejecimiento, traumas cráneo-encefálicos y genéticos¹. Es el tipo más común de demencia. Clínicamente se caracteriza por un deterioro cognitivo. Afecta a las funciones cerebrales superiores (FCS) de manera progresiva. Histopatológicamente se caracteriza por la presencia de placas neuríticas (PNs), marañas neurofibrilares (MNFs) y neuritas distróficas (NDs). Existen dos tipos de EA, uno es de tipo familiar y un tipo esporádico. El familiar afecta del 5-10% de la población con EA. Los genes que se encuentran mutados en ésta variante son el precursor del amiloide- β (APP β), y las presenilinas 1 y 2. El esporádico, se considera multifactorial. Afecta del 90-95% de la población con EA. En ésta variante no se conoce la causa de la enfermedad.

1.2 Histopatología de la EA

Las PNs, MNFs y NDs se presentan en áreas específicas del cerebro. Las PNs están constituidas por depósitos extracelulares de fibrillas insolubles de la proteína amiloide- β (producto de la proteólisis anormal de su precursor APP β). Las marañas neurofibrilares (MNFs), son agregados intracelulares constituidos por filamentos helicoidales apareados de la proteína tau. Las NDs son las estructuras degeneradas que provienen de los procesos axonales y dendríticos. Se localizan

en el espacio extracelular². Pueden formar parte de las PNs. Representan diversos grados de degeneración fibrilar, lo que culmina con la muerte celular.

El amiloide- β ($A\beta$) que constituye las PNs consta de 39-42 aminoácidos. Es el producto final de la proteólisis del extremo carboxilo terminal de PPA β . Se localiza en el cromosoma 21. Se sugiere que el péptido por si mismo no es causante de la patología de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, su proceso de agregación es necesario para la formación de las PNs³. Existe una clasificación con tres tipos de poblaciones de placas con contenido de $A\beta$ ⁴. 1) El depósito de $A\beta$ sin componente neurítico. 2) Un agregado neurítico (en forma de placa) sin $A\beta$. 3) La PN típica (depósito de $A\beta$ y componente neurítico), característica de la enfermedad. Aunado a las lesiones en forma de placa, existen las MNFs. Las MNFs se constituyen principalmente por la proteína tau. Esta proteína se encuentra polimerizada en forma de filamentos insolubles (filamentos helicoidales apareados). La proteína tau se asocia a microtúbulos y presenta 6 isoformas con longitudes variadas. Tres isoformas son fetales y las otras tres se encuentran en el adulto, la diferencia entre ellas radica en el número de dominios repetidos que contienen. El tercer tipo de lesión característico de ésta enfermedad son las NDs. Su presencia evidencia un proceso de desconexión cortico-cortical, consecuencia de la muerte neuronal. Debido a esto, los pacientes presentan atrofia cortical⁵. Existe controversia ante las explicaciones del proceso de desconexión, entre una pérdida sináptica y neuronal. Existen datos que apoyan la disminución de la densidad sináptica, hasta de 40% en la corteza cerebral de pacientes con EA⁶. Aunque existen pocas evidencias que afirmen lo contrario, nuestro grupo de

trabajo demostró que no hay diferencia significativa de la densidad sináptica en corteza cerebral entre los pacientes con EA y controles. El anticuerpo que se utilizó para cuantificar la densidad sináptica, fue la sinaptofisina humana, glicoproteína de 38 kDa. Se encuentra en la membrana de todas las vesículas sinápticas electrolúcidas de entre 50 y 90 nm. Es una proteína integral de membrana⁷. Se considera el mejor marcador para cuantificar la pérdida sináptica⁸. Guevara y cols. (1998)⁹, demuestran por primera vez, que existen lesiones que involucran alteraciones sinápticas, poblaciones de neuritas que tenían un tamaño más grande a la media encontrada comúnmente (hasta de 30 μm^2 de diámetro). A este grupo de NDs se les nombró: “Estructuras Meganeuríticas” (EM). Se consideran un cambio patológico del envejecimiento, lo cual podría indicar que los mecanismos de regulación de la sinaptogénesis están alterados.

1.3 Evaluación Neuropsicológica

La deficiencia cognoscitiva de los pacientes se debe a una alteración de las funciones que dependen de los circuitos cerebrales asociativos cortico-corticales. Recordemos que la EA se caracteriza clínicamente por un deterioro cognitivo progresivo en éstas funciones, denominadas: Funciones Cerebrales Superiores (FCS). Incluyen principalmente memoria, lenguaje, viso-constructivo, atención espacial, praxias y gnosias, las cuales se pueden evaluar por medio de pruebas neuropsicológicas. Existen herramientas neuropsicológicas que nos ayudan a acercarnos a un diagnóstico de demencia tipo Alzheimer (DA). Una de las más utilizada es la prueba neuropsicológica del Examen Mínimo del Estado Mental de Folstein (MMSE)¹⁰. Aunque se ha observado que sus puntuaciones dependen de

la interacción entre el grado de demencia y la afectación del lenguaje, por lo cual no es recomendado para perfiles neuropsicológicos de pacientes con demencia.

Se propone que el PENO (Protocolo de Evaluación Neuropsicológica Óptima)¹¹ sea un estudio más específico para evaluar los diferentes tipos de demencia, en especial la DA.

Los criterios del PENO son:

1. Evaluar, lo más completamente posible, cada función cognitiva.
2. Examinar los componentes y subcomponentes más importantes de cada función cognitiva.
3. Documentar las habilidades cognitivas tal como se entienden en la neuropsicología cognitiva y no como coeficiente intelectual (CI).
4. Incluir pruebas sensibles a los efectos más sutiles de la demencia, capaces de distinguir entre las manifestaciones del envejecimiento normal y las de las fases tempranas de demencia.
5. Incluir pruebas que puedan ser interpretadas en referencia a un modelo de la función cognitiva normal.
6. Ser aplicable en un tiempo razonable, no mayor de 3 horas.

Con estos criterios el PENO agrupa 20 pruebas que examinan: memoria, lenguaje, praxias, gnosias y funciones ejecutivas. La memoria se define como la capacidad de retener información del pasado, con base en la experiencia vivida. Se considera que en los pacientes con EA, el deterioro en la memoria es uno de los primeros síntomas¹². Se establece que la EA es una demencia amnésica, ya

que el defecto mnésico (dificultades para aprender e incorporar materiales nuevos), temprano e intenso, constituye el núcleo central de la enfermedad. Se altera la capacidad de evocación libre, al mismo tiempo que aumentan los falsos reconocimientos¹³. La afectación en el lenguaje suele aparecer cuando es evidente el trastorno de memoria. Uno de los datos más típicos de afectación inicial del lenguaje, es la incapacidad para recordar los nombres de objetos familiares o nombres de cosas o personas (disnomia). La evocación esquemática de los trastornos del lenguaje en EA inicia por una afasia nominal, que sigue por una sensorial (dificultades de comprensión de órdenes o textos complejos). En las fases intermedias y finales de la enfermedad, se pueden observar rasgos de ecolalia (repetición de las últimas palabras del evaluador), palilalia (repetición progresivamente más rápida de una sílaba, palabra o frase corta) o aposiopesis (se detiene a media frase). Al final, puede existir mutismo total¹⁴. La atención espacial y orientación en tiempo, espacio y persona es el conocimiento que tiene el individuo de su entorno. Es un concepto heterogéneo que relaciona varias capacidades cognitivas, como la atención, vigilancia, memoria reciente, conocimiento autobiográfico y proyección en el futuro. La persona que padece Alzheimer empieza a presentar desorientación en el tiempo, y más tarde en el espacio, sobre todo en lugares no habituales. Las praxias se relacionan con los gestos y la construcción, ejecución del movimiento y el comportamiento. La afectación de las praxias se caracteriza por la alteración del control voluntario de los movimientos intencionales. La alteración de ésta capacidad se denomina apraxia. En la EA se observan diferentes grados de apraxia, según el momento evolutivo de la enfermedad. En la fase inicial se alteran las capacidades

constructivas, lo que supone una simplificación de las tareas motoras complejas. En etapas más avanzadas aparecen las apraxias gestuales, donde la dificultad está al imitar gestos simbólicos, perder la mímica de situaciones cotidianas, o manipular objetos comunes¹⁵. La función cognitiva que permite percibir y reconocer la forma y las características físicas de las personas y objetos de nuestro entorno se denomina función gnósica. La disfunción se denomina agnosia y consiste en la alteración del reconocimiento del mundo que nos rodea, ya sea por entrada visual, auditiva, táctil, olfativa o del reconocimiento del esquema corporal, sin que éstos sentidos estén alterados por otra causa. Al inicio puede aparecer una dificultad en el reconocimiento de estímulos visuales complejos y en su organización espacial. La progresión de la enfermedad llevará al paciente a perder la capacidad para reconocer las caras de las personas conocidas¹⁶, y en los grados más avanzados no se reconocen a ellos mismos.

Algunas teorías del envejecimiento proponen que el deterioro cognitivo se puede dar por:

1. Disminución en la velocidad del procesamiento, entendida como la medida de la rapidez con que los sujetos pueden manipular la información^{17, 18}, se observa principalmente en la memoria¹⁹.
2. Teoría de la memoria de trabajo. Se presenta una disminución en éste tipo de memoria, la cual se define como la cantidad de recursos disponibles en un momento determinado para procesar información sobre la marcha¹⁷.
3. Teoría de la inhibición. Se centran sólo en la información relevante y no en la irrelevante²⁰.

4. Teoría de las funciones sensoriales, en donde existe una disminución del funcionamiento sensorial: visión, atención, audición, memoria, velocidad del procesamiento, entre otras²¹.

El deterioro cognitivo se puede explicar debido a que en los pacientes con EA existe una alteración a nivel sináptico. Ante éste defecto en la plasticidad sináptica y la muerte neuronal, el SNC responde con un proceso denominado: plasticidad cerebral. Sin embargo, la plasticidad cerebral en EA no es como comúnmente se ha descrito. Se le considera una plasticidad reactiva (como respuesta a la muerte neuronal y a la desconexión sináptica). La plasticidad reactiva es un mecanismo de defensa y se manifiesta por la expresión particular de factores de crecimiento y adhesión neuronal, que se localizan de manera específica en las EM. Estos factores se reportan en condiciones normales en el desarrollo del SNC, durante el estado fetal. Se reconocen con anticuerpos específicos desarrollados contra éstas proteínas.

1.4 Factores tróficos

Existe poca literatura que apoya la hipótesis que los factores tróficos se relacionen con el deterioro cognitivo que presentan los pacientes con EA. Algunos autores dan evidencia de que la circulación de IGF-I (Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I) en ratones, actúa como señal neuroactiva, en la protección de algunas lesiones y en la función cerebral normal. Se sugiere que participa también en la actividad sináptica, mediante sus efectos tróficos asociados a respuestas glutamatérgicas. La disminución del glutamato tiene una asociación con el deterioro cognitivo por pérdida sináptica²². La expresión de factores tróficos como

GAP-43 (Proteína de 43 kDa asociada al crecimiento), e IGF-II (Factor de crecimiento similar a la insulina tipo II), sugieren un proceso de regeneración. Se expresan en el estado fetal en condiciones normales, y no en la forma adulta en el SNC^{23, 24}. Además, se asocian con la acumulación extracelular de la proteína A β y con la formación de placas neuríticas en el cerebro con EA²⁵. GAP-43 es una proteína específica del tejido nervioso, que se asocia a la plasticidad neuronal. Se expresa altamente en el hipocampo y participa en los procesos de memoria. Se observa que en la corteza frontal de pacientes con EA, los niveles de GAP-43 disminuyen como consecuencia de una degeneración sináptica, mientras que en hipocampo, por el proceso de crecimiento neurítico, GAP-43 está activa²⁶. GAP-43 se expresa en grandes cantidades durante el desarrollo fetal, la regeneración axonal y el crecimiento y remodelaje neuríticos²⁷. En neuronas maduras, puede participar en el remodelaje estructural de las sinapsis que se requieren durante el aprendizaje y la adquisición de memoria²³. La alteración en la expresión neurítica, por las deficiencias en la plasticidad sináptica en EA, sugiere una expresión anormal de GAP-43. Se propone que éste evento puede contribuir al desencadenamiento de la cascada de eventos de la neurodegeneración. Recientemente se hizo la primera descripción de la existencia de inmunorreactividad del receptor de IGF-II en el cerebro de los pacientes con la EA²⁴. IGF-II se expresa en condiciones normales, durante el crecimiento del SNC en estado fetal, a diferencia de IGF-I, que se expresa únicamente en estado adulto. La expresión de IGF-I en condiciones normales actúa en la remodelación sináptica²⁵. Se observó que a mayor expresión de IGFs, mayor es el número de

sus receptores²⁸. Los IGF-I y II tienen un papel importante en el mantenimiento y desarrollo normal de las células de los organismos, incluyendo las del SNC. Sus receptores se localizan en varias regiones neuroanatómicas, especialmente en hipocampo. Se ha propuesto que los IGFs tienen actividad neurotrófica en ésta región y se asocian con la acumulación extracelular del A β . Otro factor que indica un evento de plasticidad es la expresión de Moléculas de Adhesión Celular (MACs). La NCAM (Molécula de Adhesión Celular Neuronal), contribuye a que las neuronas mantengan sus contactos sinápticos. Garantiza una transmisión correcta de las señales entre las células. Se puede unir a largas cadenas de ácido siálico, lo que genera una molécula de alto peso con carga negativa llamada ácido polisiálico (PSA). La polisialilación de NCAM como otras vías de glicosilación de proteínas, ocurre en el compartimiento trans del aparato de Golgi. En humanos, NCAM-PSA, así como IGF-II y GAP-43 se encuentra abundantemente en las etapas del desarrollo embrionario y su concentración decrece en el estado fetal²⁹. NCAM-PSA se observa en la EA, se asocia a la muerte neuronal masiva y en la plasticidad neuronal, aunque su modo de acción no se conoce. Durante el desarrollo del SNC se mostró que NCAM-PSA promueve la plasticidad mediante la interacción célula-célula. Participa en la migración celular y el desarrollo neurítico. En el cerebro adulto de mamíferos, parece tener el papel de reparación continua y de regeneración neuronal³⁰. Ante los eventos que se presentan en la EA (eventos de estrés), las proteínas pueden generar cambios en su estructura tridimensional, lo que causa su desnaturalización. Este evento se puede contrarrestar por diferentes moléculas como las chaperonas³¹.

1.5 Proteínas de choque térmico (HSPs)

Las HSPs (Proteínas de choque térmico) son chaperonas que ayudan al plegamiento de las proteínas hasta que adquieren su conformación nativa³². Así se propone que tengan un evento neuroprotector en los cerebros de pacientes con EA. Las HSPs, son la respuesta inmediata ante eventos de estrés de todas las células de todas las formas de vida. Representan un mecanismo de adaptación celular de defensa frente a agresiones por factores externos o internos al re-naturalizar las proteínas dañadas^{33, 34}. Las situaciones de estrés, tales como el choque térmico, alteraciones en el pH, falta de O₂, metales pesados, alcohol, exposición a diversas sustancias químicas, entre otros, provocan alteraciones en las proteínas e inducen su desnaturalización. Si éste evento no se detiene, las proteínas desnaturalizadas dejarán de funcionar, formarán agregados y favorecerán la muerte celular. Las HSPs protegerán a las proteínas que se sintetizan a partir de ese momento³⁵.

Las HSPs son clasificadas en cuatro grandes familias de acuerdo a su peso molecular: HSP27 (de 15 a 30 kDa), HSP60, HSP70 y HSP90. La HSP27 se localiza en el citosol, participa en la protección al comienzo de la agregación y estabilización de proteínas, en la fosforilación y oligomerización³⁶. La HSP60 (chaperonina) al igual que la HSP10, se localiza en las mitocondrias y su función incluye el plegamiento de proteínas. Previene la agregación de proteínas desnaturalizadas. Se asocia con un heptámero formado por subunidades de Hsp10 (co-chaperonina). La HSP70 participa en el plegamiento de polipéptidos nacientes, transporte interorganelar y plegamiento de proteínas desnaturalizadas y

en la degradación de proteínas mediante la vía lisosomal³⁷. Se encuentra en bacterias, citosol eucariótico y retículo endoplásmico, cloroplastos y mitocondrias. La HSP90 constituye del 1-2% de las proteínas del citosol, aunque también se encuentra en el RE. Se sugiere que puede mediar señales intracelulares como plegamiento de proteínas, degradación y evolución morfológica, y diferentes eventos traduccionales y postraduccionales³⁸. Dentro de los eventos postraduccionales en donde están involucradas las HSPs, está el de glicosilación. Se sabe que la glicosilación también está asociada a proteínas y lesiones características de la EA^{9, 39, 40}.

1.6 Glicosilación

Existen diversos eventos involucrados en la EA, a nivel celular, las evidencias histopatológicas demuestran modificaciones postraduccionales como la fosforilación, sulfatación y acetilación, las cuales han sido las más estudiadas. Aunque existe otro evento involucrado, la glicosilación, con un campo mayor de estudio. La glicosilación es un proceso postraduccional complejo en los eucariontes que modifica las proteínas mediante la adición de carbohidratos. Se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Las reacciones de glicosilación las realizan enzimas glicosiltransferasas a partir de precursores monosacáridos de origen endógeno o exógeno⁴¹. Los glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos) se encuentran presentes en todos los organismos. Realizan actividades biológicas esenciales para el desarrollo, crecimiento, funcionalidad y supervivencia⁴². La expresión de glicoconjugados es específica de cada tipo celular. Una de las características más importante reportada en los

últimos años es que, la secuencia de oligosacáridos, está controlada estrictamente durante el desarrollo y diferenciación celular⁴³.

Las lectinas son proteínas que reconocen específicamente carbohidratos. Tienen la capacidad de aglutinar células y precipitar glicoconjugados⁴⁴. Las lectinas, con su alta especificidad en el reconocimiento de carbohidratos, permiten la identificación de las células microgliales, de la microvasculatura, neuronas y otros tipos celulares en diferentes especies animales⁴⁵. El empleo de la lectina del *Amaranthus leucocarpus* (ALL) (específica para Gal β 1,3GalNAc α 1,0 Ser/Thr y GalNAc α 1,0 Ser/Thr) y la del *Machrobrachium rosenbergii* (MRL) (específica para el ácido 9,8,7-O-acetil siálico o NeuAc₃) se pueden utilizar como marcadores iniciales para la EA⁹. Muchas glicoproteínas que contienen O-glicanos, tienen un papel importante en la modulación de la respuesta inmune, la inflamación y la formación de tumores. Son responsables de la organización tridimensional de muchas glicoproteínas. La habilidad de las lectinas de unirse a estructuras de carbohidratos, depende de esta estructura tridimensional. Espinosa *et al.* (2003)⁴⁰, demostraron secuencias tipo mucina de 90 kDa presentes en las placas neuríticas, reconocidas por ALL (90Azgp). Sugieren que ALL representa una herramienta en el estudio de las estructuras glicosiladas en la EA.

Capítulo 2

ANTECEDENTES

Existe una pérdida sináptica aproximadamente del 40% en el tejido de pacientes con EA en comparación de los controles^{46, 47, 48}. Aunque algunos reportes apoyan lo contrario, se demostró que aparentemente no existe diferencia significativa en la densidad sináptica. Estos datos los obtuvieron por la cuantificación de la inmunorreactividad a la sinaptofisina, entre los casos con EA y controles⁴. Hay datos que apoyan la existencia de estructuras que participan en el crecimiento y modelación sináptica que se asocian a las PNs. Masliah y cols. (1994)⁴⁹, prueban la expresión de SP11 y p65 en asociación a subpoblaciones de neuritas y PNs en hipocampo. Proponen que existe un daño sináptico y axonal para la formación de PNs en EA. Desde 1987, se propone un evento de plasticidad en la EA. Se basan en el mantenimiento de la densidad de espinas dendríticas en fibras colinérgicas comparadas entre EA y controles. Exponen una explicación en la existencia de terminales nerviosas en crecimiento (sprouting)⁵⁰,⁵¹, apoyan la idea de que en el SNC existen respuestas de plasticidad y adaptativas que participan en los eventos de neurodegeneración, específicamente en EA.

La expresión de receptores a factores tróficos y moléculas de adhesión celular, nos permiten evaluar si existe plasticidad en los cerebros con EA. Existen evidencias de que el IGF-II puede bloquear la actividad neurotóxica de los péptidos derivados de la proteína A β en neuronas en cultivo²⁵. Se propone que

éste péptido modula la actividad colinérgica. La expresión de factores tróficos como GAP-43 e IGF-II, sugieren un proceso de regeneración. Ambos son factores tróficos que se expresan en forma exclusiva en el estado fetal y no en la forma adulta en el SNC²³. Por otro lado, la presencia de la cadherina de adhesión celular neural (NCAM) contribuye a que las neuronas mantengan sus contactos sinápticos. Esto garantiza una transmisión correcta de las señales entre las células. La cadherina de adhesión celular neural en su forma polisialilada (NCAM-PSA) se expresa normalmente durante la embriogénesis. Aunque se ha visto que participa en la restauración y reparación de los circuitos nerviosos dañados. Durante el desarrollo del SNC se observa que NCAM-PSA promueve la plasticidad mediante la interacción célula-célula durante la migración celular y el desarrollo neurítico^{52, 29, 53}. Se observa que la PPA β es una proteína transmembranal glicosilada⁵⁴ y que las modificaciones postraduccionales afectan su tamaño molecular⁵⁵. También se demostró que la proteína tau se encuentra glicosilada⁵⁶. Nuestro grupo de trabajo ofreció la primera evidencia de que las lectinas ALL y MRL están en asociación a PNs y MNFs⁹.

Ante estos acontecimientos proponemos que puede existir un evento neuroprotector por medio de proteínas como las HSPs. Estas proteínas son un mecanismo de adaptación celular. Actúan como defensa frente a agresiones por factores externos o internos al re-naturalizar las proteínas dañadas^{33, 34, 57}. Las HSPs pueden modular el metabolismo y la toxicidad del A β en *C. elegans*^{58, 59}, así como en cultivo celular. HSP60, HSP70 y HSP90 pueden proteger contra el daño producido por el A β . Éste péptido inhibe la actividad del complejo IV mitocondrial,

y específicamente HSP60 parece revertir el daño causado en la mitocondria⁶⁰. Debido a estos antecedentes se plantea que las HSPs puedan tener un evento de neuroprotección en las enfermedades neurodegenerativas⁶¹. Nosotros proponemos que participan en la EA y que posiblemente se puedan considerar como una opción terapéutica. El estudio de la EA debe ser cada vez más completo. Se debe relacionar la evidencia clínica que nos dan los pacientes y el análisis *post mortem* del SNC. Existen trabajos recientes con estudios de imagen por Resonancia Magnética, en los cuales asocian el volumen de estructuras anatómicas⁶², o de la sustancia blanca⁶³, con el deterioro cognitivo de pacientes con demencia. Proponen que los resultados que se obtienen por medio de estudios de imagen pueden ayudar a predecir un daño cognitivo⁶⁴. Aunque todavía se tiene que dar soporte a todos éstos hallazgos.

Debido a que el diagnóstico definitivo de EA se da *post mortem*, es importante obtener información sobre el deterioro cognitivo que presentan los pacientes, y los cambios patológicos. Existen trabajos que apoyan la idea de que el estudio por separado hace más difícil entender ésta enfermedad⁶⁵. Este punto es uno de los más relevantes en éste estudio, ya que se hace una correlación entre la evaluación cognitiva de los pacientes y los estudios de patología que se realiza al tejido de los mismos. Tomamos en cuenta los factores tróficos (IGFs, GAP-43 y NCAM-PSA) y las lesiones histopatológicas características de la EA (PNs, MNFs, NDs y EM).

Capítulo 3

OBJETIVO GENERAL

Demostrar la correlación entre la plasticidad reactiva y los resultados de la evaluación neuropsicológica, así como la existencia de un evento neuroprotector y de glicosilación anormal de proteínas en EA.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener los resultados de la evaluación neuropsicológica (PENO) en pacientes con DA y controles.
2. Cuantificar inmunohistoquímicamente de lesiones características de la EA: placas, marañas neurofibrilares, neuritas distróficas, estructuras meganeuríticas y GAP-43 en tejido *post mortem* de pacientes con EA y controles.
3. Hacer una correlación entre la cuantificación de las lesiones y la evaluación neuropsicológica de los pacientes.
4. Valorar la existencia de plasticidad reactiva por medio de la expresión de glicoconjugados sialilados (NCAM-PSA) y factores tróficos: IGF-I, IGF-II y GAP-43 en tejido *post mortem* de pacientes con EA y controles.
5. Demostrar la expresión de proteínas de choque térmico en tejido *post mortem* de pacientes con EA y controles, y su asociación con la plasticidad reactiva.

6. Establecer una asociación entre los cambios de glicosilación (expresión de lectinas), en las estructuras meganeuríticas, factores tróficos y glicoconjugados sialilados (plasticidad reactiva), y la expresión neuronal de HSPs (evento neuroprotector).

HIPOTESIS

Existe una correlación entre la evaluación neuropsicológica y la plasticidad reactiva en los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Los factores involucrados en la plasticidad reactiva, se asocian a un evento anormal de glicosilación. Ante el daño causado en el SNC de éstos pacientes, existe un evento neuroprotector.

Capítulo 4

METODOLOGIA

4.1 Parte I: Análisis de la evaluación neuropsicológica de pacientes y obtención de tejido *post mortem* de la población I.

La población I es de pacientes evaluados neuropsicológicamente en el Instituto Universitario de Geriatria de Montreal, Canadá, y de los que se obtuvo su tejido *post mortem* para el análisis histopatológico.

4.1.1 Consentimiento informado.

Los pacientes decidieron libremente participar en éste estudio. Fueron informados de todo el procedimiento a seguir y de los beneficios o riesgos a obtener. Este consentimiento se proporcionó por familiares en caso de que el paciente no fuera capaz de tomar decisiones.

4.1.2 Evaluación Neuropsicológica.

Los datos clínicos que se obtuvieron de los pacientes, se analizaron con un enfoque multidisciplinario. Se abordaron simultáneamente los aspectos bioéticos, deontológicos, clínico-patológicos, epidemiológicos, genético-epidemiológicos, sociográficos, genético-moleculares, tóxico-ambientales, bioquímicos, psicológicos y neurológicos. Cada paciente fue evaluado constantemente en el avance de su enfermedad. Se obtuvo un historial completo con evaluaciones neuro-psicológicas periódicas (cada 6 meses) hasta la muerte del paciente. Este mismo modelo se utilizó para voluntarios sanos (sin diagnóstico de demencia) que al final consintieron la donación de su cerebro para la investigación.

Se confirmó el diagnóstico de DA en 11 pacientes. Se utilizó la batería de pruebas neuropsicológicas PENO (Protocolo de Evaluación Neuropsicológica Óptima). Se propone que ésta batería de pruebas es completa y capaz de identificar de manera óptima una demencia, a diferencia de otras pruebas en donde sólo se descarta o afirma un daño cognitivo. Los 13 casos control (sin demencia) fueron diagnosticados sólo con algunas pruebas de la batería del PENO, suficiente para descartar un daño cognitivo sin la inversión del tiempo necesario en la aplicación de la batería completa. El PENO consta de un conjunto de 20 pruebas que evalúa memoria, lenguaje, praxias, gnosis y funciones ejecutivas. Las pruebas neuropsicológicas incluidas en el PENO, para evaluar éstas FCS son enlistadas en la **tabla 1**.

MEMORIA	LENGUAJE	GNOSIAS	PRAXIAS	FUNCIONES EJECUTIVAS
Recuerdo inmediato de palabras	Comprensión de palabras	Discriminación visual	Pantomimas	Prueba de Stroop
Memoria lógica	Denominación oral	Correspondencia visual-semántica	Gestos arbitrarios	Torre de Londres
Reproducción visual	Fluidez verbal formal y semántica	Orientación de líneas	Dibujo geométrico y figurativo	
Recuerdo facilitado	Habilidades del discurso	Prueba de las campanas	Copia de la figura de Rey	
Memoria a largo plazo	Repetición de palabras y lectura			

Tabla 1. Funciones cognitivas y pruebas neuropsicológicas del PENO. Se muestran las 5 funciones cognitivas evaluadas con el PENO y las pruebas neuropsicológicas utilizadas para evaluar a los pacientes con DA¹¹.

Se cuenta con los puntajes obtenidos para cada prueba, y para cada una de las evaluaciones periódicas de los pacientes. Esto da como resultado un conocimiento completo de la evolución clínica de la EA en cada paciente.

4.1.3 Experimentos con tejido cerebral humano.

Debido a que no existe un modelo animal para el estudio de la EA y al desconocimiento de sus causas, se hace indispensable el poder hacer investigación básica con tejido cerebral humano en condiciones óptimas. De ésta premisa surge el concepto de Banco de Cerebros. El tejido humano que se utilizó en este proyecto provino del Banco de Cerebros del “Projet Image” (Projet Image – Centre Hospitalier Côte-des-Neiges y del Douglas Hospital; Montréal, Canadá).

4.1.4 Obtención y preparación del tejido cerebral humano.

Contamos con 11 casos confirmados con Enfermedad de Alzheimer (**Tabla 2**), y 13 casos control (sin demencia). El tejido se clasifica y diagnostica por dos neuropatólogos en forma individual con los criterios de NINCDS / RCDA^{66, 67}. Mediante el protocolo de disección del mismo banco se obtuvieron 11 regiones cerebrales susceptibles de daño (**Tabla 3 y Figura 1**). La disección se hizo después de la inspección anatomopatológica macroscópica. Se procesaron al mismo tiempo los dos hemisferios. Inmediatamente al muestreo de las 11 regiones (que son fijadas por inmersión en 4% de paraformaldehído amortiguado), el cerebro se cortó por el cuerpo caloso y se separó en dos hemisferios.

Paciente	Variante EA	Género	Año de nacimiento	Edad de inicio de los primeros síntomas (años)	Edad en la primer evaluación (años)	Edad de fallecimiento (años)	Tiempo de la última evaluación a la muerte (años/días)	Duración de la Enfermedad (años)	Años de escolaridad
1	CL	M	1923	62	69	70	0/42	8	10
2	-	F	1923	61	68	70	0/83	9	7
3	-	M	1913	72	78	81	1/83	9	10
4	-	F	1914	70	78	80	1/5	10	10
5	-	F	1927	61	63	68	5/67	7	9
6	-	F	1927	58	63	68	5/17	10	7
7	-	F	1915	66	75	79	4/42	13	6
8	-	F	1913	59	78	81	3/08	22	6
9	Vasc.	M	1918	68	73	76	3/0	8	7
10	CL	M	1915	71	77	78	0/0	7	6
11	CL	M	1911	80	81	81	0/67	1	5

Tabla 2. Información de pacientes con EA evaluados neuropsicológicamente.

Vasc: Daño vascular. **CL:** Cuerpos de Lewy. **(-):** No existe. **F:** Femenino. **M:** Masculino.

Se cortó en secciones coronales a partir del polo frontal y hasta el occipital, en rebanadas de 1 cm y se fijaron por inmersión en una solución de 4% de paraformaldehído en amortiguador salino de fosfatos (PBS) (0.015 M fosfato de sodio, 0.15 M NaCl, 18 μ M CaCl₂, pH 7.4). **(Anexo I)**, a 4°C por al menos 36 hrs. Una vez que se obtuvieron las muestras, fueron deshidratadas mediante inmersión en alcoholes de concentración progresiva 70, 96 y 100%, 3 min en cada uno. Posteriormente en xilol absoluto por 10 min, y a continuación fueron incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 6 μ m, y fueron adheridos a portaobjetos tratados previamente con silano **(Anexo II)**. Antes de ser aplicadas las técnicas correspondientes a los cortes de tejido, se les eliminó la parafina mediante una inmersión en xilol absoluto, por 20 min.

No. de Región	Área de Brodmann	Ubicación anatómica
1	10	Polo Frontal anterior
2	10-46	3 cms. posterior al primer corte, en el mismo plano horizontal y vertical de la región 1
3	6	En el área de Broca junto a la región 44, al pie de la circunvolución frontal ascendente, inmediatamente por debajo de la cisura de Silvio
4	21-22-42	3 cms. posterior a la sección No. 3, identificando la 1ª, 2ª y 3ª circunvoluciones temporales, al centro sobre la segunda circunvolución
5	7	Parasagitalmente a 2 cms. del pliegue posterior de la cisura de Rolando
6	40	Sobre los mismos planos que la sección No.5 pero a 2 cms. de su parte final
7	39	Inmediatamente a la terminación posterior de la cisura de Silvio, sobre la curvatura del pliegue
8	19	Parasagitalmente, a 3 cms. anterior al polo occipital
9	28-34-38	Inmediatamente al polo anterior del Uncus
10	27-28-35-36	Inmediatamente detrás del Uncus
11	23-30-31	Posterior al <i>Splenium</i> , sobre la región posterior del cíngulo

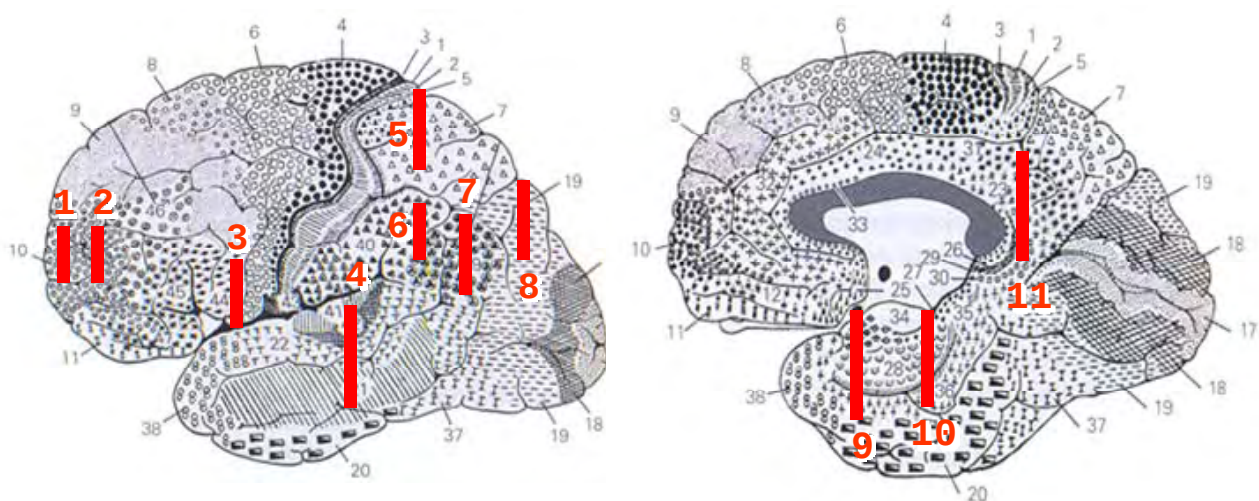


Tabla 3 y Fig. 1. Regiones anatómicas. Se muestran las 11 regiones anatómicas utilizadas en el estudio y su correlación con las áreas de Brodmann.

Posteriormente fueron rehidratados mediante su inmersión consecutiva en alcoholes al 100, 96 y 70%, 3 min en cada uno. Finalmente se sumergieron en agua destilada por un minuto.

4.1.5 Inmunohistoquímica.

El tejido se incubó en PBS. Después en una solución al 0.5% de albúmina bovina libre de inmunoglobulinas en PBS, durante 30 min. Las laminillas se lavaron en PBS con 0.2% de Triton X-100, durante 10 min. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: policlonal de conejo contra la proteína amiloide- β (dilución 1:50) (Chemicon, International Inc.), anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína GAP-43 (anti-GAP-43, dilución 1:500) (Chemicon, International Inc.), anticuerpo monoclonal de ratón anti-sinaptofisina humana (EP-10 dilución 1:2000) (Chemicon, International Inc. Temecula, CA), anticuerpo monoclonal de ratón anti-tau hiperfosforilada (Santa Cruz, Co. CA) y el anticuerpo "AD2" (dilución 1:500), gentilmente donado por el Dr. André Delacourte. INSERM, Lille, Francia). En el caso de la inmunohistoquímica para el péptido del amiloide- β , las laminillas se incubaron previamente con ácido fórmico al 98% (Merck. Darmstand, Germany) durante 8 min. Utilizamos inmunodetección indirecta con anticuerpos secundarios bioespecíficos conjugados con Lisamina-Rodamina y un secundario conjugado con FITC (Fluoresceina) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA). Las laminillas se montaron con Vectashield-DAPI (VECTOR Laboratories, Inc.).

4.1.6 Microscopía Confocal.

Se utilizó el sistema ZEISS-LSM 400. Para cada imagen analizada entre 10 y 20 secciones ópticas, con un grosor óptico de 0.5 a 1.0 μm de intervalo en el eje Z, fueron capturadas con objetivos de 20x (MNFs), de inmersión en aceite de 40x (PNs) y de 60x para la estructura fina. Las imágenes se obtuvieron en los dos canales de forma simultánea y se proyectaron en un plano de dos dimensiones. Mediante un sistema digital de pseudocolor, las imágenes se superpusieron (verde para FITC y rojo para Rodamina). En las imágenes superpuestas, el color amarillo se interpretó como colocación de los dos marcadores. Se obtuvieron impresiones directas en una impresora Epson stylus photo.

4.1.7 Análisis de imágenes.

Para la cuantificación de las estructuras, se utilizó un sistema digitalizador para la cuantimetría y morfometría de estructuras. Se utilizó el sistema IBAS que forma parte del sistema confocal ZEISS-LSM 400. La cuantificación de las diferentes estructuras dependió del tipo particular de imagen obtenida. En general, las imágenes se descompusieron en sus dos canales originales y se cuantificó a partir de la señal individual para evitar interpretaciones erróneas o confusión por contaminación del segundo canal. En las imágenes de densidad se cuantifica la imagen obtenida en el canal de luz transmitida. Se considera el número de píxeles en el máximo de resolución del sistema (1200 X 1200) y los valores se dan en una escala de grises de 250 tonos. La cuantificación de los diferentes tipos de placas se utilizó el sistema digitalizador (MCID Image analysis system, Imaging Research

Inc., Ontario, Canadá) en donde la totalidad de tejido utilizado es obtenido como una imagen digitalizada para darnos inmediatamente el área total del tejido. El sistema proporciona de manera homogénea las mediciones de área de todas las preparaciones incluidas en el estudio.

4.1.8 Estadística.

Se utilizaron las siguientes pruebas estadísticas:

- ✓ Prueba t-student y Mann Whitney (GraphPad Prism y SPSS), para evaluar las comparaciones entre ambos hemisferios.
- ✓ ANOVA de una vía y prueba post hoc de comparación múltiple de Tuckey (GraphPad Prism y SPSS), para comparar las medias de los resultados tanto de la evaluación neuropsicológica, como de las medias de los resultados de la expresión de los diferentes marcadores, entre el grupo control y con EA en las diferentes áreas cerebrales.
- ✓ Análisis multivariable y de correlación de Spearman (SPSS), para realizar el análisis de correlación entre los resultados de la evaluación neuropsicológica y los resultados de la expresión de los diferentes marcadores.
- ✓ Puntuación z (Excel), para estandarización de los datos entre los resultados obtenidos en la evaluación de las FCS.

4.2 Parte II: Análisis a partir de tejido *post mortem* de la población II.

La población II es de pacientes de los que se obtuvo su tejido *post mortem* para el análisis histopatológico. A estos pacientes no se les realizó la evaluación

neuropsicológica. Proviene del archivo de Patología del Hospital Psiquiátrico “Fray Bernardino Álvarez” México D.F.

4.2.1 Manipulación del tejido cerebral humano.

Contamos con 10 casos con diagnóstico de DA y 2 controles (sin demencia) (**Tabla 4**). Se realizaron cortes de 5 μ m, y fueron adheridos a portaobjetos tratados previamente con silano. Las rebanadas fueron deshidratadas mediante inmersión en alcoholes de concentración progresiva 70, 96 y 100%, 3 min en cada uno. Posteriormente en xilol absoluto por 10 min, y a continuación fueron incluidas en parafina. Antes de aplicar a los cortes de tejido las correspondientes técnicas, se les eliminó la parafina mediante inmersión en xilol absoluto, por 20 min. Posteriormente fueron rehidratados mediante inmersión consecutiva en alcoholes al 100, 96 y 70%, 3 min en cada uno. Después se sumergieron en agua destilada por un minuto. Las técnicas que se utilizaron para el diagnóstico de estos casos fueron: tinción de rutina de Hematoxilina-Eosina (HyE) (**Anexo III**), Bielwschowsky (**Anexo IV**), inmunohistoquímica con anticuerpos contra A β y Tau. Se confirmaron histopatológicamente 10 de 17 casos con diagnóstico de EA, los únicos que se reconocieron para utilizar en el protocolo, los otros 7 casos fueron excluidos. Las áreas analizadas fueron corteza cerebral e hipocampo.

Paciente	Edad (años)	Género	Evolución de la Enfermedad (años)
CASOS EA			
1	78	M	20
2	80	M	38
3	40	F	---
4	64	F	2
5	74	M	---
6	68	F	3
7	75	M	10
8	87	M	2
9	60	F	---
10	62	F	4
CASOS CONTROL			
1	60	M	---
2	60	M	---

Tabla 4. Información de pacientes del grupo II. Pacientes con EA y controles de los cuales se analizó su tejido. **(-):** No existe esa información. **F:** Femenino. **M:** Masculino

4.2.2 Inmunohistoquímica

Se realizó la misma técnica inmunohistoquímica que a los tejidos provenientes de Canadá. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: contra las HSPs de 27, 60, 70 y 90 kDa (dilución 1:100) (Santa Cruz, Co. CA), anticuerpo monoclonal de ratón contra NCAM-PSA (dilución 1:300) (Chemicon, International Inc.), anticuerpo policlonal de ratón anti-GFAP (dilución 1:100) (Dako Corporation), anticuerpo monoclonal de ratón contra el receptor de IGF-I (IGF-IR, dilución 1:100) (Santa Cruz, Co. CA), anticuerpo policlonal de cabra contra el receptor de IGF-II (IGF-IIR, dilución 1:100) (Santa Cruz, Co. CA), anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína GAP-43 (anti-GAP-43, dilución 1:500) (Chemicon, International

Inc.). Utilizamos inmunodetección indirecta con anticuerpos secundarios bioespecíficos conjugados con Lisamina-Rodamina y un secundario conjugado con FITC (Fluoresceina) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA). Las laminillas se montaron con Vectashield-DAPI (VECTOR Laboratories, Inc.).

4.2.3 Evaluación de la glicosilación.

Se realizó el marcaje con las lectinas de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) específica para Gal β -1,3GalNAc α -1,0-Ser,/Thr (dilución 1:100). De la hemolinfa del langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (MRL) específica para Neu5,7,9Ac2 (dilución 1:100) la cual fue purificada mediante cromatografía de afinidad. Se utilizó también la lectina *Triticum vulgaris* (WGA) específica para N-acetyl-/3-glucosaminy-(1-4)-N-acetyl-p-glucosamina (dilución 1:100). Todas las lectinas estaban conjugadas con biotina. El reconocimiento del marcaje con las lectinas en el tejido se hizo indirectamente con Extravidina conjugada con FITC (Sigma, St. Louis, MO). El tejido cerebral se desparafinó e incubó en PBS. Se incubó con una solución al 0.5% de albúmina libre de inmunoglobulinas en PBS, durante 30 min. Después se lavó en PBS conteniendo 0.2% de Triton X-100, durante 10 min adicionales. Las lectinas se diluyeron en PBS a una concentración de 50 μ g/ml y se incubó con las muestras durante 2 h a 37°C. Las laminillas se lavaron abundantemente con PBS antes de incubarse con la Extravidina fluoresceinada (dilución 1:50) (Sigma). Los experimentos control consistieron en omitir la lectina o haciendo una incubación previa con 200 mM de su azúcar

específica, para la lectina MRL usamos 10 μ M de mucina de glándula submaxilar bovina⁶⁸.

4.2.4 Microscopía de Fluorescencia.

Se obtuvieron imágenes con objetivos de 40x y 63x e inmersión en aceite de 100x para la estructura fina, en un microscopio Leica MLS y una cámara digital DFC-300 FX. Las imágenes fueron obtenidas en los tres canales en forma simultánea y proyectadas en un plano de dos dimensiones. Mediante un sistema digital de pseudocolor las imágenes se sobreponen (verde para FITC, rojo para la lisamina-Rodamina y azul para el DAPI). En la imagen sobrepuesta, la mezcla de los colores básicos se interpretan como colocación de los dos marcadores. Para realizar este análisis se utilizó el sistema IM1000 de Leica. Las imágenes se almacenaron para su análisis posterior.

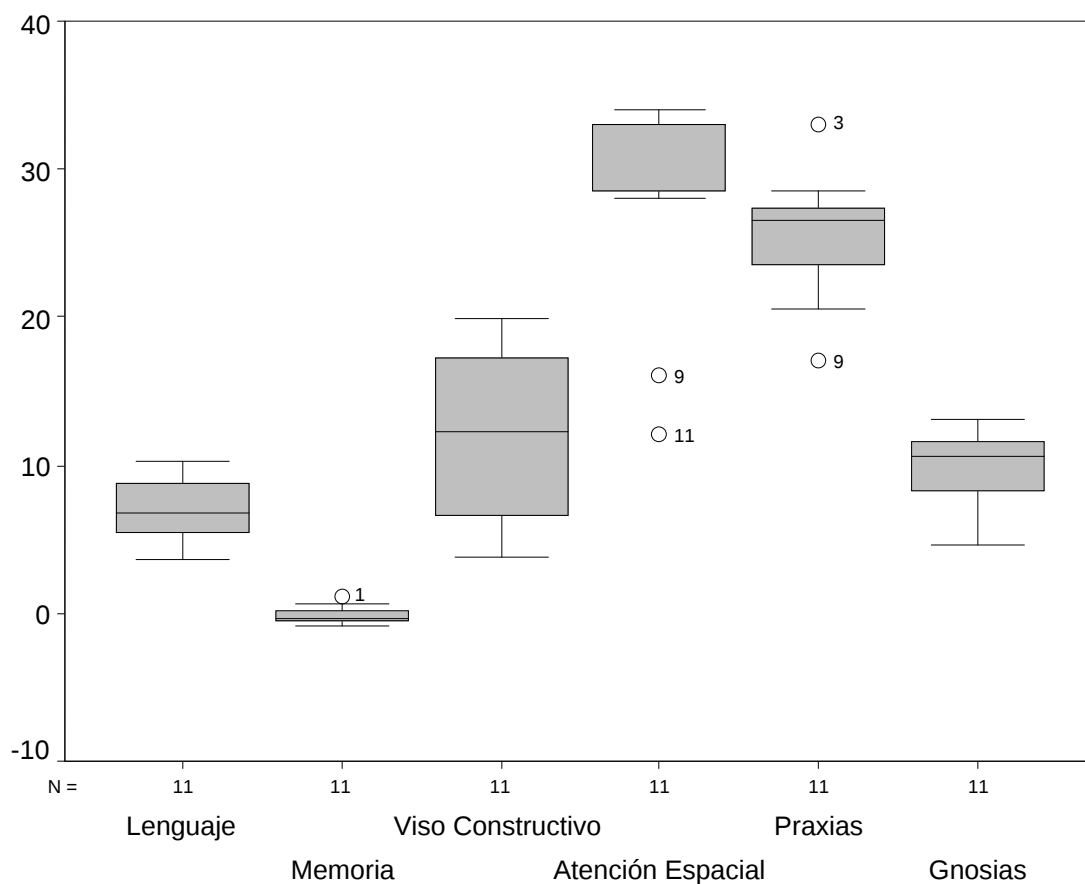
Capítulo 5

RESULTADOS

5.1 Parte I: Resultados del análisis de la evaluación neuropsicológica de pacientes de la población I: Evaluación PENO.

5.1.1 Evaluación Neuropsicológica

Se les aplicó a los pacientes la batería de pruebas neuropsicológica PENO de manera periódica (cada 6 meses) hasta el momento de su fallecimiento. Los puntajes obtenidos en la última evaluación, para cada prueba y cada paciente se muestran en la **tabla 5**. Se realizó una estandarización de los resultados obtenidos para cada prueba, para hacer la comparación de las diferentes FCS por medio de una puntuación Z. Los pacientes con diagnóstico de DA, mostraron un mayor deterioro cognitivo que los controles, en las pruebas de memoria, lenguaje, gnosias, viso-constructivo, praxias y atención espacial, en ese orden (**Gráfica 1**). Se puede observar que salen del patrón cognitivo los pacientes 1, 3, 9 y 11, de los cuales 3 de ellos muestran una variante de EA: pacientes 1 y 11: Cuerpos de Lewy; paciente 9: Daño vascular.



Gráfica 1. Deterioro cognitivo evaluado por funciones. Se muestra la afectación de las diferentes FCS evaluadas en los pacientes con EA. La función cognitiva con mayor afectación es la memoria.

5.1.2 Lesiones Histopatológicas

Se observó por medio de microscopía confocal, la expresión de los diferentes marcadores: Placas, MN, ND, GAP-43 y EM en los casos con EA (**Figs. 2 – 7**). Se realizó tanto para el hemisferio izquierdo como el derecho por separado, la cuantificación de estructuras inmunorreactivas a: Placas positivas a A β , Tau y A β +Tau; Marañas Neurofibrilares (MNFs); Neuritas Distróficas (NDs), GAP-43 y

Estructuras Meganeuríticas (EM). La expresión de las estructuras fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los casos con EA en comparación de los controles. Excepto para la expresión de Placas positivas a $A\beta$. La densidad de los agregados neuríticos para los casos con EA fueron: Placas positivas a $A\beta = 2.3 \pm 0.7$; Placas positivas a Tau = 21.9 ± 7.1 ; Placas positivas a $A\beta + \text{Tau} = 20.5 \pm 5.1$, mientras que en los controles fue de: Placas positivas a $A\beta = 5.7 \pm 4.0$; Placas positivas a Tau = 0.01 y Placas positivas a $A\beta + \text{Tau} = 0.5 \pm 0.4$. La densidad promedio de las MNFs fue de $25.8 \pm 3.34 / \text{mm}^2$ para los casos de EA y de $0.29 \pm 0.28 / \text{mm}^2$ para los casos controles. La densidad promedio de las NDs fue de $5132 \pm 512 / \text{mm}^2$ en los casos de EA, mientras que en los casos controles se observó una densidad promedio de $9.5 / \text{mm}^2$. La densidad media de las estructuras positivas a GAP-43 fue de $1759.23 \pm 623.09 / \text{mm}^2$, mientras que para los controles fue de 39.46 ± 39.46 . Las EM tuvieron una densidad media de $1.9 \pm 0.6 / \text{mm}^2$ para los casos con EA. La cuantificación de las lesiones se realizó en las regiones 2, 4, 6 y 7. Sólo en el caso de la cuantificación de las EM, se realizó en las 11 regiones, que incluyen las 6 funciones cognitivas evaluadas (**Gráficas 2 – 8**).

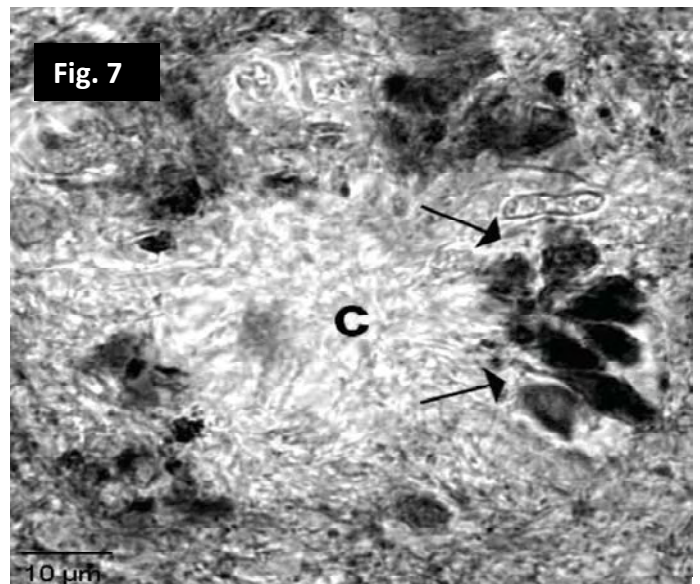
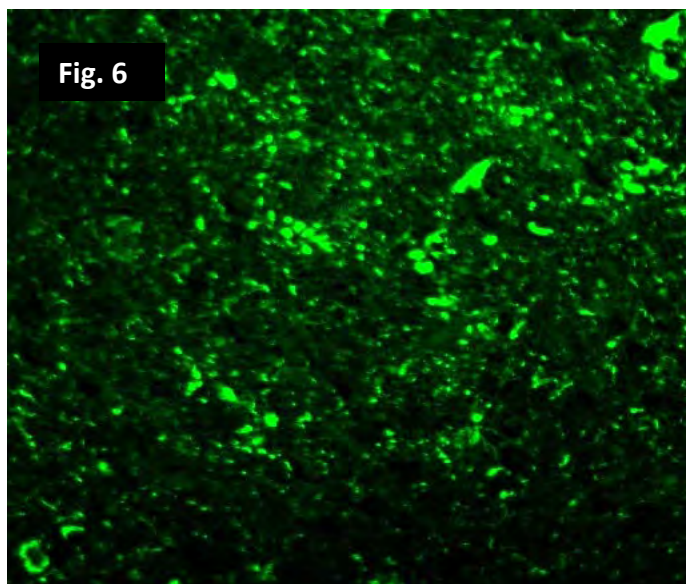
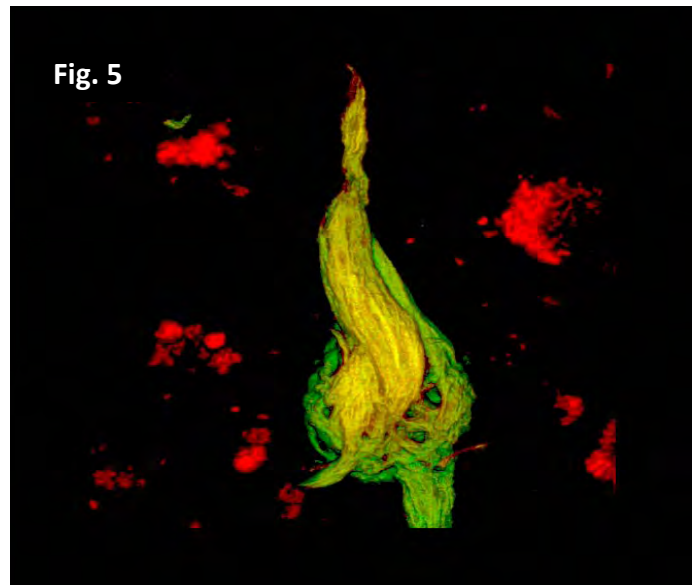
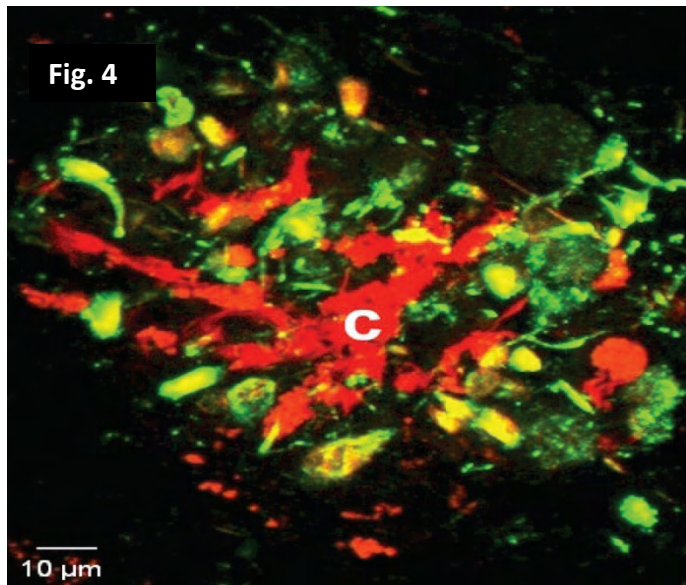
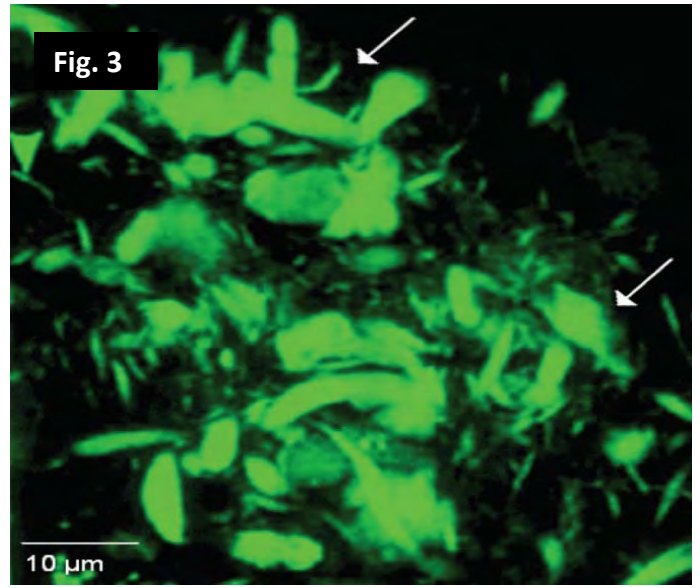
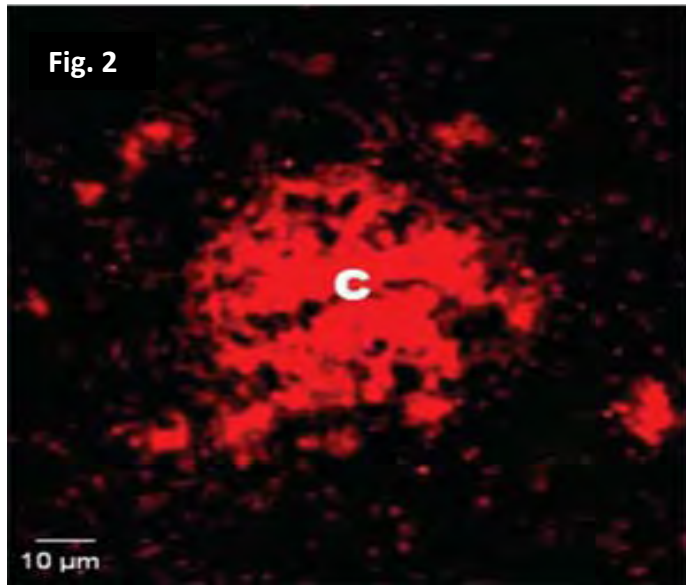


Fig. 2 Depósitos de amiloide- β . Micrografía confocal que muestra en rojo una estructura inmunorreactiva al anticuerpo anti amiloide- β (c). Este tipo de lesión fue encontrada principalmente en los controles sanos, en donde se observa la ausencia del componente neurítico.

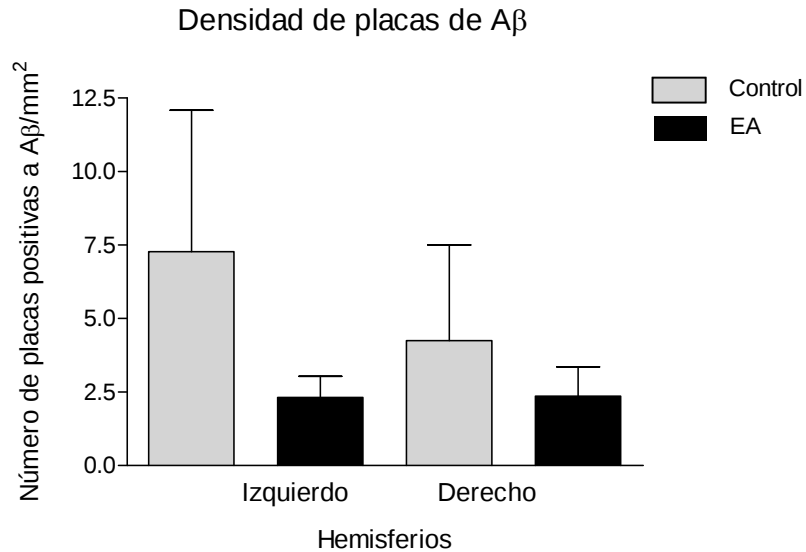
Fig. 3 Tau hiperfosforilada. Micrografía confocal en donde se observa la inmunorreactividad al AcM AD2, tau hiperfosforilada (flechas).

Fig. 4 Imagen confocal con doble marca de una típica **Placa Neurítica**. En rojo se puede observar el depósito de amiloide- β (c) y en verde el componente neurítico distribuido en forma radial al depósito. Esta es la placa característica de la EA.

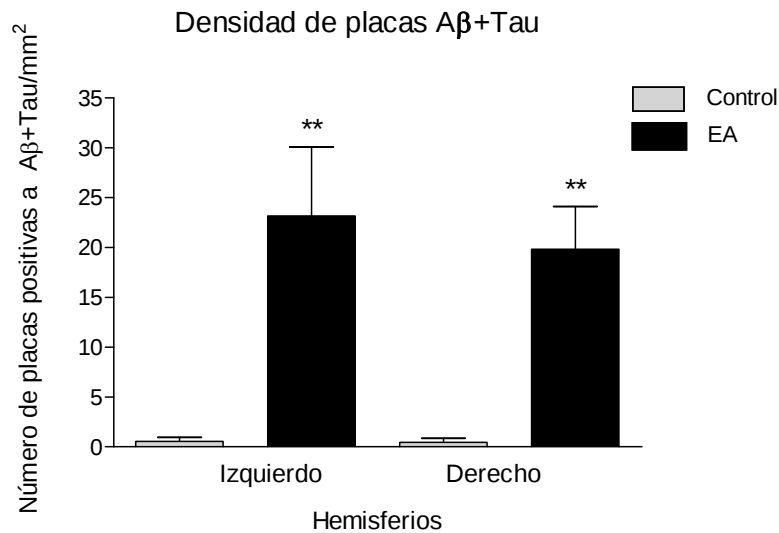
Fig. 5 Maraños neurofibrilares. Micrografía obtenida a partir de una doble marca de AD2 y rojo tiazina en microscopía confocal se muestra una reconstrucción 3-D de una MNF intracelular. En rojo se observa la autofluorescencia de la lipofuscina (Tomada de Guevara, 1998).

Fig. 6 Neuritas Distróficas. Micrografía de Neuritas Distróficas en un tejido de corteza de paciente diagnosticado con EA.

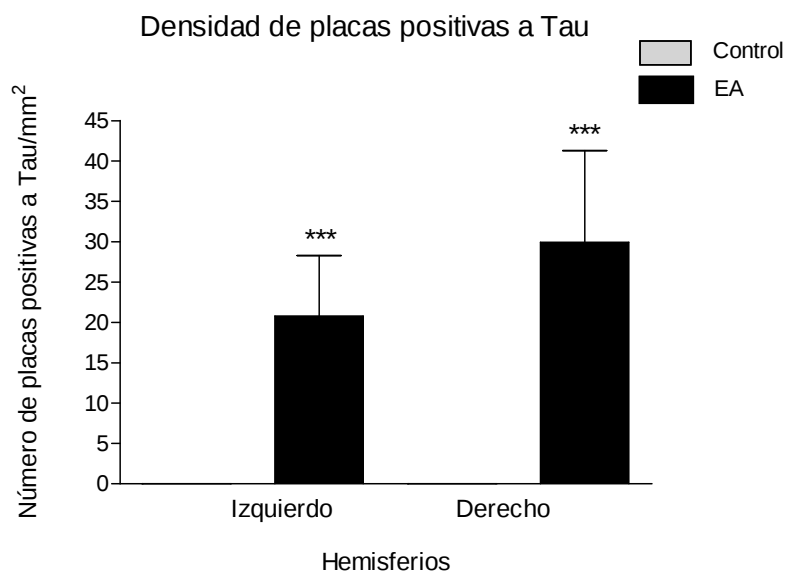
Fig. 7 Estructuras Meganeuríticas. Imagen de microscopía confocal, en donde podemos observar una placa característica de la EA (c), y la expresión de las EM alrededor de la placa de A β (flecas), en tejido de corteza de paciente diagnosticado con EA (Tomada de Guevara, 1998).



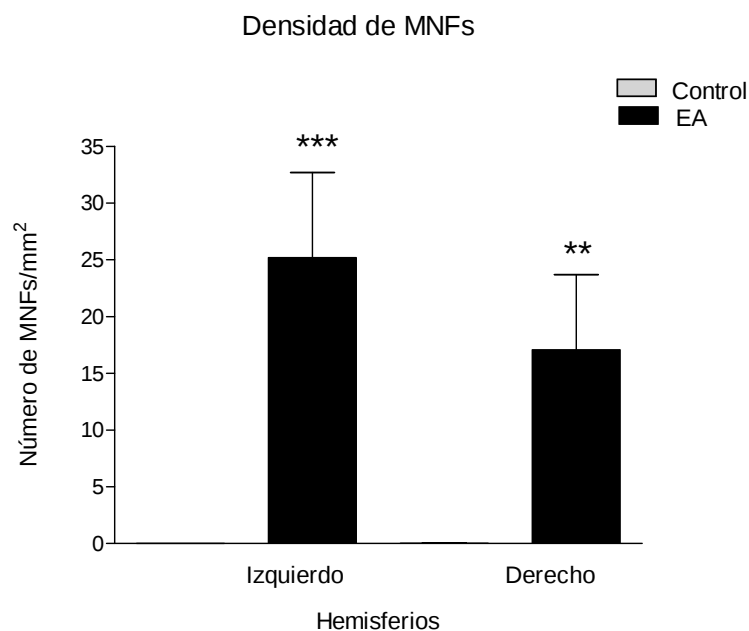
Gráfica 2. Densidad de placas positivas a Aβ en ambos hemisferios. Promedio de las 4 áreas de estudio en tejido de pacientes con EA (n=11) y controles (n=13). Se observa una mayor expresión de placas de Aβ en los casos control (dato no significativo). No existe diferencia significativa entre los hemisferios.



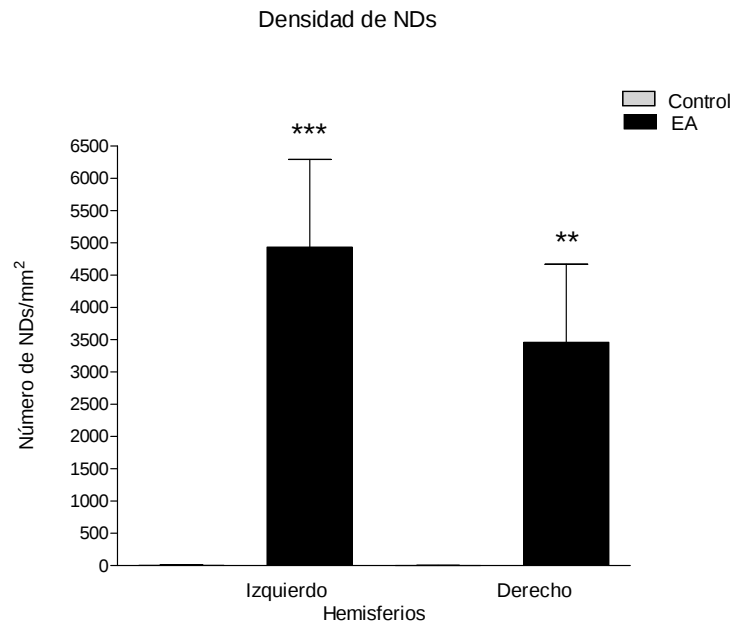
Gráfica 3. Cuantificación de la densidad de placas de Aβ +Tau en ambos hemisferios. Promedio de las 4 áreas de estudio en tejido de pacientes con EA (n=11) y controles (n=13). Se observa una mayor expresión de placas de Aβ +Tau en los casos con EA (**p<0.01). No existe diferencia significativa entre los hemisferios de los cerebros con EA.



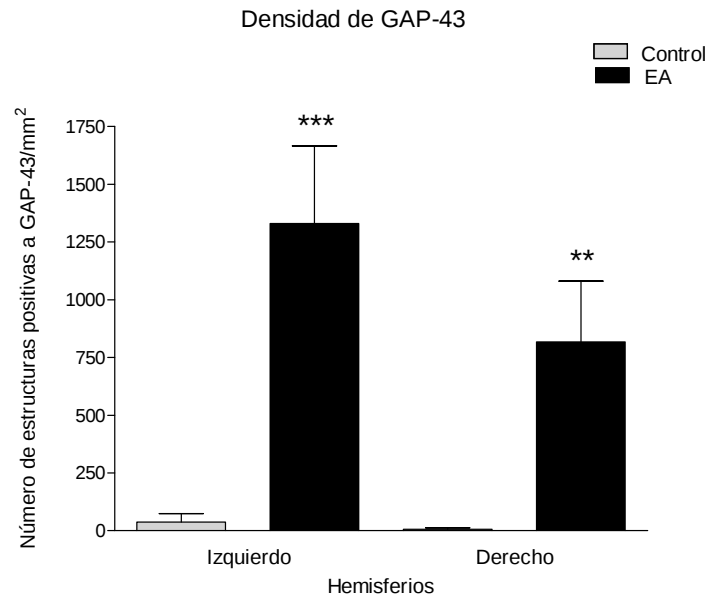
Gráfica 4. Cuantificación de la densidad de placas de Tau en ambos hemisferios. Promedio de las 4 áreas de estudio en tejido de pacientes con EA (n=11) y controles (n=13). Se observa una mayor expresión de placas de Tau en los casos con EA (** $p < 0.001$). No existe diferencia significativa entre los hemisferios.



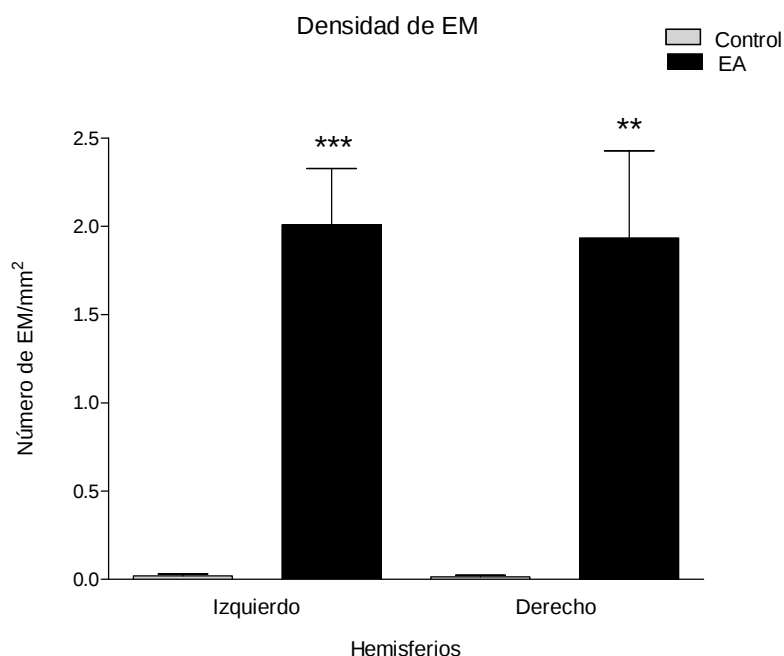
Gráfica 5. Cuantificación de la densidad de marañas neurofibrilares en ambos hemisferios. Promedio de las 4 áreas de estudio en tejido de pacientes con EA (n=11) y controles (n=13). Se observa una mayor expresión de MNFs en los casos con EA (** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$). No existe diferencia significativa entre los hemisferios.



Gráfica 6. Cuantificación de la densidad de neuritas distróficas en ambos hemisferios. Promedio de las 4 áreas de estudio en tejido de pacientes con EA (n=11) y controles (n=13). Se observa una mayor expresión de NDs en los casos con EA (**p<0.01, ***p<0.05). No existe diferencia significativa entre los hemisferios.



Gráfica 7. Cuantificación de la densidad de GAP-43 en ambos hemisferios. Promedio de las 4 áreas de estudio en tejido de pacientes con EA (n=11) y controles (n=13). Se observa una mayor expresión de GAP-43 en los casos con EA (**p<0.01, ***p<0.05). No existe diferencia significativa entre los hemisferios.



Gráfica 8. Cuantificación de la densidad de estructuras meganeuríticas en ambos hemisferios. Promedio de las 11 áreas de estudio en tejido de pacientes con EA (n=11) y controles (n=13). Se observa una mayor expresión de EM en los casos con EA (**p<0.01, ***p<0.05). No existe diferencia significativa entre los hemisferios.

5.1.3 Correlación entre la evaluación neuropsicológica y las lesiones histopatológicas.

La correlación neuropsicológica se llevó a cabo por medio de un análisis estadístico de Spearman y una prueba *post hoc* de Tuckey. Se consideraron resultados significativos: $p \leq 0.05$.

Los datos significativos de la correlación entre la expresión de los marcadores y las funciones cognitivas se resumen en las **tablas 6 – 12**. Ésta correlación sólo se da en los casos de EA, y en los controles sólo en la expresión de MNFs.

Prueba	Función	Área de Brodmann	r	p	Hemisferio
Evocación lexical (L)	Lenguaje	19	0.665	0.036	Izquierdo
Denominación oral	Lenguaje	28-34-38	0.784	0.007	Izquierdo
Evocación lexical (T)	Lenguaje	19	0.741	0.035	Derecho
Evocación lexical (Legumbres)	Lenguaje	6	-0.703	0.023	Izquierdo
Evocación lexical (Herramientas)	Lenguaje	6	-0.795	0.006	Izquierdo
Evocación lexical (Vestimenta)	Lenguaje	6	-0.795	0.018	Derecho
Evocación lexical (Vestimenta)	Lenguaje	7	-0.877	0.004	Derecho
Evocación lexical (Herramientas)	Lenguaje	7	-0.800	0.017	Derecho
Evocación lexical (Vestimenta)	Lenguaje	40	-0.711	0.048	Derecho
Evocación lexical (Vestimenta)	Lenguaje	27-28-35-36	-0.727	0.041	Derecho
Habilidades discursivas (Sándwich)	Lenguaje	19	0.636	0.048	Izquierdo
Habilidades discursivas (Asalto de banco)	Lenguaje	19	0.741	0.014	Izquierdo
Habilidades discursivas (Accidente de carro)	Lenguaje	19	0.835	0.003	Izquierdo
Habilidades discursivas (Sándwich)	Lenguaje	28-34-38	0.747	0.013	Izquierdo
Habilidades discursivas (Accidente de carro)	Lenguaje	19	0.788	0.020	Derecho
Habilidades discursivas (Accidente de carro)	Lenguaje	28-34-38	0.819	0.013	Derecho
Reproducción visual	Memoria	40	0.661	0.037	Izquierdo
Recuerdo (Semántico)	Memoria	27-28-35-36	-0.688	0.028	Izquierdo
Recuerdo (oral)	Memoria	21-22-42	-0.741	0.035	Derecho
Memoria lógica	Memoria	40	0.731	0.039	Derecho
Dibujo (comando verbal)	Viso-Constructivo	19	0.693	0.026	Izquierdo
Dibujo (copia)	Viso-Constructivo	28-34-38	0.657	0.039	Izquierdo
Pantomimas	Praxias	10	-0.699	0.035	Izquierdo
Pantomimas	Praxias	10-46	-0.754	0.012	Izquierdo
Gestos arbitrarios	Praxias	10-46	-0.717	0.020	Izquierdo
Pantomimas	Praxias	21-22-42	-0.850	0.007	Derecho
Gestos arbitrarios	Praxias	21-22-42	-0.826	0.011	Derecho
Localización visual (campanas)	Atención espacial	28-34-38	0.663	0.037	Izquierdo
Discriminación visual	Gnosias	28-34-38	0.711	0.048	Derecho
Discriminación visual	Gnosias	27-28-35-36	0.764	0.027	Derecho

Tabla 6. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de EM.
Evaluación de pacientes con EA. Se observa que la FCS más comprometida es el lenguaje,
($p < 0.05$).

A)

Prueba	Función	Área de Brodmann	r	P	Hemisferio
Denominación oral	Lenguaje	21-22-42	0.644	0.032	Derecho
Comprensión de palabras y frases	Lenguaje	21-22-42	-0.644	0.032	Derecho
Recuerdo (Sistemático)	Memoria	21-22-42	-0.644	0.032	Derecho

B)

Prueba	Función	Área de Brodmann	r	p	Hemisferio
Evocación lexical (L)	Lenguaje	39	0.665	0.036	Izquierdo
Habilidades discursivas (Accidente de carro)	Lenguaje	39	0.683	0.030	Izquierdo
Recuerdo (Semántico)	Memoria	10-46	-0.642	0.045	Izquierdo
Recuerdo (Semántico)	Memoria	21-22-42	-0.674	0.033	Izquierdo
Localización visual (Campanas)	Atención espacial	39	-0.798	0.018	Derecho
Pantomimas	Praxias	10-46	-0.707	0.022	Izquierdo
Pantomimas	Praxias	21-22-42	-0.638	0.047	Izquierdo
Pantomimas	Praxias	39	-0.675	0.032	Izquierdo
Pantomimas	Praxias	10-46	-0.867	0.005	Derecho
Pantomimas	Praxias	21-22-42	-0.802	0.017	Derecho
Pantomimas	Praxias	40	-0.802	0.017	Derecho
Pantomimas	Praxias	39	-0.802	0.017	Derecho
Gestos Arbitrarios	Praxias	10-46	-0.819	0.013	Derecho
Gestos Arbitrarios	Praxias	21-22-42	-0.085	0.007	Derecho
Gestos Arbitrarios	Praxias	40	-0.826	0.011	Derecho
Gestos Arbitrarios	Praxias	39	-0.850	0.007	Derecho

Tabla 7. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de MNFs.

A) casos control y B) casos con EA, ($p < 0.05$).

Prueba	Función	Área de Brodmann	r	p	Hemisferios
Habilidades discursivas (Accidente de carro)	Lenguaje	21-22-42	0.723	0.043	Derecho
Dibujo (Comando verbal)	Viso-Constructivo	21-22-42	0.772	0.009	Izquierdo
Dibujo (Comando verbal)	Viso-Constructivo	39	0.736	0.015	Izquierdo
Localización visual (Campanas)	Atención Espacial	39	0.773	0.024	Derecho
Pantomimas	Praxias	10-46	-0.802	0.005	Izquierdo
Pantomimas	Praxias	21-22-42	-0.693	0.026	Izquierdo
Pantomimas	Praxias	40	-0.778	0.008	Izquierdo
Pantomimas	Praxias	39	-0.675	0.032	Izquierdo
Pantomimas	Praxias	10-46	-0.898	0.002	Derecho
Pantomimas	Praxias	40	-0.802	0.017	Derecho
Pantomimas	Praxias	39	-0.755	0.031	Derecho
Gestos arbitrarios	Praxias	10-46	-0.826	0.011	Derecho
Gestos arbitrarios	Praxias	40	-0.731	0.040	Derecho

Tabla 8. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de NDs.
Evaluación de pacientes con EA, ($p < 0.05$).

Prueba	Función	Área de Brodmann	r	p	Hemisferio
Memoria lógica	Memoria	10-46	0.688	0.028	Izquierdo
Recuerdo (Semántico)	Memoria	39	0.652	0.041	Izquierdo
Dibujo (Copia)	Viso-Constructivo	40	0.738	0.037	Derecho

Tabla 9. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de GAP-43.
Pacientes con EA, ($p < 0.05$).

Prueba	Función	Área de Brodmann	r	p	Hemisferio
Evocación lexical (L)	Lenguaje	40	-0.651	0.041	Izquierdo
Comprensión de palabras y frases	Lenguaje	39	0.783	0.022	Derecho
Recuerdo (Semántico)	Memoria	40	0.676	0.032	Izquierdo
Recuerdo (Oral)	Memoria	21-22-42	0.772	0.009	Izquierdo
Recuerdo (Oral)	Memoria	40	0.712	0.021	Izquierdo
Localización visual (Campanas)	Atención espacial	10-46	0.763	0.024	Derecho
Pantomimas	Praxias	10-46	0.755	0.031	Derecho
Pantomimas	Praxias	40	0.871	0.005	Derecho
Gestos arbitrarios	Praxias	10-46	0.826	0.011	Derecho
Gestos arbitrarios	Praxias	40	0.773	0.024	Derecho
Apareamiento visual semántico	Gnosias	10-46	0.751	0.032	Derecho

Tabla 10. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de Placas positivas a A β . Pacientes con EA, (p<0.05).

Prueba	Función	Área de Brodmann	r	p	Hemisferio
Evocación lexical (vestimenta)	Lenguaje	39	-0.747	0.033	Derecho
Habilidades discursivas (Sándwich)	Lenguaje	10-46	0.691	0.027	Izquierdo
Habilidades discursivas (Robo de banco)	Lenguaje	39	0.679	0.031	Izquierdo
Recuerdo (Oral)	Memoria	21-22-42	-0.778	0.023	Derecho
Recuerdo (Oral)	Memoria	40	-0.741	0.035	Derecho
Dibujo (comando verbal)	Viso-Constructivo	10-46	0.851	0.002	Izquierdo
Dibujo (comando verbal)	Viso-Constructivo	40	0.687	0.028	Izquierdo
Dibujo (comando verbal)	Viso-Constructivo	39	0.729	0.017	Izquierdo
Dibujo (comando verbal)	Viso-Constructivo	10-46	0.738	0.037	Derecho
Dibujo (Copia)	Viso-Constructivo	39	0.742	0.014	Izquierdo
Copia de la figura de Rey	Viso-Constructivo	39	0.687	0.028	Izquierdo
Juicio de orientación de líneas	Viso-Constructivo	39	0.723	0.043	Derecho
Pantomimas	Praxias	40	0.802	0.017	Derecho
Gestos arbitrarios	Praxias	40	-0.755	0.031	Derecho
Discriminación visual	Gnosias	39	0.868	0.005	Derecho

Tabla 11. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de Placas positivas a A β +Tau. Pacientes con EA, (p<0.05).

Prueba	Función	Área de Brodmann	R	p	Hemisferio
Comprensión de palabras y frases	Lenguaje	21-22-42	-0.904	0.002	Derecho
Habilidades discursivas (Accidente de carro)	Lenguaje	10-46	0.673	0.033	Izquierdo
Habilidades discursivas (Accidente de carro)	Lenguaje	39	0.762	0.010	Izquierdo
Habilidades discursivas (Robo de banco)	Lenguaje	39	0.636	0.048	Izquierdo
Recuerdo (Oral)	Memoria	21-22-42	-0.718	0.019	Izquierdo
Recuerdo (Oral)	Memoria	39	-0.741	0.035	Derecho
Dibujo (Comando verbal)	Viso-Constructivo	39	0.687	0.028	Izquierdo
Pantomimas	Praxias	10-46	-0.692	0.027	Izquierdo
Pantomimas	Praxias	10-46	-0.922	0.001	Derecho
Pantomimas	Praxias	21-22-42	-0.766	0.027	Derecho
Pantomimas	Praxias	40	-0.988	0.000	Derecho
Pantomimas	Praxias	39	-0.731	0.040	Derecho
Gestos arbitrarios	Praxias	10-46	-0.850	0.007	Derecho
Gestos arbitrarios	Praxias	21-22-42	-0.743	0.035	Derecho
Gestos arbitrarios	Praxias	40	-0.964	0.000	Derecho
Gestos arbitrarios	Praxias	39	-0.755	0.031	Derecho
Apareamiento visual semántico	Gnosias	21-22-42	-0.751	0.032	Derecho

Tabla 12. Correlación neuropsicológica entre el puntaje del PENO y la expresión de Placas positivas a Tau. Pacientes con EA, ($p < 0.05$).

El análisis estadístico indica que existe correlación significativa ($p < 0.05$) entre los resultados de las pruebas neuropsicológicas y la expresión de los siguientes marcadores: EM, Placas positivas a Tau, MNFs, PNS, NDs, Placas de $A\beta$, GAP-43, en ese orden, para los casos de EA. Contrariamente, en los casos control sólo observamos una correlación significativa en la expresión de MNFs. La correlación en cuanto a las funciones involucradas con la expresión de los marcadores, es significativa ($p < 0.05$) para: Praxias, Lenguaje, Memoria, Viso-

Constructivo, Gnosias y Atención Espacial en ese orden, para los casos de EA. En los casos control sólo se ven involucradas las funciones de Lenguaje y Memoria en ese orden.

5.2 Parte II: Resultados obtenidos a partir del análisis de tejido *post mortem* de la población II.

5.2.1 Expresión de factores tróficos

Se llevó a cabo el análisis por medio de microscopía de fluorescencia, de la expresión de los siguientes factores tróficos neuronales: NCAM-PSA, GAP-43 y receptores de IGF-I e IGF-II (IGF-IR e IGF-IIR). Después se analizó su asociación a las diferentes HSPs. El tejido que se utilizó fue el de los pacientes mexicanos con diagnóstico de EA, así como controles. El área de estudio fue corteza frontal e hipocampo. La inmunorreactividad en neuronas corticales con el AcM contra IGF-IR, no fue positiva en ningún caso de EA, al contrario de los casos control, los cuales todos fueron positivos (**Fig. 8**). De manera opuesta, pudimos observar que los casos de EA fueron positivos al anticuerpo IGF-IIR, pero ninguno de los casos controles mostraron reactividad ante este receptor (**Fig. 9**). NCAM-PSA fue positiva para los casos de EA en neuronas de la corteza, y aunque algunos controles tuvieron inmunorreactividad a NCAM-PSA, su expresión fue menor (**Fig. 10**). Observamos por medio de la técnica inmunohistoquímica de peroxidasa (HRP), que la expresión para NCAM-PSA se expresa asociado a neuronas, EM y PNs (**Fig. 11**). También se observa inmunorreactividad contra GAP-43 sólo en los

casos de EA. Encontramos inmunorreactividad contra GAP-43 y NCAM-PSA en asociación a IGF-IIR, solamente en los casos diagnosticados con EA (**Fig. 12, 13**).

5.2.2 Expresión de HSPs

Se observó positividad al anticuerpo contra HSP27 para los casos de EA, con poca asociación a los astrocitos reactivos. Su expresión parece tener una asociación a placas neuríticas. En los casos control ninguno fue positivo (**Fig. 14**). HSP60 fue positiva solamente para los casos de EA, se presentó en conjunto con astrocitos reactivos. Se expresó cerca de PNs en corteza e hipocampo. En los casos control no se observó expresión de HSP60 (**Fig. 15**). En similitud a HSP27, la HSP70 se expresó en los casos con EA en neuronas de corteza e hipocampo. Mostró poca asociación a astrocitos reactivos. Se presenta en sitios en donde hay gran cantidad de vasos sanguíneos. Como las otras HSPs, no se presenta en los casos control (**Fig. 16**). La inmunorreactividad de HSP90 fue mayor a las demás HSPs. Se expresó en asociación a astrocitos reactivos y a vasos sanguíneos (**Fig. 17**). El nivel de expresión para las HSPs y su asociación a astrocitos reactivos, vasos sanguíneos y placas, se muestra en la **tabla 13**. Se empleó GFAP (Proteína glial ácida fibrilar) para observar la activación glial. Con respecto a la asociación de los factores tróficos con las HSPs, encontramos que la inmunorreactividad contra IGF-IIR, NCAM-PSA y GAP-43 fue positiva en conjunto con HSP90, HSP70, HSP27 y HSP60. La inmunorreactividad se observa sólo en los casos con diagnóstico de EA (**Figs. 18, 19, 20**).

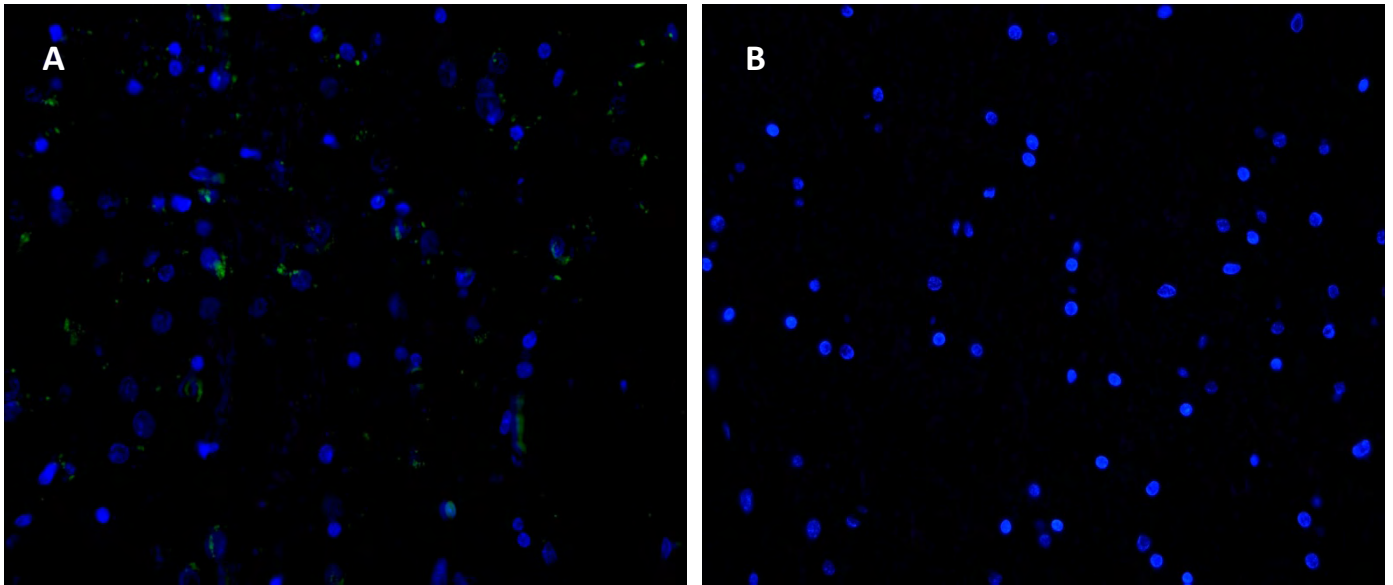


Fig. 8 Expresión de IGF-IR. Micrografía obtenida con microscopía de fluorescencia a partir de una doble marca de IGF-IR (verde) y Núcleos (azul), en tejido de corteza frontal de A) caso control, sin demencia. B) paciente diagnosticado con EA.

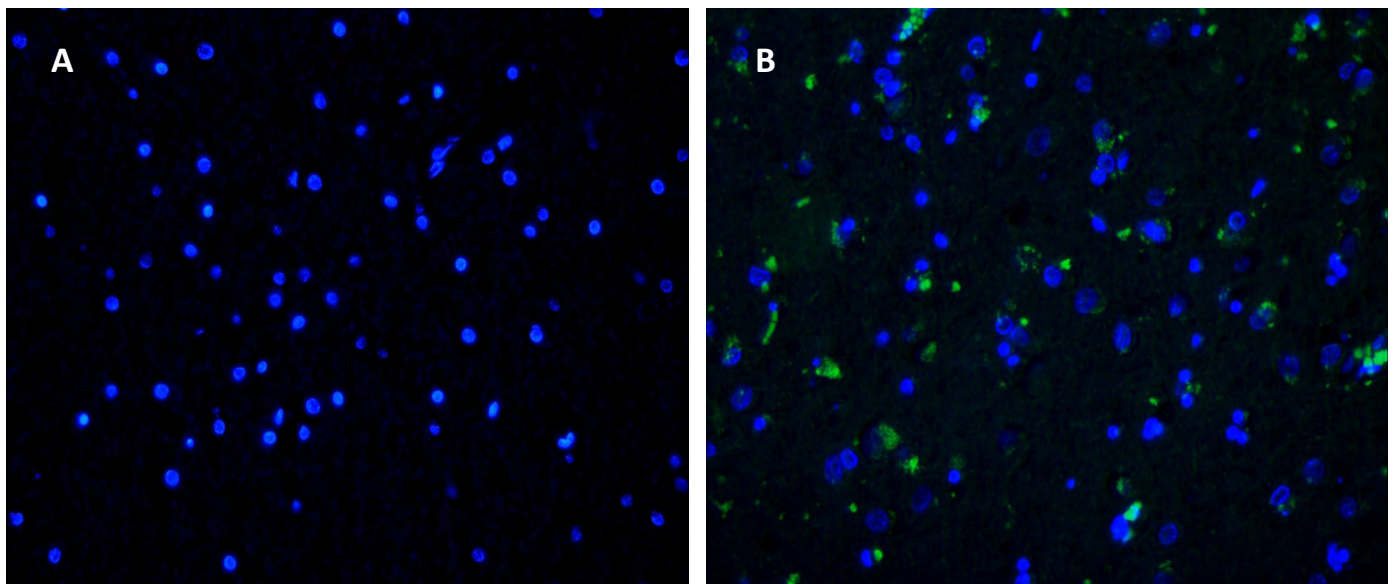


Fig. 9 Expresión de IGF-IIIR. Micrografía obtenida con microscopía de fluorescencia a partir de una doble marca de IGF-IIIR (verde) y Núcleos (azul), en tejido de corteza frontal de A) caso control, sin demencia. B) paciente diagnosticado con EA.

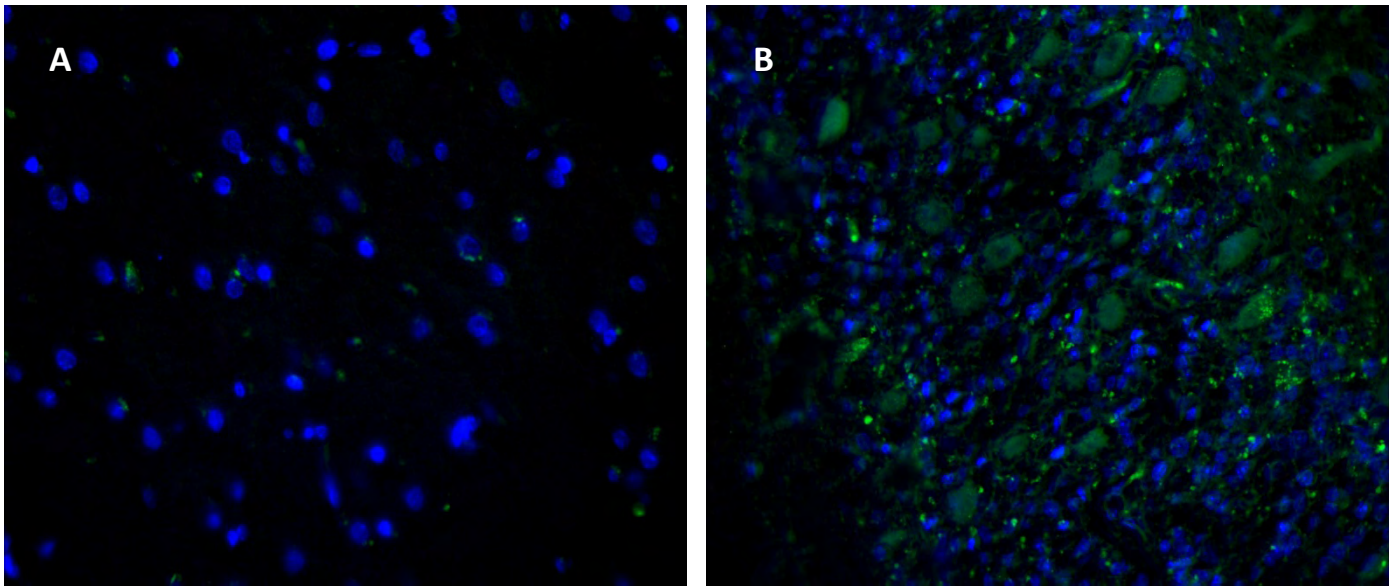


Fig. 10 Expresión de NCAM-PSA. Micrografía obtenida con microscopía de fluorescencia a partir de una doble marca de NCAM-PSA (verde) y Núcleos (azul), en tejido de corteza frontal de A) caso control, sin demencia. B) paciente diagnosticado con EA.

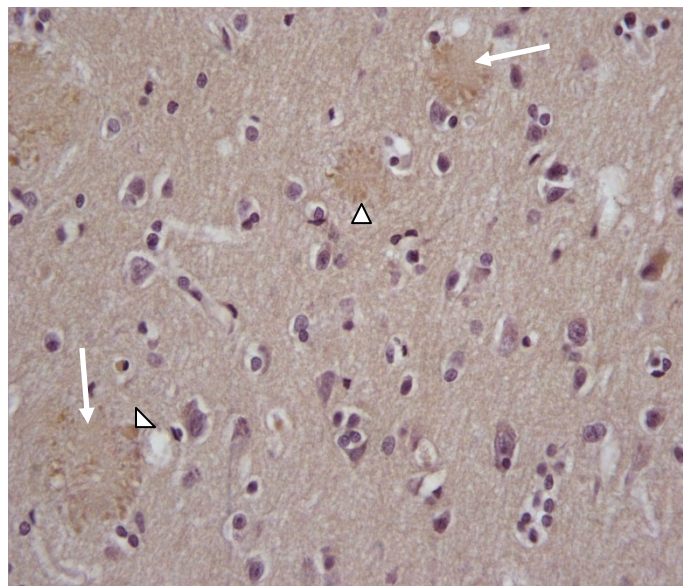


Fig. 11 Expresión de NCAM-PSA asociada a EM. Imagen obtenida a partir de la inmunohistoquímica HRP en donde podemos observar la expresión de NCAM-PSA asociada a PNS (flechas) y EM (cabezas de flecha) en un tejido de corteza frontal de paciente diagnosticado con EA.

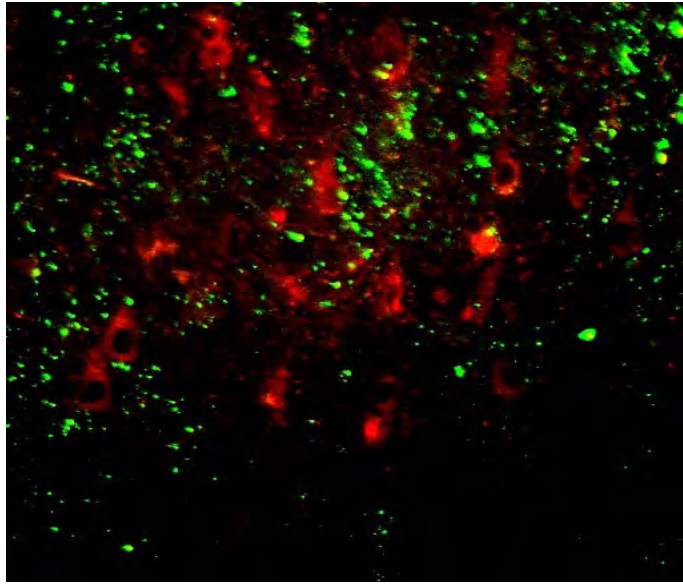


Fig. 12 Expresión de GAP-43 en asociación a IGF-IIR. Micrografía confocal de doble marcaje con el AcM contra GAP-43 e IGF-IIR. Se pueden observar numerosos somas de las neuronas de la corteza cerebral inmunorreactivos al receptor de IGF-II (rojo). Nótese el componente neurítico inmunorreactivo al GAP-43 distribuido en toda la corteza (verde).

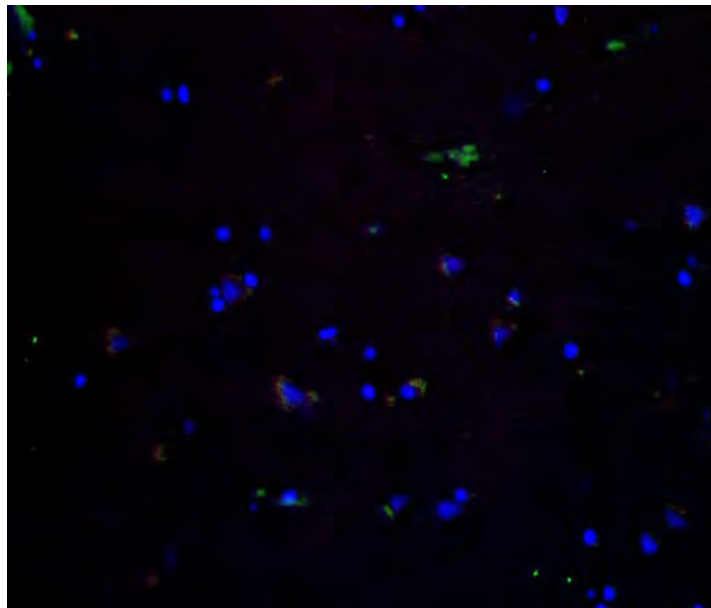


Fig. 13 Expresión de NCAM-PSA en asociación a IGF-IIR. Imagen obtenida por inmunofluorescencia de triple marca positiva a NCAM-PSA (rojo), IGF-IIR (verde) y núcleos (azul) en corteza frontal de cerebro de pacientes con EA.

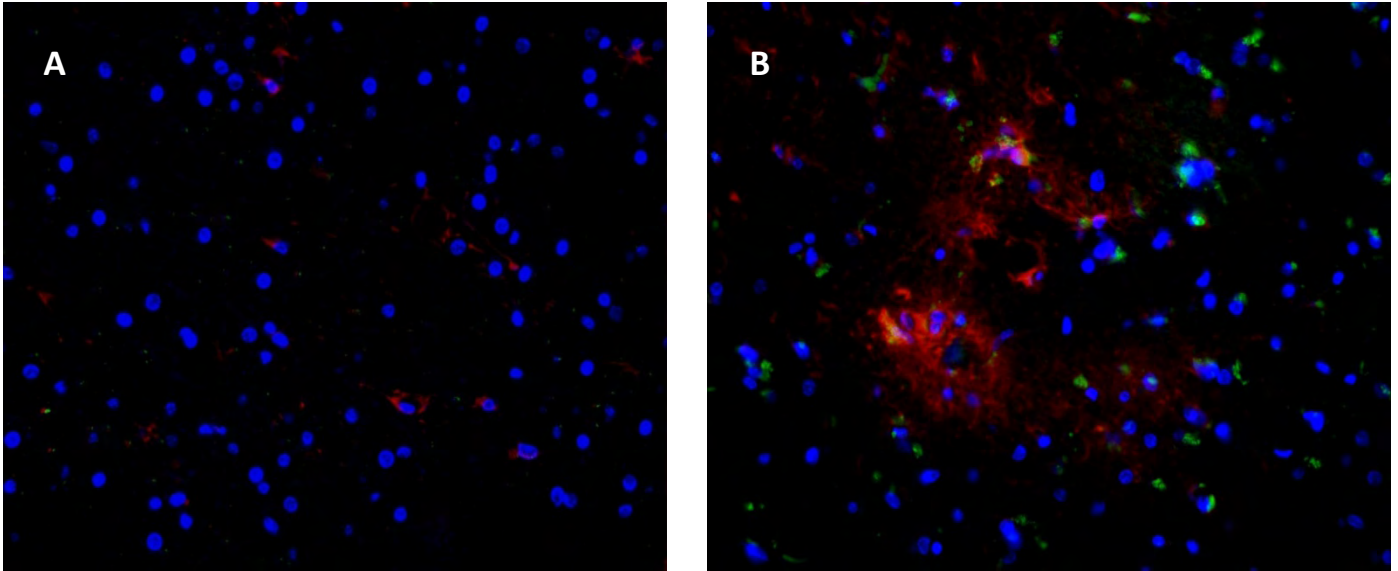


Fig. 14 Expresión de HSP27. Micrografía obtenida a partir de una triple marca de HSP27 (verde), GFAP (rojo) y Núcleos (azul), en microscopia de fluorescencia. Tejido de corteza frontal de A) paciente control B) paciente diagnosticado con EA.

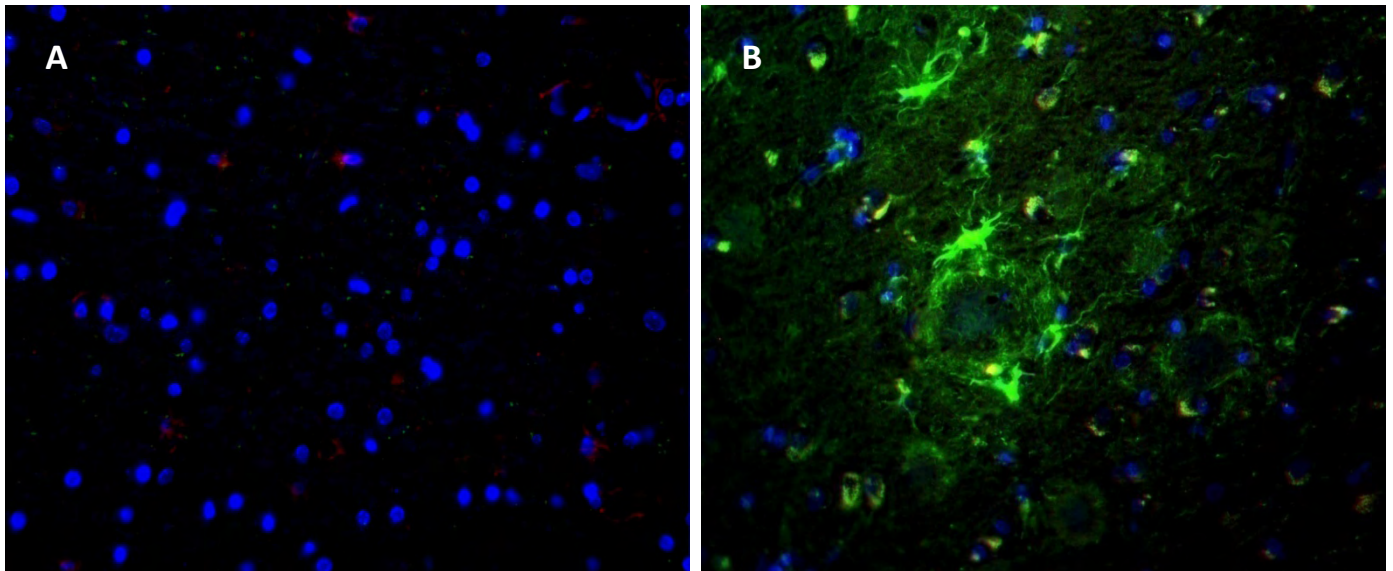


Fig. 15 Expresión de HSP60. Micrografía obtenida con microscopia de fluorescencia a partir de una triple marca de A) HSP60 (verde), GFAP (rojo) y Núcleos (azul), en tejido de corteza frontal control. B) HSP60 (rojo), GFAP (verde) y Núcleos (azul), en tejido de corteza frontal de paciente diagnosticado con EA.

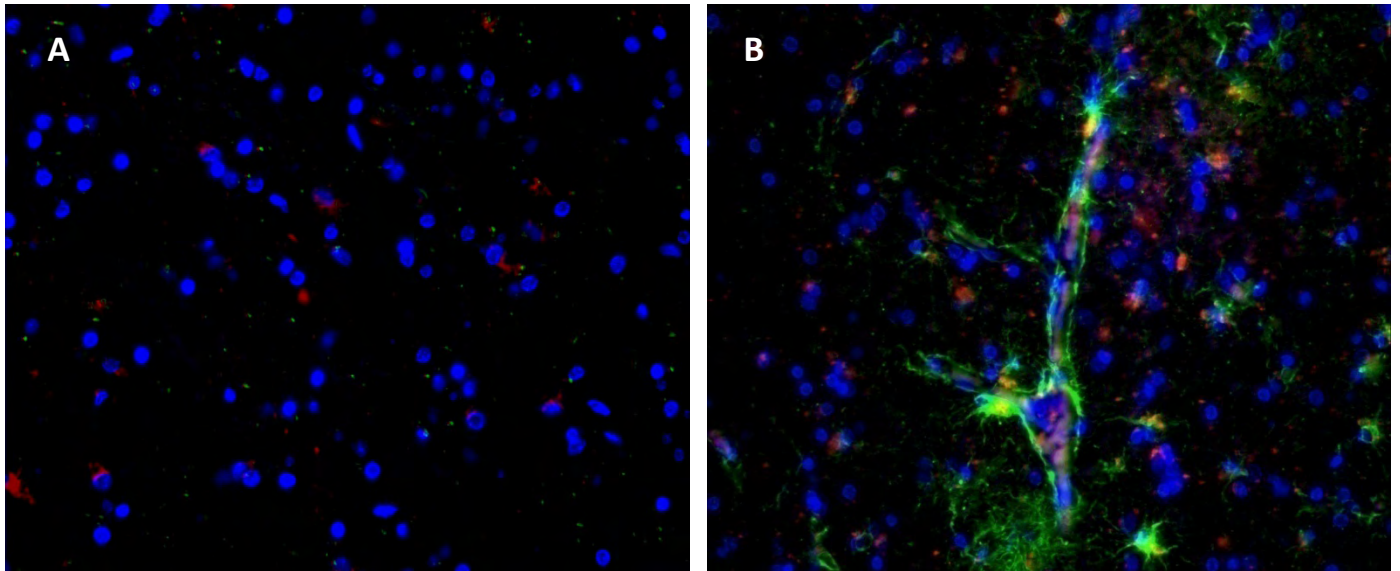


Fig. 16 Expresión de HSP70. Micrografía obtenida con microscopia de fluorescencia a partir de una triple marca de A) HSP70 (verde), GFAP (rojo) y Núcleos (azul), en tejido de corteza frontal control. B) HSP70 (rojo), GFAP (verde) y Núcleos (azul), en tejido de corteza frontal de paciente diagnosticado con EA.

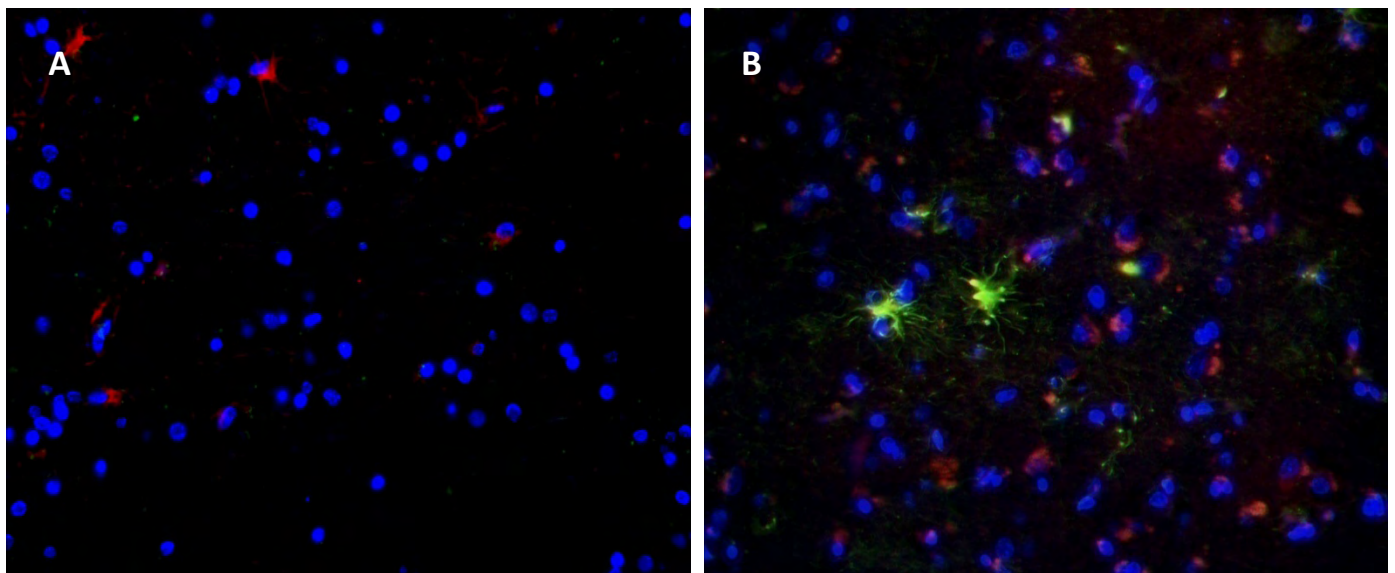


Fig. 17 Expresión de HSP90. Micrografía obtenida con microscopia de fluorescencia a partir de una triple marca de A) HSP90 (verde), GFAP (rojo) y Núcleos (azul), en tejido de corteza frontal control. B) HSP90 (rojo), GFAP (verde) y Núcleos (azul), en tejido de corteza frontal de paciente diagnosticado con EA.

HSP	Expresión en controles	Expresión en EA	Asociación a astrocitos reactivos	Asociación a vasos sanguíneos	Asociación a placas
HSP90	----	++++	+++	++	----
HSP70	----	+++	----	+++	----
HSP27	----	++	----	----	+++
HSP60	----	+	++	----	+++

Tabla 13. Orden de expresión de las HSPs y su asociación a células gliales y vasos sanguíneos. +++++, +++, ++, +: Orden de mayor a menor expresión. ---: expresión nula.

5.2.3 Glicosilación de proteínas

Las modificaciones en la glicosilación se observaron por imágenes de microscopía de fluorescencia, con una triple marca. Las lectinas ALL, MRL y WGA se expresan en asociación a factores tróficos y HSPs (**Fig. 21**). WGA fue la lectina que mostró mayor expresión y en relación a los factores tróficos. Contrariamente, MRL es la lectina con menor expresión y asociación a los marcadores utilizados. Las tres lectinas muestran una mayor asociación con NCAM-PSA. El orden de expresión y de asociación entre las lectinas y los factores tróficos se muestra en la **Tabla 14**. Podemos observar que existe un procesamiento enzimático anormal de proteínas en EA, y modificaciones específicas en la glicosilación. Estas modificaciones se ven relacionadas con estructuras características de la EA y de la plasticidad reactiva.

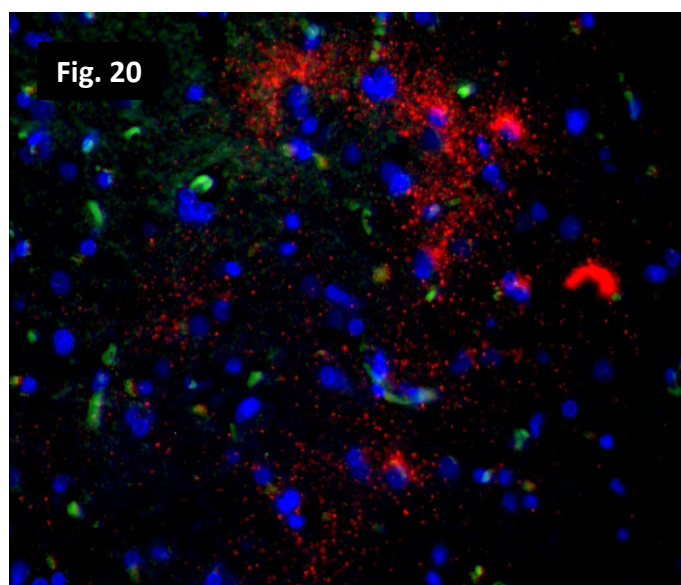
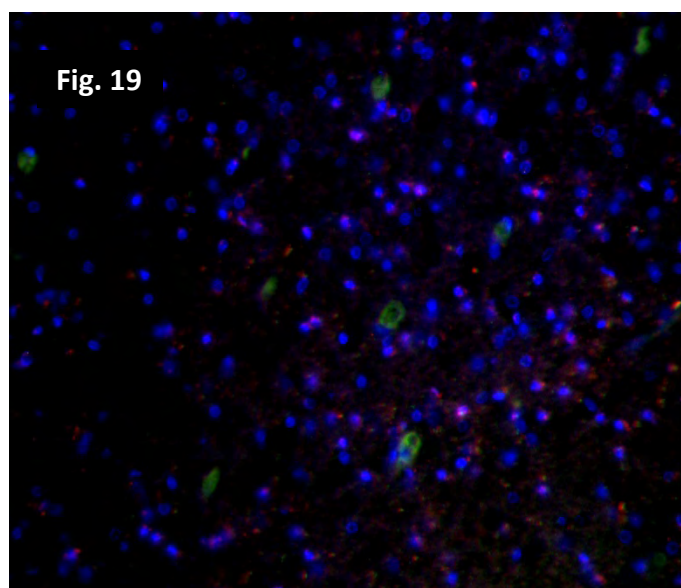
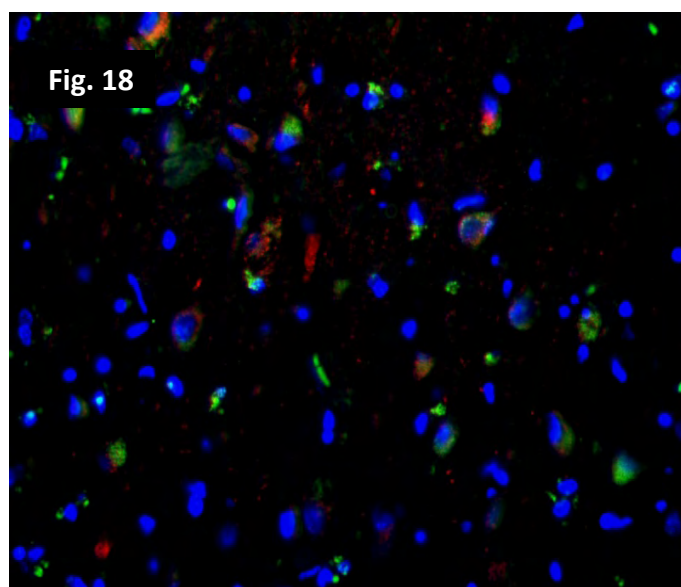
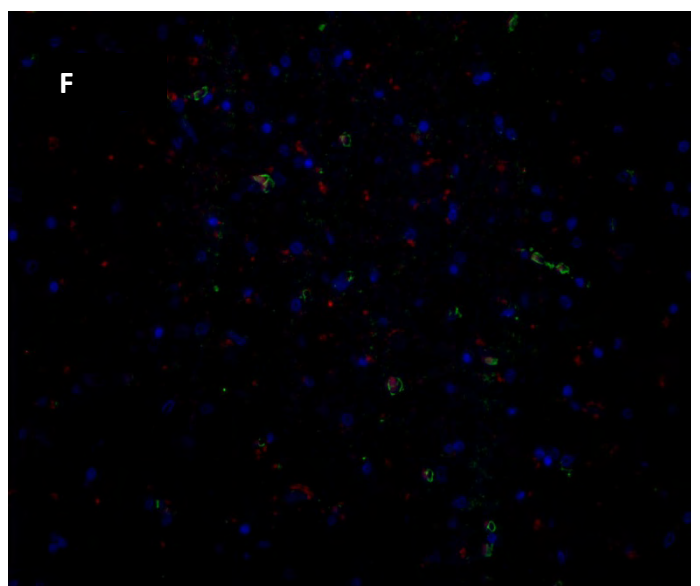
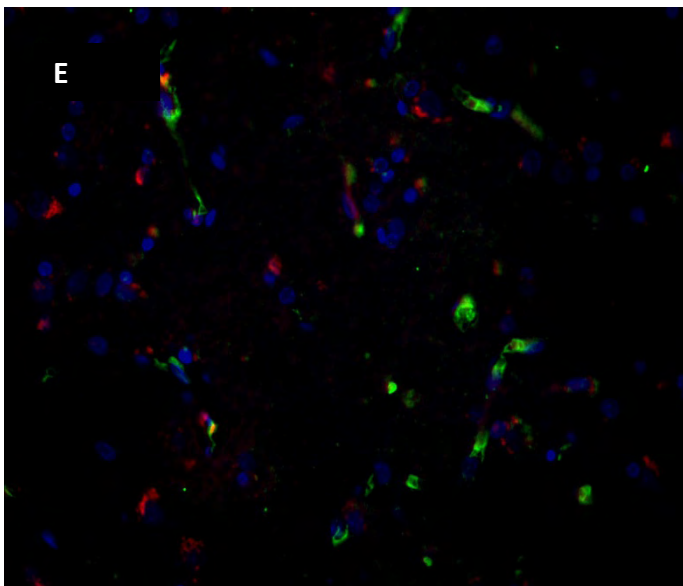
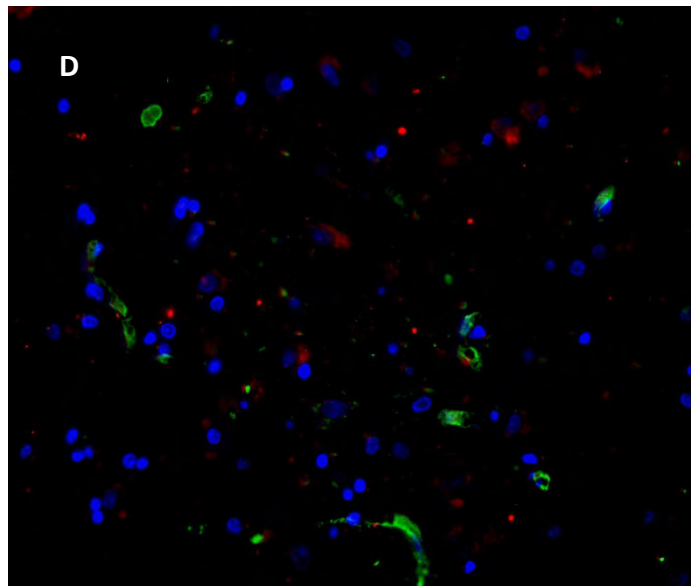
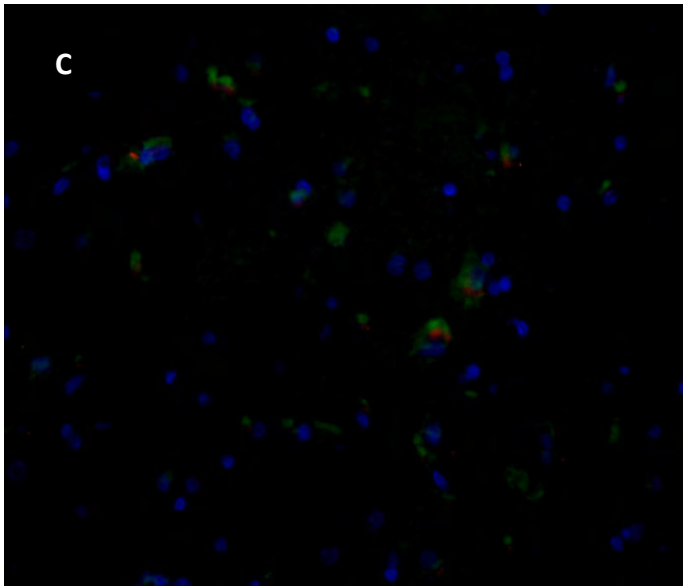
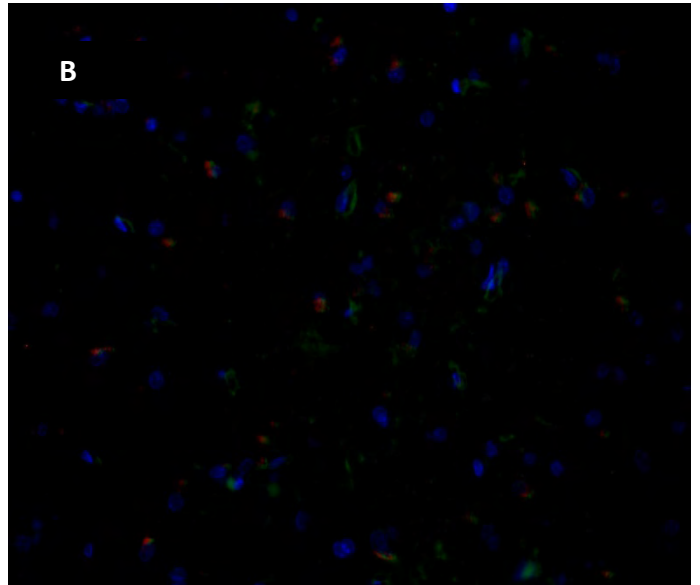
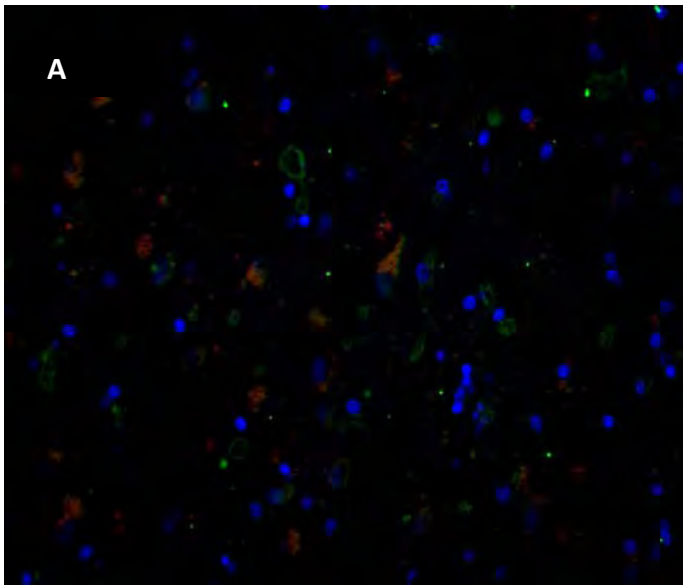


Fig. 18 Expresión de IGF-IIR en asociación a HSP60. Imagen obtenida por inmunofluorescencia de triple marca positiva a IGF-IIR (verde), HSP60 (rojo) y núcleos (azul) en corteza frontal de cerebro de pacientes con EA.

Fig. 19 Expresión de NCAM-PSA en asociación a HSP60. Imagen obtenida por inmunofluorescencia de triple marca positiva a NCAM-PSA (verde), HSP60 (rojo) y núcleos (azul) en corteza frontal de cerebro de pacientes con EA.

Fig. 20 Expresión de GAP-43 en asociación a HSP90. Imagen obtenida por inmunofluorescencia de triple marca positiva a GAP-43 (rojo), HSP90 (verde) y núcleos (azul) en corteza frontal de cerebro de pacientes con EA.



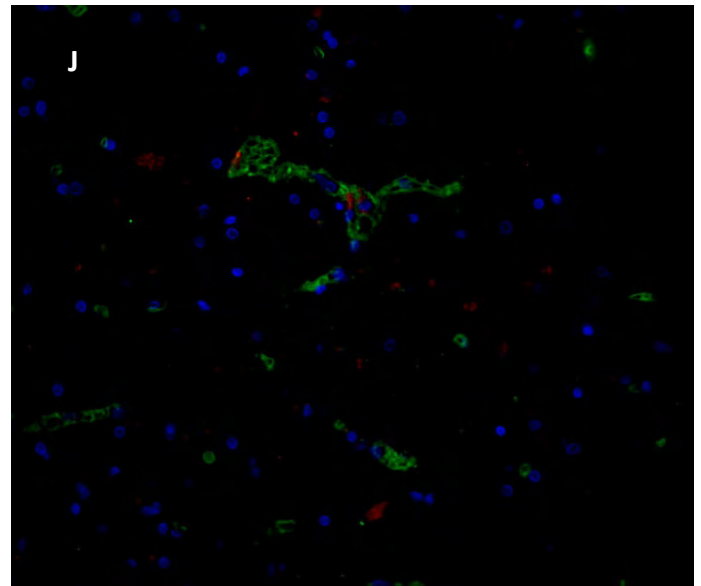
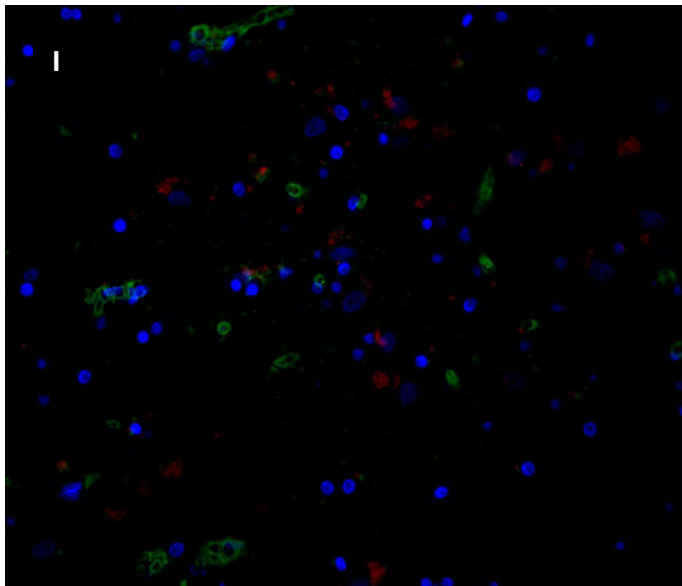
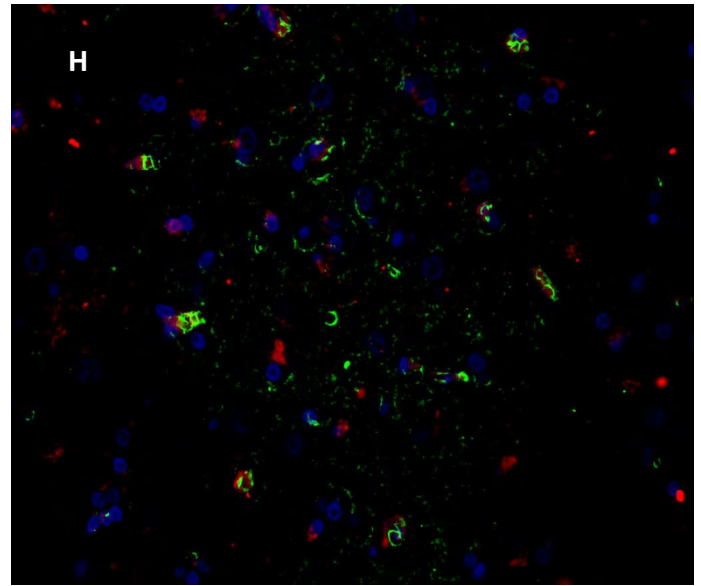
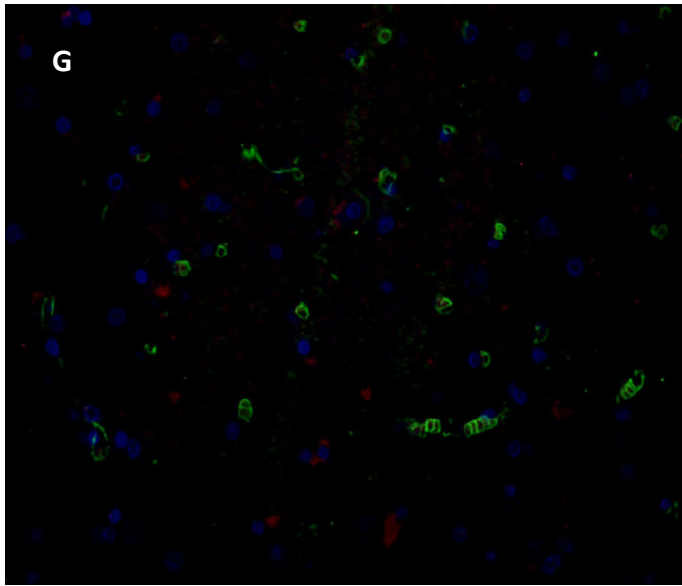


Fig. 21 Expresión de lectinas en asociación a factores tróficos. Microscopía de fluorescencia obtenida por una triple marca. Para todos los casos los núcleos están teñidos de azul. **A)** ALL (verde) y NCAM-PSA (rojo). **B)** MRL (verde) y NCAM-PSA (rojo). **C)** MRL (verde) y GAP-43 (rojo). **D)** WGA (verde) e IGF-IIR (rojo). **E)** WGA (verde) y NCAM-PSA (rojo). **F)** WGA (verde) y Sinaptofisina (rojo). **G)** WGA (verde) y GAP-43 (rojo). **H)** WGA (verde) y HSP27 (rojo). **I)** WGA (verde) y HSP60 (rojo). **J)** WGA (verde) y HSP70.

Lectinas	IGF-IIR	NCAM- PSA	GAP-43	Sinaptofisina
WGA	+++	+++	+++	+
ALL	++	+++	++	+
MRL	+	++	+	+

Tabla 14. Expresión y asociación de las lectinas y marcadores. Las lectinas utilizadas (ALL, MRL, WGA) y los diferentes marcadores (IGF-IIR, NCAM-PSA, GAP-43, Sinaptofisina). Sólo para el caso de WGA: HSP27, HSP60, HSP70, HSP90. **NP:** No se probó.

La existencia de factores tróficos nos indica un evento de degeneración temprana. Las lectinas se presentan en asociación a estos factores tróficos. Esto nos sugiere que las lectinas podrían utilizarse como herramientas bioquímicas en la búsqueda de un marcador extracerebral para el diagnóstico temprano de la EA.

Capítulo 6

DISCUSIÓN

Existe una gran necesidad de entender mejor la enfermedad de Alzheimer para poder acercarnos a un diagnóstico temprano y a un tratamiento efectivo. Los métodos de estudio de ésta patología se basan en análisis neuropsicológicos, estudios en animales, cultivo celular y estudios con tejido *post mortem*. Así, en éste trabajo, se analizaron los resultados de la evaluación neuropsicológica de los pacientes en vida, y su tejido *post mortem*. Se abordó desde diferentes perspectivas como son la plasticidad neuronal, la glicosilación anormal de proteínas y la neuroprotección. Eventos que pudieran parecer aislados pero que son parte conjunta del daño que causa ésta enfermedad. Los datos obtenidos en este proyecto ayudarán a acercarnos a un diagnóstico óptimo y temprano de la enfermedad de Alzheimer, a entender mejor la fisiopatología de éste padecimiento y así ofrecer tratamientos eficaces a los pacientes para una mejor calidad de vida.

Existen pocos estudios que asocian cognitivamente los datos histopatológicos. Recientemente, Ferrarini y cols. (2008)⁶⁹ proponen que existe una correlación entre el deterioro ventricular y la función cognitiva. Aunque la prueba neuropsicológica en la que se basaron (Exámen del estado mental mínimo de Folstein, MMSE)¹⁰, sea la más utilizada internacionalmente, no consideramos que sea suficiente para diagnosticar una DA. La batería de pruebas MMSE da como ventajas una aplicación de fácil manejo y en corto tiempo (aprox. 15 min). Sólo tiene fines de indicar si existe un daño cognitivo y deterioro en la demencia. Con estos antecedentes, Joannette y cols. (1994)¹¹, proponen que el PENO

(Protocolo de Evaluación Neuropsicológica Óptima) sea una batería de pruebas completa. Evalúa las diferentes FCS afectadas en la DA, y se obtiene un análisis específico de los pacientes para dar un diagnóstico de DA. En éste trabajo estudiamos la asociación de la evaluación cognitiva, valorada por el PENO y la expresión de diferentes lesiones histopatológicas encontradas en los cerebros *post mortem* de los pacientes con diagnóstico de DA. Encontramos que la expresión de placas positivas a A β , Tau y PNs; MNFs; NDs, GAP-43 y EM correlaciona con un deterioro en los pacientes con EA. Ésta correlación se refleja en las bajas puntuaciones de las pruebas neuropsicológicas para las funciones de Lenguaje, Memoria, Viso-Constructivo, Atención Espacial, Praxias y Gnosias. Observamos que existe una correlación inversa, específicamente entre la expresión de EM y la memoria. Con la expresión de las proteínas sinápticas, sugerimos que estas proteínas podrían reflejar un mecanismo compensatorio (plástico) a la muerte neuronal y a la desconexión sináptica que se presenta en el cerebro con EA.

Existen datos que apoyan la presencia de procesos de regeneración y plasticidad como un mecanismo compensatorio, ante el daño que se presenta en el SNC. Observamos una diferencia en la expresión de marcadores entre ambos hemisferios de los casos con EA. Ésta diferencia de expresión nos habla de una asimetría inter-hemisférica, lo cual se reportó en la literatura como un mecanismo probable de compensación neuronal. Otros datos clínicos reflejan que las personas con diagnóstico de demencia, evaluadas con Tomografía por Emisión de Positrones (PET), muestran una disminución en la asimetría hemisférica cuando

se les realizan pruebas de actividad frontal y memoria. Sugieren que ésta disminución en la asimetría hemisférica se dé por un mecanismo compensatorio ante los daños cognitivos que sufre el paciente⁷⁰. Así mismo, Avila y cols. (2004)⁷¹, observan una disminución en la activación del giro parahipocampal izquierdo en pacientes con deterioro cognitivo y EA, por medio de Resonancia Magnética Funcional (RMf). En éste trabajo hemos encontrado una diferencia en la expresión de los diferentes marcadores utilizados en los cerebros con EA, mostrando una tendencia de expresión, mayor en el hemisferio izquierdo. Cabeza y cols. (2000)⁷², encuentran un incremento en la actividad prefrontal izquierda. Proponen que puede ser interpretada como compensatoria. Sugieren que los cambios relacionados con la edad en cuanto a la actividad cerebral, son región y proceso-específicos, y que se involucran incrementos o decrementos de ésta actividad dependiendo de la actividad neuronal. Nosotros observamos que el proceso de degeneración y de plasticidad es específico en los casos de EA. Así, se apoya la idea de que existe una actividad compensatoria. Esta idea se apoya también en estudios con RMf en ancianos. Grady y cols. (1994)⁷³, encontraron que ante tareas de memoria, los pacientes tuvieron una actividad disminuida en el lóbulo occipital, aunque hubo un aumento en la corteza pre frontal. Proponen que existe un mecanismo probable de compensación de las funciones corticales superiores. De acuerdo a ésta hipótesis de compensación, se observa que en pacientes adultos existe un incremento en la actividad frontal. Éstos datos correlacionan inversamente con un decremento en la actividad occipital^{74, 75}. Se piensa que se lleve a cabo un mecanismo compensatorio, de tal manera que se aumente la expresión de proteínas sinápticas en lesiones específicas⁹. La expresión de

proteínas sinápticas nos habla de un evento de plasticidad neuronal. De tal manera que las propuestas que destacan en la explicación de la EA son: la pérdida neuronal⁷⁶ y la alteración a nivel sináptico. Los estudios realizados con proteínas de membrana como la sinaptofisina han ofrecido hasta el momento datos contradictorios entre la densidad de eventos sinápticos, en cerebros con EA y controles. Mientras la mayoría ofrece evidencia acerca de que existe una disminución en los casos con EA^{49, 77, 78, 79, 80}. Guevara y cols. (2004)⁴, sugieren que no existe diferencia significativa en la expresión de ésta proteína entre casos con EA y controles. Gracias a la cuantificación de ésta proteína, nuestro grupo de trabajo evidenció la presencia de estructuras de gran tamaño, llamadas “Estructuras Meganeuríticas” (EM). El tamaño de las EM sugiere que pueden existir diferentes moléculas que participan en un evento de plasticidad neuronal anormal. Así se propone la existencia de mecanismos que se activan durante la sinaptogénesis en el cerebro.

Para encontrar los mecanismos de regeneración activados en la EA, exploramos la expresión de marcadores específicos del crecimiento de las terminales sinápticas y factores del crecimiento y adhesión celular (GAP-43, IGF-II y NCAM-PSA). Estos factores tróficos, alcanzan su máximo nivel de expresión en la etapa del desarrollo embrionario. Posteriormente disminuyen su expresión. En este trabajo, encontramos expresión aumentada de GAP-43 en los casos con EA, contrariamente a otros resultados publicados, en donde se indica que existe disminución de la concentración de ésta proteína⁸¹. IGF-II se expresa en cerebros de pacientes adultos con EA, lo que sugiere que la expresión de éste factor

revierte la expresión del IGF-I. Esta conclusión se debe a que IGF-I se debería encontrar en la corteza cerebral del adulto normal, para favorecer el crecimiento y remodelaje neurítico. El hecho de que IGF-II se exprese en cerebro de pacientes con diagnóstico de EA, sugiere que IGF-II participa en procesos de regeneración. Esto ya se planteó por nuestro grupo de trabajo²⁴. Existen datos que apoyan la posibilidad de que los factores tróficos tengan un papel terapéutico en diferentes enfermedades neurodegenerativas⁸². También se ha reportado que IGF-II, bloquea la actividad neurotóxica de péptidos derivados de la proteína amiloide- β en cultivo neuronal²⁵.

Otro dato que apoya un evento plástico en los cerebros de pacientes con EA, es la expresión de NCAM-PSA. Existen evidencias que afirman que durante el desarrollo del SNC, NCAM-PSA promueve la plasticidad mediante la interacción célula-célula. Participa en la migración celular y el desarrollo neurítico^{83, 29}. Forma parte importante del proceso de aprendizaje⁸⁴. La expresión de NCAM-PSA, aumentó en los casos con EA en comparación con los casos control. Proponemos que puede ayudar a optimizar el contacto sináptico entre las neuronas, o a restaurar circuitos dañados. En general, estos factores tróficos se expresan en los cerebros con EA, de manera similar a la manera en que se expresan en el desarrollo embrionario en condiciones normales. Con éstos resultados, pensamos que se expresan en gran cantidad para participar en el mantenimiento de la remodelación sináptica, o como un mecanismo de regeneración. Probablemente, el motivo de su expresión sea para compensar la muerte neuronal acelerada. Con ésta información se pretende dar soporte clínico a la explicación de los cambios en

el fenómeno de degeneración en la EA. De ésta manera, abrir posibilidades de tratamientos farmacológicos para éste padecimiento. Para ofrecer tratamientos adecuados, es importante establecer asociaciones entre los datos obtenidos por estudios patológicos y las manifestaciones clínicas de los pacientes. Con ésta idea, podremos conducirnos a un posible diagnóstico temprano. Existen pocos trabajos en la literatura que correlacionen la patología en EA, con el deterioro cognitivo de los pacientes. En 1995, Dikson y cols.⁸⁵, proponen que existe una correlación entre marcadores patológicos y sinápticos con la función cognitiva de personas adultas. Concluyen que los marcadores sinápticos son indicativos de cambios en el citoesqueleto, que tienen como consecuencia la formación de MNFs. Este grupo de trabajo, propone que los marcadores sinápticos son un mejor indicativo de que existe demencia, más que tomar en cuenta la pérdida sináptica como generalmente se propone.

Mesulam (2000)⁸⁶ mantiene la hipótesis de que el aumento de la plasticidad como un mecanismo adaptativo, tiene como consecuencia la sobre regulación de la fosforilación de tau y APP. Ésta sobre regulación tiene como consecuencia la formación de las MNFs y las PNs. El Dr. Perry *et al* (1991)⁸⁷, proponen que la formación de MNFs y PNs sea el resultado de cambios conformacionales de las proteínas como respuesta al estrés oxidativo. También que en ciertas condiciones las MNFs y PNs se pueden glucosilar, y cambiar sus propiedades físico-químicas. Esto nos da la idea de indagar el fenómeno de glicosilación. Así, Guevara y cols. (1998)⁹, aportan la primera evidencia de que las proteínas tau y A β están anormalmente glicosiladas, con patrones específicos de

O-glicosilación y de 9-O-acetil-sialilación. Con esto, se puede pensar que las proteínas Tau y A β son el blanco de diferentes enzimas, capaces de agregar grupos sacarídicos. Las lectinas *Amaranthus leucocarpus* (ALL) y *Macrobrachium rosenbergii* (MRL) tienen alta especificidad y permiten observar modificaciones postraduccionales de las proteínas Tau y A β en la EA⁹. En éste trabajo observamos la asociación de estas dos lectinas con los diferentes marcadores. Por primera vez ofrecemos resultados de la expresión de la lectina WGA, asociada a marcadores que indican un evento de plasticidad reactiva en la EA. ALL es específica para residuos de GalNAc en proteínas O-glicosiladas⁸⁸. La reactividad a ALL evidencia alteraciones en la maquinaria de O-glicosilación de factores tróficos y moléculas involucradas en el daño producido en la EA. Se ha propuesto que poblaciones celulares ALL+ tienen alta resistencia a la apoptosis⁸⁹, lo cual apoya la idea de que exista un evento de compensación y defensa ante la muerte neuronal. La reactividad a las lectinas MRL y WGA también nos refleja la participación de diferentes tipos de glicoconjugados en eventos de plasticidad reactiva. El hecho de que las lectinas identifiquen estructuras oligosacarídicas con marcadores asociados a factores tróficos, característicos del estado fetal, nos indica que posiblemente, ante la muerte masiva de neuronas en la EA, el SNC responde con un intento de regeneración. Éste evento puede ser compensatorio, aunque pareciera ser que el sistema se encuentra fuera de control, por lo que la regeneración se convierte en un proceso de regeneración anormal. La importancia del reconocimiento de las lectinas y las lesiones histopatológicas en EA, sugiere la

existencia de receptores que podrían ser útiles como marcadores extracerebrales de degeneración temprana.

Sabemos que la funcionalidad de las proteínas y su especificidad, radican en su conformación tridimensional. Al ser modificada su conformación por diferentes procesos enzimáticos, se vuelven susceptibles. Ante este daño, existen moléculas chaperonas como las HSPs que le devuelven a la proteína su estructura tridimensional original. Sugerimos que la expresión de las HSPs en los cerebros con EA sea un mecanismo de protección neuronal. Todos los factores tróficos se expresan en conjunto con las diferentes HSPs. Proponemos que se asocian para tratar de revertir el daño que causa la enfermedad. El GFAP nos indica el daño causado en el SNC de EA (expresión en los astrocitos reactivos). Todas las HSPs estudiadas en este trabajo se expresaron en los cerebros con EA al contrario de los controles. Sugerimos que puede participar entonces en un evento protector, ya que se ha visto que las HSPs contribuyen al re arreglo conformacional de proteínas aberrantes por el proteosoma⁹⁰.

Estos eventos nos indican que en los pacientes con EA puede existir un evento de plasticidad cerebral activa, aunque al disminuir el número de neuronas para la reconexión y remodelaje sinápticos, la sinaptogénesis que se presenta se podría convertir en un mecanismo de crecimiento reverberante e incontrolable y dar así como resultado un evento de neurodegeneración (patológico y cognitivo).

Capítulo 7

CONCLUSIONES

El PENO se puede utilizar como una herramienta neuropsicológica óptima y sensible para el diagnóstico de DA.

El proceso de degeneración y plasticidad es específico en la EA y correlaciona con el deterioro cognitivo de las FCS.

En los cerebros de pacientes con EA existe un fenómeno de plasticidad reactiva que se asocia a la expresión de factores tróficos.

La correlación inversa entre la evaluación neuropsicológica y los factores tróficos nos indica que tienen un papel compensatorio.

Existe un defecto en la O-glicosilación de proteínas.

Se expresan moléculas chaperonas como mecanismo de neuroprotección ante el daño causado en el SNC.

Existe un evento de plasticidad reactiva en los cerebros con EA, el cual correlaciona con el deterioro cognitivo de los pacientes. La plasticidad reactiva se asocia a modificaciones en la glicosilación de proteínas y a un evento neuroprotector.

Capítulo 8

PERSPECTIVAS

- ✓ Extender los resultados encontrados en el evento de glicosilación anormal de proteínas, con una población mayor y asociar éstos resultados también a los de evaluación neuropsicológica.
- ✓ Asociar los resultados de los estudios patológicos a la evaluación clínica para acercarnos a un diagnóstico temprano y certero de la DA.
- ✓ Encontrar marcadores moleculares (como el uso de las lectinas), con métodos no invasivos.
- ✓ Tener un análisis multidisciplinario para los pacientes con DA y ofrecer un mejor diagnóstico y tratamiento, para aumentar la calidad de vida de los pacientes.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Annaert W. y De Strooper B (2002). A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18:25-51
- ² Iqbal K, Grundke-Iqbal I. (1998) Tau phosphatase activity as a therapeutic target for AD. *Drug news perspect.* 11:10-14
- ³ Cappai R y Barnham KJ (2008). Delineating the mechanism of Alzheimer's disease A-beta peptide neurotoxicity. *Neurochem Res.* 33:526-532
- ⁴ Guevara J, Dilhuydy H, Espinosa B, Delacourte A, Quirion R, Mena R, Joannette Y, Zenteno E, Robitaille Y. (2004) Coexistence of reactive plasticity and neurodegeneration in Alzheimer diseased brains. *Histol Histopathol.* 19:1075-1084
- ⁵ Corder EH, Woodbury MA, Volkman I, Madsen DK, Bogdanovic N, Winblad B (2000). Density profiles of Alzheimer disease regional brain pathology for the Huddinge brain bank: pattern recognition emulates and expands upon Braak Staging. *Exp Gerontol.* 35:851-864
- ⁶ Masliah E, Hansen L, Albright T, Mallory M, Terry RD (1991). Immunoelectron microscopic study of synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 81:428-433
- ⁷ Leube R, Leimer U, Grund C, Franke W, Harth N, Wiedenmann B. (1994) Sorting of synaptophysin into special vesicles in noneuroendocrine epithelial cells. *J Cell Biol.* 127:1589-1601
- ⁸ Wiedenmann B., Franke W., Kuhn C., Moll R. y Gould V. (1986). Synaptophysin: A marker protein for neuroendocrine cell and neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:3500-3504
- ⁹ Guevara J., Espinosa B., Zenteno E., Vazquez L., Luna J., Perry G. y Mena R. (1998). Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 57:905-14
- ¹⁰ Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. (1975) Mini-Mental State Examination: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr. Res.* 12:189-198
- ¹¹ Joannette Y, Belleville S, Roch A, Peretz I, Poissant A, Ska B. (1994). Evaluación neuropsicológica de la demencia: sistemática óptima. En: Del Ser T, Peña J.

Evaluación neuropsicológica y funcional de la demencia. *J. R. Proas Editores*. 117-126.

¹² Hodges HR (1998). The amnesic prodrome of Alzheimer disease. *Brain*. 121:1601-1602

¹³ Tounsi H, Deweer B, Ergis AM (1999). Sensitivity to semantic cueing: an index of episodic memory dysfunction in early Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Rel Disord*. 13:38-46

¹⁴ Devenand D, Jacobs DM, Tang MX (1997). The course of psychopathologic features in mild to moderate Alzheimer's disease. *Arch Gen Psychiatry*. 54:257-263

¹⁵ Crutch SJ, Rossor MN, Warrington EK (2007). The quantitative assessment of apraxic deficits in Alzheimer's disease. *Cortex*. 43:976-986

¹⁶ García-Sánchez C, Estévez-González A, Boltes A, Otermín P, López-Góngora M, Gironell A, Kulisevsky J (2003). Cognitive and functional decline in the stage previous to the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurología*. 18:716-722

¹⁷ Salthouse TA, Babcock RL, Shaw RJ (1991). Effects of adult age on structural and operational capacities in working memory. *Psychol Aging*. 6:118-127

¹⁸ Salthouse TA (1996) (b). The processing-speed theory of adult age differences in cognition. *Psychol Rev*. 103:403-428

¹⁹ Salthouse TA (1996) (a). General and specific speed mediation of adult age differences in memory. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*. 51:30-42

²⁰ Hasher L, Stoltzfus ER, Zacks RT, Rypma B (1991). Age and inhibition. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn*. 17:163-169

²¹ Lindenberger U, Baltes PB (1994). Sensory functioning and intelligence in old age: a strong connection. *Psychol Aging*. 9:339-355

²² Trejo J, Piriz J, Lorens-Martin MV, Fernandez AM, Bolós M, Leroith D, Nuñez A, Torres-Aleman I (2007). Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol Psychiatry*. 12:1118-1128

²³ De la Monte S, Ng S, Hsu D. (1995). Aberrant GAP-43 gene expression in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 147:934-946

- ²⁴ Kar S, Poirier J, Guevara J, Dea D, Hawkes C, Robitaille Y, Quirion R. (2006). Cellular distribution of insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor in normal human brain and its alteration in Alzheimer's disease pathology. *Neurobiology of aging*. 27:199-210
- ²⁵ Dore S, Kar S, Quirion R (1997). Rediscovering an old friend, IGF-I: potential use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*. 8:326-331
- ²⁶ Bogdanovic N, Davidsson P, Volkman I, Winblad B y Blennow K. (2000). Growth-associated protein GAP-43 in the frontal cortex and in the hippocampus in Alzheimer's disease: an immunohistochemical and quantitative study. *J. Neural Transm*. 107:463-478
- ²⁷ [Basi G, Jacobson R, Virag I, Schilling J, Skene J.](#) (1987). Primary structure and transcriptional regulation of GAP-43, a protein associated with nerve growth. *Cell*. 49:785-791
- ²⁸ Breese C, Ingram R, Sonntag W. (1991). Influence of age and long-term dietary restriction on plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-I gene expression, and IGF-I binding proteins. *J Gerontol*. 46:180-187
- ²⁹ Ronn L, Berezin V, Bock E. (2000) The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int. J. Devl. Neuroscience*. 18:193-199.
- ³⁰ Gascon E, Vutskits L, Kiss JZ (2007). Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev*. 56:101-118
- ³¹ Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C (2008). Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med*. Artículo en prensa.
- ³² Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G (2001). Heat Shock Proteins: Endogenous Modulators of apoptotic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 286:433-442.
- ³³ Ayala G., Tapia R. (2003). Expression of heat shock protein 70 induced by 4-aminopyridine through glutamate-mediated excitotoxic stress in rat hippocampus in vivo. *Neuropharmacology*. 45:649-660
- ³⁴ Guinez C., Lemoine J., Michalski J.C. y Lefebvre T. (2004). 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-

acetylglucosamine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 319:21-26

³⁵ Cyr DM, Höhfeld J, Patterson C (2002). Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci*. 27:368-375

³⁶ Muchowski PJ, Schaffar G, Sittler A, Wanker EE, Hayer-Hartl MK and Hartl FU (2000) Hsp 70 and hsp 40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 97:7841-7846

³⁷ Agarraberes FA, Dice JF (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrana is required for proteina translocation. *J. Cell Sci*. 114:2491-2499

³⁸ Nadeau K, Das A, Walsh CT. (1993) Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J Biol Chem*. 268:1479-87

³⁹ Espinosa B, Zenteno R, Mena R, Robitaille Y, Zenteno E, Guevara J (2001). O-Glycosylation in sprouting neurons in Alzheimer disease, indicating reactive plasticity. *J Neuropathol Exp Neurol*. 60:441-448.

⁴⁰ Espinosa B, Guevara J, Hernández P, Slomianny MC, Guzmán A, Martínez-Cairo S, Zenteno E (2003). Characterization of a O-Glycosylated plaque-associated protein from Alzheimer disease brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 62:34-41

⁴¹ Lis H, Sharon N (1993). Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem*. 218:1-27

⁴² Jürgen R. (1987) Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *BBA*; 405-436

⁴³ Jiménez M, Trejo H, Herrera A, Romero J, Chávez R, Lascurain R y Zenteno E (2002). Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. *Rev. Inst. Val. Enf. Resp. Mex*. 15:39-47

⁴⁴ Goldstein IJ (1980). What should be called lectin. *Nature* 285:66-68

⁴⁵ Hernández P, Bacilio M, Porras F, Juárez S, Debray H, Zenteno E, Ortiz B (1999). A comparative study on the purification of the *Amaranthus leucocarpus* syn. *Hypocondriacus* lectin. *Prep Biochem Biotechnol*. 29:219-234

- ⁴⁶ Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, De Teresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* 30:572-580
- ⁴⁷ Scheff SW y Price D. (1993). Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 33:190-199
- ⁴⁸ DeKosky ST y Scheff SW, Styren DS (1996). Structural correlates of cognition in dementia: Quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration.* 5:417-421
- ⁴⁹ Masliah E, Honer WG, Mallory M, Kusher P, Hansen L, Terry R (1994). Topographical distribution of synaptic-associated proteins in the neuritic plaques of Alzheimer's disease hippocampus. *Acta Neuropathol.* 87:135-142
- ⁵⁰ Gertz HJ, Cervos-Navarro J, Ewald V (1987). The septo-hippocampal pathway in patients suffering from senile dementia of Alzheimer's type. Evidence for neuronal plasticity? *Neuroscience Letters.* 76:228-232
- ⁵¹ Geddes JW, Monaghan DT, Cotman CW, Lott IT, Kim RC, Chui HC (1985). Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science.* 230:1179-1181
- ⁵² Cotman C, Hailer N, Pfister K, Soltesz I, Schachner M (1998). Cell adhesion molecules in neural plasticity and pathology: similar mechanisms, distinct organizations?. *Progress in Neurobiology.* 55:659-669
- ⁵³ Kiss JZ y Muller D (2001). Contribution of the neural cell adhesion molecule to neuronal and synaptic plasticity. *Rev Neurosci.* 12:297-310
- ⁵⁴ [Kang J](#), [Lemaire HG](#), [Unterbeck A](#), [Salbaum JM](#), [Masters CL](#), [Grzeschik KH](#), [Multhaup G](#), [Beyreuther K](#), [Müller-Hill B](#) (1987). The precursor of Alzheimer disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325:733-736
- ⁵⁵ Weidemann A, Koning G, Bunke D *et al*, (1989). Identification, biogenesis and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell.* 57:115-126
- ⁵⁶ Wang J-Z, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996). Glycosylation of microtubule-associated protein tau: An abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nature Med.* 2:871-875

- ⁵⁷ Subbarao SA y Csermely P (2004). Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. A comprehensive review. *Pharmacology and therapeutics*. 101:227-257
- ⁵⁸ Fonte V, Kapulkin V, Taft A, Fuet A, Friedman D, Link CD (2002). Interaction of intracellular β amyloid peptide with chaperone proteins. *PNAS*. 99:9439-9444
- ⁵⁹ Fonte V, Kipp DR, Yerg J 3rd, Merin D, Forrestal M, Wagner E, Roberts CM, Link CD (2008). Suppression of in vivo beta amyloid peptide toxicity by overexpression of the HSP-16.2 small chaperone protein. *J Biol Chem*. 283:784-791
- ⁶⁰ Veereshwarayya V, Kumar P, Rosen KM, Mestril R, Querfurth HW (2006). Differential effects of mitochondrial heat shock protein 60 and related molecular chaperones to prevent intracellular b-Amyloid-induced inhibition of complex IV and limit apoptosis. *The journal of biological chemistry*. 281:29468-29478
- ⁶¹ Dzaman-Serafin S, Telatynska-Mieszek B, Ciechanowski K (2005). Heat shock proteins and their characteristics. *Pol Merkur Lekarski*. 19:215-219
- ⁶² Fleisher AS, Sun S, Taylor C, Ward CP, Gamst AC, Petersen RC, Jack CR Jr, Aisen PS, Thal LJ (2008). Volumetric MRI vs clinical predictors of Alzheimer disease in mild cognitive impairment. *Neurology*. 70:191-199
- ⁶³ Smith EE, Egorova S, Blacker D, Killiany RJ, Muzikansky A, Dickerson BC, Tanzi RE, Albert MS, Greenberg SM, Guttmann CR (2008). Magnetic resonance imaging white matter hyperintensities and brain volume in the prediction of mild cognitive impairment and dementia. *Arch Neurol*. 65:94-100
- ⁶⁴ Van de Pol LA, Korf ES, van der Flier WM, Brashear HR, Fox NC, Barkhof F, Scheltens P (2007). Magnetic resonance imaging predictors of cognition in mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 64:1023-1028
- ⁶⁵ Dickson DW, Crystal HA, Marttice LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH, Aronson MK (1992). Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging*. 13:179-189
- ⁶⁶ Khachaturian ZS (1985). Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol*. 42:1097-1105
- ⁶⁷ Mirra SS, Heyman A, McKell D, et al (1991). The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 41:479-486

- ⁶⁸ Vázquez L, Massó F, Rosas P, Montaña LF, Zenteno E (1993). Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (crustacea, decapoda) hemolymph. *Comp Biochem Physiol.* 105:617-623
- ⁶⁹ Ferrarini L, Palm WM, Olofsen H, van der Landen R, Blauw GJ, Westendorp R, Bollen E, Middelkoop H, Reiber J, van Buchem MA, Admiraal-Behloul F (2008). MMSE scores correlate with local ventricular enlargement in the spectrum from cognitively normal to Alzheimer disease. *NeuroImage.* 39:1832-1838
- ⁷⁰ Cabeza R, Grady C, Nyberg L, McIntosh A, Tulving E, Kapur S, Jennings J, Houle S, Craik F (1997). Age-related differences in neural activity during memory encoding and retrieval: A Positron Emission Tomography Study. *The Journal of Neuroscience.* 17:391-400
- ⁷¹ Avila C, Parcet MA, Barros A, Forn C, Mallol R, Gonzalez Darder JM, Feliu Tatay R, Martinez Lozano MD, Campos Hernandez S (2004). Memory evaluation using functional magnetic resonance: applications in preoperative patients and in Alzheimer's disease. *Rev. Neurol.* 38:284-291
- ⁷² Cabeza R, Anderson ND, Houle S, Mangels JA, Nyberg L (2000). Age-related differences in neural activity during item and temporal-order memory retrieval: a positron emission tomography study. *J Cogn Neurosci.* 12:197-206
- ⁷³ Grady C, Maisog J, Horwitz B, Ungerleider L, Mentis M, Salerno J, Pietrini P, Wagner E, Haxby J (1994). Age-related changes in cortical blood flow activation during visual processing of faces and location. *The Journal of Neuroscience.* 14: 1450-1462
- ⁷⁴ Cabeza R, Daselaar SM, Dolcos F, Prince SE, Budde M, Nyberg L (2004). Task-independent and Task-specific age effects on brain activity during working memory, visual attention and episodic retrieval. *Cerebral cortex.* 14:364-375
- ⁷⁵ Davis SW, Dennis NA, Daselaar SM, Fleck MS, Cabeza R (2007). Qué PASA? The posterior-Anterior Shift in Aging. *Cerebral Cortex.* 1-9
- ⁷⁶ Gómez-Isla T, Price JL, McKeel Jr DW, Morris JC, Growdon JH, Hyman B (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience.* 16:4491-4500
- ⁷⁷ Honer WG, Dickson DW, Gleeson J, Davies P (1992). Regional synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 13:375-382

- ⁷⁸ Lassmann H, Weiler R, Fisher P, Bancher C, Jellinger K, Floor E, Danielczyk W, Seitelberger F, Winkler H. (1992). Synaptic pathology in Alzheimer's disease: immunological data for markers of synaptic and large dense-core vesicles. *Neuroscience*. 46:1-8
- ⁷⁹ Zhan SS, Beyreuther K, Schmitt HP (1993). Quantitative assessment of the synaptophysin immune-reactivity of the cortical neuropil in various neurodegenerative disorders with dementia. *Dementia*. 4:66-74
- ⁸⁰ Reddy PH, Mani G, Park BS, Jacques J, Murdoch G, Whetsell W Jr, Kaye J, Manczak M (2005). Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *J Alzheimers Dis*. 7:103-117
- ⁸¹ Masliah E, Mallory M, Hansen L, Alford M, DeTeresa R, Terry R, Baudier J, Saitoh T (1992). Localization of amyloid precursor protein in GAP43-immunoreactive aberrant sprouting neurites in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 574:312-316.
- ⁸² Gasparini K and Xu H. (2003). Potential roles of insulin and IGF-1 in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 26:404-406
- ⁸³ Bonfanti L (2006) PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Progress in Neurobiology*. 80:129-164
- ⁸⁴ Fox G, Ficera G, Barry T, O'Connell A, Gallagher HC, Murphy K, Regan C (2000) Consolidation of passive avoidance learning is associated with transient increases of polysialylated neurons in layer II of the rat medial temporal cortex. *J Neurobiol*. 45:135-141
- ⁸⁵ Dickson DW, Crystal HA, Bevona C, Honer W, Vincent I, Davies P (1995). Correlation of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiology of Aging*. 16:285-304
- ⁸⁶ Mesulam MM (2000). A plasticity-based theory of the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 924:42-52
- ⁸⁷ Perry G, Siedlak SL, Richey P, Kawai M, Cras P, Kalaria RN, Galloway PG, Scardina JM, Cordell B, Greenberg BD, et al (1991). Association of heparin sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J neurosci*. 11:3679-3683
- ⁸⁸ Hernández P, Tetaert D, Vergoten G, Debray H, Jimenez MC, Alvarez G, Agundis C, Degand P, Zenteno E (2004). Specificity of *Amaranthus leucocarpus*

syn. hypocondriacus lectin for O-glycopeptides. *Biochim Biophys Acta*. 1674:282-290

⁸⁹ Alvarez G, Lascurain R, Hernández-Cruz P, Yeyaert D, Degand P, Gorocica P, Espinosa B, Zenteno E, Chávez R (2006). O-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1760:1235-1240

⁹⁰ Chul YB, Hwan KS, Cairos N, Fountoulakis M and Lubec G (2001). Deranged expresión of molecular chaperones in brfains of patients with Alzheimer´s disease. *Bioch and Biophy Res Communic*. 280:249-258

ANEXOS: TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS Y SOLUCIONES

✓ ANEXO I: Solución Salina de Fosfatos (PBS), pH 7.4.

Solución A:

Fosfato monosódico NaH_2PO_4 43.8 g

Disolver en 250 ml de agua destilada

Solución B:

Fosfato disódico Na_2HPO_4 56.8 g

Disolver en 1 L de agua destilada

Procedimiento:

Mezclar 190 ml de la solución A, con 810 ml de la solución B. Adicionar 17.6 gr de cloruro de sodio, NaCl , y 8 gr de cloruro de potasio, KCl con ácido clorhídrico, HCl . Llevar la solución hasta 7.4 y aforar a 1 L.

✓ ANEXO II: Silano, adherente para tejidos (SIGMA).

Reactivos:

Silano..... 2 ml

Acetona..... 98 ml

Procedimiento:

Lavar los portaobjetos con detergente de pH neutro, enjuagarlos con agua destilada y dejarlos secar completamente. Sumergirlos en la solución de silano al 2 % en acetona, durante 2 minutos y sumergidos en agua destilada dos veces, dos minutos cada vez. Dejar secar completamente a temperatura ambiente o en estufa. La solución de silano debe almacenarse en refrigeración, a 4°C. Puede

volver a utilizarse siempre que su transparencia no cambie a color amarillo o rojizo.

✓ **ANEXO III: Tinción de Hematoxilina – Eosina (HyE).**

Solución A: Hematoxilina de Harris:

Hematoxilina..... 0.5 g
Alcohol etílico absoluto..... 5 ml
Alumbre de amonio o potasio..... 10 g
Agua destilada..... 100 ml
Óxido rojo de mercurio..... 0.25 g

Solución B: Eosina:

Solución concentrada de eosina.....1 parte
Alcohol 70%.....3 partes
Por cada 100 ml de solución agregar 1 ml de ácido acético.
Solución concentrada de eosina amarillenta.....1 g
Alcohol al 70%..... 100 ml

Procedimiento:

Los cortes se sumergen en la Solución A, por 3 min y se enjuagan con agua corriente. Posteriormente se sumergen en la Solución B, por 3 min y se enjuagan con agua corriente. Para deshidratar los cortes, éstos se sumergen en alcoholes al 70, 96 y 100%, por 3 min cada uno. Después en xilol por 10 min y se montan con resina permanente.

✓ **ANEXO IV: Técnica de Bielschowsky.**

Solución Reveladora:

Formalina 10%..... 20 ml
Agua destilada 100 ml
Acido nítrico..... 1 gota
Acido cítrico 0.5 g

Solución de tiosulfato de Na al 5%:

Tiosulfato de sodio..... 5 g
Agua destilada..... 100 ml

Nitrato de plata al 20%:

Nitrato de plata..... 20 g
Agua destilada..... 100 ml

Solución de Hidróxido de Amonio al 1%:

Hidróxido de amonio..... 1 ml
Agua destilada..... 100 ml

Procedimiento:

Desparafinar los cortes en dos cambios de xilol de 20 min cada uno. Se hidratan en alcoholes graduales: 100%, 96% y agua destilada, cada uno por 3 min. Sumergir las laminillas en una solución de nitrato de plata al 20%, previamente caliente a una temperatura de 37°C durante 15 min. Lavar las laminillas en agua destilada. A la solución de nitrato de plata se añaden 6 ml de hidróxido de amonio concentrado. Se aclara la solución añadiendo gota a gota de 1-3 ml de hidróxido de amonio, sin que exista exceso de amonio, ya que puede causar precipitado o puede resultar pobre la impregnación de las fibras. Pasar las laminillas en la plata

amoniacal e impregnar durante 15 min a 37 °C. Colocar las laminillas en una solución de hidróxido de amonio al 1 % de 1-3 min. Pasarlas nuevamente al nitrato de plata y agregarle de 10 a 25 gotas de solución reveladora, dejar las laminillas en ésta solución de 3-5 min. Parar la reacción de la solución en hidróxido de amonio al 1% y checar al microscopio. Si las fibras están negras, meter las laminillas a la solución de plata amoniaca-sol reveladora por 3 min. Lavar las laminillas en la solución de hidróxido de amonio al 1% por 3 min. Colocar en una solución de tiosulfato de Na y dejarlas durante 5 min. Lavar las laminillas en agua destilada con 3 cambios de 3 min cada uno. Deshidratar, aclarar y montar.

84	Lenguaje												Memoria				Viso-Constructivo					
	CASOS EA																					
Paciente	Denominación oral	Comprensión de palabras y frases	Evocación léxical (T)	Evocación léxical (L)	Evocación léxical (P)	Evocación léxical (legumbres)	Evocación léxical (vestimenta)	Evocación léxical (herramientas)	Habilidades discursivas (caperucita rojas)	Habilidades discursivas (sándwich)	Habilidades discursivas (asalto de banco)	Habilidades discursivas (accidente de carro)	Memoria lógica	Reproducción visual	Recuerdo (semántico)	Recuerdo semántico (evocación oral)	Dibujo (comando verbal)	Dibujo (copia)	Copia (figura de Rey)	Juicio de orientación de líneas		
1	29	41	10	2	9	9	11	5	1	5	4	9	0.5	0	4	4	21	32	20	10		
2	24	30	9	5	10	11	12	5	0	5	4	8	0	1	0	0	12	11	1.5	1		
3	22	41	6	3	4	4	10	4	0	5	5	6	0	3	0	1	11	23	23	11		
4	19	33	0	1	5	4	5	3	0	2	1	1	0	0	0	0	5	14	3	4		
5	21	28	1	1	2	5	1	3	0	6	7	7	0.5	4	0	0	20	28	11	9		
6	22	43	6	4	8	11	8	8	0	4	4	8	0.5	0	0	0	16	20	7.5	9		
7	9	38	10	6	5	1	0	0	0	3	5	16	1	2	0	0	15	27	25.5	10		
8	23	34	3	1	7	3	1	2	0	1	0	4	1	0	1	4	10	20	1.5	7		
9	16	32	3	2	4	2	5	1	0	3	3	4	0	0	0	2	13	16	5	0		
10	19	32	3	4	2	3	12	5	0	6	6	6	0.5	1	0	1	25	35	15.5	7		
11	12	28	1	1	1	5	1	4	0	2	0	0	0.5	0	1	1	10	7	2	0		
Escola ridad	Edad	CASOS CONTROL																				
4-9	60-69	30.15	44.61	11.08	11.77	18.46	16.08	19.92	10.08	12.46	9.54	9.15	12.31	9.92	10.61	7.69	4.23	32	37.31	29.96	13.77	
10-12	60-69	30.46	45.54	10.69	14	22.15	17.54	21.23	11.61	15.46	11.46	10	16.08	11.88	11	9.54	4.31	34.15	38.92	27.96	13.38	
4-9	70-84	29.96	44.74	7.39	11.22	15.69	12.39	17.52	9.69	11	10.52	10.04	13.52	8.52	7.43	7.04	3.48	29.17	35.61	27.89	12.96	
10-12	70-84	29.95	45.45	12.65	14.8	17.25	15.5	21.7	10.8	14.15	9.5	9.65	12.9	11.57	9.9	7.9	3.85	33.55	37.8	29.85	13.65	

Tabla 4. Resultados por paciente de la evaluación neuropsicológica. Se observan los puntajes obtenidos en pacientes con EA y controles para cada prueba aplicada del PENO. Los puntajes de los controles son obtenidos por medio de tablas estandarizadas por prueba, dependiendo de la escolaridad (años de estudio) y edad de los sujetos.