



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

***ANÁLISIS DE MARCADORES
GLICOSILADOS EN LA ENFERMEDAD
DE ALZHEIMER***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. MARÍA BLANCA ESPINOSA MANCILLA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2009



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.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

OFICIO No. FESZ/DEPI/CP/CB/004/09.

ASUNTO: Asignación de jurado para examen de grado.

LIC. BALFRED SANTAELLA HINOJOSA
COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN DEL POSGRADO
DIRECCIÓN GENERAL DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E .

Informo a usted, que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria celebrada el día 17 de agosto de 2009, aprobó el siguiente jurado para presentar el Examen de Grado a la alumna **María Blanca Espinosa Mancilla**, del **Doctorado en Ciencias (Biología)**:

Presidente: Dra. Patricia Rosas Saucedo
1^{er} Vocal: Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca
2^o Vocal: Dr. Luis Felipe Jiménez García
3^{er} Vocal: Dr. José Raúl Mena López
Secretario: Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo
1^{er} Suplente: Dra. María Esther Cruz Beltrán
2^o Suplente: Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Sin más por el momento, quedo de usted.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 20 de agosto de 2009.

**EL COORDINADOR DEL POSGRADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**


DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por la formación recibida durante mis estudios.

Este trabajo fue financiado por:

Programa de Becas Nacionales, Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP), UNAM.

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación y Tecnología (IN 212108) y al Programa Universitario de Epidemiología, Genómica y Proteómica (SDEI.PTID.05.2) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A los miembros del Comité tutorial:

Dr. Raúl Mena López

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Por sus valiosas observaciones durante el desarrollo de este trabajo que permitieron su conclusión.

Al Banco de cerebros del CINVESTAV, IPN, y a la Dra. Laura Chávez (Hospital General) por la donación de las valiosas muestras utilizadas en este trabajo.

De manera muy especial y con profundo respeto a los familiares de los pacientes que con su sensibilidad y compromiso social hicieron posible la donación del tejido utilizado en este trabajo, contribuyendo así al conocimiento y comprensión de esta enfermedad.

Al Dr. Salvador Martínez-Cairo (IMSS) por el apoyo prestado para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado:

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dr. Miguel Angel Jorge Guevara Fonseca

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Raúl Mena López

Dr. Edgar Zenteno Galindo

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Por la cuidadosa revisión y los valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

Este trabajo se realizó bajo la asesoría de los Doctores Edgar Zenteno Galindo y Jorge Guevara Fonseca, en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo por su amistad y apoyo durante tanto tiempo.

A mis compañeros del laboratorio, Flor, Dr. Chávez, Paty y Ricardo de quienes he disfrutado de su chispa, compañerismo y amistad invaluable.

A todos mis compañeros del laboratorio Maka-II, Leslie, Karina y Agustín por su amistad y solidaridad. A Noé, Federico, Carmen, Paco, Antonio y a los estudiantes de Servicio social y tesis por su empeño de cada día.

De manera muy especial a la Sra. Rosa Nieto, por su apoyo incondicional y su amistad (este laboratorio no sería el mismo sin usted!).

A quienes siempre me han apoyado, mis padres Fernando y Teresa por su presencia y ejemplo.

A mis hermanos Saúl, Fernando y Ernesto por compartir tantas vivencias y por su cariño.

Con cariño a todos mis sobrinos, en especial a Jessica, por su fortaleza frente a la adversidad, sigue adelante!

A Jorge, por tu amor, solidaridad y paciencia siempre! y por andar el camino juntos en esta aventura de ser padres, te amo!

A los proyectos más hermosos de mi vida!, Denisse y Sebastián, quienes hacen de cada momento un gozo y un aprendizaje y han dado un sentido muy profundo a mi vida, con todo mi amor semillitas!.

INDICE

	pg
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Las Marañas Neurofibrilares (MNFs)	3
Las Placas Neuríticas (PNs)	6
La ApoE como factor de riesgo en la EA	10
Procesamientos postraduccionales de las proteínas en la EA	12
La glicosilación	14
Planteamiento del problema	18
Hipótesis	19
Objetivos	19
Diagrama de flujo	20
Materiales y Métodos	21
Lectinas	21
Enzimas	22
Actividad hemaglutinante	22
Concentración de proteína	22
Conjugación de lectinas a biotina	23
Tejido cerebral	23
Histoquímica con lectinas	24
Inmunohistoquímica	25
Microscopía confocal	26
Identificación del receptor para las lectinas de ALL y MrL	27

Transferencia	27
Digestión enzimática del ácido siálico	28
Inhibición del reconocimiento de ALL	29
Determinación de la secuencia de aminoácidos	29
Resultados	32
Histoquímica con lectinas	32
Plasticidad reactiva	35
Identificación de glicoproteínas reconocidas por las lectinas de ALL y MrL	37
Detección Azgp94 en homogenados de cerebro humano	39
I.- Caracterización del reconocimiento de la lectinas de MrL con la neuraminidasa de <i>C. perfringes</i>	40
II.- Caracterización del reconocimiento de la lectina de MrL con neuraminidasa de <i>V. cholerae</i>	42
Detección de la Azgp90 en homogenados de cerebro humano	43
Especificidad del reconocimiento de la lectina de ALL	44
Caracterización química de la fracción de cerebro de pacientes con EA reconocida por ALL	45
Caracterización química de la fracción proteica de cerebros de pacientes con EA reconocida por MrL	48
Discusión	51
Conclusiones	64
Perspectivas	65
Bibliografía	66
Anexo	80

I "Altered Glycosylation Pattern of Proteins in Alzheimer Disease"

II “O-Glycosylation in Sprouting Neurons in Alzheimer Disease, Indicating Reactive Plasticity”

III “Characterization of an O-Glycosylated Plaque-Associated from Alzheimer Disease Brain”

IV “Envejecimiento cerebral normal y patológico: plasticidad cerebral reactiva en la enfermedad de Alzheimer”. En Abriendo las puertas al envejecimiento. De lo biológico a lo social. Una mirada desde la Salud Pública

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Isoformas de la proteína Tau	5
Figura 2. Sitios de reconocimiento por anticuerpos sobre la proteína Tau	6
Figura 3. Esquema del Precursor del amiloide- β	7
Figura 4. Lesión típica en EA	8
Figura 5. Gen y apoproteína ApoE	11
Figura 6. Ubicación intracelular y tipos de Glicosilación	15
Figura 7. Representación del ácido siálico	16
Figura 8. Biosíntesis de estructuras O-glicosídicas	17
Figura 9. Impregnación argéntica de cerebro humano	32
Figura 10. Histoquímica con lectinas	33
Figura 11. Sinaptogénesis reactiva en cerebros con Alzheimer	33
Figura 12. Perfil electroforético de homogenados cerebrales humanos	38
Figura 13. Reconocimiento de la lectinas de MrL	40
Figura 14. Inhibición parcial del reconocimiento de la lectina de MrL	41
Figura 15. Inhibición del reconocimiento de la lectina de MrL sobre	42

glicoproteínas de homogenados humanos

Figura 16.- Perfil de reconocimiento de la lectina de ALL en 43
homogenados de cerebro humano

Figura 17. Inhibición del reconocimiento de ALL en homogenados de 45
cerebro humano

Tabla 1. Genes asociados a la presentación de la EA 9

Tabla 2. Especificidad de Lectinas 21

Tabla 3. Marcaje con lectinas 34

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos obtenida a partir de péptidos trípticos 46
por MALDI-TOF de la Azgp90

Tabla 5a. Sitios potenciales de modificaciones postraduccionales en los 47
candidatos de la Azgp90

Tabla 5b. Ubicación de sitios potenciales de glicosilación en los posibles 47
ligandos de la Azgp90 humana

Tabla 6. Secuencia de aminoácidos obtenida a partir de péptidos trípticos 49
por MALDI-TOF de la Alzgp94

Tabla 6a. Sitios potenciales de modificaciones postraduccionales en los 50
candidatos

Tabla 6b. Ubicación de sitios potenciales de glicosilación de los 50
candidatos para la Azgp94

RESUMEN

En este trabajo se identificó que las placas neuríticas y marañas neurofibrilares lesiones típicas de la enfermedad de Alzheimer (EA); constituidas principalmente por las proteínas amiloide- β y tau respectivamente se encuentran asociadas a glicoproteínas que contienen al disacárido Gal β 1,3GalNAc (O-glicano) identificado con la lectina de ALL (*Amaranthus leucocarpus*), así como a una glicoproteína que contiene al ácido siálico 9-O-acetilado (Neu5,9Ac₂) reconocido con la lectina de MrL (*Macrobrachium rosenbergii*). La expresión del receptor para MrL se concentró principalmente en los conos axonales y en estructuras meganeuríticas que parece relacionarse con plasticidad neuronal en un intento de regeneración. Por electrotransferencia de homogenados de cerebro de pacientes con EA se identificó una glicoproteína de 90 kD (Azgp90) y otra de 94 KD (Azgp94) reconocidas con las lectinas de ALL y MrL, respectivamente. Por espectrometría de masas (MALDI-TOF) y comparando en un banco de datos (SWISS-PROT/2001), se identificó que la Azgp90 posee 42 % de identidad con mucina humana (MUC) y 32 % con la proteína KIAA 0310. Azgp94 posee identidad del 52 % con las proteínas DNA ligasa III, del 42% con las proteínas KIAA 0388, 0413 y 29% con KIAA 0460. Sugerimos que la O-glicosilación y la adición de residuos de O-acetil-siálico en estas glicoproteínas podría ser producto del daño sufrido en la maquinaria de glicosilación neuronal lo que podría desencadenar señales para la neurodegeneración y la regeneración neuronal encontrada en la enfermedad de Alzheimer. Así, consideramos necesario la caracterización de estos marcadores para determinar la etiología y para diseñar nuevas estrategias en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

ABSTRACT

In this work we identified the hallmark lesions that characterize Alzheimer's disease; neuritic plaques and neurofibrillary tangles. Amyloid- β and tau proteins are constituted those lesions, respectively. We also found glycoproteins associated to the disaccharide Gal β 1,3GalNAc (O-glycan) and 9-O-acetyl sialic acid (Neu5,9Ac). These glycoproteins were identified with ALL (*Amaranthus leucocarpus*) and MrL (*Macrobrachium rosenbergii*) lectins. The expression of O-glycosidic receptor for MrL was mainly observed in axonal cones and meganeuritic structures. These results could be related with neuronal plasticity process as an attempt of brain regeneration against neuronal loss. Two glycoproteins of 90 (Azgp90) and 94 (Azgp94) KD were characterized from Alzheimer disease brain homogenates. These glycoproteins were recognized on western blots using GalNAc and Neu5,9Ac-specific lectins from ALL and MrL, respectively. The sequence of aminoacids was obtained through MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) and compared with the relative values obtained of bank dates (SWISS-PROT/2001). Azgp90 showed 42 % identity with human mucin and 32% with KIAA 310 protein. In other hand, Azgp94 showed 52 % of identity with the DNA III, 42 % KIAA 0388, 0413 and 29 % with KIAA 0460 proteins. We suggest that the O-glycosylation and the addition of O-acetyl sialic residues on these glycoproteins could be product of failure on glycosylation neural machinery. This produce either signals for the neurodegeneration and neural regeneration in Alzheimer's disease. It is necessary to find some other markers in order to know the etiology, pathology and to design new strategies in Alzheimer's disease treatment.

RESUMEN

En este trabajo se identificó que las placas neuríticas y marañas neurofibrilares lesiones típicas de la enfermedad de Alzheimer (EA); constituidas principalmente por las proteínas amiloide- β y tau respectivamente se encuentran asociadas a glicoproteínas que contienen al disacárido Gal β 1,3GalNAc (O-glicano) identificado con la lectina de ALL (*Amaranthus leucocarpus*), así como a una glicoproteína que contiene al ácido siálico 9-O-acetilado (Neu5,9Ac₂) reconocido con la lectina de MrL (*Macrobrachium rosenbergii*). La expresión del receptor para MrL se concentró principalmente en los conos axonales y en estructuras meganeuríticas que parece relacionarse con plasticidad neuronal en un intento de regeneración. Por electrotransferencia de homogenados de cerebro de pacientes con EA se identificó una glicoproteína de 90 kD (Azgp90) y otra de 94 KD (Azgp94) reconocidas con las lectinas de ALL y MrL, respectivamente. Por espectrometría de masas (MALDI-TOF) y comparando en un banco de datos (SWISS-PROT/2001), se identificó que la Azgp90 posee 42 % de identidad con mucina humana (MUC) y 32 % con la proteína KIAA 0310. Azgp94 posee identidad del 52 % con las proteínas DNA ligasa III, del 42% con las proteínas KIAA 0388, 0413 y 29% con KIAA 0460. Sugerimos que la O-glicosilación y la adición de residuos de O-acetil-siálico en estas glicoproteínas podría ser producto del daño sufrido en la maquinaria de glicosilación neuronal lo que podría desencadenar señales para la neurodegeneración y la regeneración neuronal encontrada en la enfermedad de Alzheimer. Así, consideramos necesario la caracterización de estos marcadores para determinar la etiología y para diseñar nuevas estrategias en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

ABSTRACT

In this work we identified the hallmark lesions that characterize Alzheimer's disease; neuritic plaques and neurofibrillary tangles. Amyloid- β and tau proteins are constituted those lesions, respectively. We also found glycoproteins associated to the disaccharide Gal β 1,3GalNAc (O-glycan) and 9-O-acetyl sialic acid (Neu5,9Ac). These glycoproteins were identified with ALL (*Amaranthus leucocarpus*) and MrL (*Macrobrachium rosenbergii*) lectins. The expression of O-glycosidic receptor for MrL was mainly observed in axonal cones and meganeuritic structures. These results could be related with neuronal plasticity process as an attempt of brain regeneration against neuronal loss. Two glycoproteins of 90 (Azgp90) and 94 (Azgp94) KD were characterized from Alzheimer disease brain homogenates. These glycoproteins were recognized on western blots using GalNAc and Neu5,9Ac-specific lectins from ALL and MrL, respectively. The sequence of aminoacids was obtained through MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) and compared with the relative values obtained of bank dates (SWISS-PROT/2001). Azgp90 showed 42 % identity with human mucin and 32% with KIAA 310 protein. In other hand, Azgp94 showed 52 % of identity with the DNA III, 42 % KIAA 0388, 0413 and 29 % with KIAA 0460 proteins. We suggest that the O-glycosylation and the addition of O-acetyl sialic residues on these glycoproteins could be product of failure on glycosylation neural machinery. This produce either signals for the neurodegeneration and neural regeneration in Alzheimer's disease. It is necessary to find some other markers in order to know the etiology, pathology and to design new strategies in Alzheimer's disease treatment.

INTRODUCCION

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria y que concluye en una demencia profunda (Blessed *et al.*, 1968). La deficiencia cognoscitiva de los pacientes se debe a una alteración de las funciones que dependen de los circuitos cerebrales asociativos cortico-corticales. Braak y Braak (1996) demostraron que en la EA existen 6 grados de destrucción de la corteza cerebral que comienza por la corteza transentorrinal (Etapa I y II) caracterizada por cambios neurofibrilares la cual se considera una etapa pre-clínica (Braak y Braak, 1991, 1998), luego la corteza transentorrinal y entorrinal (Etapa III y IV) hasta que alcanza la isocorteza (Etapa V y VI); al mismo tiempo se van desarrollando los síntomas neurológicos del paciente. A nivel histopatológico, la EA se caracteriza por la presencia de tres lesiones principales: las marañas neurofibrilares (MNFs), las placas neuríticas (PNs) y las neuritas distróficas (NDs); éstas últimas presentan cambios en su número y morfología. Estas estructuras se encuentran en gran cantidad en áreas específicas del hipocampo y de la corteza cerebral (Terry *et al.*, 1964; 1972; Iqbal *et al.*, 1998). De esta manera se observan diversos grados de degeneración fibrilar, además de la pérdida sináptica masiva.

Las Marañas Neurofibrilares (MNFs)

En la EA las MNFs están constituidas principalmente por agregados de la proteína tau que se encuentra polimerizada en filamentos insolubles denominados filamentos helicoidales apareados (FHAs) (Kidd, 1963), y que progresivamente reemplazan al citoesqueleto neuronal (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b). La proteína tau se encuentra anormalmente fosforilada e hiperfosforilada en la EA (Goedert y Hasegawa, 1999) y en otras tauopatías relacionadas (Braak *et al.*, 1986, Tolnay y Probst, 1999, Lee *et al.*, 2001). Así la proteína tau se encuentra como FHAs mezclados con filamentos rectos y con proteína tau citosólica la cual corresponde al 40 % del total de la proteína en la EA (Köpke *et al.*, 1993).

Tau es una proteína abundante en el sistema nervioso central (SNC) y predominante en los axones. En condiciones normales tau pertenece a un

grupo de fosfoproteínas que se asocian a los microtúbulos (Johnson y Stoothoff, 2004) (MAPs) y que regulan su ensamble (Cleveland *et al.*, 1977, Lindwall y Cole, 1984) a través de un proceso de fosforilación – defosforilación sitio específica (Johnson y Stoothoff, 2004); de esta manera mantiene la estructura neuronal (Lee *et al.*, 2001), favoreciendo la extensión y el transporte axonal de vesículas y proteínas (Liu y Gong, 2008).

En el cerebro humano se presentan 6 isoformas principales de longitudes variadas generadas por procesamiento alternativo del RNAm de un solo gen (Goedert *et al.*, 1989) localizado en el cromosoma 17q21 (Neve *et al.*, 1986; Froelich *et al.*, 1997) que posee al menos 16 exones (Lee *et al.*, 1989) y por diferentes niveles de fosforilación (García de Ancos *et al.*, 1993). La isoforma más pequeña con 352 aminoácidos (aa), se considera exclusivamente fetal (Kosik *et al.*, 1989), las isoformas restantes poseen 381, 383, 410, 412 y 441 aa y están presentes en el cerebro humano, aunque las isoformas predominantes en el cerebro adulto son las de 383, 412 y 441 aa. La diferencia entre ellas radica en el número de dominios repetidos de unión a microtúbulos (R) que contienen; como consecuencia del procesamiento alternativo del exón 10, generando así dos grupos de isoformas: tipo II, las cuales presentan cuatro dominios repetidos de unión a microtúbulos (R4), mientras que, las tipo I sólo tienen tres (R3) (Goedert *et al.*, 1989) (Figura 1).

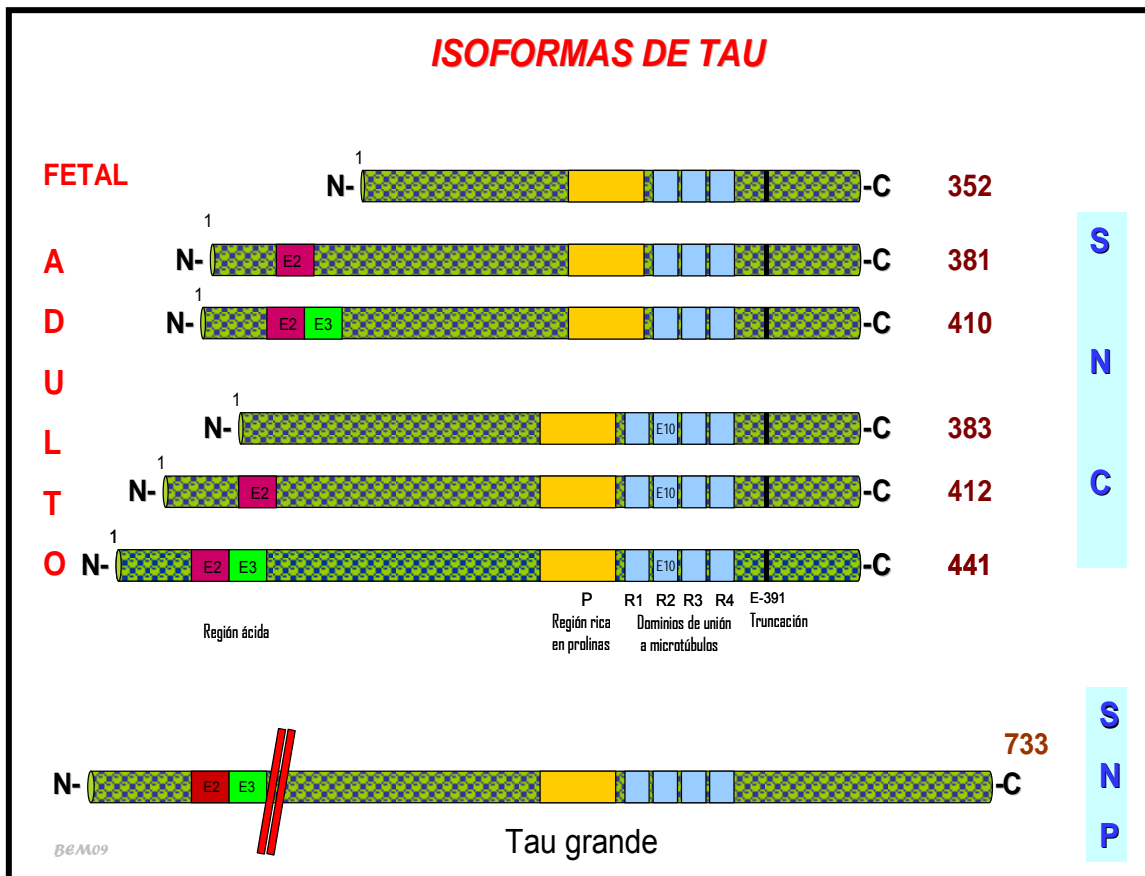


Figura 1. Representación de las isoformas de tau. R indica los dominios repetidos de la molécula, que son los sitios de unión a los microtúbulos, localizados en la porción carboxilo terminal. P corresponde a la región rica en prolina adyacente a los R. E-391, representa el sitio donde la molécula se trunca, los fragmentos truncados conforman los FHAs. E2 y E3 representan los insertos en la porción N- terminal que dan origen a las 6 isoformas encontradas en el cerebro humano con diferentes pesos moleculares. E10 representa la inserción de otro fragmento que da origen al cuarto dominio repetido de unión a microtúbulos. Tau grande corresponde a la forma completa de la proteína existente en el sistema nervioso periférico. Modificado de Johnson y Stoothoff (2004).

Los Filamentos Helicoidales Apareados (FHAs) son polímeros que se forman a partir de un fragmento de 92 residuos de aa de la proteína tau que corresponde a la zona de los dominios repetidos y que termina en el Glu-391 (E-391) hacia el extremo carboxilo (Novak *et al.*, 1993). Estos fragmentos denominados núcleos mínimos de los FHAs se polimerizan en un complejo en forma de “C”, dándoles una apariencia de filamento helicoidal cuando son observados al microscopio electrónico (Wischnik *et al.*, 1988a) sin embargo, el mecanismo exacto de formación de los FHAs se desconoce hasta el momento. Las modificaciones postraduccionales parecen jugar un papel importante en la formación de dichos filamentos; las principales son: fosforilación anormal e hiperfosforilación (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Flament y Delacourte, 1989;

Iqbal *et al.*, 1989; De Ancos *et al.*, 1993, Delobel *et al.*, 2003), truncación en la posición E-391 del extremo carboxilo (Wischik *et al.*, 1988a,b; Novak *et al.*, 1993; Mena *et al.*, 1995), glicación (Perry *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1994), sulfatación (Snow *et al.*, 1989) y glicosilación (Wang *et al.*, 1996).

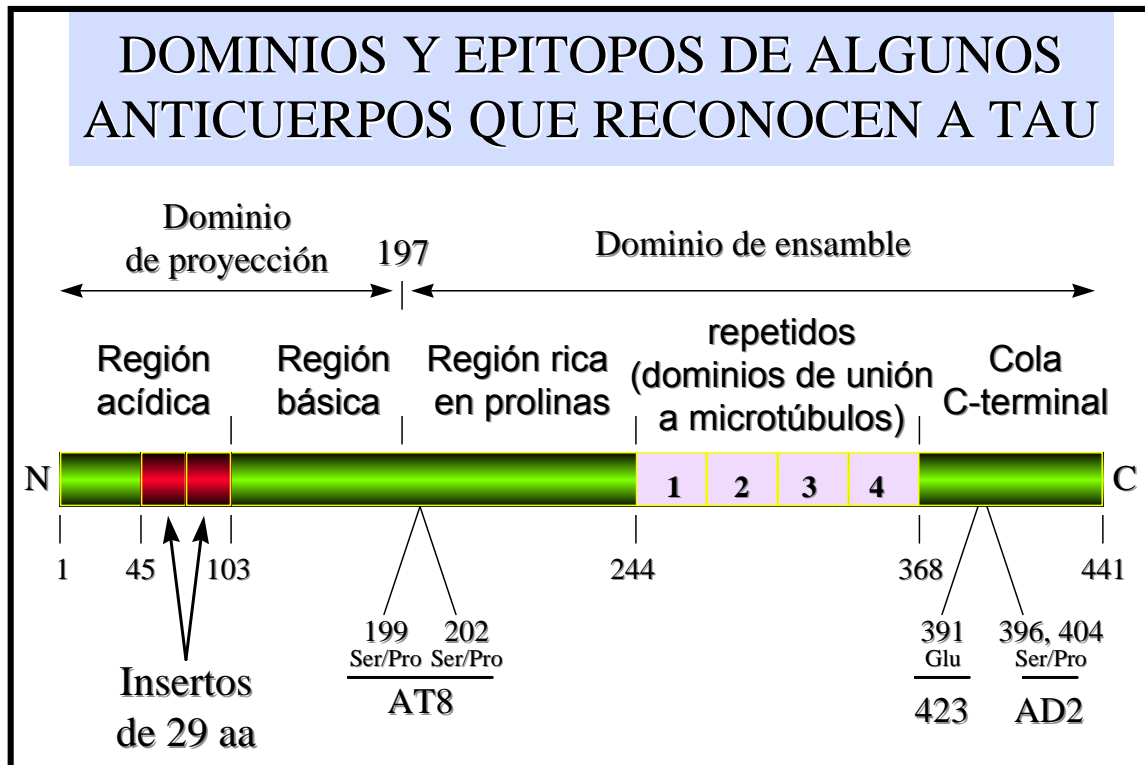


Figura 2. Sitios de reconocimiento por anticuerpos sobre la proteína tau. El esquema representa una isoforma de tau donde se localizan los diferentes sitios de fosforilación reconocidos por los anticuerpos AT8, AD2 y el de truncación para el AcM 423.

Las placas neuríticas (PNs)

Las PNs están constituidas principalmente del péptido amiloide- β de 39-43 aa de longitud, que es el producto final de la proteólisis del extremo carboxilo terminal de su proteína precursora (Glennner y Wong, 1984; Hass y Selkoe, 1993), una glicoproteína integral de membrana tipo I (Kang *et al.*, 1987) de alto peso molecular. El péptido A β tiene un peso molecular aproximado de 4 KD por lo que también se conoce como β A/4 (Masters *et al.*, 1984; Masters *et al.*, 1985). Existen tres isoformas principales conocidas de la PPA β , de 695, 751 y 771 aa (Tanaka *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 1989) provenientes de un mismo gen constituido por 19 exones (Yoshikai *et al.*, 1991) que está localizado en el cromosoma 21 (Kang *et al.*, 1987) (Figura 3).

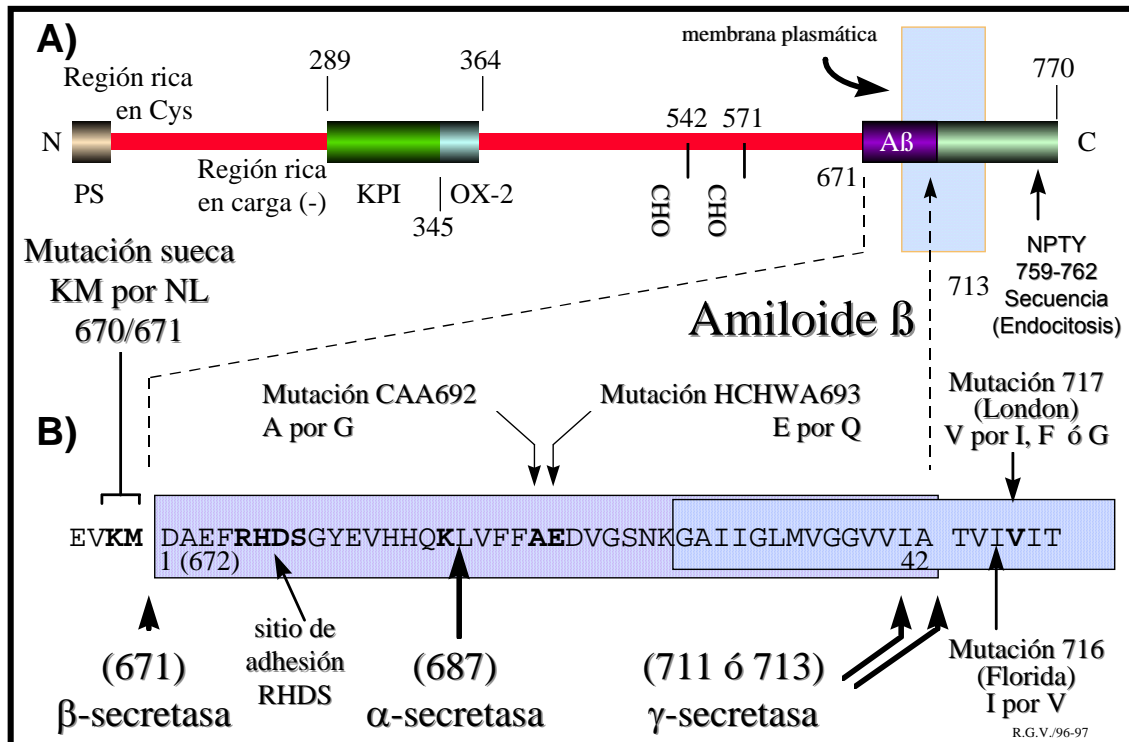


Figura 3. Esquema del precursor del amiloide-β. A) Diagrama que representa al precursor del amiloide-β. Destacan la región Aβ que corresponde a la secuencia del péptido amiloide-β enclavada en la membrana. B) Secuencia del amiloide-β de 42 residuos. Resaltan los tres sitios posibles de corte por secretasas y los sitios descritos de mutaciones (negritas).

La proteína precursora de la amiloide-β (PPAβ) se encuentra en todas las células del organismo y es fragmentada por tres actividades de α, β y γ secretasas (De Strooper y Annaert, 2000), y en contra de lo que se había sugerido, la sobre expresión de la PPAβ no conduce por sí misma a la patología de la EA. Sin embargo, existe un mecanismo que da origen al péptido amiloide-β cuya agregación parece ser necesaria en la formación de PNs. Las PNs recibieron ese nombre, para diferenciarlas de aquellas placas que no tienen neuritas distróficas agregadas alrededor del depósito del amiloide-β y que en un inicio, se denominaron como placas seniles, y que pueden encontrarse en los cerebros de ancianos sanos sin deterioro cognoscitivo (Wilcock *et al.*, 1982; Cristal *et al.*, 1988; Arriagada *et al.*, 1992; Dickson *et al.*, 1992; Joannette *et al.*, 1994). Se han hecho intentos para diferenciar las poblaciones de placas con diferentes métodos, tales como las impregnaciones argénticas de Bielschowsky, colorantes fluorescentes como la tioflavina S, el rojo congo, el rojo tiazina y métodos inmunohistoquímicos con anticuerpos

contra diferentes regiones de la proteína amiloide- β (Wisniewski *et al.*, 1989, Delaère *et al.*, 1991). Así, la clasificación de las placas depende del observador y de los métodos utilizados, algunos autores clasifican a las PNs por subtipos que van desde los estadios iniciales hasta los maduros; otros prefieren definir las en dos grupos: a) las placas difusas (reconocidas sólo con anticuerpos contra el amiloide- β) y sin componente neurítico, y b) las placas neuríticas “clásicas”, que están conformadas por un núcleo o depósito del péptido amiloide- β y de un agregado de neuritas distróficas, inmunorreactivas a tau, con una disposición radial (Guevara *et al.*, 2004).

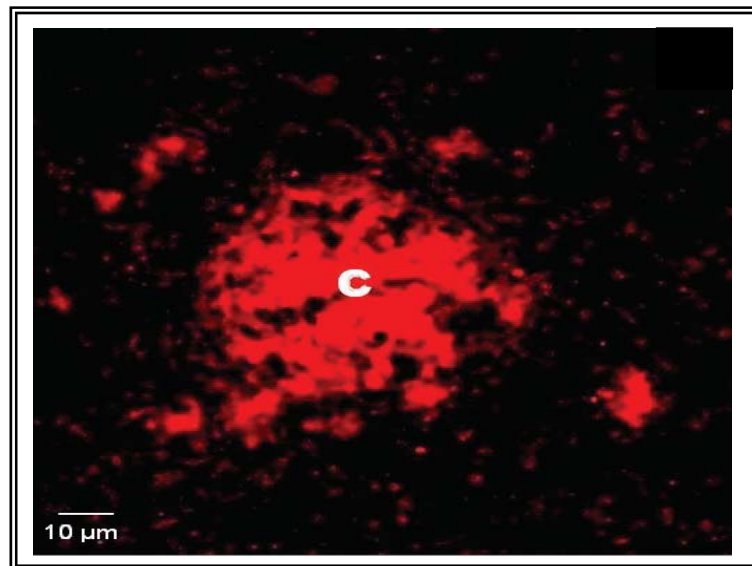


Figura 4. Lesión típica en la EA: Doble marcaje visto por microscopía confocal. Aquí se muestra un depósito de amiloide- β (canal rojo). Este tipo de depósito ($A\beta$ Ds) no está relacionado con las neuritas distróficas (canal verde). Los depósitos de amiloide- β se observaron especialmente en casos no demenciados, pero también en EA. C) Placa neurítica clásica. (Tomado de Guevara *et al.*, 2004)

El mecanismo de formación y maduración de las placas no es claro todavía, sin embargo, los mecanismos involucrados en la agregación del péptido $A\beta$ podrían ser producto de alteraciones del proceso metabólico normal del $PPA\beta$. Contrario a lo que se pensó en un inicio, el mecanismo de proteólisis de la $PPA\beta$ es normal y no patológico, por lo que se puede encontrar el $A\beta$ como producto normal de secreción en el torrente sanguíneo y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de las personas ancianas (Dickson *et al.*, 1992).

La EA tiene dos formas de presentación: una forma esporádica y una de tipo familiar. La EA familiar está definida por tres variantes genéticas (Tabla 1). Hasta el momento, se conocen tres genes que tienen un carácter autosómico dominante: a) El de la PPA β , que se localiza en el cromosoma 21 y que constituye menos del 2-3% de los casos familiares reportados y la edad de inicio de la enfermedad se ha reportado entre los 45 y 65 años por lo que se le considera de inicio temprano (Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Mullan *et al.*, 1992; Goate *et al.*, 1997). b) El de la Presenilina 1 (PS1), localizado en el cromosoma 14 y que ocupa más del 50 % del total de los casos de la EA de tipo familiar y es el de inicio más temprano, puesto que está entre los 30 y 60 años de edad (Sherrington *et al.*, 1995). c) El de la Presenilina 2 (PS2) que se localiza en el cromosoma 1. Constituye aproximadamente el 20 % de los casos reportados con EA familiar. Su edad de inicio esta entre los 40 y 70 años de edad (Levy-Lahad *et al.*, 1995).

GENES RELACIONADOS CON LA EA			
FAMILIAR			
GEN	UBICACIÓN	TIPO DE HERENCIA	EDAD DE INICIO
PPAβ	21q21.2	A.D	45-65
PS1	14q24.3	A.D	28-60
PS2	1q42.1	A.D	40-70
ESPORÁDICA : FACTORES DE RIESGO			
ApoE	19q13.2	Polimorfismo	60-85

Tabla 1. Genes asociados a la presentación de la EA. Aquí se muestran las dos variantes de la EA. Se describen los genes involucrados en la EA familiar y su herencia de tipo autosómico dominante, esta variante se considera de inicio temprano. Para la EA de tipo esporádica se ha descrito la participación del gen de la ApoE como factor de riesgo.

La EA familiar representa una minoría en comparación con el número de casos para EA esporádico, ya que se han descrito menos de 100 familias en el mundo que portan estas mutaciones. En contraparte, la EA de tipo esporádico ocupa más del 97 % (Rojo *et al.*, 2006) de los casos totales reportados y hasta el momento, la etiología de esta variante de la EA se desconoce. La participación de las proteínas patológicas descritas con anterioridad, se ve reflejada en las lesiones que se observan. Quizás, la relación más importante descrita hasta el momento entre un gen y la EA de tipo esporádico, se describe para la apolipoproteína E (ApoE); esta relación debe entenderse como un riesgo de desarrollar la EA (Wisniewski y Frangione, 1992).

La ApoE como factor de riesgo en la EA

Existe una fuerte asociación de la ApoE con la EA debido a la presencia de un genotipo particular de la ApoE (Schelleberg *et al.*, 1992; Strittmatter *et al.*, 1993a; Roses *et al.*, 1994). Las tres isoformas principales de ApoE (E2, E3 y E4) son el producto de los tres alelos (2, 3 y 4) de un solo gen localizado en el cromosoma 19 (Mahley, 1988). De los tres alelos principales de la ApoE, el más común en la población general es el 3, con una frecuencia de 78 % (Mahley, 1988). La presencia del alelo 4, se asocia tanto con la EA de tipo esporádica, como con la de aparición tardía familiar (Davignon *et al.*, 1988; Saunders *et al.*, 1993; Strittmatter *et al.*, 1993b; Schächter *et al.*, 1994; Talbot *et al.*, 1994; Whitson *et al.*, 1994), pero no con ciertas familias que presentaron EA familiar de aparición temprana (Saunders *et al.*, 1993). La ApoE completa es una cadena polipeptídica de 299 aa y peso molecular de 34 KD (Mahley, 1988; Wiesgraber, 1994). Las isoformas difieren entre sí por el intercambio de los residuos de cisteína y arginina en las posiciones 112 y 158 de la proteína madura (Mullan y Crawford, 1993) (Figura 5).

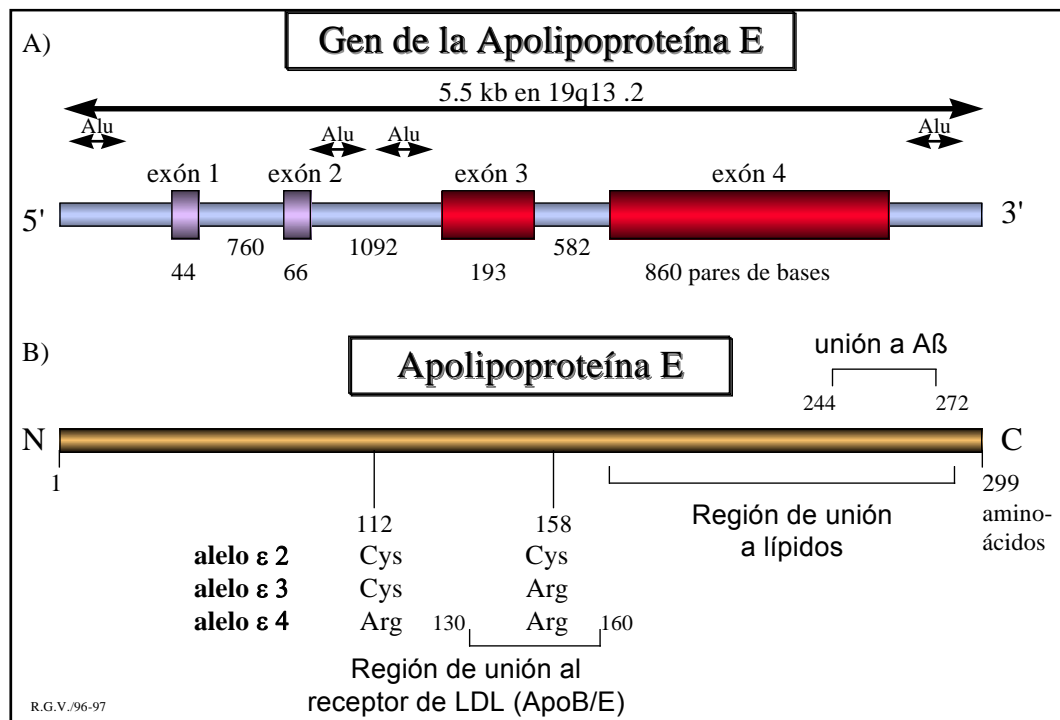


Figura 5. Gen y proteína ApoE. A) Representación del gen de la ApoE donde se muestran sus 4 exones, peso y ubicación en el cromosoma 19. B) Esquema que representa a la proteína, los sitios posibles a sustituirse (112 y 158) que dan origen a las tres isoformas. También se muestran las diferentes regiones de unión al receptor de la LDL, al Aβ en el extremo carboxilo terminal así como la región de unión a lípidos.

Existen poblaciones celulares que producen ApoE, como los astrocitos y la microglia (Poirier *et al.*, 1991; Rebeck *et al.*, 1993). Ambos tipos celulares la sintetizan en el sistema nervioso central (Pitas *et al.*, 1987). La ApoE se encuentra normalmente en circulación en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo. La ApoE plasmática funciona como ligando para receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Beisegel *et al.*, 1989; Kowall *et al.*, 1989), para los quilomicrones remanentes en circulación; así como para unir a la proteína relacionada con el receptor de las LDL (LRP) (Mahley, 1988; Wiesgraber, 1994) además, participa en el transporte de lípidos como colesterol y triglicéridos y regula el metabolismo de los lípidos (Kowall *et al.*, 1989).

Se ha propuesto que la ApoE actúa como un chaperón molecular para el procesamiento patológico de la proteína amiloide-β (Wisniewski y Frangione 1992; Strittmatter *et al.*, 1993a; Strittmatter *et al.*, 1993b), se ha mostrado que un péptido sintético de la proteína amiloide-β une a las isoformas ApoE4 y ApoE3, formando un complejo peptídico que resiste a la disociación con dodecil

sulfato de sodio (SDS). La unión con las isoformas ApoE4 se diferencia en el grado de afinidad; para la ApoE4 se requieren unos minutos para enlazarse, mientras que para la ApoE3 se necesita de varias horas (Strittmatter *et al.*, 1994). Estos datos apoyan la idea de que la ApoE participa en la fisiopatogénesis de la EA y explican algunas de las etapas de la acumulación de la proteína amiloide- β en función de la expresión del genotipo ApoE4. Además, se ha sugerido que las isoformas de ApoE3 y 4 participan en el secuestro de las proteínas asociadas a los microtúbulos tau y MAP2 (Roses 1994; Strittmatter *et al.*, 1994).

Procesamientos postraduccionales de las proteínas en la EA

Se han atribuido una serie de funciones importantes a la PPA β , entre ellas, que es un receptor de superficie celular o una proteína transmembranal glicosilada (Kang *et al.*, 1987), como factor de crecimiento (Rossjohn *et al.*, 1999) y ha sido implicado en funciones pro y anti-apoptóticas (Wolozin *et al.*, 1986; Yamatsuji *et al.*, 1996b; Xu *et al.*, 1999; Esposito *et al.*, 2004). Existen alteraciones en la expresión del gen de PPA β para una variante de la EA (Weiderman *et al.*, 1989), conocida como EA familiar, y ya se han descrito varias modificaciones postraduccionales que afectan el tamaño molecular de la PPA β , las cuales incluyen N- y O-glicosilación (Galbete *et al.*, 2000), fosforilación (Caporaso *et al.*, 1992; Vingtdoux *et al.*, 2005) y tirosin O-sulfatación (Dyrks *et al.*, 1988; Weideman *et al.*, 1989). También se mostró por inmunohistoquímica que, los proteoglicanos sulfatados se asocian con las PNs y con placas en formación, lo cual sugiere que el acúmulo de los proteoglicanos sulfatados ocurre en etapas iniciales del desarrollo de las placas neuríticas (Snow *et al.*, 1988, 1994).

Por otro lado, los mecanismos potencialmente involucrados en el procesamiento anormal de la proteína tau pueden ser los responsables de las primeras modificaciones postraduccionales de la molécula, las cuales conducen al ensamble de los FHA (Grudke-Iqbal *et al.*, 1986a; Wolozin *et al.*, 1986; Iqbal *et al.*, 1989; Greenberg *et al.*, 1992; Wischik *et al.*, 1985; Wischik 1988a, Wischik 1988b; Novak *et al.*, 1993).

También se han identificaron proteoglicanos asociados con las MNFs que al parecer resultan de la unión de heparan sulfato a grupos carboxilos libres sobre los FHAs (Perry *et al.*, 1991; Ledesma *et al.*, 1994; Hasegawa *et al.*, 1997). A este respecto, se han propuesto la formación de complejos moleculares denominados productos finales de glicación (AGES, de sus siglas en Inglés). Se sugiere que estas moléculas son capaces de inducir estrés oxidativo (Yan *et al.*, 1994; Tabaton *et al.*, 1997) y de esta forma los radicales libres se involucran en la formación de las MNFs (Yan *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1997). Tanto la glicación como el procesamiento oxidativo proteico se relacionan con el “estrés oxidativo”. Hasta ahora, sólo se ha observado la presencia de los AGES, pero no se ha identificado su participación en los mecanismos de formación de las lesiones típicas en la EA. Tampoco se ha identificado sí los AGES son producto de una deficiencia metabólica específica o de una interacción química óxido-reductiva inespecífica. Sin embargo, con estos antecedentes, se ha sugerido que el estrés oxidativo puede ser uno de los mecanismos responsables del origen de las MNFs y las PNs (Smith y Perry, 1994; Castellani *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1996a; Sayre *et al.*, 2001).

Existen evidencias que sugieren que la proteína tau se encuentra glicosilada anormalmente en la EA (Wang *et al.*, 1996) y que esto afecta la estabilidad del citoesqueleto en las neuronas (Araujo *et al.*, 1997). En las enfermedades producidas por priones se ha propuesto que la proteína prion normal (Pr^C) podría adquirir una actividad de prion patológica (Pr^P) únicamente por el cambio en el patrón de N-glicosilación (Lehmann y Harris, 1997). También se sugiere que existen alteraciones en la actividad enzimática relacionada con la glicosilación en la EA (Maguire y Breen, 1995) que bien podrían participar en las etapas iniciales de la patogénesis de la EA (Wang *et al.*, 1996; Araujo *et al.*, 1997).

Recientemente se ha propuesto que la O-glicosilación por N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) está relacionada con la EA, al parecer existe una interacción dinámica entre O-GlcNAc y fosforilación en los mismos sitios o bien sitios vecinos del esqueleto peptídico de Tau (Comer y Hart 2001; Kamemura *et al.*, 2002) que influyen en su localización celular (Lefebvre *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta el momento, aún se desconoce como se originan tanto las PNs

como las MNFs y uno de los puntos de mayor relevancia en la EA sigue siendo la formación de estas lesiones.

La Glicosilación

La glicosilación es un evento central en diversos fenómenos biológicos y el primer paso en los procesos de interacciones celulares. Ocurre en proteínas integrales de membrana de organismos superiores y es común en proteínas secretorias. La principal ruta biosintética lleva a la producción de glicoproteínas maduras mediante la acción de glicosiltransferasas, glicosidasas y enzimas modificadoras de carbohidratos (Sharon y Lis 1989; Varki 1993). Para el estudio de estos procesos biológicos de reconocimiento celular mediante estructuras sacarídicas es útil el uso de lectinas de origen animal o vegetal. Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que interaccionan específicamente con estructuras sacarídicas e inducen aglutinación celular. Debido a esta especificidad, las lectinas han sido utilizadas como herramientas para identificar estructuras sacarídicas en proteínas de tejido nervioso de diferentes especies. Algunas lectinas tienen la capacidad de unirse a células de la microglia (Hassan *et al.*, 1991; Ling *et al.*, 1992; Perlmutter *et al.*, 1992 ; Ledoux *et al.*, 1993; Dickson *et al.*, 1996, Andjelkovic *et al.*, 1998), a neuronas (Kobayashi *et al.*, 1989) y a vasos sanguíneos (Nag, 1985; Mann *et al.*, 1992).

Así se han detectado alteraciones en la glicosilación de componentes de superficie celular. Las consecuencias de esta alteración pueden ser inocuas o bien pueden llevar a la pérdida de la función incluso a la pérdida de la proteína misma, debido a la modificación de la estructura terciaria o bien, puede ser una señal para la destrucción de una glicoproteína (Varki, 1993). El aparato de Golgi tiene un papel central en las modificaciones postraduccionales fisiológicas de proteínas luminales y secretorias además de lípidos (Fan *et al.*, 2008). Participa en el procesamiento y clasificación durante el transporte desde los sitios de síntesis en el retículo endoplásmico (RE) hacia las vacuolas secretorias, la superficie celular (Fan *et al.*, 2008) y los lisosomas para la destrucción de una variedad de proteínas (Farquhar, 1985). En las neuronas todas las proteínas recién sintetizadas destinadas para un transporte axoplásmico rápido son procesadas por el aparato de Golgi (Hammerschlag *et al.*, 1982), mismo que ha sido implicado en la patogénesis de una variedad de

enfermedades humanas asociadas con defectos de tráfico intracelular de proteínas (Amara *et al.*, 1992; Fan *et al.*, 2008) y en muchas enfermedades neurodegenerativas (Fan *et al.*, 2008) como la EA (Baloyannis *et al.*, 2004).

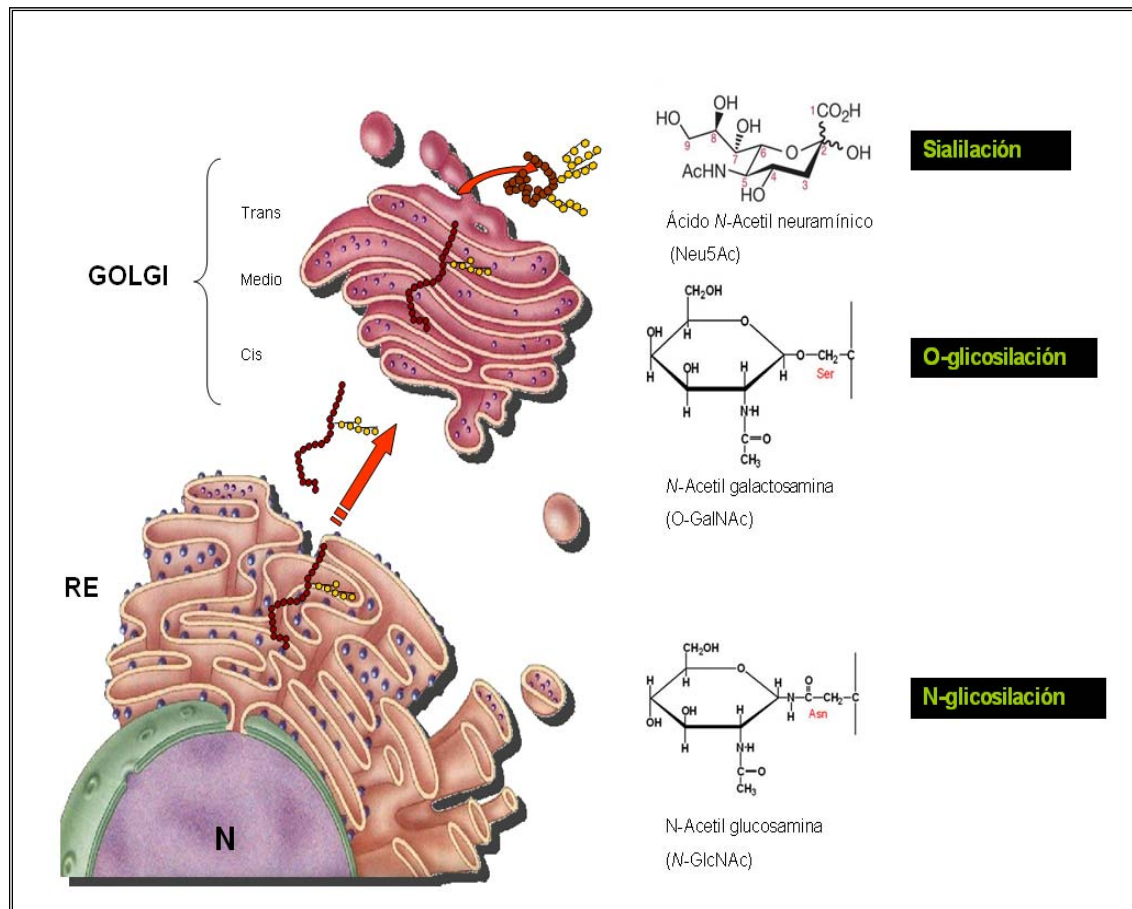


Figura 6. Ubicación intracelular y tipos de glicosilación. Esquema que describe la ruta de tráfico de proteínas glicosiladas. Se muestran los dos tipos más comunes de glicosilación, la N- y O- de acuerdo a su unión con aminoácidos específicos, y la localización subcelular donde se llevan a cabo estos procesos, así como la adición de residuos de ácido siálico.

Los ácidos siálicos son una familia de azúcares carboxilados de 9 carbonos, generalmente se encuentran como monosacáridos terminales de varias clases de glicanos de superficie celular y de secreción (Varki, 2007a). El ácido siálico más común es el ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac) que es el precursor de todos los miembros de la familia (Roseman, 1970). Los ácidos siálicos pueden tener sustituciones de uno o más grupos hidroxilo con grupos acetilo, metilo, lactilo, fosfato o sulfato (Varki, 1992; Schauer, 2000). La modificación más común que pueden sufrir los ácidos siálicos es la adición de O-acetil ésteres en las posiciones 7 y 8; o 7, 8 o 9; dicha modificación puede

afectar el desarrollo embriogénico y alterar el reconocimiento del ácido siálico original por lectinas endógenas, anticuerpos y virus (Varki, 1997).

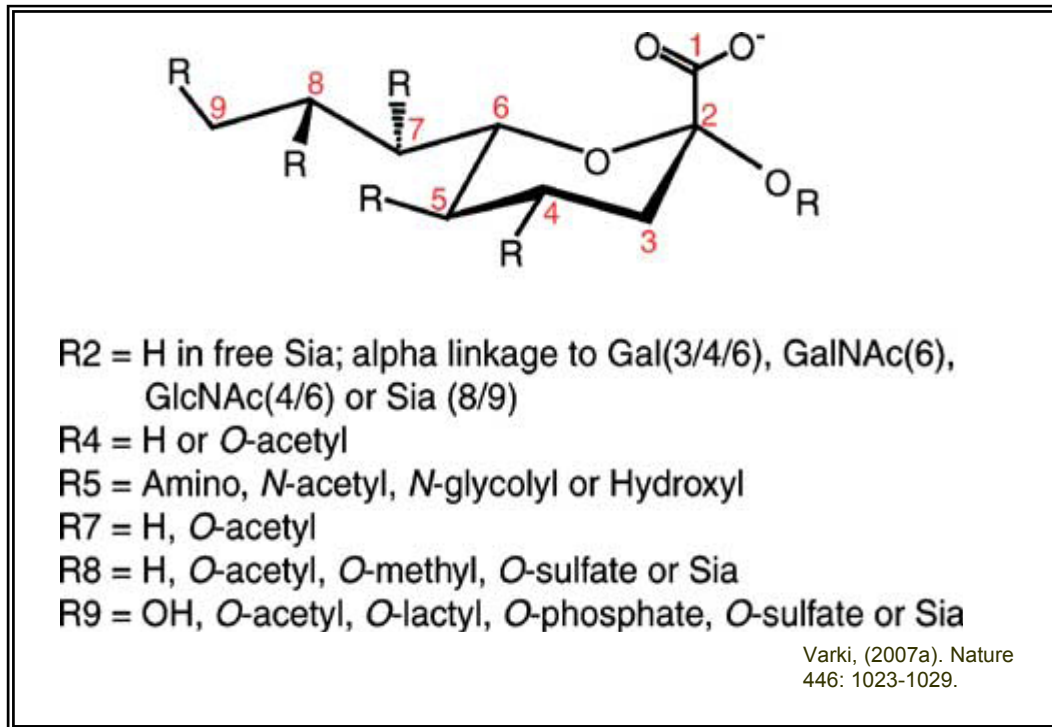


Figura 7. Representación del ácido siálico. Se muestran las posibles sustituciones conocidas, mismas que dan origen a una gran variedad de ácidos siálicos. Tomado de Varki, (2007a). Nature 446: 1023-1029.

Se conoce poco sobre la regulación de la expresión en los niveles de ácidos siálicos en la célula y en consecuencia en la diversidad de procesos celulares. Sin embargo, el ácido siálico en particular en la forma de ácido polisialílico (APS) con enlace α 2,8 juega un papel muy importante en la modulación de las interacciones célula-célula en el sistema nervioso (Rutishauser *et al.*, 2008). Durante las etapas tempranas del desarrollo coincidente con el crecimiento neurítico, se expresa APS en altos niveles sobre la molécula de adhesión celular neural (NCAM), este provee un sustrato permisivo en el cual las neuritas pueden viajar. Coincidentemente con la sinaptogénesis, los niveles de APS disminuyen dramáticamente, así se permite la generación de contactos sinápticos (Fryer y Hockfield, 1996). La transferencia de ácidos siálicos ocurre en las posiciones terminales de los carbohidratos de glicoproteínas y glicolípidos, y es catalizada postraduccionalmente por una familia de glicosiltransferasas que en el humano

incluyen al menos 18 sialiltransferasas diferentes (Harduin-Lepers *et al.*, 2001) que intervienen en la síntesis de todas las estructuras sialil-oligosacáridas conocidas (Broquet *et al.*, 1991). No se conoce si las sialiltransferasas para glicoproteínas son diferentes de las que actúan en glicolípidos (Lee *et al.*, 1993). Recientemente se ha descrito que BACE 1 la aspartil-proteasa que actúa sobre el PPA para generar el péptido amiloide- β actúa también sobre otros sustratos que incluyen a la ST6Gal I (β -galactosido α 2,6-sialiltransferasa 1) para iniciar su proceso de secreción; sin embargo, el significado biológico de las glicosiltransferasas solubles aún no se conoce (Sugimoto *et al.*, 2007).

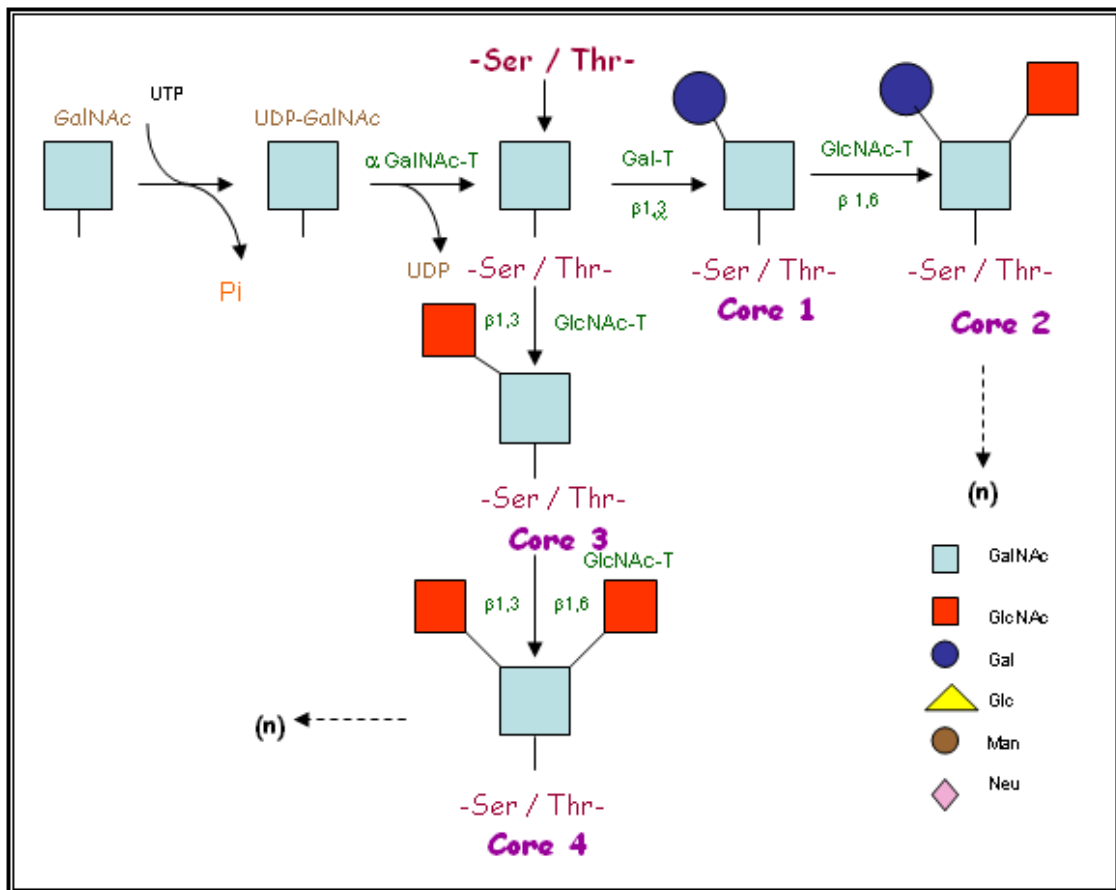


Figura 8. Biosíntesis de estructuras O-glicosídicas.- Se representan los núcleos o “cores” 1 a 4, que comprenden la mayoría de las estructuras O-glicánicas producidas *in vivo*. El Core 2 es ampliamente expresado y su posterior procesamiento resulta en diferentes glicanos sobre el mismo péptido por adición de otros sacáridos, generando diversificación y complejidad de estas estructuras. No existe una secuencia consenso conocida para la adición de GalNAc a un residuo de Ser o Thr.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad multifactorial que cursa con daño cognoscitivo y que concluye con demencia profunda. Las lesiones características en los cerebros afectados presentan componentes proteicos principalmente, sin embargo; estos componentes al parecer no son los únicos involucrados en esta patología y a la fecha las causas de esta enfermedad aún no han sido determinadas; por lo que es necesaria la búsqueda de otros marcadores que permitan entender y determinar el origen de esta patología para diseñar nuevas estrategias en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Nuestro grupo ha mostrado que existen modificaciones en la glicosilación de proteínas de cerebro humano de pacientes con la EA (Guevara *et al.*, 1998). El reconocimiento de la lectina de ALL (*Amaranthus leucocarpus*) sugiere un incremento en la producción de proteínas O-glicosiladas que contienen Gal(β 1,3GalNAc) 1,0 Ser/Thr o GalNAc 1,0 Ser/Thr, principalmente en las placas neuríticas (PNs). También se identificó con la lectina de MrL (*Macrobrachium rosenbergii*) la expresión de posibles derivados de ácido O-acetil siálico (Neu5,9Ac) en las marañas neurofibrilares (MNFs) (Guevara *et al.*, 1998). La reactividad de las lectinas ALL y MrL en los cerebros con EA sugiere que existe un procesamiento enzimático anormal que puede estar relacionado con la degeneración neuronal (Guevara *et al.*, 1998).

HIPOTESIS

Glicoproteínas con modificaciones por O-glicosilación y ácido siálico O-acetilado participan en los procesos de degeneración y plasticidad neuronal en la enfermedad de Alzheimer.

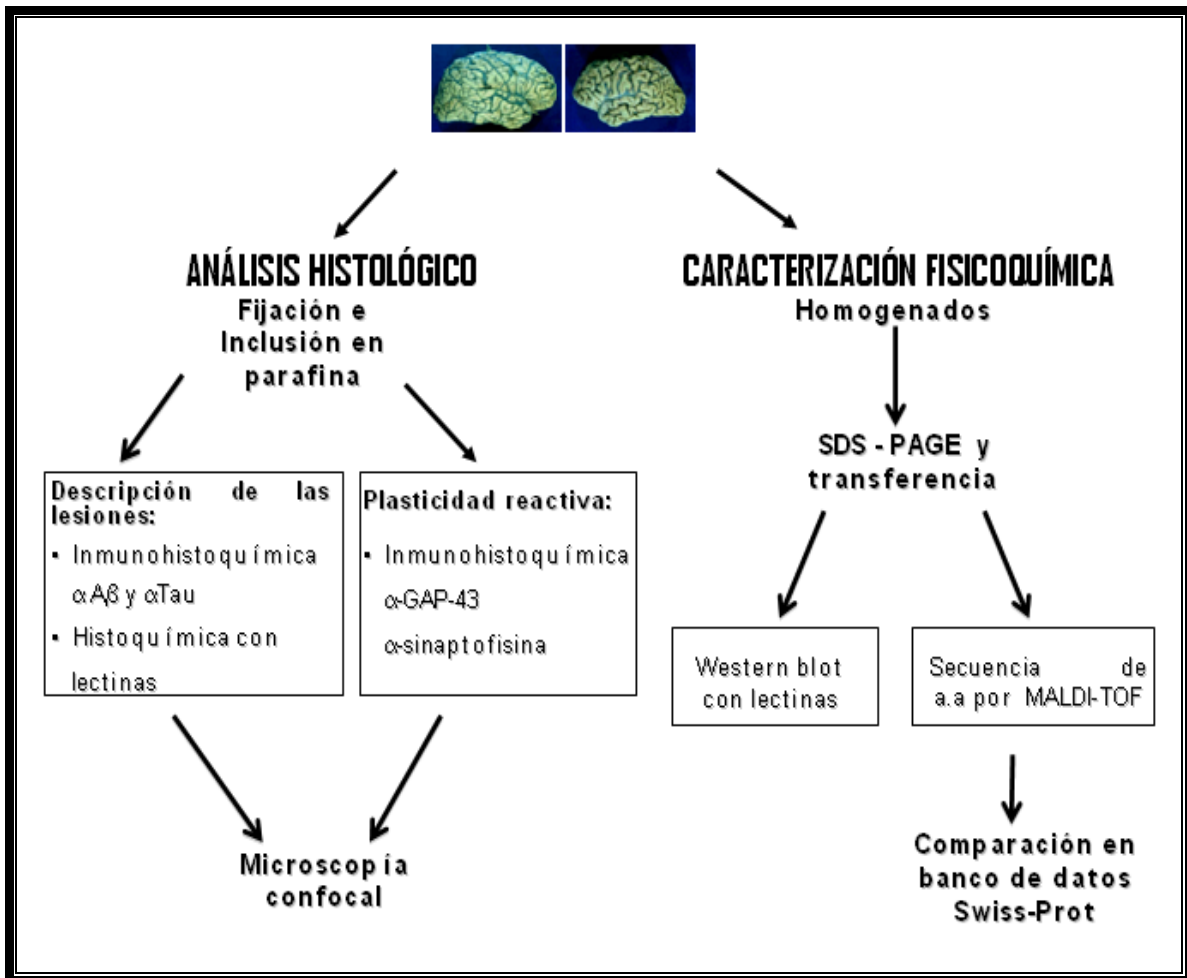
OBJETIVO GENERAL

Estudiar las moléculas O-glicosiladas en el proceso neurodegenerativo y la plasticidad neuronal en la enfermedad de Alzheimer.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Identificación de moléculas sacarídicas de cerebros diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer.
- ◆ Utilización de las lectinas de ALL y MrL como marcadores de neurodegeneración y plasticidad neuronal.
- ◆ Caracterización de los receptores reconocidos por las lectinas de ALL y MrL en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

DIAGRAMA DE FLUJO



MATERIALES Y METODOS

Lectinas.- La lectina del langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (MrL) y la lectina del amaranto *Amaranthus leucocarpus* (ALL) se purificaron por cromatografía de afinidad (Zenteno y Ochoa 1988; Vázquez *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 1998). Se utilizaron también lectinas comerciales como: *Maackia amurensis* (MAA), *Sambucus nigra* (SNA), *Arachis hypogaea* (PNA) y *Limulus polyphemus* (LPA) (EY Laboratorios Inc. St. Mateo CA; Sigma Chem. Co, St. Louis MO), las cuales poseen diferentes especificidades por oligosacáridos. Todas las lectinas fueron conjugadas a ésteres de N-hidroxisuccinimida de biotina (Pierce Chem. Co. Rockford) en una relación de 2:1 (Savage *et al.*, 1992).

Lectina	Fuente	Especificidad
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	α -NeuAc-(2-6)Gal/GalNAc
LCA	<i>Lens culinaris</i>	α -Man
Concanavalina A (Con A)	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -Man; α -Glc
LPA	<i>Limulus polyphemus</i>	NeuAc
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	α -NeuAc(2-3)
MRL	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	9,8,7-O-acetil NeuAc
ALL	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	Gal β 1,3GalNAc α 1,0 Ser/ Thr y GalNAc α 1,0 Ser/Thr
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	β -D-Gal(1-3) GalNAc

Tabla 2.- Especificidades de las lectinas utilizadas en este estudio

Enzimas.- Se utilizaron neuraminidasas comerciales de *Vibrio cholerae* (Sigma Chem. Co. St. Louis MO) y *Clostridium perfringens* (Calbiochem, EMD Biosciences Inc. Darmstadt, Germany) las cuales poseen especificidades diferentes por ácido siálico (Neu5Ac).

Actividad hemaglutinante.- La actividad hemaglutinante de las lectinas se determinó de acuerdo a Osawa y Matsumoto (1972). En una placa de 96 pozos de fondo en U se colocaron 25 µl de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.15 M, pH 7.4 (Na₂HPO₄, KH₂PO₄, KCl, NaCl), luego se agregaron 25 µl de lectina y se realizaron diluciones dobles seriadas, posteriormente se adicionaron 50 µl de una solución de eritrocitos tipo A al 1 % para el caso de la lectina de ALL y eritrocitos de rata para la lectina de MrL y se incluyó un pozo sin lectina como testigo negativo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente y se leyeron cuando el testigo negativo se sedimentó. El resultado se reporta en unidades hemaglutinantes (UHA) como el inverso de la máxima dilución donde se aprecia hemaglutinación.

Concentración de proteína.- Esta determinación se realizó con el Kit protein assay DC (Bio Rad Laboratories) basado en el método de Lowry y modificado para micro-volúmenes. En una placa de 96 pozos se preparó una curva de concentración creciente de proteína utilizando albúmina sérica bovina (ASB) como estándar, el volumen utilizado de cada muestra fue de 5 µl y se agregan los reactivos del kit de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La lectura de la placa se realizó a los 15 min a 690 nanómetros (nm) en un lector de Elisa marca Labsystems Multiskan MS (Finland).

Conjugación de lectinas a biotina.- Se ajustó la concentración de proteína de cada una de las lectinas a un mg/ml y se disolvieron en solución amortiguadora de carbonatos ($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$) 0.5 M, pH 8.5. Se adicionó el éster de N-hidroxisuccinimido-biotina (NHS-biotina) en proporción 2:1 y se mantuvo en agitación constante a 4°C durante 2 h o bien 30 min a temperatura ambiente. Al finalizar de este tiempo se dializó el conjugado toda la noche a 4°C en solución amortiguadora de carbonatos pH 8.5 para el caso de MrL y para ALL en solución salina isotónica (SSI), se hicieron varios cambios durante 2 ó 3 horas. Para el resto de las lectinas se dializó contra PBS 0.15 M, pH 7.4. Finalmente se comprobó el proceso de biotinación por dot-blot utilizando un conjugado de estravidina-peroxidasa y diaminobencidina (Sigma Chem Co St. Louis MO St. Louis MO); además se determinó actividad hemaglutinante y concentración de proteína a 690 nm utilizando ASB como estándar.

Tejido cerebral humano.- Se utilizó tejido de corteza frontal humana de tres casos con diagnóstico confirmado de Alzheimer (dos casos esporádicos y un caso familiar) de acuerdo a los criterios NINCDS-ADRDA además de un caso de demencia vascular, los cuales fueron donados por el Banco de Cerebros del (CINVESTAV-IPN) a cargo del Dr. Raúl Mena López. También se obtuvo tejido de corteza frontal humana de dos casos no demenciados (75 y 28 años) que se utilizaron como testigos negativos, mismos que fueron donados por la Dra. Laura Chávez, (Hospital General). Una parte del tejido cerebral se fijó por inmersión en Fijador Carnoy Methacarn- Bouin (metanol 60%, 30% cloroformo, 10% ácido acético glacial - solución saturada de ácido pícrico, p-formaldehído

al 4% y ácido acético glacial al 1%) o formalina amortiguada (formol al 10% en PBS) a 4°C y otra parte del tejido se mantuvo en congelación a -70°C hasta su uso.

Histoquímica con lectinas.- Se realizaron cortes de 10 µm de grosor de corteza frontal e hipocampo de tejido cerebral de pacientes con Alzheimer incluidos en parafina. Los cortes se desparafinaron y luego se incubaron en una solución de PBS/Ca⁺⁺ (0.15M, 18 µM ClCa₂, pH 7.4) durante 10 min. Luego se incubaron a 37 °C durante 30 min en una solución de PBS 0.5 % de albúmina libre de IgG (Sigma Chem. Co. St. Louis MO) como bloqueador de interacción inespecífica. Posteriormente, los cortes se lavaron de manera alternada con una solución de PBS/Ca⁺⁺ - Tritón X-100 al 0.2 % durante 10 min, luego sólo con PBS durante 5 min, finalmente los cortes se incubaron con las lectinas biotinadas de ALL y MrL dilución 1:20 y para las lectinas de LPA, PNA, MAA, SNA dilución 1:50 en PBS/Ca⁺⁺ durante 2 h a 37 °C en cámara húmeda. Los tejidos se lavaron exhaustivamente con PBS y posteriormente se realizó una segunda incubación con un conjugado de estravidina-FITC (Sigma Chem. Co. St. Louis MO) en una dilución 1:50 durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Luego los tejidos se lavaron con PBS y finalmente se cubrieron con resina sintética para su observación en el microscopio de luz. Se incluyeron controles negativos sin lectina y con lectina bloqueada con 200 mM del azúcar específico, para la lectina de MrL se utilizó 10 µM de mucina submaxilar bovina (Vázquez *et al.*, 1993).

Inmunohistoquímica.- Se realizaron tinciones para identificar varios componentes: amiloide- β ($A\beta$), se usó un anticuerpo de conejo (dilución 1:50) (Dr. André Delacourte, INSERM; Lille, Francia), tau hiperfosforilada (1:100) (Sigma Chem. Co. St Louis MO). En el caso del anti- $A\beta$ ($\alpha A\beta$), los cortes se trataron con una solución de ácido fórmico al 98 % (Merck, Darmstadt, Germany), durante 8 min antes de la inmunotinción. Se utilizó un anticuerpo secundario contra IgG de conejo conjugado a Rodamina (Pierce Chem. Co). Las preparaciones se contratiñieron con una solución acuosa al 0.0002 % de rojo tiazina (RT) durante 15 min y posteriormente se montaron con resina Vectashield (Vector Laboratorios, Burlingame) para su observación en el microscopio confocal.

Histoquímica e inmunohistoquímica para plasticidad neuronal.- Se utilizaron cortes de 6 μ m de grosor de tejido hipocampal y cortical de cerebros de pacientes con Alzheimer y testigos no demenciados incluidos en parafina, anticuerpos monoclonales contra Sinaptofisina (MAB332, Chemicon internacional Inc. Temecula, CA), en una dilución 1:1000, Tau-PHF hiperfosforilada (mAb AD2) dilución 1:500 y anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (HRP) (Jackson Inmunoresearch, Canadá) utilizando como cromógeno Diaminobencidina (Sigma Chem. Co. St. Louis MO). Una vez seleccionadas las áreas, las laminillas se marcaron por segunda vez con las lectinas de ConA, LCA, LPA, MAA, PNA, SNA, ALL y MrL conjugadas a biotina y reconocidas por estravidina-FITC y los anticuerpos mAb AD2 y anti GAP-43 (proteína asociada al crecimiento-43) (mAb 347, Chemicon Internacional Inc.) dilución 1:500. Las laminillas recibieron un pre-tratamiento con ácido fórmico al

80% durante 5 min antes de la inmunotinción, luego se lavaron y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados a Lisamina-Rodamina (Jackson Immunoresearch, Canadá). Las lectinas se reconocieron con un conjugado extravidina-FITC (dilución 1:50) (Sigma Chem. Co. St Louis MO). Se realizaron contratincciones en algunas laminillas con RT 0.0002 % o 5 μ M de yoduro de propidio (Sigma Chem. Co. St. Louis MO) en solución acuosa durante 15 minutos. Como control se omitieron las marcas con lectinas, realizando ensayos de inhibición incubando cada lectina con 200 mM del azúcar específico o bien incubando los cortes con 0.1 U de neuraminidasa de *V. cholerae* a 37 °C 30 minutos.

Microscopía confocal.- Las laminillas con doble marca se revisaron en un microscopio Nikon Diaphot (Nikon, Japón) equipado con un sistema de epi-iluminación y un sistema láser confocal (Bio Rad MRC-600, Watford, UK). Se capturaron de 10 a 20 imágenes consecutivas con intervalos de 0.5 a 1 μ m en el eje Z con un objetivo de inmersión 60X en dos canales simultáneamente. Las imágenes se proyectaron en un plano bidimensional y se sobrepusieron utilizando un monitor de pseudocolor (verde para FITC y rojo para Rojo tiamina o Rodamina). En la imagen sobrepuesta, el color amarillo se interpretó como colocación entre las dos marcas. Las imágenes se guardaron en un disco óptico de 1.2 GB y se obtuvieron fotografías en película Kodak T-Max 100 o Ektachrome 100 (Kodak, México), las imágenes se imprimieron con una impresora a color marca Mitsubishi. Las dobles marcas se revisaron en un microscopio invertido marca ZEISS equipado con epi-iluminación y sistema láser confocal LSM-410.

Identificación del receptor para las lectinas de ALL y MrL.- Se preparó un homogenado con 500 mg de corteza frontal humana de pacientes con EA y testigos no demenciados en 2 ml PBS-Tritón X-100 al 1 % en presencia de un coctel de inhibidores de proteasas (Mini complete Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Germany)). Las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm durante 15 min / 4 °C, los sobrenadantes obtenidos se centrifugaron nuevamente a 14,000 rpm durante 30 min a 4 °C. A la fracción soluble se le cuantificó la concentración de proteína con un kit protein assay DC (Bio-Rad, Laboratoires) utilizando ASB (1 mg/ml) como estándar. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemli, 1970) ajustando las concentraciones de proteína a 80 µg/carril. Las condiciones del corrimiento electroforético fueron 150 V / 1.5 h en una minicámara de 8 x 10 cm (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco).

Transferencia.- Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron a papel de nitrocelulosa (Osmonics Inc., Westborough MA) de acuerdo a los métodos estándares (Towbin *et al.*, 1979; Ericsson *et al.*, 1982). La membrana se lavó durante 1 h en agua desionizada y luego se colocó en amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192mM pH 8.3 / 20% de metanol absoluto) al igual que el papel filtro para equilibrar el sistema, así permanecieron hasta el momento de la transferencia. Una vez concluida la electroforesis, el gel también se equilibró en amortiguador de transferencia durante 15 minutos. Las condiciones fueron 15 V / 1.15 h en una cámara de

transferencia semiseca (Trans blot, Biorad Laboratories). Concluida la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se incubó en amortiguador Tris salino-Tween 20 0.1% (TBSTw) (Tris base 20 mM, NaCl 150 mM) pH 7.4 / Tween 20 al 0.1%) con leche en polvo descremada al 7 % durante toda la noche a 4 °C o bien 2 h a 37 °C para bloquear sitios inespecíficos, luego se realizaron lavados alternados con TBSTw y TBS pH 7.4 solo. Una vez bloqueada la membrana se cortó en tiras y cada tira se incubó con las lectinas biotinadas de ALL y MrL en una dilución de 1:70 y 1:100 respectivamente en TBS / leche descremada al 7 %. Con ALL se incubó toda la noche a 4 °C y posteriormente 2 h a 37 °C y para MrL solo 2 h a 37 °C. Al término de la incubación se realizaron varios lavados con TBS pH 7.4 solo. Luego se realizó una segunda incubación con un conjugado de estravidina-peroxidasa (Sigma Chem. Co. St. Louis MO) / TBS pH 7.4, dilución 1:8000, durante 1 h en oscuridad a 37 °C en agitación suave. Finalmente se realizaron varios lavados con TBS. La detección se realizó con un kit para quimioluminiscencia (ECL Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante, sobre película para autoradiografía (Kodak Biomax MR, Kodak Company).

Digestión enzimática de ácido siálico.- Se utilizaron transferencias de proteínas de corteza de cerebro humano en las condiciones antes descritas. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con solución de bloqueo (TBSTw / leche descremada al 7 %) toda la noche, luego se realizaron lavados con TBS solo. Una de las membranas transferidas se incubó con 0.1 U de neuraminidasa, de *Vibrio cholerae* (Sigma Chem. Co. St. Louis MO.) y otra con neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Calbiochem, EMD Biosciences Inc.

Darmstadt, Germany) en la misma concentración, durante 1 h y 2 h respectivamente a 37 °C. Luego, se realizaron lavados con TBS pH 7.4 y se realizó una segunda incubación de las membranas con una dilución 1:100 de MrL durante 2 h a 37 °C en cámara húmeda. Nuevamente se hicieron lavados con TBS solo y finalmente las membranas se incubaron con una dilución 1:8000 de un conjugado de estravidina-peroxidasa por 1 h a 37 °C y se reveló por quimioluminiscencia como se describió antes.

Inhibición de la interacción de la lectina de ALL con su receptor en cerebro humano.- Este procedimiento también se realizó sobre membranas transferidas de corrimientos electroforéticos de tejido cortical humano obtenido como se describió antes. La membrana de nitrocelulosa fue colocada en solución de bloqueo y posteriormente lavada con TBS solo. Una dilución 1:70 de la lectina de ALL se incubó con el azúcar específico [N-acetil galactosamina (GalNAc)] (Sigma Chem. Co. St. Louis MO) en concentración 0.2 M en TBS durante toda la noche a 4 °C y posteriormente 2 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo se realizaron lavados con TBS y finalmente la membrana se incubó con el conjugado de estravidina-peroxidasa en dilución 1:800 durante 1 h a 37 °C. La membrana se lavó y finalmente se reveló por quimioluminiscencia.

Determinación de la secuencia de aa de las proteínas de cerebro humano de pacientes con EA reconocidas por las lectinas de ALL y MrL.- La secuencia de aa de las proteínas reconocidas por las lectinas de ALL y MrL se determinó por el sistema MALDI-TOF (Matriz assisted laser desorption ionization-time of flight). La muestra se obtuvo de corrimientos electroforéticos

en geles de poliacrilamida al 10%, 1.5 mm de grosor en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de los homogenados de corteza cerebral de pacientes con diagnóstico de EA. Se cortaron las bandas proteicas correspondientes a los pesos moleculares de 90 y 94 kD y posteriormente las proteínas se eluyeron de la matriz de poliacrilamida con un equipo de electroelución (BioRad mod. 422) el eluido recuperado, nuevamente se sometió a electroforesis y se realizó la digestión de estas proteínas con 0.5 µg de tripsina grado secuenciación (Promega, Madison, WI) en 500 µl de bicarbonato de amonio, pH 8.0 a 37 °C durante 24 h. Las muestras se almacenaron a 4 °C durante 4 h para inhibir la acción de la tripsina. El digerido enzimático se preparó mezclando directamente sobre el blanco 1 µl (50pM) de los productos de reacción y 1 µl de ácido 2,5-dihidroxibenzoico como matriz (12 mg/ml en CH₃OH/H₂O, 70:30, v/v). La muestra se evaporó hasta secarse, continuando el proceso de rehidratado y reevaporado con agua dos veces más en 100 µl utilizando un sistema concentrador Speed Vac (GMI, Inc., Albertville, MN). Posteriormente se cristaliza la mezcla a temperatura ambiente. Los iones positivos de los péptidos obtenidos se miden por el sistema de MALDI-TOF en un espectrofotómetro de masas mod. Vision 2000 (time-of-flight) (Finnigan MAT, Bremen, Germany), equipado con un láser UV a 337 nm. El espectro de masas se adquirió en modo reflectron con una aceleración de voltaje de 8 keV y detección positiva. Los ensayos controles se realizaron utilizando tripsina sola para identificar la masa de los péptidos propios y con angiotensina I como estándar (Mr 1296.7) (Hellman *et al.*, 1995). La masa de los iones {M+H}⁺ de los péptidos producidos por la digestión con tripsina se comparó con las obtenidas en una base de datos de NCBI (Swiss-Prot 10/01/2001). Los sitios

posibles de glicosilación se determinaron utilizando un método de búsqueda NetOGlyc 2.0.

RESULTADOS

HISTOQUÍMICA CON LECTINAS

Las principales lesiones histopatológicas halladas en la EA son las placas neuríticas y marañas neurofibrilares, esto se demostró con la impregnación argéntica de Bielchowski (Figura 9) estas lesiones están formadas por agregados de proteínas A β y tau respectivamente. Sin embargo, estas proteínas no son los únicos componentes de las MNFs y de las PNs. Así que, para identificar la posible participación de componentes sacarídicos en las lesiones características de la EA realizamos histoquímicas con lectinas con diferentes especificidades (Ver tabla 3).

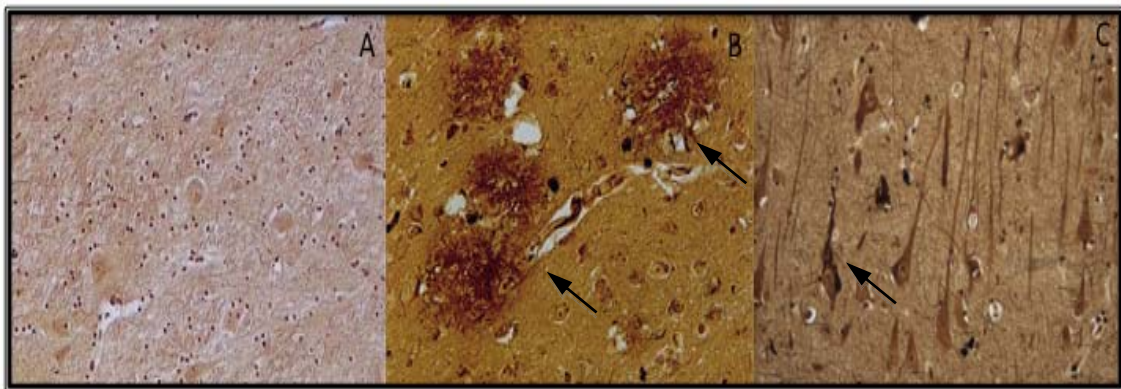


Figura 9. Impregnación argéntica. A. Tejido cerebral de un caso testigo sin demencia. B. Corteza cerebral de paciente con Alzheimer donde se destacan los agregados de amiloide- β en forma de placa (placa neurítica). C. Corteza cerebral de paciente con Alzheimer donde se destacan las marañas neurofibrilares.

Esto nos permitió hallar un patrón diferencial de reconocimiento principalmente con las lectinas de ALL y MrL las cuales reconocen al disacárido GalNAc y Neu5,9Ac₂ respectivamente en las estructuras histopatológicas propias de la EA, esto es PNs y MNFs; este reconocimiento lo clasificamos como de gran intensidad. En el caso de las lectinas que reconocen ácido siálico genérico como LPA (Neu5Ac), y aquellas que son estereoespecíficas como

MAA (α -NeuAc-(2-3)Gal/GalNAc) y SNA (α -NeuAc(2-6) Gal/GalNAc) el reconocimiento fue pobre sobre las PNs y MNFs (Tabla 3). Para estas y el resto de las lectinas probadas el reconocimiento se limitó a vasos sanguíneos y algunas células gliales. Fue de baja intensidad y en el caso de la lectina de MAA también reconoció depósitos granulares difusos en el citoplasma de algunas neuronas. Con respecto a los testigos negativos sin demencia no se hallaron estructuras fibrilares reconocidas por el colorante RT.

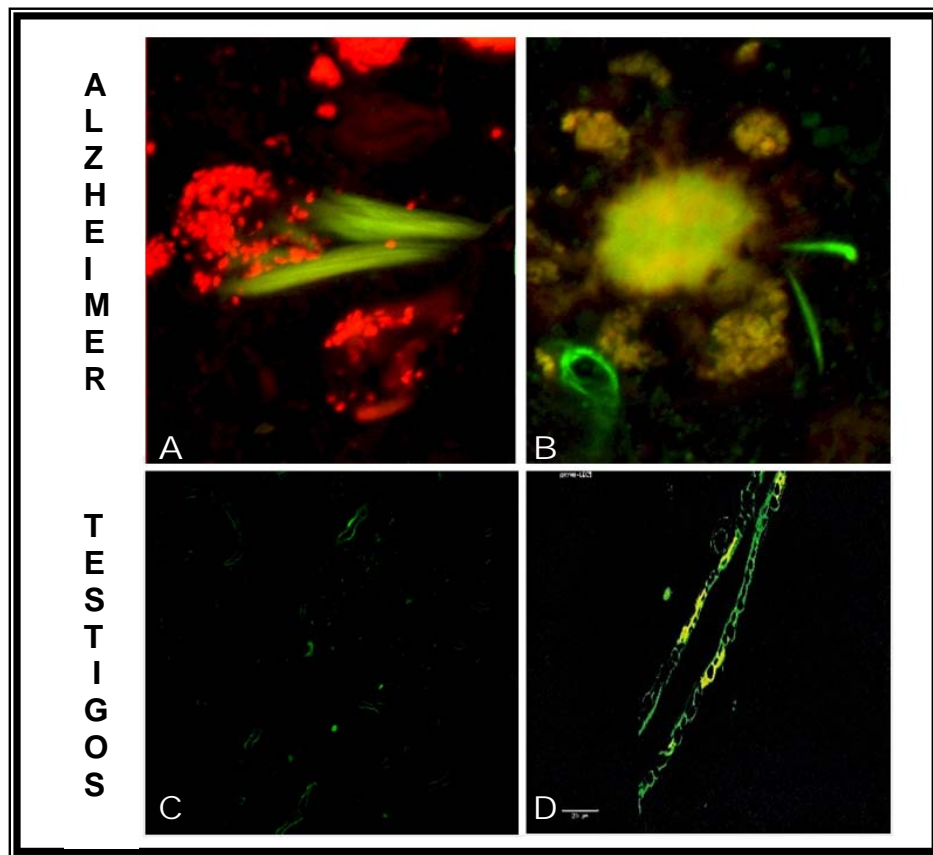


Figura 10. Reconocimiento por lectinas de las lesiones típicas en Alzheimer
Histoquímica con lectinas. Panel superior.- Tejido de corteza cerebral humana de pacientes con la EA. A) Reconocimiento con la lectina de MrL sobre una maraña neurofibrilar (MN) y vasos sanguíneos (canal verde). Contrateñida con rojo tiazina (canal rojo). B) Placa neurítica (PN) reconocida con la lectina biotinada de ALL-FITC (canal verde) y contrateñida con α -amiloide- β -TRIC (canal rojo), las regiones en amarillo indican co-localización de los marcajes. Panel inferior C) y D) Reconocimiento de las lectinas de MAA-FITC y LPA-FITC (canal verde) respectivamente sobre tejido cortical humano de casos sin demencia. El reconocimiento de estas lectinas en los testigos negativos se restringió a neuronas y vasos sanguíneos. Microscopía confocal.

Los resultados muestran la presencia de residuos O-glicosídicos del tipo GalNAc y ácido siálico O-acetilado con diferentes niveles de complejidad en las lesiones características de la EA reconocidas por las lectinas de ALL y MrL respectivamente, no así en los tejidos sin demencia que fueron utilizados como testigos. Esto se demostró con la contratinción con α -A β y con el colorante rojo tiazina (RT), mismos que, son ampliamente utilizados para identificar dichas lesiones.

ESTRUCTURA	LECTINAS							
	LCA	CoA	LPA	MAA	SNA	MrL	ALL	PNA
PN	+	-	+	-	+	+++	++++	±
MNFs	-	-	+	+	±	++++	++	±
LPF	+	-	-	-	+	-	+++	-
Neuronas	-	+	+	+ ⁿ	+	+	+	+
Vasos	+	+	+	+	+	+	+	+
Células gliales	-	+	+	+	+	+	+	±

Tabla 3. Reconocimiento con lectinas. Se resume el reconocimiento e intensidad de cada una de las lectinas utilizadas sobre diversas estructuras en el tejido cerebral de pacientes con Alzheimer. PN.- Depósitos de A β ; MNFs.- Marañas neurofibrilares; LPF.- Depósitos de lipofucsina; Neuronas.- Cuerpos celulares; +ⁿ.- Marcaje en neuronas y núcleos en casos testigo sin demencia; Vasos; Células gliales; ±.- reacción débil; +, ++, +++, +++++.- Marcaje positivos de baja a alta intensidad de reacción.

PLASTICIDAD REACTIVA

Además de las lesiones histopatológicas que caracterizan a la EA, algunos autores han mostrado inmunoreactividad sináptica en la corteza y en el hipocampo de dichos cerebros, esta plasticidad reactiva incluye crecimiento axonal, dendrítico y sinaptogénesis reactiva. Por otro lado, se ha descrito la presencia de gran cantidad de ácido siálico y quizás la existencia de diferentes glicofomas del PPA β soluble donde al parecer la glicosilación es crucial para su procesamiento y función. Así, para identificar moléculas sacarídicas implicadas en la sinaptogénesis reactiva como determinante de plasticidad reactiva en la EA utilizamos histoquímica con lectinas con diferentes especificidades como PNA, ALL, ConA, LPA, LCA, SNA, MAA y MrL. También se utilizaron anticuerpos α -sinaptofisina, α -GAP-43 y α -tau hiperfosforilada.

Con respecto al reconocimiento por lectinas, los resultados mostraron un aumento en la producción de estructuras sacarídicas unidas por enlaces O-glicosídicos a proteínas, estas estructuras sacarídicas son NeuAc α 2,6Gal β 1,3GalNAc α 1,0 Ser/Thr o antígeno Sialil T presentes en los procesos de crecimientos neuríticos en los cerebros con EA reconocidos por la lectina de ALL la cual es específica del antígeno sialil T y con MrL específica para ácido siálico 9-O-acetilado (NeuAc5,9Ac $_2$). Estas estructuras sacarídicas se encontraron específicamente en los procesos de crecimiento sináptico llamados meganeuritas por su estructura globular con un diámetro superior a 10 μ m; las cuales tienden a agruparse o a formar racimos, algunas veces asociados con los depósitos de amiloide- β . Aquí ALL mostró afinidad por componentes granulares, mientras que MrL reconoce tanto a los componentes granulares como intracitoplásmicos de las meganeuritas (Fig. 11B, C). Por otro

lado para identificar las posibles estructuras crípticas se eliminaron los residuos de ácido siálico con neuraminidasa de *V. cholerae* lo cual permitió que la lectina de PNA además de reconocer la membrana citoplásmica de las meganeuritas ahora también reconociera a los componentes granulares de dichas estructuras y que la lectina de MrL perdiera su reconocimiento por estas estructuras. En cerebros sin demencia (testigos negativos) el marcaje con las lectinas se restringió a los vasos sanguíneos.

Por otro lado, α -sinaptofisina (Fig. 11A) y α -GAP-43 mostraron también reactividad con meganeuritas en los cerebros de pacientes con Alzheimer. Además α -GAP-43 reconoció meganeuritas y neuritas distróficas asociadas y alrededor de los depósitos de amiloide- β contra-teñido con RT. De igual manera estas meganeuritas se reconocieron con α -tau hiperfosforilada. En los cerebros testigo el reconocimiento por α -GAP-43 se mostró como puntos pequeños en pocas neuritas y α -sinaptofisina no mostró reactividad, de esta manera se confirmó que la presencia y la inmunoreactividad de esta meganeuritas está asociada a la patología sináptica en la EA.

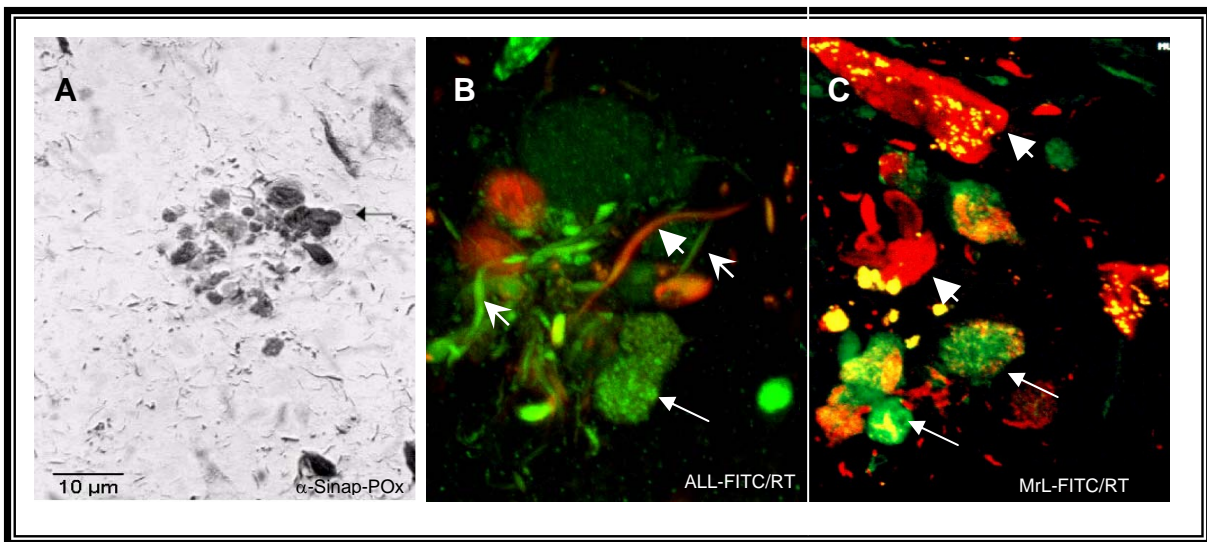


Figura 11. Sinaptogénesis reactiva en cerebros con Alzheimer. A) Estructura conocida como meganeurita reconocida con α -sinaptofisina-POx presente también en los cerebros de pacientes con EA. B) Reconocimiento por la lectina de ALL-FITC (canal verde) y contrateñida con rojo tiazina (RT) (canal rojo). La lectinas de ALL reconoció componentes granulares al interior de estructuras globulares conocidas como meganeuritas (flecha larga), así como algunas neuritas distróficas (NDs), otras NDs fueron reconocidas sólo por RT (flechas cortas) C) La lectinas de MrL reconoció meganeuritas con componentes granulares y el RT reconoció estructuras fibrilares, en algunas regiones de estas estructuras co-localizan los marcajes.

IDENTIFICACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS RECONOCIDAS POR LAS LECTINAS DE ALL Y MrL EN HOMOGENADOS DE CEREBRO CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Como resultado del reconocimiento de las lectinas de ALL y MrL sobre las lesiones características PNs, MNs por histoquímica y su posible implicación en la plasticidad neuronal determinamos la naturaleza glicoproteica de las moléculas reconocidas por las lectinas de ALL y MrL. Se determinó el perfil electroforético de 6 muestras de corteza cerebral humana: de los cuales 3 casos fueron de cerebros con la enfermedad de Alzheimer, 2 casos testigos negativos sin demencia y una demencia vascular para su análisis comparativo a nivel electroforético. Se ajustaron las concentraciones de proteína de cada muestra a 80 μ g / pozo.

El método de extracción proteica a partir de homogenados de corteza cerebral humana nos mostró en un perfil electroforético al menos 31 bandas

proteicas de diferentes pesos moleculares distribuidas a lo largo del gel (~205, ~25 KD). Fue evidente la presencia de algunas proteínas mayoritarias en el rango entre 66 y 36 KD, en este rango de peso molecular se apreció la mayor cantidad de ellas (11 proteínas), se hallaron también otras proteínas mayoritarias de 205 y 25 KD aproximadamente. Estas proteínas mostraron mayor concentración en las muestras de casos sin demencia y demencia vascular en comparación con las muestras patológicas de EA. Con respecto a los casos de Alzheimer se aprecian algunas variaciones entre ellos (Figura 12, líneas A, B y C).

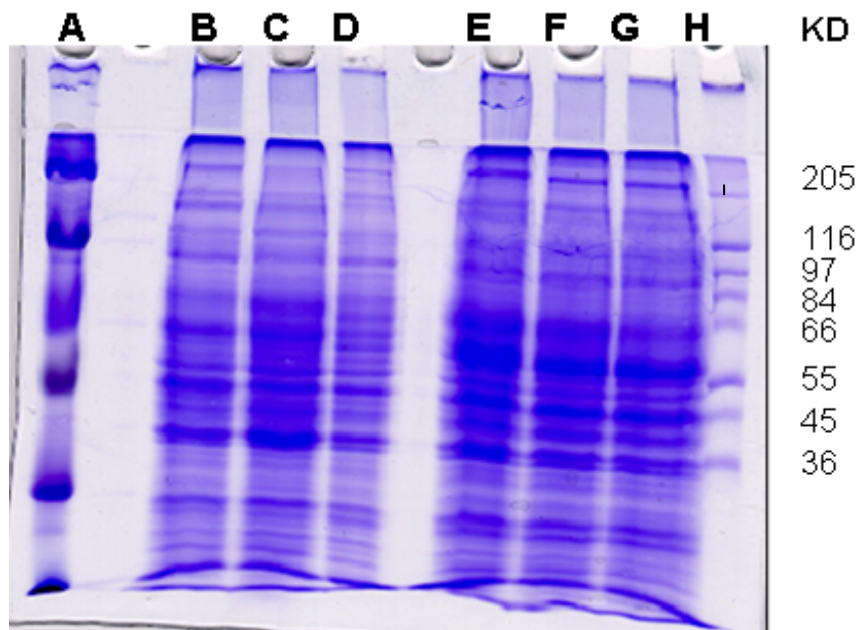


Figura 12. Perfil electroforético de homogenados de cerebro humano. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de los 6 homogenados de cerebro humano. A) Marcadores de peso molecular arcoiris, (Amersham) B) Alzheimer, Caso 1, C) Alzheimer, Caso 2, D) Alzheimer, Caso 3, E) Demencia vascular, F).-Testigo anciano sin demencia, G).-Testigo joven sin demencia, H) Marcadores de alto peso molecular. 80 µg/pozo. Tinción con azul de Coomasie.

DETECCIÓN DE LA Azgp94 EN HOMOGENADOS DE CEREBRO HUMANO

Para identificar al ligando glicoproteico de la lectina de MrL. Se realizó electro-transferencia del corrimiento electroforético de 6 homogenados de cerebro de pacientes con Alzheimer, demencia vascular y casos testigos sin demencia en una concentración de 80 µg / pozo. La detección se hizo con la lectina de MrL acoplada a biotina (MrL-B). El revelado del reconocimiento de la lectina MrL-B (dilución 1:100) se hizo utilizando un conjugado de estravidina-peroxidasa (dilución 1:8000) y la detección se realizó por quimioluminiscencia. En la figura 13 se muestra el reconocimiento de la lectina de MrL por una glicoproteína de aproximadamente 94 KD en todos los casos, con mayor reconocimiento en los casos testigo y el caso de demencia vascular. El reconocimiento positivo sobre esta y otras bandas proteicas nos confirmó la presencia de ácido siálico O-acetilado en la posición 9 (Neu5,9Ac₂). Así mismo, se reconocieron varias bandas sialoproteicas de peso molecular menor a 94 KD y algunas otras de mayor peso. También se muestra reconocimiento por una proteína de alto peso molecular sólo en los casos testigo (5 y 6). En el análisis electroforético teñido con azul de Coomassie se identificó que esta banda de 94 KD corresponde a una glicoproteína expresada en baja concentración, sin embargo, MrL mostró gran afinidad y en consecuencia el marcaje de la lectina de MrL es de mayor intensidad en comparación con su concentración (1, 2, 3). Es notorio que los casos testigo (5,6) así como el caso de demencia vascular (4) poseen mayor densidad en el reconocimiento por la banda de 94 KD en comparación con los casos de Alzheimer.

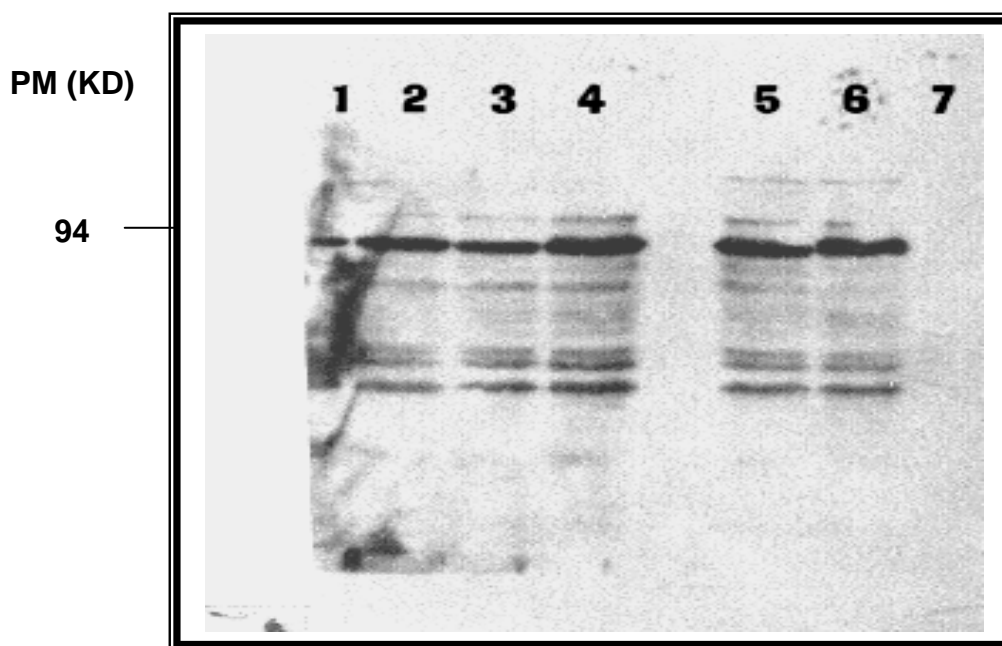


Figura 13. Reconocimiento de la lectina de MrL sobre los homogenados de cerebro humano. Se muestra el patrón de reconocimiento de la lectina de MrL por varias sialoproteínas. La principal diferencia se encuentra en el reconocimiento de la proteína de 94 KD entre casos de EA y testigos negativos. Se muestran 3 casos de Alzheimer, un caso de demencia vascular y controles sin demencia revelados por quimioluminiscencia. 1) Alzheimer Caso 1; 2) Alzheimer Caso 2; 3) Alzheimer Caso 3; 4) Demencia vascular; 5) Testigo anciano sin demencia; 6) Testigo joven sin demencia; 7) Control negativo de albúmina sérica bovina (ASB).

I.- CARACTERIZACIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE LA LECTINA DE MrL CON LA NEURAMINIDASA DE *C. perfringens*

El reconocimiento de la lectina de MrL por varias glicoproteínas se inhibió parcialmente utilizando neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, una exo-glicosidasa que posee especificidad por ácido siálico con diferentes tipos de enlace; ella reconoce y corta residuos de α 2,3 NeuAc, α 2,6 NeuAc, y α 2,8 NeuAc o ácido polisiálico de manera secuencial. Una electrotransferencia del corrimiento electroforético de las 6 muestras de cerebro humano humano obtenidas para este estudio se incubó previamente con la neuraminidasa de *C. perfringens* y posteriormente se incubó con la lectina de MrL. Como se aprecia en la figura 14, este tratamiento enzimático no eliminó totalmente la interacción con la lectina después de 2 h a 37 °C, y en el caso del testigo joven sin demencia joven parece diferenciar 2 bandas sialoproteicas de peso molecular

muy cercano, una de 94 KD y otra de mayor peso molecular aproximadamente 95.5 KD (figura 14-carril 6), antes de este tratamiento esta banda sialoproteica reactiva a MrL no era visible.

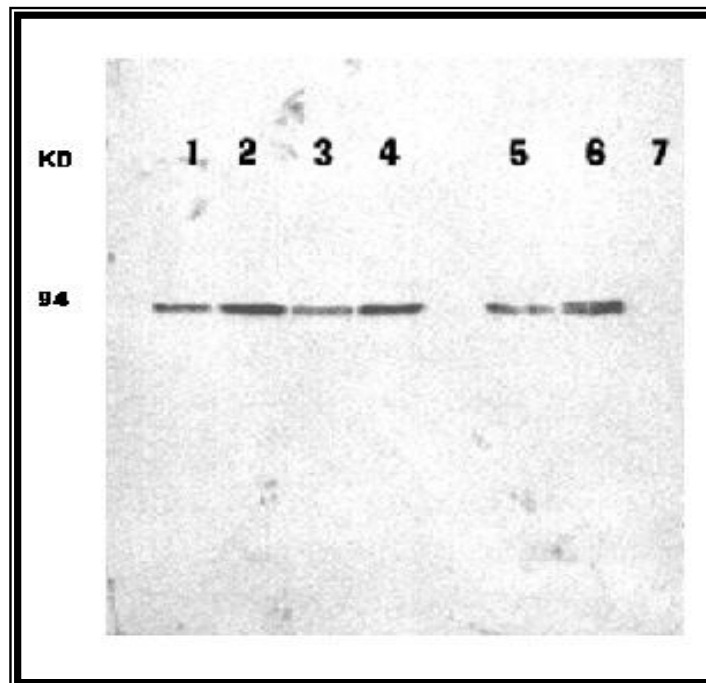


Figura 14.- Inhibición parcial del reconocimiento de la lectina de MrL sobre homogenados de cerebro humano. Se muestra el efecto del tratamiento con 0.1 U de la neuraminidasa de *C. perfringes*, 2 h a 37 °C sobre el patrón de reconocimiento de la lectina de MrL en los homogenados de cerebro humano de 3 casos de Alzheimer, un caso de demencia vascular y dos casos testigo sin demencia. El reconocimiento de la lectina de MrL se limitó a la banda de 94 KD y una banda de 95.5 KD en el caso 6. 1) Alzheimer caso 1; 2) Alzheimer caso 2; 3) Alzheimer caso 3; 4) Demencia vascular; 5) Testigo sin demencia anciano, 6) Testigo sin demencia joven; 7) Control de ASB.

II.- CARACTERIZACIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE LA LECTINA DE MrL CON NEURAMINIDASA DE *V. cholerae*

Por otro lado, la incubación previa de la electrotransferencia de las 6 muestras de cerebro humano con 0.1 U de neuraminidasa de *Vibrio cholerae* inhibió totalmente el reconocimiento de la lectina de MrL en 1 h a 37 °C. La especificidad de la neuraminidasa de *V. cholerae* por el ácido siálico es similar a la de *C. Perfringes*. Sin embargo, el sitio de corte por esta enzima se sitúa en la porción genérica de la molécula. La neuraminidasa de *V. cholerae* en la misma concentración, eliminó completamente los residuos de ácido siálico en un menor tiempo; al parecer el grupo O-acetilo reconocido por la lectinas de MrL no impidió su acción, aboliendo de manera total el reconocimiento, no así la neuraminidasa de *C. perfringes* que es estereoespecífica en su reconocimiento.

TRATAMIENTO ENZIMÁTICO CON NEURAMINIDASA DE *V. cholerae* SOBRE HOMOGENADOS DE CEREBRO HUMANO

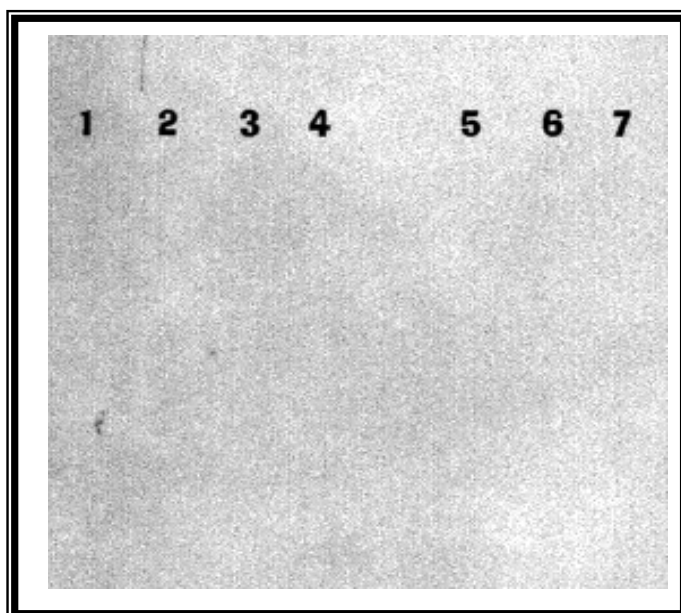


Figura 15. Inhibición del reconocimiento de la lectina de MrL sobre glicoproteínas de homogenados de cerebro humano. Los homogenados se trataron con 0.1 U de neuraminidasa de *Vibrio cholerae* 1 h a 37 °C. 1) Alzheimer caso 1; 2) Alzheimer caso 2; 3) Alzheimer caso 3; 4) Demencia vascular; 5) Testigo anciano sin demencia, 6) Testigo joven sin demencia, 7) Control negativo de ASB.

DETECCIÓN DE LA Azgp90 EN HOMOGENADOS DE CEREBRO HUMANO

Se incubaron electro-transferencias de homogenados cerebrales de pacientes con Alzheimer, demencia vascular y testigos negativos sin demencia con la lectina de ALL-B, (dilución 1:200) y con un conjugado de estravidina-peroxidasa (1:8000) y se reveló por quimioluminiscencia.

Nuestro resultado mostró la presencia de una banda glicoproteica de 90 KD reconocida por la lectina de ALL en todos los casos de Alzheimer, y demencia vascular. Todas las muestras patológicas mostraron reactividad, incluyendo el caso de demencia vascular mientras que los testigos negativos no lo hicieron (Figura 16, líneas 5-6). Así el uso de la lectina de ALL nos permitió identificar en los homogenados de cerebro humano, a una glicoproteína de 90 KD que posee al disacárido GalGalNAc

IDENTIFICACIÓN DEL LIGANDO PARA ALL EN HOMOGENADOS DE CEREBRO HUMANO

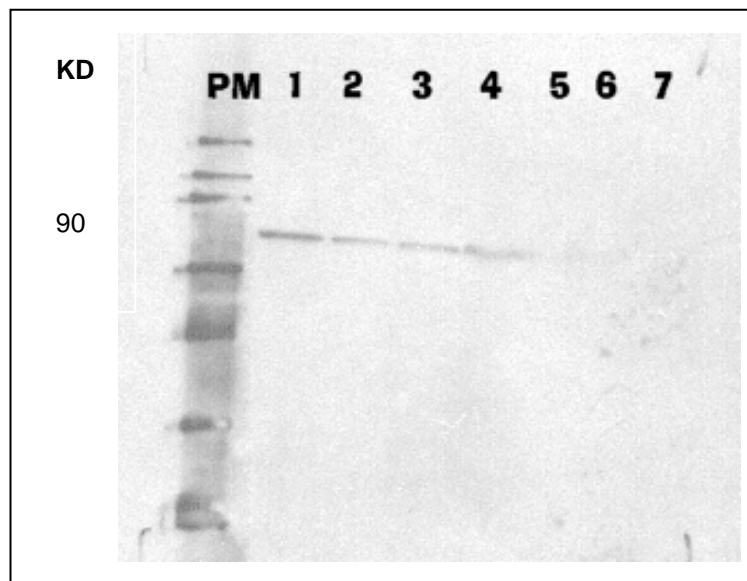


Figura 16.- Perfil de reconocimiento de la lectinas de ALL sobre homogenados de cerebro humano. Transferencia con la lectina de ALL de 3 casos de Alzheimer, un caso de Demencia vascular y dos casos testigo negativos. El reconocimiento por ALL se concentró en una banda de 90 KD reactiva sólo en los casos patológicos. 1) Alzheimer caso 1; 2) Alzheimer caso 2; 3) Alzheimer caso 3; 4) Demencia vascular; 5) Testigo sin demencia anciano, 6) Testigo sin demencia joven, 7) Control negativo de ASB.

ESPECIFICIDAD DEL RECONOCIMIENTO DE LA LECTINA DE ALL

Para identificar la interacción de la lectinas de ALL con su ligando en el cerebro de pacientes con Alzheimer, realizamos un ensayo de competencia de la lectina de ALL contra la Azgp90, misma que, consideramos el ligando transferido en el papel de nitrocelulosa, dicho ensayo por competencia se realizó utilizando 0.2 M de GalNAc y ALL-B (dilución 1:70), con las cuales se incubó la membrana de nitrocelulosa. Como resultado de este procedimiento no observamos el reconocimiento de la banda de 90 KD en ninguno de los casos de Alzheimer, ni demencia vascular como anteriormente ocurrió, en virtud de que se inhibe completamente la interacción con las fracciones reconocidas, en ensayos preliminares identificamos que con concentraciones de 100 mM o menores de éste carbohidrato, se logra inhibir de manera parcial el reconocimiento por ALL. El ensayo de inhibición del reconocimiento de la lectina de ALL por su ligando celular también se realizó incubando previamente la lectina en presencia de GalNac 0.2 M. El resultado fue la inhibición completa de dicho reconocimiento. Ensayos control con otros carbohidratos simples en las mismas concentraciones fueron negativos y no indujeron inhibición del reconocimiento de la lectina.

ENSAYO DE INHIBICIÓN CON GalNAc

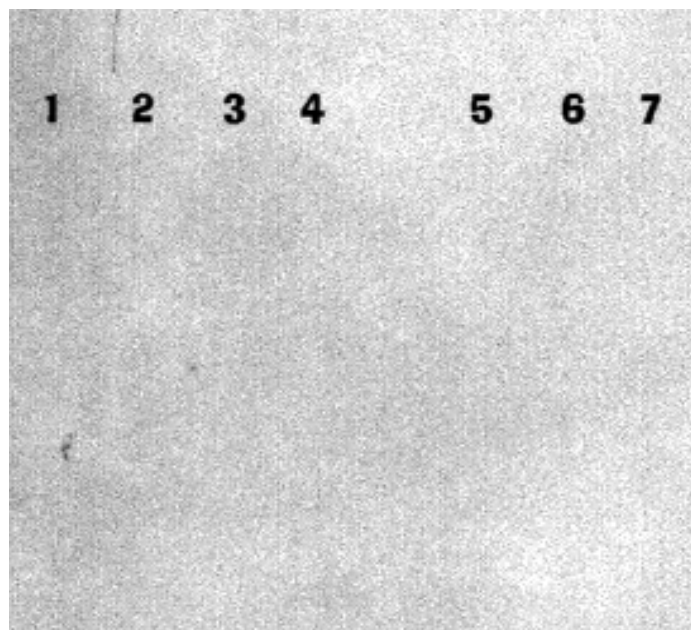


Figura 17.- Inhibición del reconocimiento de ALL sobre homogenados de cerebro humano. Se muestra la inhibición total del reconocimiento de la lectina de ALL incubada previamente con el disacárido GalNAc 0.2 M de GalNAc 1 hr a 37 °C en electrotransferencia de homogenados de 3 casos de Alzheimer, un caso de Demencia vascular y dos casos testigo sin demencia. 1) Alzheimer caso 1. 2) Alzheimer caso 2. 3) Alzheimer caso 3. 4) Demencia vascular. 5) Testigo anciano sin demencia. 6) Testigo joven sin demencia. 7) Control de ASB.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA FRACCIÓN DE CEREBRO DE ENFERMOS DE ALZHEIMER RECONOCIDA POR ALL

El análisis de la fracción reconocida por ALL se realizó a partir de la banda glicoproteica identificada por SDS-PAGE y recuperada por electro-elución. Los péptidos obtenidos, por tratamiento con tripsina se analizaron por MALDI-TOF. La secuencia de aminoácidos obtenida indicó que la Azgp90 posee una identidad del 32 % con KIAA 0310, una proteína humana con un peso molecular estimado de 95.2 KD perteneciente a una familia de proteínas cuya secuencia se ha inferido a partir del cDNA. El análisis posterior en una base de datos mostró que esta proteína posee diversos sitios susceptibles de modificaciones postraduccionales entre ellos varios sitios de N-glicosilación y O-glicosilación, también es susceptible a la acción de diversas cinasas (4 sitios de fosforilación por proteína cinasa dependiente de AMPc y GMPc, 21 sitios de fosforilación por proteína cinasa C, 19 sitios de fosforilación por caseína cinasa

II, 4 sitios de fosforilación por tirosina cinasa), así como numerosos sitios de miristoilación (20), amidación y un patrón de cierre de leucina (Tabla 5).

Otra molécula con la cual la Azgp90 posee alta identidad es mucina humana (MUC) con un porcentaje de identidad del 42 % y que posee un peso molecular de 91.8 KD que se asemeja al peso molecular estimado para la Azgp90. Esta proteína también posee numerosos sitios posibles de O-glicosilación (88, 49 sobre Thr y 39 sobre Ser), así como un sitio potencial de N-glicosilación. Esta proteína posee además sitios potenciales para fosforilación por proteína cinasa dependiente de AMPc y GMPc; 18 sitios de fosforilación por proteína cinasa C, 8 sitios de fosforilación por caseína cinasa II, 2 sitios de fosforilación por tirosina cinasa y 14 sitios de miristoilación.

TABLA 4. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS OBTENIDA A PARTIR DE PEPTIDOS TRÍPTICOS POR MALDI-TOF DE LA Azgp DE 90 KD

MASA (m/z)	No. RESIDUO	SECUENCIA	IDENTIDAD
PEPTIDO			
1477.10	1-13	MEQV <u>SS</u> RPTSPEK	K31*
1200.60	63-74	K <u>LS</u> P <u>SC</u> PDALAPKD	MUC
1699.90	116-131	RQNGTVVGTDIAELLLRD	K31*
1794.4	138-152	RYAQACHEVGTCLRT	MUC
634.9	190-194	RGDCLRD	MUC
2367.4	234-254	RFANSLPINDPLQTVYQLMSGRM	K31*
1255.2	291-302	RTMATMGDTLASRG	K31*
2378.90	303-324	RGLLDAAHFCYLMAQAGFGVYTKK	K31*
1901.80	518-536	RLLPSAPQTLDPGPLASPARV	K31*
2379.20	743-763	RCTWTKWFDVDFPSPGPHGGDKE	MUC
2004.50	792-809	KSHPEVSIEHLGQVVQCSRE	MUC

K31 (KIAA0310) es una proteína humana de 95.2 kD y posee 32 % de identidad con la Azgp90. MUC mucina humana pesa 91.8 kD y mostró 42 % de identidad con la Azgp90. Los aminoácidos subrayados indican sitios posibles de O-glicosilación.

TABLA 5a. SITIOS POTENCIALES DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN LOS CANDIDATOS PARA LA Azgp90

	KIAA 0310	MUC
GLICOSILACIÓN:		
N-	6	1
O-	26	88
FOSFORILACIÓN:		
Proteína cinasa C dependiente de AMPc y GMPc	4	1
Proteína cinasa C	21	18
Caseína cinasa II	19	8
Tirosina cinasa	4	2
OTRAS:		
Miristoilación	20	14
Amidación		1
Patrón de cierre de leucina	1	1

Obtenido por NCBI Swiss-Prot ; NPS@Proscan results 2001

TABLA 5b. UBICACIÓN DE SITIOS POTENCIALES DE GLICOSILACIÓN EN LOS POSIBLES LIGANDOS DE LA Azgp90

	KIAA 0310	MUC humana
Sítios de N-glicosilación	3 – 6 NTSL	304 - 307 NGTI
	103 – 106 NHSS	
	532 – 535 NFSS	
	669 – 672 NGTV	
	887 – 890 NHSL	
	1249 – 1252 NKSI	
Sítios de O-glicosilación	Thr: 548, 725, 1197, 1209, 1279, 1284, 1352. Ser: 7, 16 82, 190, 241, 244, 257, 350, 557, 558, 1064, 1065, 1067, 1183, 1202, 1204, 1280, 1326, 1346.	Thr: 49 Ser : 39

Obtenido por comparación de datos en NetOglyc 2.0 Prediction Results

CARACTERIZACION QUÍMICA DE LA FRACCION DE CEREBRO DE ENFERMOS DE ALZHEIMER RECONOCIDA POR MrL

La secuencia de aminoácidos obtenida por MALDI-TOF del ligando de MrL indicó que la Azgp94 posee una homología del 52, 41 y 29 % con KIAA0413, KIAA0388 y KIAA460 respectivamente con un peso molecular estimado de 98.4, 85.3 y 95.6 KD pertenecientes a una familia de proteínas cuya secuencia se infirió a partir del cDNA, pero que a la fecha es no es bien conocida su expresión ni su función (Tabla 6).

Otra molécula con la cual la Azgp94 posee alta homología es DNA ligasa III humana (DNLI3; EC 6.5.1.1) con un porcentaje de identidad también del 52 % y que posee un peso molecular de 95.8 KD y un pI de 9.15 mismo que, se asemeja al peso molecular estimado para la Azgp94 (Tabla 6).

TABLA 6. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS OBTENIDA A PARTIR DE PEPTIDOS TRÍPTICOS POR MALDI-TOF DE LA Azgp DE 94 KD

MASA m/z	No. RESIDUO	SECUENCIA	IDENTIDAD
PÉPTIDO			
1464.4	35 – 48	VVPNPFSESGDMK	DNA
905.70	76 – 82	IITQFQR	K413
2775.10	172–197	SGTPTODEMMDKPTSSSVDTMSLLSK	K460
2776.40	271-295	AHEDEVLCCAFSTDDRFIATCSVDK	K413
2379.10	303-323	EDQQQALQDIASRCTANDLK	DNA
2759.50	305-328	LSDTTEYQPILSSYSHRAQEFQVK	K460
2999.8	383-410	ALSVQASLMTPVQPMLAEACKSVAYAMK	DNA
1254.30	411-421	KCPNGMFSEIK	DNA
2776.40	456-480	DYPQAFPGGHSMILDSEVLLIDNK	DNA
805.10	524-529	LWETKK	K413
1446.60	540-552	MSGEPIQTVESIR	K460
2789.00	631-654	ESVQKNEFISEYCGELISQDEADR	K388
2759.50	658-680	VYDKYMSSFLFNLNDFWDATR	K388
1254.30	674-684	LLSWSFDGTVK	K413
1464.40	687-699	FANHSVNPNCYAK	K388
2999.80	696-723	DFVCHQGTVLSCDISHDATFKFSSTSADK	K413

Candidatos para la Azgp94 reconocidos por la lectina de MrL. DNA ligasa III (DNLI3) es una proteína de 95.8 KD y posee 52 % de identidad con Azgp94. K0413 (KIAA 0413), K388 (KIAA0388), K460 (KIAA0460) pertenecen a un grupo de proteínas humanas cuya secuencia se ha inferido a partir del cDNA. Su porcentaje de identidad es de 52, 41 y 29 % y su peso molecular estimado es de 98.4 KD, 85.3 KD y 95.6 KD respectivamente.

TABLA 6a.- SITIOS POTENCIALES DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN LOS CANDIDATOS PARA LA Azgp94

	DNALI3	KIAA0413	KIAA0388	KIAA0460
Glicosilación:				
N-		7	5	7
O-			2	48
Fosforilación:				
Proteína cinasa dependiente de AMPc y GPMc			2	2
Proteína cinasa C		9	11	17
Caseína cinasa II		13	9	21
Tirosina cinasa		1		1
Sitios PTB	1			
Otras:				
Miristoilación		6	6	23
Señales repetidas de Trp-Asp		4		

Obtenido por NCBI Swiss-Prot ; NPS@Proscan results 2001

TABLA 6b. UBICACIÓN DE SITIOS POTENCIALES DE GLICOSILACIÓN DE LOS CANDIDATOS PARA LA Azgp94

	KIAA0413	KIAA0388	KIAA0460
Sitios de N-glicosilación	36 – 39 NKSL	195 –198 NDTS	9 – 12 NTTV
	65 – 68 NCSQ		37 – 40 NSST
	218 – 221 NITN		376 – 379 NDSF
	221 – 224 NLSR		457 – 460 NASR
	325 – 328 NSSH		485 – 488 NLTQ
	771 – 774 NVSN		629 – 632 NSTF
	832 – 835 NGTN		834 – 837 NSSS
Sitios de O-glicosilación	Thr:17 residuos		Thr:17 residuos
	Ser31 residuos	Ser 416, 429	Ser 31 residuos

Obtenido por comparación de datos en NetOglyc 2.0 Prediction Results

DISCUSIÓN

ANÁLISIS DE MARCADORES GLICOSILADOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En este trabajo, usamos lectinas específicas para el ácido siálico, derivados del ácido siálico y O-glicanos que nos permitieron encontrar un patrón particular de glicosilación en las MNFs y NPs presentes en los cerebros con la EA, no así en los cerebros testigo sin demencia. La utilización del doble marcaje con un colorante conocido como rojo tiazina (RT) y el uso de lectinas sobre las lesiones nos permitió identificar la naturaleza de la glicosilación de estas estructuras. Se ha mostrado que el RT reconoce de manera específica al amiloide- β y a tau en estado fibrilar en el cerebro (Mena *et al.*, 1995; Mena *et al.*, 1996) y por ello es ampliamente usado para identificar las lesiones de la EA. El análisis con lectinas conjugadas a FITC en tejido de la EA doblemente marcado, mostró una diferencia consistente en el reconocimiento de estructuras patológicas, en el núcleo del amiloide- β de las NPs y en las MNFs.

Las marañas neurofibrilares (MNFs), las placas neuríticas (PNs) y la muerte neuronal son los componentes principales de la enfermedad de Alzheimer (EA). Diversos estudios sugieren que las modificaciones postraduccionales de las proteínas, especialmente la glicosilación, podrían correlacionar con las alteraciones específicas de la EA (Kobayashi *et al.*, 1989). Sin embargo, el hecho de que las dos principales proteínas identificadas en la EA, la proteína tau (Wang *et al.*, 1996; Araujo *et al.*, 1997) y el precursor de la amiloide- β son glicoproteínas (Kang *et al.*, 1987), apoya nuestro interés en la identificación de la micro-heterogeneidad de estas, y otras proteínas asociadas a las PNs y

MNFs basándonos en la glicosilación como un marcador nuevo y específico para la EA.

Estudios histopatológicos previos en el sistema nervioso de mamíferos muestran una glicosilación anormal en el proceso de maduración (Alroy *et al.*, 1987) así como en las condiciones patológicas humanas (Mann *et al.*, 1992). Esos estudios con lectinas en la EA reportan inconsistencias en el reconocimiento de las lesiones (Mann *et al.*, 1988; Mann *et al.*, 1989; Mann *et al.*, 1990); en cambio, nosotros encontramos que la lectinas de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) y la lectinas del langostino de agua dulce *Machrobrachium rosenbergii* (MrL) tienen un reconocimiento específico por MNFs y PNs.

La presencia o prevalencia de secuencias sacarídicas específicas han sido consideradas como indicativas de maduración o transformación celular (Springer, 1984). Los antígenos T ($\text{Gal } \beta 1,3\text{GalNAc1,0Ser/Thr}$) y Tn (GalNAc1,0Ser/Thr) se evaluaron con las lectinas PNA y ALL, respectivamente. PNA muestra reactividad sobre la galactosa del antígeno T ($\text{Gal } \beta 1,3\text{GalNAc1,0Ser/Thr}$) y ALL reconoce al hidroxilo del C4 y el N-acetilo del C2 de la GalNAc en ambas secuencias (Zenteno *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 2004). La adición de ácido siálico elimina la unión de PNA como resultado de un determinante críptico (Pereira *et al.*, 1976). Como nuestros resultados indican, la lectina PNA es incapaz de reaccionar con las lesiones típicas de la EA; así, la utilización de la lectina ALL nos ha permitido reconocer algunos componentes sacarídicos en las PNs desde su reconocimiento estereoespecífico por el antígeno T y Tn. Estas lesiones están constituidas principalmente del péptido amiloide- β en estado fibrilar.

La PPA β es una proteína de 695-770 aa que posee 45 residuos de treonina y 30 de serina que pueden ser sustituidos por N-acetil-D-galactosamina para formar el antígeno T o el Tn (GalNAc1,0 Ser/Thr). Esto podría representar el núcleo típico de la O-glicosilación. Si así fuera, el marcaje positivo con ALL podría indicar la presencia del antígeno T en una forma críptica en las PNs. Incluso es posible que los antígenos T y Tn puedan ser sustituidos por ácido siálico conformando los antígenos Sialil T y Sialil Tn. Así la pre-incubación del tejido con la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* vuelve positivo el marcaje para PNA sobre todas las PNs. ALL es una lectina específica para el antígeno Tn e interactúa específicamente con el grupo N-acetilo sobre el C2 de la GalNAc presente en la estructura del antígeno T y Tn (Zenteno *et al.*, 1992]. El pretratamiento de los tejidos con neuraminidasa no pareció modificar la estructura del antígeno Tn, por tanto fue reconocida por la misma lectina. Esto indica la relevancia de contener estructuras GalNAc como indicador de alteraciones patológicas en la EA. Este resultado es importante ya que sugiere la presencia de modificaciones específicas de la O-glicosilación en un receptor putativo para esta lectina.

Nuestros resultados muestran que las diferencias que se observaron en las estructuras patológicas en la EA mediante el uso de lectinas, representan diferentes grados de complejidad de biosíntesis de oligosacáridos unidos por enlaces O-glicosídicos. En estos fenómenos participarían entonces, una gran variedad de transferasas que están influenciadas por la presencia de ciertos aminoácidos adyacentes a serina y treonina, como la prolina (Marth, 1996). Aunado a esto, dependiendo de la sustitución de los residuos de GalNac, las glicoproteínas difieren estructuralmente en sus ángulos de torsión y en sus

enlaces glicosídicos aumentando la diversidad estructural a diferencia de los enlaces de tipo N-glicosídicos, lo que enfatiza la relevancia del ordenamiento estructural en una membrana biológica de las glicoproteínas O-glicosiladas (Pepe *et al.*, 1991).

A la fecha se conocen al menos 15 sialiltransferasas en el humano, aunque el genoma humano al parecer codifica probablemente para más de 20 sialiltransferasas diferentes involucradas en la biosíntesis de sialoproteínas y sialolípidos (Harduin-Lepers *et al.*, 2001; Harduin-Lepers *et al.*, 2005). El ácido siálico es miembro de la familia de azúcares carboxilados de 9 carbonos encontrados en la parte más externa de los oligosacáridos de vertebrados (Varki 2007a). El más común es el ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac), que es considerado el precursor de todos los demás. Una diversidad adicional en los residuos de ácido siálico, se produce por diferentes enlaces glicosídicos sobre el C2. Esto produce en la mayoría de los animales, enlaces del tipo NeuAc α 2,3 o enlaces α 2,6 de los grupos hidroxilos de la galactosa (Gal) o el grupo 6-OH de la N-Acetilglucosamina (GlcNAc) o N-Acetilgalactosamina (GalNAc). La lectina LPA reconoce ácido siálico sin preferencia de enlace glicosídico. Esto explica su reactividad en la EA y en los casos controles sin demencia. Sin embargo, el reconocimiento de MAA específico para NeuAc α 2,3Gal (Kanami *et al.*, 1994) y de SNA específico para NeuAc α 2,6Gal (Shibuya *et al.*, 1987) está modificado en condiciones patológicas, particularmente en las MNFs. Como demostramos en este trabajo, el NeuAc α 2,3Gal se identificó en neuronas de cerebros testigo y el NeuAc α 2,6Gal en MNFs de casos con Alzheimer. Nuestros resultados están apoyados por las descripciones de que la actividad de sialil transferasa

neuronal disminuye en la EA (Maguire y Breen, 1995). Otra sustitución interesante que observamos fue la del ácido siálico 9-O-acetilado, que identifica la lectina del langostino de agua dulce MrL (Vázquez *et al.*, 1993), este tipo de sustitución fue observada principalmente en las MNFs. Diversos trabajos muestran que la 9-O-acetilación se observa en células de origen neuroectodérmico y sugieren que pueden jugar un papel importante en la migración de neuronas en desarrollo en el cerebro del embrión (Blum y Barnstable, 1987). Además, se ha mostrado que las estructuras que contienen ácido siálico 9-O-acetilado, participan activamente en la organización y crecimiento de conos y neuritas (Araujo *et al.*, 1997).

Los ácidos siálicos pueden ser modificados por uniones O-acetil éster en las posiciones 7 y 8; o 7, 8 o 9 (Schauer, 1991; Varki, 1992; Wei-Xing *et al.*, 1998), una vez modificados aparecen en las posiciones terminales de los carbohidratos de glicoproteínas y glicolípidos y pueden alterar el desarrollo embriogénico y el reconocimiento de anticuerpos, lectinas y virus (Wei-Xing *et al.*, 1998). Sin embargo, aunque la actividad enzimática de la O-acetil transferasa ha sido mostrada, a la fecha su purificación no ha sido posible (Wei-Xing *et al.*, 1998). Los mecanismos de regulación y el significado de las modificaciones en el proceso de sialización no se conocen actualmente. Se puede asumir entonces, que la modificación en la O-glicosilación y la sialización de las proteínas, particularmente de tau (Araujo *et al.*, 1997) y PPA β soluble, inducen cambios estructurales que afectan a la proteína y su función (McFarlane *et al.*, 1999). Estos cambios pueden hacer más rígida la estructura glicosídica, induciendo modificaciones en la comunicación célula-célula. Por ejemplo, cambios sitio-específicos después de la 9-O-acetil-

glicosilación podrían no sólo modular la función de tau sino también el papel que juega en la despolimerización del microtúbulo (Araujo *et al.*, 1997). Nuestro estudio sugiere que en los cerebros con EA, un patrón específico de O-glicosilación y 9-O-acetilación, podrían producir re-arreglos fibrilares de tau y amiloide- β . Proponemos entonces que las lectinas ALL y MrL son herramientas útiles y específicas para el estudio de las modificaciones de las proteínas en la EA. Se requiere profundizar en el papel específico de las glicosiltransferasas en los cerebros con EA.

En este estudio, el uso de lectinas específicas para el ácido siálico y O-glicanos nos permitió describir un patrón anormal de glicosilación en los procesos de sinaptogénesis, específicamente de las meganeuritas y neuritas distróficas en la EA. La naturaleza de la glicosilación en las meganeuritas se confirmó por una doble marca con RT y con lectinas, α -sinaptofisina o α -GAP-43. En nuestras condiciones experimentales, la autofluorescencia de la lipofuscina fue monitoreada permanentemente para evitar cualquier tipo de interferencia con el marcaje de las lectinas. Es interesante desde un punto de vista técnico para una interpretación correcta del marcaje de las meganeuritas con las lectinas.

La presencia o prevalencia de secuencias específicas sacarídicas se considera un indicador de maduración o transformación celular, por ejemplo, el antígeno T o Tn. En este estudio revisamos las estructuras glicosiladas presentes en los cerebros con la EA con ayuda de las lectinas cuyas especificidades son bien conocidas (Tabla 2). Los antígenos T y Tn fueron evaluados con las lectinas PNA y ALL. PNA es una lectina galactosa (Gal) específica que muestra reactividad por el antígeno T. Cuando este antígeno es cubierto por el ácido siálico, se pierde el reconocimiento por PNA (Pereira *et al.*, 1976). PNA

reconoció estructuras meganeuríticas. Sin embargo, la presencia de antígenos sializados T en las meganeuritas y en los depósitos de amiloide- β fueron confirmados con la incubación de neuraminidasa de *V. cholerae* sobre los tejidos. Estos tratamientos produjeron un aumento en la reactividad de PNA sobre las meganeuritas y depósitos de amiloide- β . ALL es una lectina específica para GalNAc que tiene una gran afinidad por los antígenos T. La interacción con su receptor se ve modificada por la presencia del ácido siálico (Hernández *et al.*, 1999). ALL reconoció meganeuritas, neuritas distróficas así como depósitos de amiloide- β . Además, el tratamiento con neuraminidasa no modificó el reconocimiento de las estructuras, lo que indica que el antígeno T es un componente constitutivo de las neuronas con sinaptogénesis en la EA. Nuestros resultados indican diferencias en el grado de sialización de las muestras evaluadas. La diversidad en los ácidos siálicos generados por el enlace glicosídico en el C2, resulta en un enlace NeuAc α 2,3 o α 2,6 con el grupo OH de la galactosa (Varki, 1997). La lectina de LPA reconoce el ácido siálico sin importar el tipo de enlace (Rocha *et al.*, 1979). Como lo indicó el reconocimiento sobre los depósitos de amiloide- β y en menor grado de las meganeuritas. SNA reconoció las mismas estructuras que LPA. Sin embargo, el reconocimiento de MAA cuya especificidad es por Neu5Ac α 2,3 estuvo ausente en todas las muestras evaluadas. Esto indica que los residuos que se encuentran en estas estructuras están unidos a las galactosas con enlaces α 2,6 (Kanami *et al.*, 1994). Esto sugiere que las sialil transferasas α 2,3 no son efectivas en la EA. MrL que reconoce Neu5,9Ac2, indica que el crecimiento neurítico podría estar asociado con la adición de un ácido siálico O-acetilado

sobre una proteína O-glicosilada (Blue, 1987). Estos cambios de glicosilación podrían participar en el proceso temprano de neurodegeneración (Araujo *et al.*, 1997), debido a la formación de estructuras más rígidas que posiblemente modifiquen la comunicación celular. Por otra parte, los gangliósidos, también están implicados en numerosas funciones del desarrollo del sistema nervioso central y se sugiere que la glicosilación alterada correlaciona con periodos de migración celular y migración axonal. Por tanto, los derivados del ácido siálico tienen un papel regulador en los procesos de crecimiento del cono axonal, motilidad y adhesión (Araujo, 1997).

Los ensayos con LCA y ConA indican que LCA reconoció solamente los depósitos de amiloide- β , mientras que ConA reconoció las meganeuritas. Ambas lectinas muestran reconocimiento con proteínas N-glicosiladas. Sin embargo, en contraste con ConA, LCA tolera la sustitución con residuos N-acetilactosamínicos en las mismas estructuras, lo que sugiere que las cadenas oligomanosídicas y N-acetilactoamínicas aparecen en menor proporción que las de los O-glicanos observados en las meganeuritas y las de los depósitos de amiloide- β .

Estructuralmente, las meganeuritas que fueron reconocidas por PNA, ALL y MrL podrían ser estructuras dendríticas atróficas. La acumulación de sinaptofisina y GAP-43 sobre esas estructuras indican un crecimiento sináptico anormal en la EA. Existen reportes que indican que GAP-43 se expresa en altos niveles en neuronas en desarrollo, regeneración axonal y crecimiento neurítico (Neve *et al.*, 1988; Masliah *et al.*, 1991; De la Monte *et al.*, 1995; Benowitz y Routtenberg, 1997). Sin embargo, la falta de marcadores confiables para identificar los procesos de crecimiento en el cerebro humano, dificulta

examinar los cambios neurodegenerativos o identificar los puntos bioquímicos claves en la respuesta sinaptogénica. Nuestros resultados sugieren fuertemente que las meganeuritas podrían representar plasticidad cerebral en la EA.

En suma, nuestros resultados indican que las alteraciones en la plasticidad cerebral se podrían deber a una participación diferencial de O-glicosil y sialiltransferasas que fallan a través del procesamiento de las proteínas en Golgi y que participan en la sinaptogénesis reactiva. Esto podría representar un evento temprano en la neurodegeneración del tipo Alzheimer.

En relación a las estructuras sacarídicas reconocidas por las lectinas de *Macrobrachium rosenbergii* (MrL) y *Amaranthus leucocarpus* (ALL) asociadas a las principales lesiones histopatológicas (PNs y MNs), resulta interesante la identificación de las glicoproteínas de 90 y 94 KD reconocidas con cada lectina, este hallazgo abre la posibilidad de utilizar las lectinas de ALL Y MrL como marcadores para identificar bioquímicamente la enfermedad de EA.

La digestión del ácido siálico mediante neuraminidasas nos indicó la relevancia de los carbohidratos en la interacción y reconocimiento del receptor, además nos confirma que el tipo de enlace reconocido por la lectina de MrL es el 9-O-acetilo en el ácido siálico, ya que la especificidad de la neuraminidasa de *C. perfringens* es α 2,3; α 2,6; α 2,8 y el grupo O-acetilo en la posición 9 de la molécula de ácido siálico de manera secuencial. Este último al parecer se encuentra en gran proporción en la Azgp de 94 KD presente en todas las muestras de cerebro humano probadas y en el caso testigo joven, también en la banda de 95.5 KD. Además pudimos observar que la cantidad expresada de dicha proteína es mayor en los casos testigo sin demencia que en los cerebros

con EA, esto puede indicar que existe una pérdida de este tipo de sialoproteína en estas condiciones patológicas.

Por otro lado, la inhibición parcial del reconocimiento de la lectina de ALL por su ligando específico GalNAc, en un ensayo de competencia, nos indicó que existe una mayor afinidad por el receptor completo más que por el disacárido GalNAc solo. Esto indica que las interacciones entre la lectina y su receptor no solo se circunscriben a la porción sacarídica (GalNAc) sino que, el reconocimiento involucra también a la porción peptídica del receptor, según lo reportado por Hernández *et al.*, (2004), la lectina de ALL reconoce las treoninas (Thr) 2 y 6 en glicopéptidos con una secuencia común de TTSAPTTS donde existe un residuo de prolina. Por otra parte, el reconocimiento compartido por las dos lectinas tanto de ALL como MrL sobre la banda de 90 kD, nos indica que el ácido siálico O-acetilado se encuentra unido a una molécula de GalNAc. Las secuencias de aminoácidos obtenidas por digestión con tripsina y MALDI-TOF de las proteínas de 90 y 94 KD reconocidas por las lectinas de ALL y MrL indican cierta homología con proteínas como, mucina y otras cuya función aun no es conocida. Sólo se conoce su expresión a partir del cDNA. Estas proteínas son el producto de una familia de genes conocidos como KIAA (Takahiro *et al.*, 1997), que a la fecha agrupa a más de 2000 genes. Llama la atención el porcentaje de identidad de la Azgp90 con mucina humana (MUC) (42%) con un peso molecular de 91.8 KD, aun cuando existe una diferencia en el peso molecular con respecto a la Azgp de 90 KD cabe la posibilidad de que ambas compartan dominios similares, importantes para el reconocimiento o comunicación celular. Por otro lado, Azgp90 también presentó alta identidad

(32%) con KIAA0310, una proteína con un peso molecular estimado de 95.2 KD.

Recientemente, se han descrito dos productos codificados por una clona del gen KIAA0310, obtenida de lisados de cerebro de ratón llamados p125 (Tani *et al.*, 1999) y p250 (Linuma *et al.*, 2007) y que poseen similitud con la proteína Sec 16, una proteína de alto peso molecular inicialmente descrita en las levaduras *Sacharomices cerevisea* y *P. pastoris* (Watson *et al.*, 2006). Sec 16 al parecer se localiza en los sitios de salida o sitios de transición del retículo endoplásmico (tER) hacia el aparato de Golgi y se sugiere está implicado en el tráfico de membrana del retículo endoplásmico vía la formación de vesículas de transporte COPII (Watson *et al.*, 2006; Linuma *et al.*, 2007). Es posible que las proteínas p125 y p250 pudieran tener un papel similar a Sec 16 en el tráfico de membrana en cerebro de ratón. Ya que se ha identificado que p125 se localiza en los tER donde las vesículas de transporte COPII son producidas junto con otros 2 miembros de la familia PA-PLA1 y KIAA0725p de mamífero (Tani *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2002; Shimoi *et al.*, 2005).

La eliminación de p125 mediante RNA de interferencia (RNAi) afecta la organización de los tRE y también de la estructura del cis-Golgi pero no del Golgi-medio por lo que se sugiere que p125 es un componente de tER y participa en la organización de este compartimento celular (Shimoi *et al.*, 2005). Con respecto a p250 también se le localizó en tER con una presencia predominante en citosol. Al parecer p250 es reclutada a la membrana del RE de manera dependiente de Sar1 y su depleción causa desorganización de los tER y disminución en el transporte de proteínas, lo que sugiere su participación en el transporte proteico hacia el exterior del RE (Linuma *et al.*, 2007). En las

neuronas todas las proteínas recién sintetizadas destinadas para un transporte axoplásmico rápido son procesadas por el aparato de Golgi (Hammerschlag *et al.*, 1982), el cual ha sido implicado en la patogénesis de una variedad de enfermedades humanas asociadas con defectos de tráfico intracelular de proteínas (Amara *et al.*, 1992; Fan *et al.*, 2008) y en muchas enfermedades neurodegenerativas (Fan *et al.*, 2008) como la EA (Baloyannis *et al.*, 2004).

Por otro lado, aún cuando p125 y p250 poseen un peso molecular que difiere con el de la Azgp90 cabe la posibilidad de que los productos obtenidos a partir de esta clona del gen KIAA0310 en cerebro de ratón tengan homólogos en cerebro humano.

Respecto a los candidatos para el receptor de la lectina de MrL (Azgp94), existe mayor complejidad puesto que DNA ligasa III (DNALI3) presentó una homología alta (52 %) al igual que para KIAA0413, KIAA0388 (41 %) y KIAA0460 con 29 %. Se conocen dos formas de DNALI3 alfa y beta generadas por mecanismos de splicing alternativo (Tomkinson, 1997) y que pertenecen a la categoría de DNA ligasas dependientes de ATP presentes al parecer sólo en vertebrados (Martin y MacNeil, 2002). Recientemente se ha mostrado en extractos de proteínas mitocondriales de células HT1080, que DNA polimerasa γ y la DNALI3 interactúan, lo que apoya la interpretación de que dicha interacción mantiene apropiadamente el genoma mitocondrial (De y Campbell, 2007). Por otro lado, KIAA0413 también presentó un porcentaje de identidad alto con la Azgp94. Las predicciones hechas para estas proteínas indican que KIAA0413 debería tener un peso molecular aproximado de 89 KD y se le atribuye su participación en la señalización y comunicación celular con alta homología con el factor 1 activador de proteasas apoptóticas (APAF). A

KIAA0460 con una identidad con Azgp94 de 29 % se le atribuye un peso molecular mayor de 100 KD y una función de manejo de ácido nucleico como una molécula relacionada con el factor de splicing asociado a PTB (Ishikawa *et al.*, 1997). Finalmente KIAA0388 tiene un peso molecular aparente, mayor a 100 KD y se le atribuye una función de manejo de ácidos nucleicos con una identidad del 99.9 % con Ezh 1 (enhancer of zeste homolog 1) (Nagase *et al.*, 1997).

Por otro lado se sugiere actualmente que la regulación de la fosforilación y de la glicosilación de la proteína, podrían ser los procesos más importantes para la formación de las MNFs (Lefebvre *et al.*, 2005). Estas modificaciones podrían participar en la formación de los FHAs y por tanto en la fisiopatogénesis de la enfermedad de Alzheimer.

CONCLUSIONES

- Las estructuras sacarídica del tipo GalNAc (Antígeno T) y ácido siálico O-acetilado (Neu5,9Ac₂) presentes en las lesiones típicas son indicadoras de las alteraciones en la EA
- La sialilación α 2, 6 O-acetilo y el antígeno T son predominantes en la plasticidad reactiva
- Las lectinas de ALL y MrL pueden ser útiles como marcadores del estado de glicosilación patológico en la EA.

PERSPECTIVAS

Purificación y caracterización de los posibles ligandos para las lectinas de ALL y MrL

Análisis de la actividad de sialiltransferasas α 2,3, α 2,6

Análisis morfológico y ultraestructural de los sitios de reconocimiento de las lectinas de ALL y Mr

Búsqueda de los productos de los genes KIAA 0310, 0388, 0413, 0460 como posibles ligandos para las lectinas de ALL y MrL

BIBLIOGRAFÍA

- Alroy J, Goyal V, Skutelsky E. (1987). Lectin Histochemistry of mammalian endothelium. *Histochem*; 86: 603-607.
- Amara JF, Cheng SH, Smith AE. (1992). Intracellular protein trafficking defects in human disease. *Trends in Cell Biol*; 2: 145-149.
- Andjelkovic AV, Nikolic B, Pachter JS and Zecevic N. (1998). Macrophages/ microglial cells in human central nervous system during development: an immunohistochemical study. *Brain Res*; 814: 13-25.
- Araujo H, Menezes M, Mendez-Otero R. (1997). Blockage of 9-O-acetyl gangliosides induces microtubule depolymerization in growth cones and neurites. *Eur J Cell Biol*; 72: 202-213.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte T, Hyman BT. (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*; 42: 631-639.
- Baloyannis SJ, Costa V, and Michmizos D. (2004) Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers dis Other Demen*; 19: 89-93.
- Beisegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. (1989). The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature*; 341: 162-164.
- Blessed G, Tomlison BE, Roth M. (1968). The association between quantitative measures of dementia and of neuritic change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry*; 114: 797-811.
- Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1986). Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett* 24; 65: 351-355.
- Braak H, Braak E. (1996). Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl*; 165: 3-12.
- Broquet P, Baubichon-Cortay H, George P, Louisot P. (1991). Glycoprotein sialyltransferase in eukaryotic cells. *Int J Biochem*; 23: 385-389.
- Caporaso GL, Gandy SE, Buxbaum JD and Greengard P (1992). Chloroquine inhibits intracellular degradation but not secretion of Alzheimer /A4 amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 89: 2252-2256.

- Castellani R, Smith AM, Richey LP, Perry G. (1996). Glycooxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Brain Res*; 737: 195-200.
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J and Mullan M. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature*; 353: 844-846.
- Cleveland D W., Hwo S Y and Kirschner M. W (1977). Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol*; 116: 227-247.
- Comer FI, Hart GW. (2001). Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochem*; 40: 7845-7852.
- Crystal H, Dickson D, Fuld P, Masur D, Scott R, Mehler M, Masdeu J, Kawas C, Aronson M and Wolfson L. (1988). Clinico-pathologic studies in dementia: non-demented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurology*; 38: 1682-1687.
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. (1988). Apolipoprotein E polymorphisms and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*; 8: 1-21.
- De A. and Cambell C. (2007). A novel interaction between DNA ligase III and DNA polymerase γ plays an essential role in mitochondrial DNA stability. *Biochem J*; 402: 175-186.
- De Strooper B and Annaert W. (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*; 113: 1857-1870.
- Delaère P, Duykaerts C, He Y, Piette F, Hauw J-J. (1991). Subtypes and differential laminar distributions of β A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol*; 81: 328-335.
- Delobel P, Mailliot C, Hamdane M, Sambo AV, Bégard S, Violleau A, Delacourte A, Bueé L. (2003). Stable-Tau Overexpression in human neuroblastoma cells. An open door for explaining neuronal death in tauopathies. *Ann. N.Y. Acad. Sci*; 1010: 623-634.
- Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH and Aronson MK. (1992). Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol. Aging*;13: 179-189.
- Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J, Muller-Hill B, Masters CL, and Beyreuther K. (1988). Identification,

transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J*; 7: 949-957.

- Erickson PF, Minier LN, Lasher RS. (1982). Quantitative electrophoretic transfer of polypeptides from SDS polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: a method for their re-use in immunautoradiographic detection of antigens. *J. Immunol Methods*; 51: 241-249.
- Esposito L, Gan L, Gui-Qui Y, Essrich C and Mucke L. (2004). Intracellularly generated amyloid- β peptide counteracts the antiapoptotic function of its precursor protein and primes proapoptotic pathways for activation by other insults in neuroblastoma cells. *J. Neurochem*; 91: 1260-1274.
- Fan J, Hu Z, Zeng L, Lu W, Tang X, Zhang J and Li T. (2008). Golgi apparatus and neurodegenerative diseases. *Int. J. Devl Neuroscience*; 26: 523-534.
- Farquhar MG. (1985). Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Annu Rev Cell Biol*; 1: 447-488.
- Flament S, Delacourte A. (1989). Abnormal tau species are produced during Alzheimer's disease neurodegenerating process. *FEBS Lett*; 247: 213-216.
- Flyer HJ and Hockfield S. (1996). The role of polysialic acid and other carbohydrates polymers in neural structural plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 6: 113-118.
- Froelich S, Basun H, Forsell C, Lilius L, Axelman K, Andreadis A, Lannfelt L. (1997). Mapping of a disease locus for familial rapidly progressive frontotemporal dementia to chromosome 17q12-21. *Am J Med Genet*; 74: 380-385.
- Galbete JL, Martin TR, Peressini E, Modena P, Bianchi R, Forloni G. (2000). Cholesterol decreases secretion of the secreted form of amyloid precursor protein by interfering with glycosylation in the protein secretory pathway. *Biochem J*; 348: 307-313.
- García de Ancos J, Correias I, Avila J. (1993). Differences in microtubule binding and self-association abilities of bovine brain tau isoforms. *J Biol. Chem*; 268: 7976-7982.
- Ghoshal N, García-Sierra F, Wu J, Leurgans S, Bennett DA, Berry RW, Binder LI. (2002). Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Exp Neurol*; 177: 475-493.
- Glenner GG, Wong CW. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*; 12: 885-890.

- Goate AM. (1997). Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Geriatrics*; 52: S9-S12.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*; 3: 519-526.
- Goedert M, Spillantini, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA. (1989). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNA in human brain. *EMBO J*; 8: 393-399.
- Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI. (1992). Hydrofluoric acid-treated τ PHF proteins display the same biochemical properties as normal τ . *J Biol. Chem*; 267: 564-569.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS and Wisniewski HM, (1986a). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol. Chem*; 261: 6084-6089.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. (1986b). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*; 83: 4913-4917.
- Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, Vázquez L, Luna J, Perry G, Mena R. (1998). Altered Glycosylation Pattern of Proteins in Alzheimer's disease. *J Neuropathol and Exp Neurol*; 57: 905 -914.
- Guevara J, Dilhuydy H, Espinosa B, Delacourte A, Quirion R, Mena R, Joannette Y, Zenteno E and Robitaille Y. (2004). Coexistence of reactive plasticity and neurodegeneration in Alzheimer diseased brains. *Histol Histopathol* 19(4):1075-1084.
- Haass C and Selkoe DJ. (1993). Cellular processing of amyloid precursor protein and the genesis of amyloid peptide. *Cell*; 75: 1039-1042.
- Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S and Delannoy P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*; 83: 727-737.
- Harduin-Lepers A, Mollicone R, Delannoy P and Oriol R. (2005). The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology*; 15: 805-817.
- Hasegawa M, Crowther RA, Jakes R, Goedert M. (1997). Alzheimer-like changes in microtubule-associated protein tau induced by sulfated glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem*; 272: 33118-33124.

- Hashimoto M, Masliah E. (2003). Cycles of aberrant synaptic sprouting and neurodegeneration in Alzheimer's and dementia with Lewy bodies. *Neurochem Res*; 28: 1743-56.
- Hellman U, Wernstedt C, Góñez J, Heldin, Heldin CH. (1995). Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem*; 224: 451-455
- 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.
- Hernández P, Tetaert D, Vergoten G, Debray H, Jiménez MC, Fernández G, Agundis C, Degand P, Zenteno E. (2004). Specificity of *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin for O-glycopeptides. *Biochim et Biophys Acta (BBA)*; 1674: 282-290.
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Smith AJ, George L, Tung YC, Zaidi T. (1989). Identification and localization of a tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86: 5646-5650.
- Iqbal K, del C Alonso A, Gong CX, Khatoon S, Pei JJ, Wang JZ, Grundke-Iqbal I. (1998). Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. *J Neural Transm Suppl*; 53: 169-180.
- Ishikawa KI, Nagase T, Nakajima D, Seki N, Ohira M, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O. (1997). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VIII. 78 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res*; 4: 307-313.
- Joannette Y, Belleville S, Leocours AR, Peretz I, Poissant A, Ska B. Evaluación neuropsicológica de la demencia: sistemática óptima. In: Evaluación neuropsicológica y funcional de la demencia. Del Ser T and Peña J (eds) Barcelona: J. R. Prous Editores, 1994.
- Johnson GVW and Stoothoff WH. (2004). Tau phosphorylation in neural cell function and dysfunction. *J Cell Sci*; 117: 5721-5729.
- 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.
- Kidd M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy in Alzheimer's disease. *Nature*; 197: 192-193.
- Kobayashi K, Emson PC, Mountjoy CQ. (1989). *Vicia villosa* lectin-positive neurons in human cerebral cortex. Loss in Alzheimer-type dementia. *Brain Res*; 498: 170-174.

- Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso A, Iqbal K and Grunke-Iqbal I. (1993). Microtubule-associated Protein Tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem*; 268: 24374-24384.
- Kowall RC, Herz J, Golstein JL, Esser V, Brown MS. (1989). Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86: 5810-5814.
- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL. (1989). Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron*; 2: 1389-1397.
- Laws SM, Hone E, Gandy S, Martins RN. (2003). Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription. *J Neurochem*; 84: 1215-1236.
- Laemli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685.
- Ledesma MD, Bonay P, Colaco C, Avila J. (1994). Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem*; 269: 21614-21619.
- Lee G, Neve RL, Kosik KS. (1989). The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron*; 2: 1615-1624.
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev Neurosci*; 24: 1121-1159.
- Lee YC, Kurosawa N, Hamamoto T, Nakaoka T, Tsuji S. (1993). Molecular cloning and expression of Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase from mouse brain. *Eur J Biochem*; 216: 377-85.
- Lefbvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussi re T, Dupire MJ, André Delacourte, Michalski JCI, Caillet-Boudin ML. (2003). Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins-a role in nuclear localization. *Biochem Biophys Acta*; 1619: 167-176.
- Lefbvre T, Guinez C, Dehennaut V, Beseme-Dekeyser O, Morelle W and Michalski JC. (2005). Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases?. *Expert Rev. Proteomics*; 2: 265-275
- Lehmann S, Harris DA. (1997). Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. *J Biol Chem*; 272: 21479-21487.

- Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD. (1995). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*; 269: 970-973.
- Lindwall G and Cole RD. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*; 259: 5301-5305.
- Linuma T, Shiga A, Nakamoto K, O'Brien M, Aridor M, Arimitsu N, Tagaya M and Tani K. (2007). Mammalian Sec16/p250 plays a role in membrane traffic from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*; 282: 17632-17639.
- Liu F and Gong CX. (2008). Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies. *Molecular Neurodegeneration*; 3: 8
- McFarlane I, Georgopolou N, Coughlan CM, Gillian AM, Breen KC. (1999). The role of the protein glycosylation state in the control of cellular transport of the amyloid β precursor protein. *Neurosci*; 90: 15-25.
- Mahley RW. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*; 240: 622-630.
- Mann DM, Bonshek RE, Marcyniuk B, Stoddart RW, Torgerson E. (1988). Saccharides of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*; 85: 277-282.
- Mann DM, Brown AM, Prinja D, Davies CA, Landon M, Masters CL, Beyreuthers K. (1989). An analysis of the morphology of senile plaques in Down's syndrome patients of different ages using immunocytochemical and lectin histochemical techniques. *Neuropathol Appl Neurobiol*; 15: 317-329.
- Mann DM, Brown AM, Prinja D, Jones D, Davies CA. (1990). A morphological analysis of senile plaques in the brains of non-demented persons of different ages using silver, immunocytochemical and lectin histochemical staining techniques. *Neuropathol Appl Neurobiol*; 16: 17-25.
- Mann DM, Jones D, Prinja D, Purkiss MS. (1990). The prevalence of amyloid (A4) protein deposits within the cerebral and cerebellar cortex in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 80: 318-327
- Mann DM, Purkiss MS, Bonshek RE, Jones D, Brown AM, Stoddart RW. (1992). Lectin histochemistry of cerebral microvessels in ageing, Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neurobiol Aging*; 13: 137-43.
- Marth JD. (1996). Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology*; 6: 701-705.
- Martin IV and MacNeill Stuart A. (2002). Protein family review. ATP-dependent DNA ligases. *Genome Biol*; 3: 3005.1-3005.7

- Masters CL. (1984). Etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Pathology*; 16: 233-234.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BR, Beyreuther K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*; 82: 4245-4249.
- Mena R, Edwards P, Pérez-Olvera O, Wischik CM. (1995). Monitoring pathological assembly of tau and β -amyloid proteins in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*; 89: 50-56.
- Mena R, Edwards P, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM. (1996). Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*; 91: 633-641.
- Mullan M, Crawford F. (1993). Genetic and molecular advances in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*; 16: 398-403.
- Mullan M, Houlden H, Windelspecht M, Fidani L, Lombardi C, Diaz P, Rossor M, Crook R, Hardy J, Duff K, Crawford F. (1992). A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene. *Nat Genet*; 2: 340-342.
- Nagase T, Ishikawa KI, Nakajima D, Ohira M, Seki N, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O. (1997). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA research* 4: 141-150.
- Nakajima K-I, Sonoda H, Mizoguchi T, Aoki J, Arai H, Nagahama M, Tagaya M, Tani K. (2002). A novel phospholipase A1 with sequence homology to a mammalian Sec23p-interacting protein p125. *J Biol Chem*; 277: 11329-1335.
- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Mol Brain Res*; 1: 271-280.
- Novak M, Kabat J, Wischik CM. (1993). Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J*; 12: 365-370.
- Osawa T and Matsumoto Y. (1972). Concanavalin (Ulex europeus) phytohemagglutinin. *Meth Enzymol*; 28: 323-327.
- Pepe G, Siri D. (1991). Conformational analysis of the amino termini (5 residues) of human glycoporphin AM and AN: differentiation of the structural

features of the TN antigenic determinants in relation to their specificity. *Carbohydr Res*; 209: 67-81.

- Pereira ME, Kabat EA, Lotan R, Sharon N. (1976). Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. *Carbohydr Res*; 51: 107-118.
- Perlmutter SL, Scott AS, Barrón E Chui HC. (1992). MHC class II positive microglia in human brain: Association with Alzheimer lesion. *J. Neurosci. Res*; 33: 549-558.
- Perry G, Siedlak SL, Richey P, Kawai M, Cras P, Kalaria RN, Galloway PG, Scardina JM, Cordell B, Greenberg BD, Ledbetter SR, Gambetti P. (1991). Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurosci*; 11: 3679-3683.
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. (1987). Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochem Biophys Acta*; 917:148-161.
- Poirier J, Hess M, May PC, Finch CE. (1991). Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Mol Brain Res*; 11: 97-106.
- Romas SN, Santana V, Williamson J, Ciappa A, Lee JH, Rondon H, Estevez P, Lantigua R, Medrano M, Torres M, Stern Y, Tycko B, Mayeux R. (2002). Familial Alzheimer Disease among Caribbean Hispanics. A reexamination of its association with APOE. *Arch Neurol*; 59: 87-91.
- Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron*; 11: 575-580.
- Rojo L, Sjöberg MK, Hernández P, Zambrano C, Maccioni RB. (2006). Roles of Cholesterol and lipids in the Ethnopathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol*; 73976: 1-17.
- Roseman S. (1970). The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intercellular adhesion. *Chem. Phys Lipids*; 5: 270-297
- Roses AD. (1994). Apolipoprotein E affects rate of Alzheimer disease expression: β -amyloid burden is a secondary consequence dependent on APOE genotype and duration of disease. *J Neuropathol Exp Neurol*; 53: 429-437.
- Rossjohn J, Cappai R, Feil SC, Henry A, McKinstry WJ, Galatis D, Hesse L, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL, Parker MW. (1999). Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol*; 6: 327-331.

- Rutishauser U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature Rev Neurosci*; 9: 26-35.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, St. George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-Mclachlan DR, Albetrs MJ, Hulette C, Crain B, Goldgaber D, Roses AD. (1993). Association of apolipoprotein E allele 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*; 43: 1467-1472.
- Savage D, Mattson G, Desai S, Nielander G, Morgensen S, Conklin E. (1992). *Avidin-biotin chemistry: A handbook*. Ed. Pierce Chemical Company, Rockford IL, USA, 42-48.
- Schächter F, Faure-Delanef L, Guénot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, Cohen D. (1994). Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nature. Genet*; 6: 29-32.
- Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, Potter H, Heston LL, Martin GM. (1992). Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*; 258: 668-671.
- Selkoe DJ. (1992). Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Appl Neurobiol*; 18:13-26.
- Sharon N, Lis H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. *Science*; 246: 227-234.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky J, Wasco W, Da Silva AR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St. George-Hyslop PH. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*; 375: 754-760.
- Shimoï W, Ezawa I, Nakamoto K, Uesaki S, Gabreski G, Aridor M, Yamamoto A, Nagahama M, Tagaya M, Tani K. (2005). p125 Is localize in endoplasmic reticulum exit sites and involved in their organization. *J Biol Chem*; 280: 10141-10148.
- Smith MA, Perry G. (1994). Alzheimer disease: An imbalance of proteolytic regulation?. *Med Hypoth*; 42: 277-279.
- Smith MA, Taneda S, Richey PL, Miyata S, Yan SD, Stern D, Sayre LM, Monnier VM, Perry G. (1994). Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91: 5710-5714.

- Smith MA, Sayre LM, Monnier VM, Perry G. (1996a). Oxidative posttranslational modifications in Alzheimer disease. A possible pathogenic role in the formation of senile plaques and neurofibrillary tangles. *Mol Chem Neuropathol*; 28: 41-48.
- Smith MA, Tabaton M, Perry G. (1996b). Early contribution of oxidative glycation in Alzheimer disease. *Neurosci Lett*; 217: 210-211.
- Smith MA, Perry G. (1997). The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. *J Neuropathol Exp Neurol*; 56: 217.
- Snow AD, Mar H, Nochlin D, Kimata K, Kato M, Suzuki S, Hassell J, Wight TN. (1988). The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*; 133: 456-463.
- Snow AD, Lara S, Nochlin D, Wight TN. (1989). Cationic dyes reveal proteoglycans structurally integrated within the characteristic lesions of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*; 78: 113-123.
- Snow AD, Mar H, Nochlin D, Kresse H, Wight TN. (1992). Peripheral distribution of dermatan sulfate proteoglycans (Decorin) in amyloid-containing plaques and their presence in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Histochem Cytochem*; 40: 105-113.
- Springer GF. (1984). T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science*, 224: 1198-1206.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvensen GS, Roses AD. (1993a). Apolipoprotein E: high avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90: 1977-1981.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Goedert M, Saunders AM, Huang D, Corder EH, Dong L-M, Jakes R, Alberts Mj, Gilbert JR, Han S-H, Hulette C, Einstein G, Schmechel DE, Pericak-Vance MA, Roses AD. (1994). Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. *Exp Neurol*; 125: 163-171.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong L-M, Salvensen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD. (1993b). Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90: 8098-8102.
- Tabaton M, Perry G, Smith M, Vitek M, Angelini G, Dapino D, Garibaldi S, Zacco D, Odetti P. (1997). Is amyloid beta-protein glycosylated in Alzheimer's disease?. *Neuroreport*; 8: 907-909.

- Talbot C, Lendon C, Craddock N, Shears S, Morris JC, Goate A. (1994). Protection against Alzheimer's disease with apoE epsilon 2. *Lancet*; 343: 1432-1433.
- Tanaka S, Nakamura S, Ueda K, Kameyama M, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Ito H. (1988). Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: Their differential expression in Alzheimer's Disease. *Biochem Biophys Res Commun*; 157: 472-479.
- Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Ito H, Kameyama M, Kimura J, Nakamura S, Ueda K. (1989). Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun*; 165: 1406-1414.
- Tani K, Mizoguchi T, Iwamatsu A, Hatsuzawa K, Tagaya M. (1999). p125 Is a novel mammalian Sec23p-interacting protein with structural similarity to phospholipid-modifying proteins. *J Biol Chem*; 274: 20505-20512.
- Terry RD, Gonatas NK, Weiss M. (1964). Ultrastructural studies in Alzheimer's preneuritic dementia. *Am J Pathol*; 44:269-297.
- Terry RD, Wisniewski HM. (1972). Ultrastructure of neuritic dementia and of experimental analogs. *Aging and the Brain*. In: *Advances in Behavioral Biology*, Gaitz C.M. ed., New York: Plenum Press, vol. 3; 89-116.
- Tolnay M. and Probst A. (1999). *Neuropathol Appl Neurobiol*; 25: 171-187.
- Tomkinson AE, Levin DS. (1997). Mammalian DNA ligases. *Bioessays*; 19: 893-901.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*; 76: 4350-4354.
- Varki A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiol.* 3: 97-130.
- Varki A. (1997). Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J*; 11: 248-255
- Varki A. (2007a). Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature*; 446: 1023-1029.
- Varki NM and Varki A. (2007b). Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest*; 87: 851-857

- 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*; 105B; 617-623.
- Vingtdeux V, Hamdane M, Gompel M, Bègard S, Drobecq H, Ghestem Antoine, Grosjean ME, Kostanjevecki V, Grognet P, Vanmechelen E, Buée L, Delacourte A, Sergeant N. (2005). Phosphorylation of amyloid precursor carboxy-terminal fragments enhances their processing by a gamma-secretase-dependent mechanism. *Neurobiol Disease*; 20: 625-637.
- 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.
- Watson P, Townley AK, Koka P, Palmer KJ and Stephens DJ. (2006). Sec 16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic*; 7: 1678-1687.
- Weidemann A, Köning G, Bunke D, Fischer P, Salbaum MJ, Masters CL, Beyreuther K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*; 57: 115-126.
- Wei-Xing S, Chammas R, Varki A. (1998). Induction of sialic acid O-acetylation by diverse gene products: implications for the expression cloning of sialic acid O-acetyltransferases. *Glycobiology*; 8:199-205.
- Whitson JS, Mims MP, Strittmatter WJ, Tamaki T, Morrisett JD, Appel SH. (1994). Attenuation of the neurotoxic effect of A β amyloid peptide by apolipoprotein E. *Biochem Biophys Res Commun*; 199:163-170.
- Wiesgraber KH. (1994). Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Prot Chem*; 45: 249-320.
- Wilcock GK, Esiri MM. (1982). Plaques, tangles and dementia: a quantitative study. *J Neurol Sci*; 56: 407-417.
- Wischik CM, Crowther RA, Stewart M, Roth M. (1985). Subunit of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*; 100: 1905-1912.
- Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA. (1988a). Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85: 4884-4888.
- Wischik CM, Novak M, Thogersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, Walker JE, Milstein C, Roth M, Klug A. (1988b). Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85: 4506-4510.
- Wisniewski HM, Wen GY, Kim KS. (1989). Comparison of four staining methods on the detection of neuritic plaques. *Acta Neuropathol*; 67: 22-27.

- Wisniewski T, Frangione B. (1992). Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett*; 135: 235-238.
- Wolozin BL, Pruchnicki A, Dickson DW, Davies P. (1986). A neuronal antigen in the brains of Alzheimer patients. *Science*; 232: 648-650.
- Xu X, Yang D, Wyss-Coray T, Yan J, Gan L, Sun Y, Mucke L. (1999). Wild-type but not Alzheimer-mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 7547-7552.
- Yamatsuji T, Matsui T, Okamoto T, Komatsuzaki K, Takeda S, Fukumoto H, Iwatsubo T, Suzuki N, Asami-Odaka A, Ireland S, Kinane TB, Giambarella U, Nishimoto I. (1996b). G protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. *Science*; 272: 1349-1352.
- Yan SD, Chen X, Schmidt AM, Brett J, Godman G, Zou YS, Scott CW, Caputo C, Frappier T, Smith MA, Perry G, Yen SH, Stern D. (1994). Glycated tau protein in Alzheimer disease: A mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91: 7787-7791.
- Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. (1991). Genomic organization of the human-amyloid beta-protein precursor gene. *Gene*; 102: 291-292.
- Zenteno E, Ochoa JL, (1988). Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column. *Phytochem*; 27: 313-317.
- Zenteno E, Lascurain R, Montaña LF, Vázquez L, Debray H, Montreuil J. (1992). Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj J*; 9: 204-208.

ANEXO:

Artículo 1: Altered Glycosylation Pattern of Proteins in Alzheimer Disease

Jorge Guevara, Blanca Espinosa, Edgar Zenteno; Lorena Vázquez, José Luna, George Perry and Raúl Mena. (1998). Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, Vol. 57, No. 10, pp. 905-914.

Artículo 2: O-Glycosylation in Sprouting Neurons in Alzheimer Disease, Indicating Reactive Plasticity

Blanca Espinosa, Roberto Zenteno, Raúl Mena, Yves Robitaille, Edgar Zenteno and Jorge Guevara. (2001). Journal of Neurophthology and Experimental Neurology, Vol. 60, No. 5, pp. 441-448.

Artículo 3: Characterization of an O-Glycosylated Plaque-Associated from Alzheimer Disease Brain

Blanca Espinosa, Jorge Guevara, Pedro Hernández, Marie-Christine Slomianny, Aída Guzmán, Salvador Martínez-Cairo, and Edgar Zenteno. (2003). Journal of Neurophthology and Experimental Neurology Vol. 62, No. 1, pp. 34-41.

Capítulo de libro: Envejecimiento cerebral normal y patológico: plasticidad cerebral reactiva en la enfermedad de Alzheimer. En Abriendo las puertas al envejecimiento. De lo biológico a lo social. Una mirada desde la Salud Pública. Jorge Guevara Fonseca, Blanca Espinosa Mancilla, Minerva Calvillo y Edgar Zenteno. Primera Edición. Universidad Veracruzana 2005

Altered Glycosylation Pattern of Proteins in Alzheimer Disease

JORGE GUEVARA, MS, BLANCA ESPINOSA, MS, EDGAR ZENTENO, MD, PHD, LORENA VÁZQUEZ, PHD,
JOSÉ LUNA, BS, GEORGE PERRY, PHD AND RAÚL MENA, MD, PHD

Abstract. Post-translational modifications due to glycosylation of proteins in human brains from patients with Alzheimer disease (AD) were analyzed using lectin histochemistry. Results indicate a significant increase in the production of O-glycosylated (containing Gal β 1,3GalNAc α 1.0 Ser/Thr or GalNAc α 1.0 Ser/Thr) proteins in neuritic plaques and neurofibrillary tangles which are the major histopathological hallmarks of AD brains. These alterations were determined by positive labelling with lectins obtained from *Amaranthus leucocarpus* (ALL) and *Macrobrachium rosenbergii* (MRL) respectively. Immunohistochemistry indicated that the lectin-staining labelled specifically both neurofibrillary tangles and neuritic plaques. In contrast, lectins labelling was restricted to microvessels in normal control brains. These results provide evidence that modifications of the specific glycosylation patterns are closely related with the presence of the hallmark lesions of this disease, suggesting that an abnormal enzymatic processing of proteins may be an early event in the neuronal degeneration which characterises AD.

Key Words: Alzheimer disease; Amyloid- β protein; Lectins; O-glycans; 9-O-acetyl-sialic acid; Tau protein.

INTRODUCTION

Neurofibrillary tangles (NFT) and neuritic plaques (NP) are the neuropathological hallmarks of Alzheimer disease (AD), whose density correlate with the degree of cognitive failure in AD (1). NP are defined by an amyloid- β deposit surrounded by dystrophic neurites, to varying degrees depending on the type of NP, reactive astrocytes and microglia (2, 3). NFT are intraneuronal inclusions formed by tau protein polymers. Since amyloid- β deposits also characterize nondemented elderly cases (4-7) it is not surprising that NFT densities appear to correlate better with the loss of cognitive function than those amyloid- β deposits (8, 9).

Amyloid- β is a 39-42 amino acid residues cleavage product of the larger β -amyloid precursor protein (β APP), a glycosylated transmembrane protein (10). To date, there is no consistent evidence of alterations in β APP gene expression specific for AD. Several post-translational modifications, including N- and O-glycosylation, phosphorylation, and tyrosine O-sulphation have been reported in β APP (11, 12).

NFT as well as some of the dystrophic neurites surrounding NP, are comprised of insoluble abnormal filaments referred to as paired helical filaments (PHF) (13). The tau protein comprising PHF is highly hyperphosphorylated (14-17). PHF-associated tau protein is also characterised by a C-terminal truncation at Glu-391 (18). Phosphorylation and truncation have been involved in the

earliest events that lead to PHF assembly in AD (14, 15, 17, 19-21); moreover, recent findings showed that glycosylation appears to be responsible for the maintenance of the PHF structure (22).

Glycation and other oxidative damage mechanisms have been also associated with tau proteins significantly (23-25). Oxidative stress appears to be the earliest pathological change of AD (23, 26-27).

Due to high sugar specificity, lectins have been used extensively to identify post-translational modifications in proteins. Additionally, lectins have the capacity to bind and specifically identify microglial cells (28-33), neurons (34), microvessels (35, 36), and other cell types in different species (37).

In this study, we used lectins to identify glycan abnormalities in NP, NFT and vascular structures. Our findings suggest that both NFT and NP are sites of abnormal glycan addition, indicative of protein processing deficiencies. Our findings of similar abnormalities in neurons lacking NFT in cases of AD, but not controls, suggest these deficiencies may be an early event in AD pathogenesis.

MATERIAL AND METHODS

Tissue

Hippocampal tissue from 7 AD (mean age of 74.6 ± 7.9 years) and 3 normal nondemented (mean age of 65.6 ± 9 years) cases of similar postmortem interval were included for this study. AD cases were diagnosed according to NINCDS criteria (5, 38). Tissue was fixed by immersion in methacarn Bouins or buffer formalin at 4°C. Samples were then embedded in paraffin and blocks were cut into 10- μ m-thick sections and stained according to well established histochemical and immunocytochemistry protocols.

Lectins

The lectins: *Arachis hypogaea* (PNA), *Canavalia ensiformis* (ConA), *Lens culinaris* (LCA), *Limulus polyphemus* (LPA),

From the Program of Molecular Biomedicine, CINVESTAV, México (JG); the Department of Biochemistry, INER, México (BE); the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, UNAM, México (EZ); the Lectins Laboratory, UAEM, Cuernavaca, Morelos, México (LV); the Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, CINVESTAV, México (JL, RM); and the Institute of Pathology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, (GP).

Correspondence to: Raúl Mena MD, PhD, the Department of Physiology and Neurosciences, CINVESTAV-IPN, PO. Box 14-740, 07000, México D.F. Mexico.

TABLE 1
Lectin Used in this Study

Lectin	Source	Sugar specificity
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	α -NeuAc-(2 \rightarrow 6)gal/galNAc
LCA	<i>Lens culinaris</i>	α -Man
Concanavalin A (ConA)	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -Man; α -Glc
LPA	<i>Limulus polyphemus</i>	NeuAc
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	α -NeuAc-(2 \rightarrow 3)
MRL	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	9,8,7-O-acetyl NeuAc
ALL	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	Gal β 1,3GalNAc α 1,0 Ser/Thr and GalNAc α 1,0 Ser/Thr
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	β -D-gal(1 \rightarrow 3)galNAc

TABLE 2
Intensity of Reaction to Lectin Labelling

Structure	Lectins							
	LCA	ConA	LPA	MAA	SNA	MRL	ALL	PNA
NP	+	-	+	-	+	+++	++++	\pm
NFT	-	-	+	+	\pm	++++	++	\pm
LPF	+	-	-	-	+	-	+++	-
Neurons	-	+	+	+ ⁿ	+	+	+	+
Vessels	+	+	+	+	+	+	+	+
Glial-like cells	-	+	+	+	+	+	+	\pm

NP = Amyloid- β deposits; NFT = Intracellular neurofibrillary tangles; LPF = Lipofuscin Deposits; Neurons = Cell bodies; +ⁿ neurons and nucleus labelling in normal control; Vessels; Glial-like cells; \pm weak reaction, +, ++, +++, ++++ = Positive labelling from low to high intensity of reaction. (For details on lectin nomenclature and specificity, see Table 1).

Maackia amurensis (MAA), and *Sambucus nigra* (SNA), as well as all sugars and reference glycoproteins used in this study were obtained from Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Lectin from *Amaranthus leucocarpus* (ALL) was purified from seeds obtained in Tulyehualco, México, by affinity chromatography on a column packed with stroma from human erythrocytes type O, physically entrapped in Sephadex G-25, as described previously (39). Lectin from the hemolymph of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (MRL) was purified by affinity chromatography on a column containing stroma from rat erythrocytes-Sephadex G-25, as previously described (40). Sugar specificity of the lectins used in this study are listed in Table 1.

Biotin Lectin Labelling

Lectins were labelled with N-hydroxysuccinimide esters of biotin (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) at a label, protein weight ratio of 2:1 (41). Electrophoresis and blotting reagents were obtained from Bio-Rad Laboratories. (Richmond, CA).

Lectin Histochemistry

Lectin binding was indirectly recognized with streptavidin-FITC conjugated (Sigma Chemical Co.). Briefly, brain tissue was deparaffined and incubated in phosphate buffered saline PBS (0.015 M Na⁺-phosphate, 0.15 M NaCl, 18 μ M CaCl₂, pH 7.4). Followed by incubation with 0.5% solution of IgG free-albumin (Sigma Chemical Co.) in PBS for 30 minutes (min). After washing in PBS-0.2% Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) for 10 min. Sections were washed in PBS for 5 min, lectins

diluted in PBS (50 μ g/ml) were applied for 2 hours (h), at 37°C. Sections were thoroughly rinsed with PBS before incubating for 1 h, at 37°C in Streptavidin-FITC (1:50) (Sigma Chemical Co.) followed by rinsing in PBS. Control experiments consisted of omission of the lectin or prior incubation of the lectin with 200 mM of their specific sugar. For MRL, we used 10 μ M of bovine submaxillary gland mucin (40).

Specificity of Lectin Interaction

To abolish all sialic acid residues, sections were incubated with *Clostridium perfringens* neuraminidase (Sigma Chemical Co.), 0.1 Units/100 μ l of PBS at 37°C for 30 min.

Double Immunolabelling

Immunolabelling was performed after lectin histochemistry. Antibodies used were rabbit antiserum to A β (1:50) (anti-A β polyclonal antibody, kindly provided by Dr. Andre Delacourte, INSERM, Lille, France), rabbit antiserum to tau (1:100) (Sigma, St. Louis, Mo.), and rabbit antiserum to GFAP (1:400) (DAKO, Denmark). In the case of the A β antibody, sections were treated with 98% formic acid (MERCK, Darmstadt, Germany) for 8 min prior to immunostaining. Immunolabelling was demonstrated with isotype specific Rhodamine-conjugated secondary antibodies to rabbit IgG (Pierce Chemical Co.). Prior to mounting with Vectashield (VECTOR Laboratories, Burlingame), samples were counterstained with thiazin red (TR) (0.0002% aqueous solution for 15 min) (19).

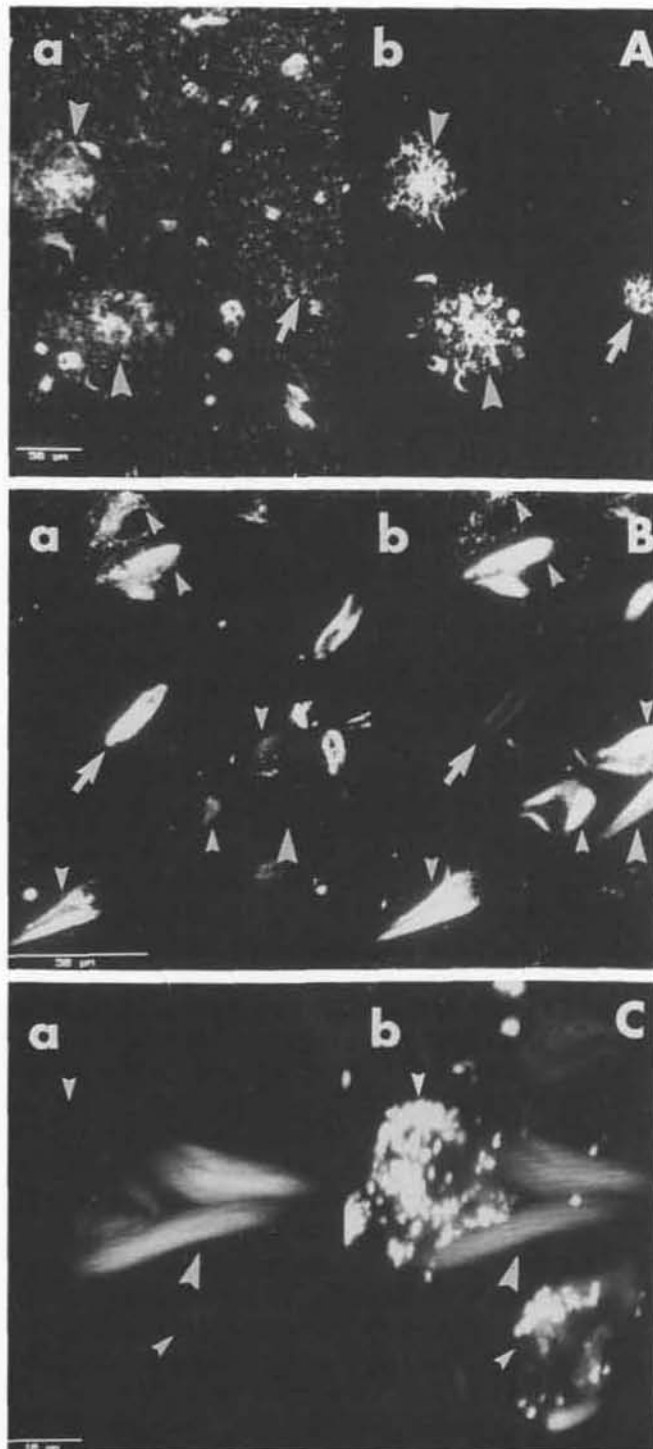


Fig. 1. Double labelling with lectins ALL (A and C) and MRL (B) visualized in the green channel (a), and thiazin red (red channel, b). A. Lectin ALL detects some amyloid- β deposits (arrowheads) present in the field. An amyloid- β core, which is detected in the red channel (arrow) is not labelled by ALL. B. This low magnification micrograph shows the varying degrees of lectin MRL labelling of tangles. Some tangles are double labelled by the lectin and thiazin red and detected in both channels (small arrowheads). Some other tangles are undetected by the lectin (large arrowhead). The microvessel present in the vicinity (arrow) is also labelled by MRL. C. Lectin

Confocal Microscopy

Double-labelled slides were viewed on a Nikon Diaphot microscope (Nikon, Japan) equipped with epi-illumination and laser confocal system (Bio-Rad MRC-600, Watford, UK). 10–20 consecutive images at 0.5–1 μm intervals in the z-axis were collected with a 60 \times oil-immersion objective lens, and were simultaneously obtained in 2 channels. Images were projected on the two-dimensional plane and were merged using a pseudocolor display (green for FITC, and red for thiazin red or Rhodamine). In the merged image, a yellow color display was interpreted as co-localization between 2 markers. Images were stored on 1.2 GB optical disk cartridges and photographed on Kodak T-Max 100 or Ektachrome 100 film (Kodak, México) and printed on a Mitsubishi color video printer.

RESULTS

Thiazin red (TR) recognized fibrillar tau and amyloid- β in tissue sections from cases of AD (19, 42). In confocal microscopy, TR can be simultaneously visualized in the red channel, while the FITC-labelled lectins are seen in the green channel. We identified a consistent differential binding for the lectins on pathological structures (Table 2; Figs. 1–5), while only vessels bound lectins in the normal nondemented control cases (Fig. 7).

Lectins Label Amyloid- β Deposits

While all the lectins tested labelled vessels (Figs. 1B, 2, 4, 7), in AD tissue, lectins ALL and MRL and less by SNA, LCA, and PNA (Table 2) marked structures corresponding in double labelling with TR to either dense fibrillar or loose fibers of amyloid- β deposits (Figs. 1A, 2, 3). The 5 lectins showing binding to amyloid- β deposits also detected some neuritic processes that lacked TR binding sites (Fig. 5a). Similar structures were detected with lectin ConA, which did not label amyloid- β deposits (Table 2).

In AD brains, antibodies to amyloid- β following formication acid revealed more extensive diffuse deposits which were not detectable with TR (19). These deposits, which were strongly labelled with MRL, showed no associated neurites detected by antibodies to tau (not shown). MRL strongly labelled this type of diffuse plaques (not illustrated).

Labelling of NFT with Lectins in AD Brains

While the majority of NFT were strongly labelled by lectins MRL, ALL, and fewer by SNA, MAA and PNA (Figs. 1B, 1C, 4, 5), no extracellular NFT were labelled by the lectins (not illustrated). Intraneuronal NFT labelled by MRL and ALL were double labelled by TR (Figs. 1C,

←

ALL also detects neurofibrillary tangles in AD cases (large arrowhead). Autofluorescent lipofuscin granules are detected only in the red channel (small arrowheads).

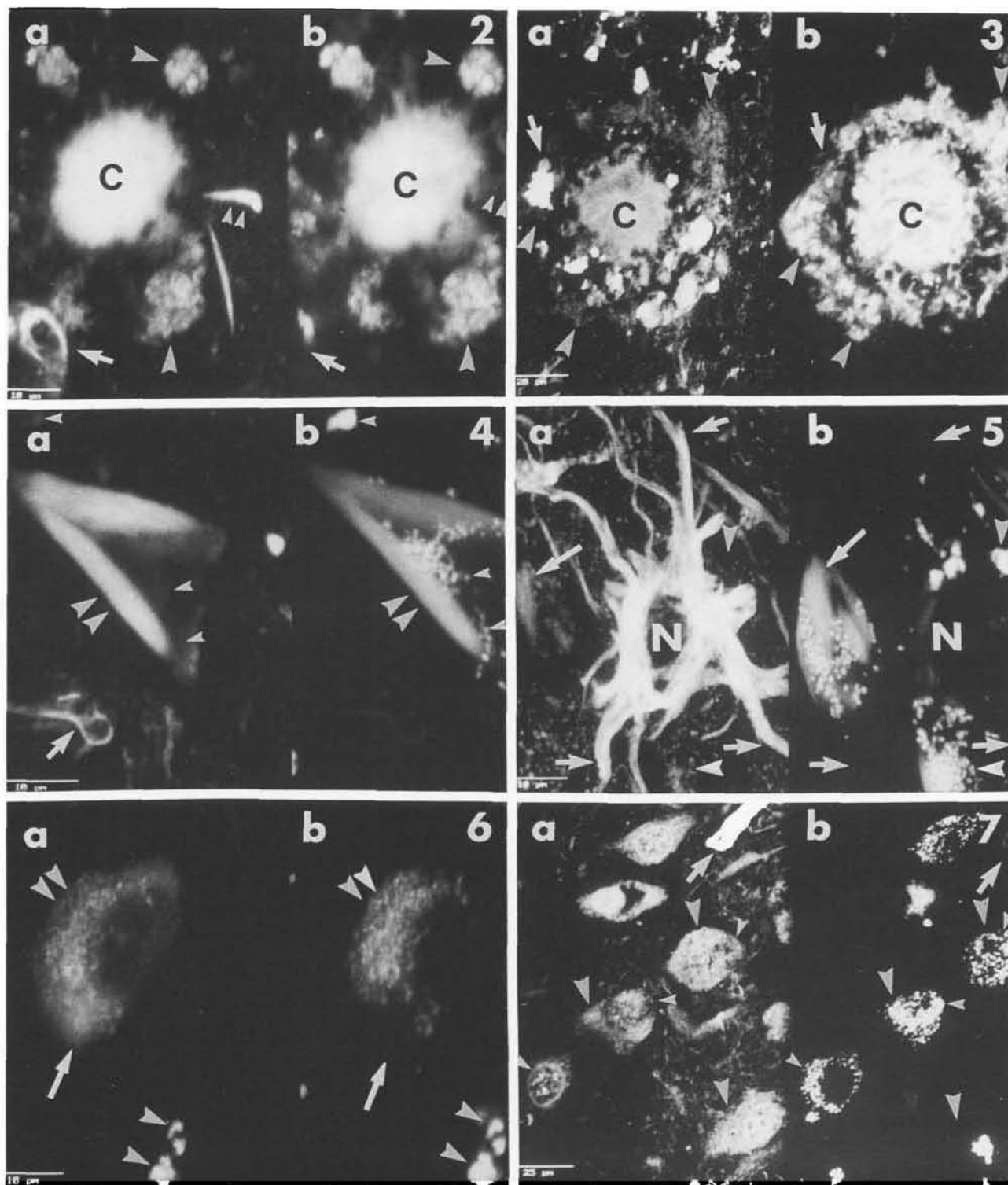


Fig. 2. Double labelling with lectin ALL (green channel, a) and thiazin red (red channel, b) in an AD case. a) Amyloid- β deposit (c) present in the field displays labelling with the 2 markers. The vascular structure (arrow at the left side) is detected only by ALL but not labelled by thiazin red. Amorphous deposits of autofluorescent lipofuscin granules are also detected by ALL (large arrowheads). The enlarged neurites present in the vicinity of the plaque (small arrowheads) are labelled only by ALL but unlabelled by thiazin red.

Fig. 3. Lectin MRL/amyloid- β antibody double-labelled sections. a. Lectin MRL labelled the compact amyloid- β core (c) of the classical plaque but not the amyloid- β deposits present in the vicinity (arrowheads) and labelled by amyloid- β antibody in the red channel (b). MRL labelling is also showed in the neurites associated with the plaque (a, arrow).

4), while extracellular NFT showed TR binding sites depending on the degree of proteolytic degradation that the lesions undergo in the extracellular space (19). In contrast, LCA labelled amyloid- β deposits but not NFT, while ConA failed to identify both types of lesions (Table 2).

Labelling of a Sub-group of Lipofuscin Deposits with Lectins

Lipofuscin deposits are autofluorescent in the red channel and unlabelled by TR (Figs. 4, 5, 7). Of particular interest, the lectin ALL (and to a less extent LCA and SNA) detected a subgroup of the lipofuscin clusters present in the vicinity of the amyloid- β deposits but, significantly, only in case of AD (Figs. 2, 6). It is of further interest from a technical aspect that the subset of lipofuscin granules identified by ALL, LCA, and SNA showed decreased autofluorescence than those not labelled by lectins (Figs. 4, 5, 7). We interpreted this loss of brightness as a consequence of interference of the lectins with the lipofuscin granules autofluorescence resulting in attenuation of signal.

Labelling of Cell bodies and Processes with Lectins

In AD brains, all the lectins tested, except for LCA, strongly labelled cell bodies and neuronal processes (Table 2). TR labelling was always observed in the NFT present in the vicinity of these cells (Fig. 5). In these brains, lectin labelling defined 2 different types of cells, both of which were not labelled by TR. A striking MRL labelling was found in cells displaying numerous proximal processes varying in length with a rather fibrillar appearance. In addition, these cells were not detected by TR (Fig. 5a). The morphology displayed by this type of cell is similar to a "spider-like" profile. However, the anti-GFAP antibody did not label these cells (not illustrated). The other type of labelled cell was characterized

by diffuse perinuclear lectin deposits. Nuclear labelling with lectin ConA was occasionally observed.

Labelling of Cell Bodies and Nuclei with Lectins

In addition to labelling of microvessels by all the lectins in normal control brains, lectin MAA also labelled granular or diffuse structures in neuronal cell bodies, nuclei, as well as their proximal processes (Fig. 7).

Specificity of the Lectin Interaction

In all cases, incubation of the lectin with its specific sugar abolished lectin labelling of structures in the sections. Pretreatment of slides with neuraminidase *Clostridium perfringens* increased the labelling by PNA, in both control and AD samples, while it abolished MAA, SNA, and MRL labelling (all specific for sialic acid residues). Interaction of ConA, LCA, and ALL was not modified by neuraminidase (not illustrated).

DISCUSSION

Neurofibrillary tangles, NP and neuronal loss are the main neuropathological features of AD (9, 43). Several studies have suggested that post-translational modifications of proteins, such as glycosylation, could be correlated with specific alterations of AD (34). However, the fact that 2 of the most relevant proteins identified in AD, namely tau (44, 22) and β -amyloid precursor protein are glycoproteins (10), strongly supports our interest in identifying the microheterogeneity of these proteins based on glycosylation as a novel accurate marker for AD.

In the present study, the use of lectins specific for sialic acid, sialic acid derivatives, and O-glycans allowed us to find a particular pattern of glycosylation, characterizing both NFT and NP present in AD brains. Thiazin red double-labelling in such lesions makes it possible to identify the nature of the glycosylated structures. We have demonstrated that TR is a fluorescent dye

←

Fig. 4. Lectin MRL and thiazin red labelling in NFT. a. Lectin MRL labels the intracellular tangle (large arrowheads) which is detected by thiazin red in the red channel. The autofluorescent lipofuscin deposits are detected in the red channel (small arrowheads) and unlabelled by MRL. Conversely, the vascular structure labelled by MRL (arrow at the left side of Figure a) is not labelled by thiazin red.

Fig. 5. Double-labelling with lectin MRL (a) and thiazin red (b). a. The spider-like cell which is strongly labelled by MRL (small arrows) is not stained by thiazin red (b). On the other hand, the intracellular tangle which is detected by thiazin red in the red channel (large arrow) is unlabelled by lectin MRL. Autofluorescent lipofuscin deposits are detected only in the red channel (arrowheads, N = nucleus).

Fig. 6. ALL and thiazin red labelling of the lipofuscin deposits in an AD case. a. ALL strongly labelled the clusters of the autofluorescent lipofuscin granules present in the perinuclear region of the cell and its vicinity (arrowheads) and detected in the red channel (b). The diffuse amorphous material observed in close association with the lipofuscin granules which is labelled by ALL in the green channel (arrow) is not stained by thiazin red.

Fig. 7. Hippocampus of a nondemented normal elderly control case double-labelled with lectin MAA (a) and thiazin red (b). a. The diffuse granular cytoplasmic deposits of cells is labelled by MAA (arrowheads), but not stained by thiazin red (b). Autofluorescent lipofuscin deposits are detected only in the red channel (small arrowheads). The microvessel observed in the upper side of the Figure is detected only by MAA (arrow).

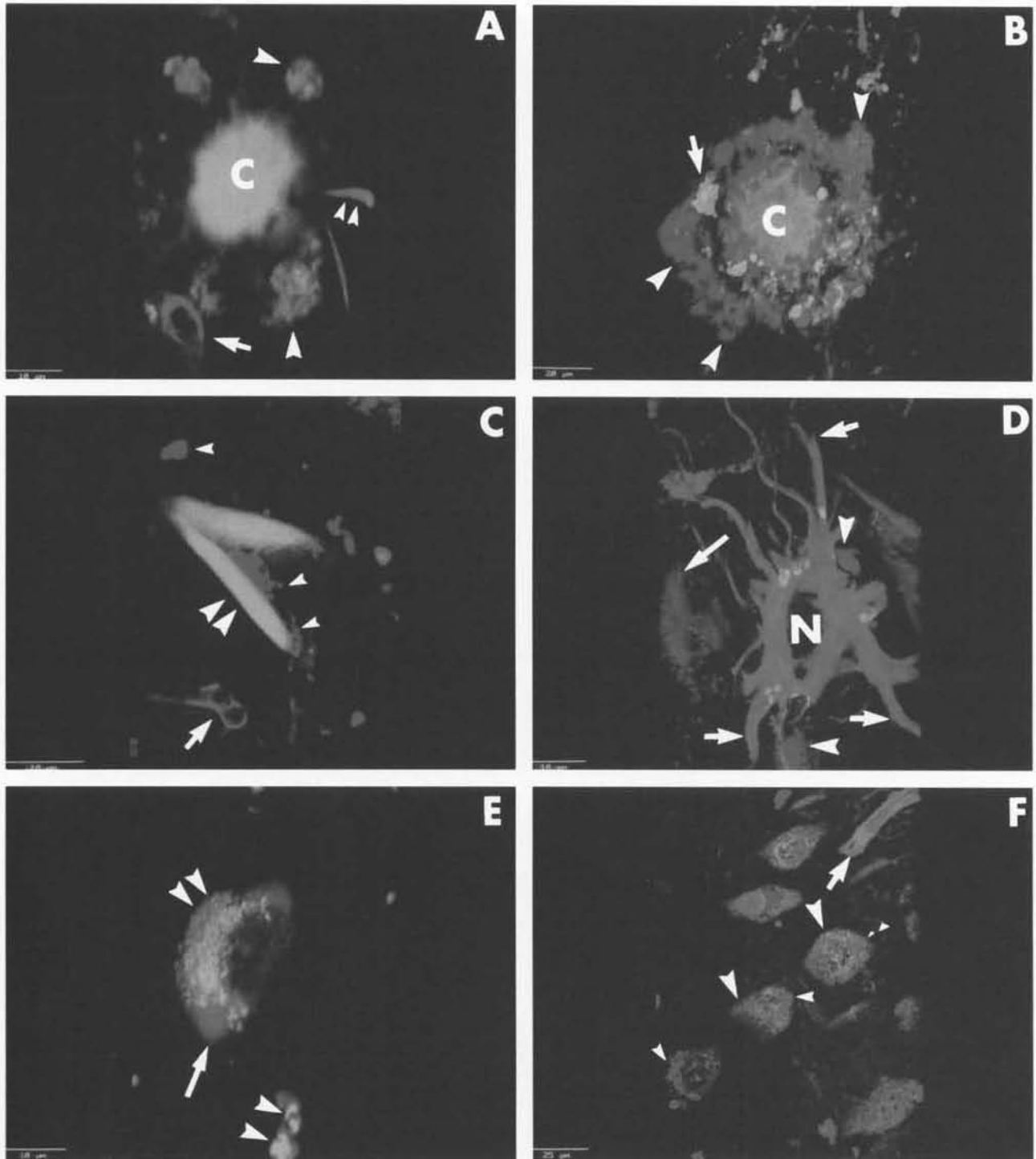


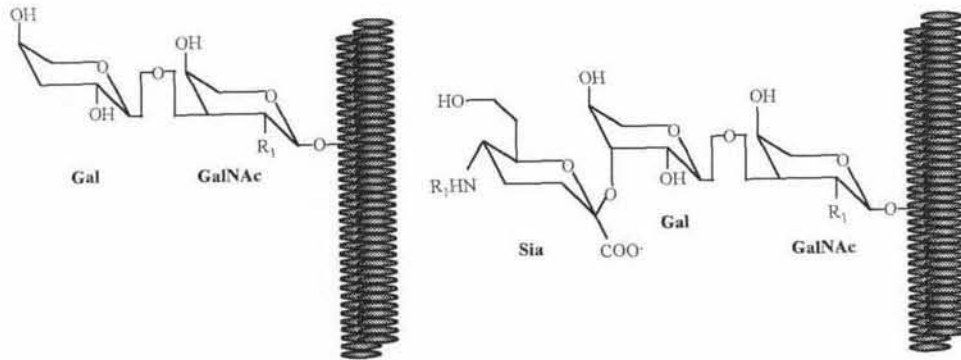
Fig. 8. A. Merged color image corresponding to Figure 2a, b. B. Merged color image corresponding to Figure 3a, b. C. Merged color image corresponding to Figure 4a, b. D. Merged color image corresponding to Figure 5a, b. E. Merged color image corresponding to Figure 6a, b. F. Merged color image corresponding to Figure 7a, b.

which specifically identifies tau and amyloid- β in a fibrillar state (19, 42). Analysis with FITC-lectins in a double labelled AD tissue showed a consistent differential lectin binding in pathological structures, NP-amyloid- β core, and NFT.

Previous lectin histopathological studies on the mammalian nervous system have found evidence of abnormal glycosylation in the maturation process (45) as well as in human pathological conditions (36). While these lectin studies of AD reported inconsistent binding to lesions

CONTROL ————— AD

AMYLOID - β



tau

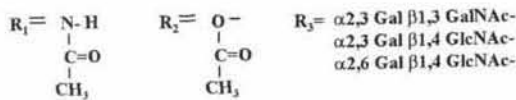
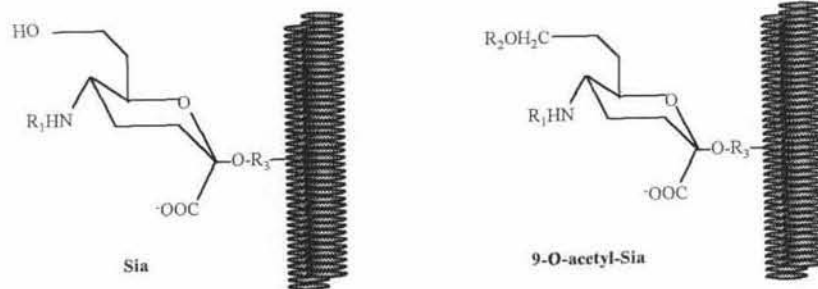


Fig. 9. Diagram illustrating proposed modification of glycosylation pattern of amyloid- β and tau proteins in AD, based on lectin binding. AD is associated the incorporation of a sialic acid on the T antigen of amyloid- β to render the cryptic form of the disaccharide, while tau protein is modified by incorporation of an O-acetylated group of C₉, (Gal, Galactose; Sia, Sialic acid; GalNAc, N-acetyl-galactosamine; 9-O-acetyl-sia, 9-O-acetyl-sialic acid).

(46–48), we instead found ALL and MRL labeling is a consistent feature of both NP and NFT. The presence or prevalence of specific saccharidic sequences has been considered as indicative for maturity or cell transformation (49).

The T and Tn antigens were evaluated with the PNA and ALL lectins: PNA shows T-antigen reactivity to the galactose present on the T-antigen (Gal β 1,3GalNAc1,0 Ser/Thr); however, addition of sialic acid abolishes binding of PNA to the resulting cryptic determinants (50). As our results indicate, PNA lectin is practically unable to react with typical AD lesions. By using lectin from ALL we found NP labelling (Fig. 1A, 2, 3). These lesions are mainly composed of amyloid- β fibrils. The β -amyloid

precursor protein is a 695-770 amino acid protein which possesses 45 threonine and 30 serine residues that can be substituted by N-acetyl-D-galactosamine to form the T or Tn antigens (GalNAc α 1,0 Ser/Thr). This could represent the core of the typical O-glycosylation. If so, the positive labelling with ALL lectin would indicate the presence of T antigen in a cryptic form in NP. Moreover, it is possible that T and Tn antigens may be substituted by sialic acid, since preincubation of tissue slides with neuraminidase from *Clostridium perfringens* rendered positive to PNA labelling practically all the NP. ALL is a Tn specific lectin that interacts specifically with the N-acetyl-group on C2 from GalNAc present in the Tn antigens structure (51).

Neuraminidase pretreatment of slides did not appear to modify the Tn structures recognized by the same lectin, thus indicating the relevance of GalNAc containing structures as indicators of pathological alterations in AD. This result is of potential relevance since it suggests the presence of specific modifications in the O-glycosylation of the putative lectin receptor.

Our results indicate that the differences which were identified in AD structures represent different levels of complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis, engendered by the participation of multiple transferases that are influenced by the presence of adjacent charged amino acid residues, such as proline, serine, and threonine (52). Moreover, depending on the substitution of such residues by GalNAc residues, these molecules differ structurally even in the torsion angles of their glycosidic bonds (53).

The sialic acid is a member of a family of 9-carbon carboxylated sugars usually found as the outermost units of vertebrate oligosaccharides, the most common is the N-acetyl-neuraminic acid, which could be considered the precursor for all others. Additional diversity in sialic acid residues is generated by the glycosidic linkage at carbon 2, providing, in most animals, NeuA α 2,3 or 2,6 linkages of hydroxyl groups of Galactose, or the 6-hydroxyl group of N-acetylglucosamine or N-acetylgalactosamine residues. The lectin from LPA recognizes sialic acid in spite of the glycosidic linkage. This explains its reactivity in all AD and nondemented control brains; however, the recognition of MAA (specific for NeuA α 2,3Gal) (54) and SNA (specific for NeuA α 2,6Gal) (55) lectins is modified under pathological conditions, particularly in NFT. As we have shown in this work, NeuA α 2,3Gal is preferentially identified in neurons from normal control brains and NeuA α 2,6 linkages are identified in NFT. Our results are supported by previous reports indicating that activity of neuronal sialyltransferases decrease in AD (56). Another interesting substitution of sialic acid (9-O-acetyl sialic acid), is identified by the lectin from the freshwater prawn, MRL (40). This type of substitution was mainly observed in NFT; the presence of this residue is negative in normal brains (Fig. 9). Several studies showed that 9-O-acetylation is commonly seen in cells of neuroectodermal origin and seem to play a role in migration of developing neurons in the embryonic brain (57); moreover, 9-O-acetyl-sialic containing structures have been shown to participate actively in the organization and growth of cones and neurites (44).

Sialic acids occur at the terminal positions of carbohydrate groups of glycoproteins and glycolipids. More than 12 different sialyltransferases are required for the synthesis of all known sialyl-oligosaccharide structures; moreover, O-acetylation of sialic acid occurs within the Golgi lumen after transferring the sialic acid to glycoconjugates (58, 59). Although the regulatory mecha-

nism, as well as the significance of modifications in the sialylation process are not currently well known, it can be assumed that modifications in O-glycosylation and sialylation of proteins, particularly in tau (44), induce structural modifications of the affected protein. These changes will make the glycosylated structure more rigid, possibly inducing modifications in cell-cell communication; e.g. the site-specific changes after 9-O-acetyl glycosylation may not only modulate tau function but also play a role in microtubule depolymerization (44). Our study suggests that in AD brains, a specific O-glycosylation and 9-O-acetyl-sialylation pattern might produce a fibrillary rearrangement of tau and amyloid- β proteins (Fig. 9). Hence, ALL and MRL lectins are useful and accurate tools for the study of protein modifications in AD. More detailed studies are needed to understand better the processes involving specific glycosyl transferases in AD brains.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grants 2151PM (to E.Z.), 26068 (to L.V.) and 26319M (to R.M.) from CONACyT, México.

REFERENCES

- Blessed G, Tomlison BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of neuritic change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* 1968;114:797-811
- Terry RD, Gonatas NK, Weiss M. Ultrastructural studies in Alzheimer's preneuritic dementia. *Am J Pathol* 1964;44:269-97
- Terry RD, Wisniewski HM. Ultrastructure of neuritic dementia and of experimental analogs. *Aging and the Brain*. In: Gaitz CM, ed. *Advances in behavioral biology*. New York: Plenum Press, vol. 3. 1972;89-116
- Wilcock GK, Esiri MM. (1982) Plaques, tangles and dementia: A quantitative study. *J Neurol Sci* 1982;56:407-17
- Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1985;42:1097-1105
- Crystal H, Dickson D, Fuld P, et al. Clinico-pathologic studies in dementia: Nondemented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurology* 1988;38:1682-87
- Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, et al. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol. Aging* 1992;13:179-89
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-White ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not neuritic plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 1992;42:631-39
- Gómez-Isla T, Price LJ, McKeel WD Jr, Morris C J, Growdon HJ, Hyman TB. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neuroscience* 1996;16:4491-4500
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, et al. The precursor of Alzheimer disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987;325:733-36
- Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, et al. Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J* 1988;7:949-57
- Weidemann A, Koning G, Bunke D, et al. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 1989;57:115-26
- Kidd M. Paired helical filaments in electron microscopy in Alzheimer's disease. *Nature* 1963;197:192-93

14. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4913-17
15. Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Smith AJ, George L, Tung YC, Zaidi T. Identification and localization of a tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:5646-50
16. Flament S, Delacourte A. Abnormal tau species are produced during Alzheimer's disease neurodegenerating process. *FEBS Lett* 1989;247:213-16
17. Wischik CM, Crowther RA, Stewart M, Roth M. Subunit of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 1985;100: 1905-12
18. Novak M, Kabat J, Wischik CM. Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J* 1993;12:365-70
19. Mena R, Edwards P, Pérez-Olvera O, Wischik CM. Monitoring pathological assembly of tau and β -amyloid proteins in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1995;89:50-56
20. Wolozin BL, Pruchnicki A, Dickson DW, Davies P. A neuronal antigen in the brains of Alzheimer patients. *Science* 1986;232:648-50
21. Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI. Hydrofluoric acid-treated τ PHF proteins display the same biochemical properties as normal τ . *J Biol Chem* 1992;267:564-69
22. Wang J-Z, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Glycosylation of microtubule-associated protein tau: An abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nature Med* 1996;2:871-75
23. Smith AM, Tameda S, Richey LP, et al. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5710-14
24. Ledesma MD, Bonay P, Colaco C, Avila J. Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem* 1994;269:21614-19
25. Yan SD, Chen X, Schmidt AM, et al. Glycated tau protein in Alzheimer disease: A mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7787-91
26. Smith MA, Perry G. Alzheimer disease: An imbalance of proteolytic regulation? *Med Hypoth* 1994;42:277-79
27. Castellani R, Smith AM, Richey LP, Perry G. Glycooxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Brain Res* 1996;737:195-200
28. Jenkins GH, Bacherlard SH. Glycosaminoglycans in cortical autopsy samples from Alzheimer brain. *J Neurochem* 1988;51:1641-45
29. Hassan HF, Campbell ED, Rifat S, Douglas SD. Isolation and characterization of human fetal brain-derived microglia in vitro culture. *Neuroscience* 1991;41:149-58
30. Ling EA, Dahlstrom A, Polinsky JR, Nee LE, McRae A. Studies of activated microglial cells and macrophages using Alzheimer's disease cerebrospinal fluid in adult rats with experimentally induced lesions. *Neuroscience* 1992;51:815-25
31. Perlmutter SL, Scott AS, Barrón E, Chui HC. MHC class II-positive microglia in human brain: Association with Alzheimer lesions. *J Neurosci Res* 1992;33:549-58
32. Ledoux S, Rebai N, Dagenais A, et al. Amyloid precursor protein in peripheral mononuclear cells is up-regulated with cell activation. *J Immunol* 1993;150:5566-75
33. Dickson DW, Sinicropi S, Yen HS, et al. Glycation and microglial reaction in lesions of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996; 17:733-43
34. Kobayashi K, Emson PC, Mountjoy CQ. *Vicia villosa* lectin-positive neurons in human cerebral cortex. Loss in Alzheimer-type dementia. *Brain Res* 1989;498:170-74
35. Nag S. Ultrastructural localization of lectin receptors on cerebral endothelium. *Acta Neuropathol* 1985;66:105-10
36. Mann DM, Purkiss MS, Bonshek RE, Jones D, Brown AM, Stoddart RW. Lectin histochemistry of cerebral microvessels in ageing, Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neurobiol Aging* 1992; 13:137-43
37. Lascrain R, Chávez R, Gorocica P, Pérez A, Montaña LF, Zenteno E. Recognition of a CD4⁺ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology* 1994;83: 410-13
38. Mirra SS, Heyman A, McKell D, et al. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991;41:479-86
39. Zenteno E, Ochoa JL. Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column. *Phytochemistry* 1988;27:313
40. Vázquez L, Massó F, Rosas P, Montaña LF, Zenteno E. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (crustacea, decapoda) hemolymph. *Comp Biochem Physiol* 1993; 105:617-23
41. Savage D, Mattson G, Desai S, Nielander G, Morgensen S, Conklin E. Avidin-biotin chemistry: A handbook. Rockford IL, USA: Pierce Chemical Company, 1992:42-48
42. Mena R, Edwards P, Harrinton CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM. Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1996;91:633-41
43. Terry RD, Peck A, DeTeresa R, Schechter R, Horoupian DS. Some morphometric aspects of the brain in neuritic dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 1981;10:184-92
44. Araujo H, Menezes M, Mendez-Otero R. Blockage of 9-O-acetyl gangliosides induces microtubule depolymerization in growth cones and neurites. *Eur J Cell Biol* 1997;72:202-13
45. Alroy J, Goyal V, Skutelsky E. Lectin histochemistry of mammalian endothelium. *Histochemistry* 1987;86:603-7
46. Mann DM, Bonshek RE, Marcyniuk B, Stoddart RW, Torgerson E. Saccharides of neuritic plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1988;85:277-82
47. Mann DM, Brown A, Prinja D, et al. An analysis of the morphology of neuritic plaques in Down's syndrome patients of different ages using immunocytochemical and lectin histochemical techniques. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1989;15:317-29
48. Mann DM, Jones D, Prinja D, Purkiss MS. The prevalence of amyloid (A4) protein deposits within the cerebral and cerebellar cortex in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1990;80:318-27
49. Springer, G.F. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science* 1984;224:1198-1206
50. Pereira ME, Kabat EA, Lotan R, Sharon N. Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. *Carbohydr Res* 1976;51:107-18
51. Zenteno E, Lascrain R, Montaña LF, Vázquez L, Debray H, Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconjugate J* 1992;9:204-8
52. Marth JD. Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylglucosaminyltransferases. *Glycobiology* 1996;6:701-5
53. Pepe G, Siri D, Oddon Y, Pavia AA, Reboul JP. Conformational analysis of the amino termini (5 residues) of human glycophorin AM and AN: differentiation of the structural features of the TN and T antigenic determinants in relation to their specificity. *Carbohydr Res* 1991;209:67-81
54. Kanami Y, Yamamoto K, Osawa T, Irimura T. Strong affinity of *Maackia amurensis* hemagglutinin for sialic acid-containing ser/thr-linked carbohydrate chains of N-terminal octapeptides from human glycophorin A. *FEBS Lett* 1994;342:334-38
55. Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-lubaki M, Peeters B, Peumans WP. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin

- recognizes the Neu5Ac (α 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem* 1987;262:1596-1601
56. Maguire TM, Breen KC. A decrease in neural sialyltransferase activity in Alzheimer's disease. *Dementia* 1995;6:185-90
57. Blum AS, Barnstable CJ. O-acetylation of a cell-surface carbohydrate creates discrete molecular patterns during neural development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:8716-20
58. Harduin-Lepers A, Recchi MA, Delannoy P. 1994, the year of sialyltransferases. *Glycobiology* 1995;5:741-58
59. Varki A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J* 1997;11:248-55

Received January 22, 1998

Revision received June 25, 1998

Accepted June 27, 1998

O-Glycosylation in Sprouting Neurons in Alzheimer Disease, Indicating Reactive Plasticity

BLANCA ESPINOSA, MS, ROBERTO ZENTENO, PHD, RAÚL MENA, MD, PHD, YVES ROBITAILLE, MD,
EDGAR ZENTENO, MD, PHD, AND JORGE GUEVARA, PHD

Abstract. Reactive plasticity, including axonal and dendritic sprouting and reactive synaptogenesis, has been proposed to contribute to the pathogenesis of several neurological disorders. This work was aimed at identifying the possible role of protein glycosylation in the brain from patients with Alzheimer disease (AD), using lectin histochemistry, as determinants of reactive plasticity. Results indicate an increase in the production of cryptic O-glycosidically linked proteins (NeuAc α 2,6 Gal β 1,3GalNAc α 1,0 Ser/Thr or sialyl-T-antigen) in neuritic sprouting in AD brains as determined by positive labeling with *Amaranthus leucocarpus* (ALL, T-antigen-specific) and *Macrobrachium rosenbergii* (MRL, specific for NeuAc5,9Ac₂) lectins. Immunohistochemistry indicated that lectin staining was specific for the synaptic sprouting process (meganeurites) in AD. These results were confirmed using anti-synaptophysin and anti-GAP 43 antibodies, which recognized meganeurites and dystrophic neurites around amyloid- β deposits. In normal control brains, labeling with the aforementioned lectins was restricted to microvessels. Control experiments with neuraminidase-treated brain samples revealed positivity to the lectin from *Arachis hypogaea* (PNA), which is specific for galactose. Our results suggest specific O-glycosylation patterns of proteins closely related to neuronal plasticity in AD.

Key Words: Alzheimer disease; Lectins; O-glycosylation; Sialic acid-specific lectins; Sprouting neurons; T antigen.

INTRODUCTION

The neuropathological hallmarks of Alzheimer disease (AD) are neuritic plaques (NPs) and neurofibrillary tangles (NFTs). Although they are the most sensitive and specific criteria to establish a definite diagnosis of AD, it is still controversial whether the density or distribution of NPs or NFTs is directly related to cognitive deficits (1, 2). In recent years it has been shown that in addition to those lesions, abnormal synaptic immunoreactivity is present in the cortex and the hippocampus of AD brains (3, 4). Most of the studies addressing this synaptic pathology were focused on measuring synaptic densities and, interestingly, several reports have found good correlations between synaptic density decrease and cognitive impairment. It has been proposed that synaptic loss is an early phenomenon possibly preceding loss of neurons (5). Synaptic pathology has been considered particularly relevant in several neuropsychiatric illnesses. A synaptic failure may potentiate the cognitive impairment to deep dementia conditions (6, 7); additionally, abnormally dilated synaptic terminals have been observed in normally aging (8) and demented brains (9).

Glycosylation and other oxidative damage mechanisms have been associated with the earliest pathological change in AD (10–12); however, recent findings indicated that different proteins seem to participate in the major events of AD pathogenesis. These proteins seem to exist in several isoforms that arise (in many tissues) by alternative splicing of a single gene, but are subjected to post-translational modification such as glycosylation, particularly O-glycosylation and sialic acid transference, during transit through the trans-Golgi and the intracellular protein secretory pathway (13). Because of their fine sugar specificity, lectins have been used to demonstrate post-translational modifications due to glycosylation of proteins in human brains from patients with AD (14–16), and they have also been used to identify microglial cells, neurons, microvessels, and cell types in different animal species (17–25). In this study we used lectins to identify glycan moieties in meganeuritic structures (a specific population of dystrophic neurites) in AD. Our findings suggest a differential glycan addition, indicative of protein processing differences in the synaptic sprouting process in AD but not in normal control brains, suggesting that these glycan modifications might be an early event in AD pathogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Tissue

Complete hippocampal formations from 7 autopsied brains, ascertained both clinically and morphologically for AD according to NINCDS-ADRDA criteria, were studied (1, 2). AD patients had a mean age of 74.6 ± 7.9 yr. Five nondemented control brains without any neurological impairment were also studied (age 74 ± 6.9 yr). All the tissues were sampled within 24 hours (h) after death. Samples were

From the Departamento de Bioquímica (BE, RZ), Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City, Mexico; Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias (RM), CINVESTAV, Mexico City, Mexico; Department de Neuropathologie (YR), Institut de Gériatrie de Montreal, Montreal, Canada; Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica (EZ), Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City, Mexico; Departamento de Neuropatología (JG), Instituto Nacional de Neurología, Mexico City, Mexico.

Correspondence to: Jorge Guevara, PhD, Departamento de Neuropatología, Instituto Nacional de Neurología, Insurgentes Sur 3877, La Fama. C.P. 14269, Mexico City, Mexico.

This work was supported in part by CONACyT (27609, 990155, and 26319M) to (JG) and DGAPA-UNAM (IN224598).

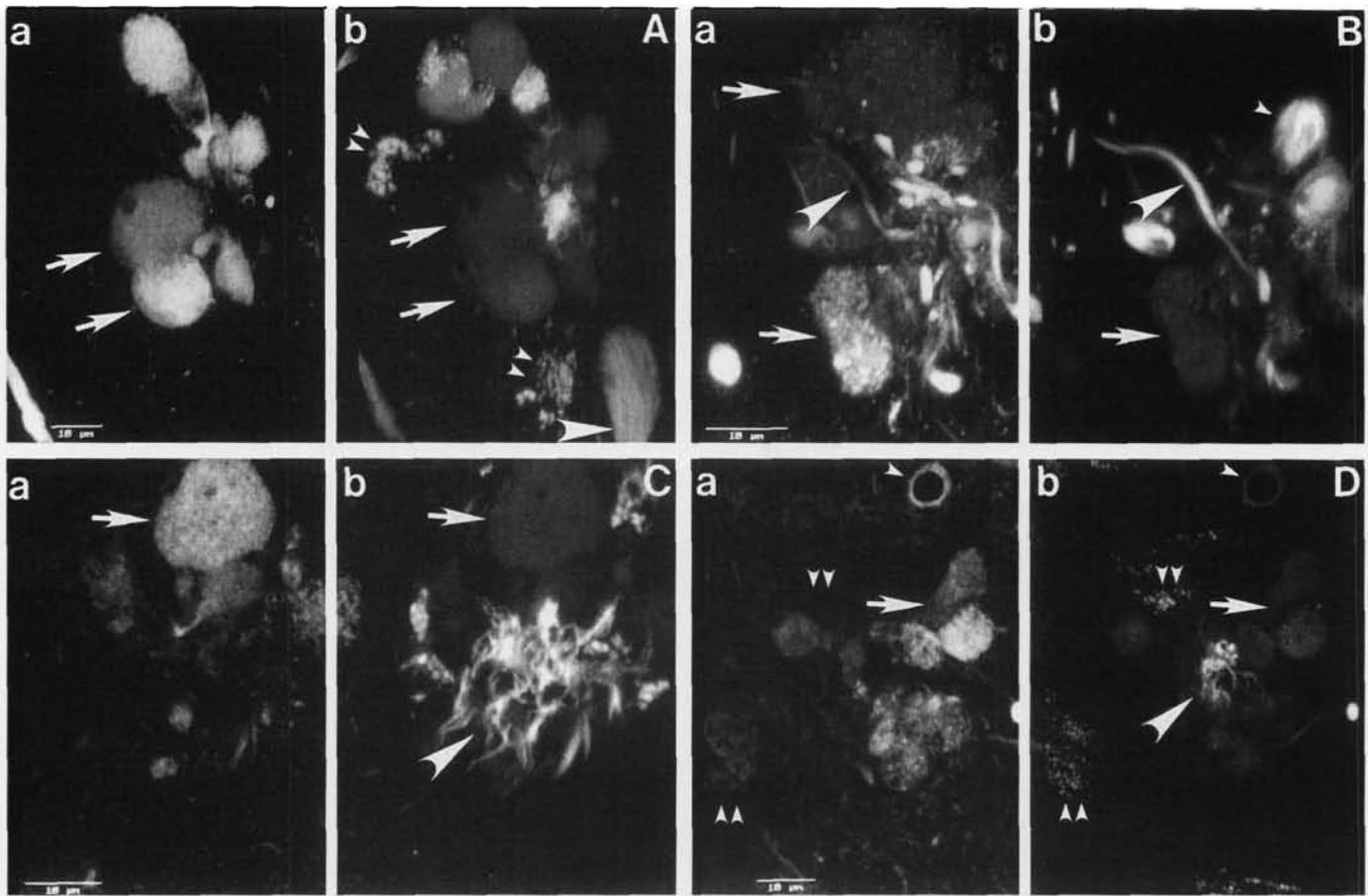


Fig. 1. Double labeled slides with lectins (green channel, a) and TR (red channel, b) in confocal microscopy. A, B, C, D: (a) images demonstrated lectin labeling in AD tissue. A: PNA labeling of meganeurites in AD demonstrated ovoid structures in clusters (arrows, a). Red channel (b) also showed TR-positive labeling (arrows) and NFTs (arrowhead), and lipofuscin deposits (double small arrowheads). B: ALL labeling on meganeurites (arrows, a, b). ALL also recognized TR-positive dystrophic neurites (arrowheads, a, b). Some other dystrophic neurites are only recognized by TR (small arrowhead, b). C: MRL labeling of meganeurites (arrows, a, b). TR labeled the amyloid- β deposit (arrowhead, b). D: ConA labeling of meganeurites (arrow, a). TR labeled amyloid- β deposit (arrowhead, b) and the amyloid- β deposit on the microvessels (small arrowheads, a, b). ConA recognized a specific meganeurites population smaller than meganeurites recognized by PNA, ALL and MRL (arrows, a, b). Lipofuscin deposits are visualized in (b) red channel but not in (a) green channel (double arrowheads).

fixed by immersion in 4% paraformaldehyde buffered solution at 4°C. Samples were then embedded in paraffin and blocks were cut into 6- μ m-thick sections and stained according to well-established histochemical and immunohistochemistry protocols (16).

Lectins

Biotinylated lectins: *Canavalia ensiformis* (ConA), *Lens culinaris* (LCA), *Limulus polyphemus* (LPA), *Maackia amurensis* (MAA), *Arachis hypogaea* (PNA), and *Sambucus nigra* (SNA) were obtained from EY Laboratories Inc. (San Mateo, CA). Sugars, reference glycoproteins, *V. cholerae* neuraminidase, and Extravidin-FITC were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Lectins from *Macrobrachium rosenbergii* (MRL) and from *Amaranthus leucocarpus* (ALL) were purified by affinity chromatography as described previously. Briefly, ALL was purified from seeds by affinity chromatography on a column packed stroma from human erythrocytes type O (26). MRL was purified from hemolymph by affinity

chromatography on a column containing stroma from rat erythrocytes-Sephadex G-25 (27).

Lectin Histochemistry

Lectin binding was indirectly recognized on paraffin-embedded samples with Extravidin-FITC-conjugated. Sections were washed in PBS for 5 min; lectins diluted in PBS (50 μ g/ml) were applied for 2 h at 37°C. Sections were thoroughly rinsed with PBS before incubating for 1 h at 37°C in Extravidin-FITC (1:100) followed by PBS rinsing. Prior to mounting with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA), samples were counterstained with 5 μ M Propidium Iodide (PI) in an aqueous solution for 15 min (Sigma). Control experiments consisted of omitting the lectin. Specificity of lectin interaction was determined by hapten-inhibition assays: each lectin was pre-incubated with 200 mM of its specific sugar (Table). Ten μ M bovine submaxillary gland mucin was used for MRL (27). Lectin interaction was also determined on slides previously incubated with 0.1 units of *V. cholerae* neuraminidase/100 μ l of PBS at 37°C for 30 min.

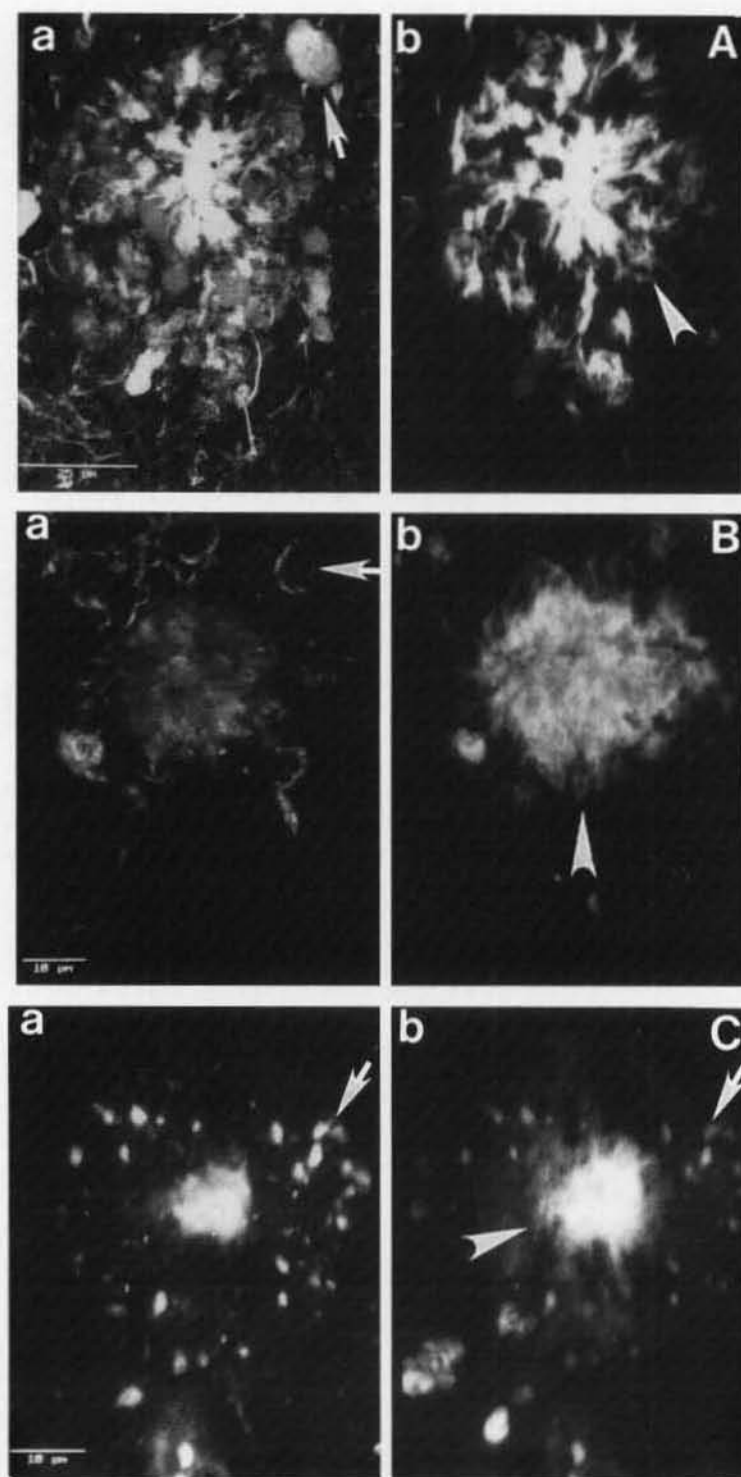


Fig. 2. Double labeled slides with lectins (green channel, a) and TR (red channel, b) in confocal microscopy. Lectin labeling was observed simultaneously in amyloid- β core of TR-positive NPs (arrowheads, b images). A: Double labeled meganeurites recognized by MRL (arrow, a) and TR, showing an amyloid- β deposit (arrowhead, b). B: Double labeled meganeurites recognized by SNA (arrow, a) and TR, showing an amyloid- β deposit (arrowhead, b). SNA labeling only recognized cytoplasmic membrane of meganeurites (arrow, a). C: Double labeling with LCA and TR. LCA recognized dystrophic neurites (arrow, a) and TR-positive neurites (arrow, b) but not meganeurites around the amyloid- β deposit (arrowhead, b).

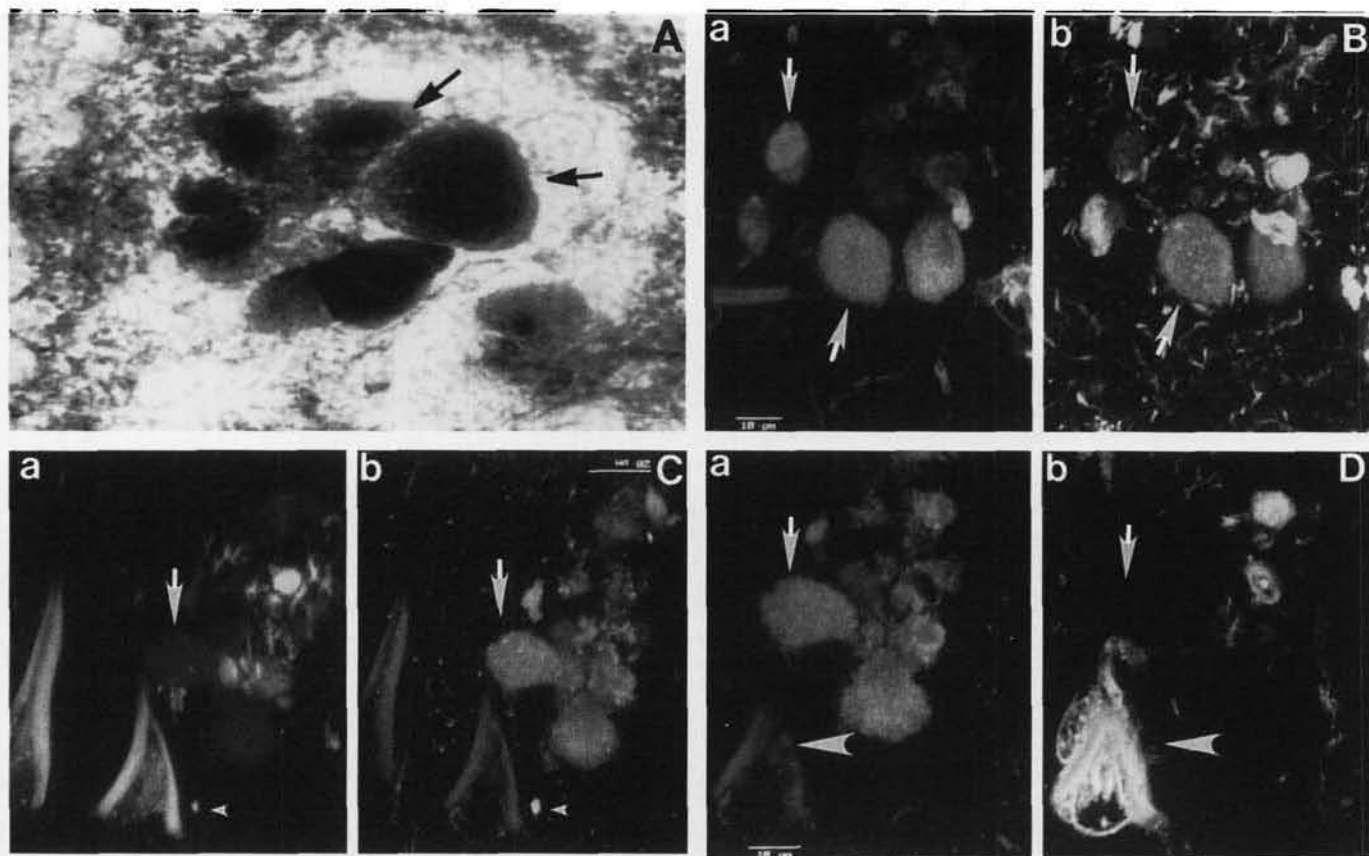


Fig. 3. A: Meganeurites are recognized by anti-synaptophysin antibody in AD tissue (arrows). Single labeling with the PAP method. B, C, D: Double labeled slides with lectins (green channel, a) and TR (red channel, b) in confocal microscopy. B: Double labeled meganeurites with MRL (arrows, a) and hyperphosphorylated-tau antibody (arrows, b). AD2 antibody strongly labeled dystrophic neurites (b), which were not recognized by MRL (a). C: PNA labeling on meganeurites (arrow, b) and TR labeling (arrow, a). Meganeurites (arrow, b) are not NFTs labeled by PNA and TR simultaneously (small arrowheads, a, b). D: Double labeled meganeurites with MRL (arrow, a) were not labeled by PI (arrow, b) for nuclei staining. TR labeled the NFTs (arrowhead, b) also positive for MRL (arrowhead, a).

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded blocks from AD and normal control brains were cut 6- μm thick and single labeled according to the indirect PAP method using a monoclonal antibody (mAb) against human Synaptophysin (MAB332, Chemicon International Inc. Temecula, CA. Dilution 1:1,000), PHF-tau hyperphosphorylated (mAb AD2. Dilution 1:500). Monoclonal antibody was kindly provided by Dr. Andre Delacourte, INSERM. Lille, France [28]). Secondary isospecific antibody HRP-conjugated (Jackson Immunoresearch, Canada) was used to develop indirectly through the standard immunoperoxidase method with Diaminobenzidine (Sigma). Selected sections were double-labeled with the lectins and mAb AD2 and against Growth Associated Protein 43 (GAP-43), (MAB347, Chemicon International Inc., Dilution 1:500). Slides were pretreated in 80% formic acid for 5 min prior to immunostaining, washed, and incubated for 1 h at room temperature with the secondary isotype antibody lissamine-Rhodamine-conjugated (Jackson Immunoresearch). Lectin binding was indirectly recognized with Extravidin-FITC conjugated (Sigma). Selected slides were double-labeled to monitor amyloid- β and PHF-tau assembly (16, 29, 30). We performed double labeling with fluorescent dye thiazin red (TR) in aqueous solution at $2 \times 10^{-4}\%$ for 15 min (16, 29, 30)

and PI (Sigma). Finally, the samples were washed and mounted with Vectashield (Vector, Burlingame, CA).

Confocal Microscopy

Double-labeled slides were viewed on an inverted ZEISS microscope equipped with epi-illumination and laser confocal system LSM-410. Consecutive images at 0.5- to 1- μm intervals in the z-axis were collected with a 60 \times oil-immersion objective lens and were simultaneously obtained in 2 channels. Images were projected on a 2-dimensional plane and merged using a pseudocolor display (green for FITC and red for TR and PI). In the merged image, a yellow color display is interpreted as co-localization between 2 markers. Images were stored on 1.2 GB optical disk cartridges, photographed on Kodak T-Max 100 or Ektachrome 100 films, and printed on a color video printer.

RESULTS

Meganeuritic Sprouting in AD

PNA preferentially recognized the cytoplasmic membrane of meganeuritic structures with a diameter bigger than 10 μm (Fig. 1A); these structures showed high tendency to

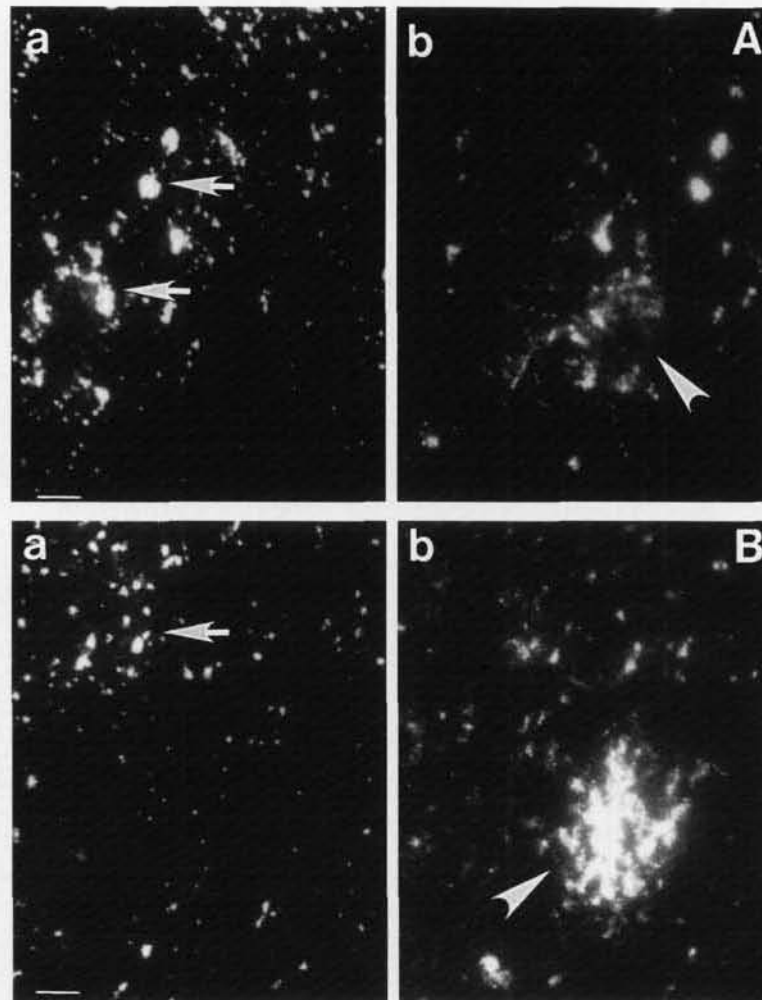


Fig. 4. Double labeling with GAP-43 and TR. A: Meganeurites are recognized by GAP-43 (arrows, a) immunohistochemistry around the amyloid- β deposits (arrowhead, b). B: GAP-43 immunoreactivity was also localized in regular dystrophic neurites (arrow, a) around amyloid- β deposits (arrowhead, b). Scale bar = 10 μ m.

form clusters, sometimes associated with amyloid- β deposits. ALL labeled the meganeurites as well as dystrophic neurites with TR-positive PHF-tau in filaments (Fig. 1B); interestingly, in these meganeurites, ALL also showed affinity for granular components. Figure 1C shows MRL-labeling of the intracytoplasmic and granular components of meganeurites. ConA (Fig. 1D), LPA, and SNA showed lower capacity than other tested lectins to label meganeurites (Fig. 1D). *Maackia amurensis* (MAA) and LCA lectins were negative (Table). Incubation of tissue slides with *V. cholerae* neuraminidase increased the positive labeling by PNA of granular components in meganeurites and rendered negative the labeling of structures by MRL.

Meganeuritic Sprouting Associated with Amyloid- β Deposit in AD

TR was simultaneously visualized in the red channel through confocal microscopy, whereas FITC-labeled

lectins were seen in the green channel. Control experiments indicated that SNA, LCA, LPA, MRL, ALL, and PNA positively recognized amyloid- β deposits (Table). Double-labeled slides with lectins and TR from AD showed a differential pattern of meganeuritic labeling. We found that LPA, MRL, and ALL labeled the meganeurites associated with amyloid- β deposits. Figure 2A illustrates the meganeurites recognized by MRL with characteristically ovoid structures intimately related to the amyloid- β deposit. Figure 2B shows that SNA labeled only the cytoplasmic membrane of meganeurites around the amyloid- β deposit. MRL- and SNA-labeled meganeurites are 10- μ m thick.

Regular dystrophic neurites (approximately 1- μ m thick) were recognized by LCA (Fig. 2C), ALL, and MRL. MAA, PNA, and ConA lectins were negative for dystrophic neurites (Table). Incubation of tissue slides with *V. cholerae* neuraminidase did not modify ALL labeling of

TABLE
Lectin Labeling in AD Tissue Sections

Lectin	Meganeurites	Dystrophic neuritis	Amyloid- β deposit
SNA	\pm	-	+
LCA	-	+	+
ConA	+	-	-
LPA	+	-	+
MAA	-	-	-
MRL	+	\pm	+
ALL	+	+	+
PNA	+	-	\pm

Histochemistry in AD tissue sections was performed using biotin-conjugated lectins and the biotinyltyramide amplification technique (44). The lectins were *Canavalia ensiformis* (ConA, specific for α -Man; α -Glc), *Lens culinaris* (LCA, α -Man), *Limulus polyphemus* (LPA, Neu5Ac); *Maackia amurensis* (MAA, Neu5Ac α 2,3Gal), *Sambucus nigra* (SNA, Neu5Ac α 2,6 Gal/GalNAc), *Macrobrachium rosenbergii* (MRL; Neu5,9Ac2); Peanut agglutinin (PNA, specific for T antigen: Gal β 1,3GalNAc α 1,0Ser/Thr) and *Amaranthus leucocarpus* (ALL, specific for Tn antigen: GalNAc α 1,0Ser/Thr). Lectin binding was evaluated as follows: -, absent; \pm , low reaction, observed in dispersed cells; +, high intensity, observed homogeneously in a tissue section.

dystrophic neurites but rendered positive PNA-labeling, whereas SNA and MRL labeling became negative.

Other Markers

Figure 3 illustrates the labeling of meganeurites with different markers. Anti-human synaptophysin antibody recognized meganeurites in clusters (Fig. 3A). Meganeurites immunoreactive to human synaptophysin were found only in AD brains (mean density $2.4 \pm 0.3/\text{mm}^2$). These meganeurites were also recognized by the anti-hyperphosphorylated PHF tau antibody (Fig. 3B). In contrast to this labeling, slides double-labeled with the lectins and counterstained with TR revealed NFTs, but meganeurites were not labeled (Fig. 3C). Furthermore, slides double-labeled with the lectins and counterstained with PI revealed meganeurites labeled by the lectins but negative to PI labeling (Fig. 3D). Anti-GAP 43 antibody recognized meganeurites in amyloid- β deposits stained by TR in AD (Fig. 4A). Also, anti-GAP 43 antibody recognized the regular dystrophic neurites around amyloid- β deposits (Fig. 4B) as well as neurons. In control brains, anti-GAP 43 label appeared as very small dots and in few neurites (not illustrated).

Lipofuscin Autofluorescence

Lipofuscin deposits were autofluorescent in the red channel and were not labeled by TR (Fig. 1A, D). In these slides, lipofuscin autofluorescence was monitored permanently to avoid any kind of interference with the lectin labeling on meganeurites. Lipofuscin appeared as intracellular granular deposits clearly distinguished by

their brightness from the lectin labeling in the green channel (Fig. 1A, D).

DISCUSSION

Alzheimer disease is characterized by extracellular amyloid- β deposits without neuritic elements and by intraneuronal changes (1, 2). These changes involve NFTs and synaptic loss (6). Reactive plasticity, including axonal and dendritic sprouting as well as reactive synaptogenesis, has been proposed to contribute to the pathogenesis of several neurological disorders. Results from a previous study in AD suggest altered glycosylation and sialylation of glycoproteins (13). In the present study, the use of lectins specific for sialic acid and O-glycans allowed us to find a particular pattern of glycosylation in sprouting mechanisms, specifically of meganeurites and dystrophic neurites in AD. The nature of the glycosylated meganeurites was also confirmed by double-staining assays with lectins and TR, PI, synaptophysin, or GAP-43. TR specifically identifies tau and amyloid- β in a fibrillar state (29, 30). In our experimental conditions, lipofuscin autofluorescence was monitored permanently to avoid any kind of interference with the lectin labeling. It is interesting from a technical point of view for the correct interpretation of lectin-labeled meganeurites (Fig. 1A, D).

The presence or prevalence of specific saccharidic sequences has been considered an indicator of maturity or of cell transformation; for example, the Thomsen-Friedenreich (T) antigen and the Tn antigen (Gal β 1,3GalNAc α 1-0-Ser/Thr and GalNAc1-0-Ser/Thr, respectively) have been identified as specific structures for immature or transformed cells (31). In this study, we performed a screening of glycosylated structures from AD brains with the aid of lectins with well-known sugar specificity. T and Tn antigens were evaluated with PNA and ALL. PNA is a Gal-specific lectin that shows T-antigen reactivity; capping off the disaccharide by sialic acid abolishes binding of PNA (32). PNA recognized meganeuritic structures; however, the presence of sialylated T antigens in meganeurites and amyloid- β deposits was confirmed by incubation of tissue slides with *V. cholerae* neuraminidase, which increased the positive labeling by PNA on meganeurites and rendered positive the amyloid- β deposits. ALL is a GalNAc-specific lectin that shows great affinity for the T antigen; interaction with its receptor is not modified by the presence of sialic acid (33, 34). ALL recognized meganeurites, dystrophic neurites, as well as amyloid- β deposits; furthermore, neuraminidase treatment did not modify the structures recognized by this lectin, indicating that the T antigen is a constitutive component in sprouting neurons in AD.

Our results also indicated relevant differences in the degree of sialylation of the samples tested. Diversity in sialic acids is generated by the glycosidic linkage at carbon 2, resulting in NeuAc α 2,3 or 2,6 linkages of hydroxyl groups of galactose (35). The lectin from LPA

recognizes sialic acid in spite of the glycosidic linkage (36) and, as indicated, this lectin recognized amyloid- β deposits and, to a lower extent, meganeurites. *Sambucus nigra* agglutinin recognized the same structures as LPA lectin. However, recognition of the lectin from MAA with specificity for Neu5Ac in α 2,3 bond was absent in all tested samples, indicating that sialic acid residues present in these structures were mainly linked to galactose by an α 2,6 bond (37), suggesting that α 2,3 sialyl-transferases are ineffective in AD. O-acetyl sialic acid (Neu5,9Ac2) is identified with MRL (27). MRL labeling indicates that neuritic sprouting might be associated with the addition of O-acetyl-sialic acid (Neu5,9Ac2) on O-glycosidically linked proteins (38). These changes in the sialylation pattern might contribute to the early neurofibrillary degeneration (39), but would also make the glycosylated structure more rigid, possibly inducing modifications in cell-cell communication; for example, glycosylation may not only modulate tau function but also play a role in microtubule depolymerization (39). Sialylated gangliosides have been implicated in numerous cellular functions in developing nervous systems and it has been suggested that altered glycosylation correlates with periods of cell migration and axonal pathfinding, suggesting a modulatory role of sialic acid derivatives on growth cone motility and adhesion (39).

LCA and ConA assays indicated that LCA recognizes only amyloid- β deposits, whereas, ConA stained meganeurites. Both lectins react with N-glycosylated proteins; although, in contrast to ConA, LCA tolerates substitutions with N-acetylglucosaminic residues in the same structures, suggesting that oligomannosidic and N-acetylglucosaminic type chains occur in minor proportion than O-glycosidically linked glycans in amyloid- β deposits and meganeurites.

Structurally, meganeurites recognized by PNA, ALL, and MRL lectins might be atrophic dendritic structures. Synaptophysin and GAP-43 accumulation in these structures indicates an abnormal synaptic sprouting in AD (Figs. 3A, 4A, B). Furthermore, it has been reported that GAP-43 is a growth-associated phosphoprotein expressed at high levels in neurons during development, axonal regeneration, and neuritic sprouting (40–43). Although the lack of suitable markers for sprouting in human brain makes it difficult to examine changes in neurodegenerative diseases, or to pinpoint the biochemical events that underlie the sprouting response, our results indicate that meganeurites may represent brain plasticity in AD. In summary, our results strongly suggest that alterations in brain plasticity could be due to differential participation of O-glycosyl- and sialyl-transferases through the trans-Golgi processing of proteins that participate in reactive synaptogenesis, and could be an early event in AD-type neuronal degeneration.

REFERENCES

1. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991;41:479–86
2. Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1985;42:1097–1105
3. Geddes JW, Monaghan DT, Cotman CW, Lott IT, Kim RC, Chui HC. Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science* 1985;230:1179–81
4. Ihara Y. Massive somatodendritic sprouting of cortical neurons in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1988;459:138–44
5. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991;30:572–80
6. Zhan SS, Beyreuther K, Schmitt HP. Quantitative assessment of the synaptophysin immuno-reactivity of the cortical neuropil in various neurodegenerative disorders with dementia. *Dementia* 1993;4:66–74
7. DeKosky ST, Scheff SW, Styren SD. Structural correlates of cognition in dementia: Quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration* 1996;5:417–21
8. Braak H, Braak E. Histology and histopathology of the aging brain. Chapter 2. Editor H. P. von Hahn. Ed. J. Ulrich. Basel: Karger, 1988
9. Ferrer I, Guionnet N, Cruz-Sanchez F, Tunon T. Neuronal alterations in patients with dementia: A Golgi study on biopsy samples. *Neurosci Lett* 1990;114:11–16
10. Smith AM, Taneda S, Richey LP, et al. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5710–14
11. Yan SD, Chen X, Schmidt AM, et al. Glycated tau protein in Alzheimer disease: A mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7787–91
12. Smith MA, Perry G. Alzheimer disease: An imbalance of proteolytic regulation? *Med Hypoth* 1994;42:277–79
13. Weidemann A, König G, Bunke D, et al. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 1989;57:115–26
14. Dickson DW, Farlo J, Davies P, Crystal H, Fuld P, Yen SH. Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *Am J Pathol* 1988;132:86–101
15. Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Glycosylation of microtubule-associated protein tau: An abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996;2:871–75
16. Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, et al. Altered glycosylation patterns of proteins in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:905–14
17. Jenkins HG, Bachelard HS. Glycosaminoglycans in cortical autopsy samples from Alzheimer brain. *J Neurochem* 1988;51:1641–45
18. Hassan NF, Campbell DE, Rifat S, Douglas SD. Isolation and characterization of human fetal brain-derived microglia in vitro culture. *Neuroscience* 1991;41:149–58
19. Ling EA, Dahlstrom A, Polinsky RJ, Nee LE, McRae A. Studies of activated microglial cells and macrophages using Alzheimer's disease cerebrospinal fluid in adult rats with experimentally induced lesions. *Neuroscience* 1992;51:815–25
20. Perlmutter LS, Scott SA, Barron E, Chui HC. MHC class II-positive microglia in human brain: Association with Alzheimer lesions. *J Neurosci Res* 1992;33:549–58
21. Dickson DW, Sinicropi S, Yen SH, et al. Glycation and microglial reaction in lesions of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996; 17:733–43

22. Ledoux S, Rebai N, Dagenais A, et al. Amyloid precursor protein in peripheral mononuclear cells is up-regulated with cell activation. *J Immunol* 1993;150:5566-75
23. Nag S. Ultrastructural localization of lectin receptors on cerebral endothelium. *Acta Neuropathol (Berl)* 1985;66:105-10
24. Mann DM, Purkiss MS, Bonshek RE, Jones D, Brown AM, Stoddart RW. Lectin histochemistry of cerebral microvessels in aging, Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neurobiol Aging* 1992;13:137-43
25. Lascurain R, Chavéz R, Gorocica P, Pérez A, Montañó LF, Zenteno E. Recognition of a CD4⁺ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology* 1994;83:410-13
26. Zenteno E, Ochoa JL. Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column. *Phytochemistry* 1988;27:313-17
27. Vázquez L, Massó F, Rosas P, Montañó L, Centeno E. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea, decapoda) hemolymph. *Comp Biochem Physiol* 1993;105B:617-23
28. Buée-Scherrer V, Condamines O, Mourton-Gilles C, et al. AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 1996;39:79-88
29. Mena R, Edwards P, Pérez-Olvera O, Wischik CM. Monitoring pathological assembly of tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J* 1993;12:365-70
30. Mena R, Edwards P, Harrinton CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM. Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1996;91:633-41
31. Springer GF T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science* 1984;224:1198-1206
32. Pereira ME, Kabat EA, Lotan R, Sharon N. Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. *Carbohydr Res* 1976;51:107-18
33. Hernandez P, Bacilio M, Porras F, et al. A comparative study on the purification of the *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin. *Prep Biochem Biotech* 1999;29:219-34
34. Zenteno E, Lascurain R, Montañó L, Vázquez L, Debray H, Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconjugate J* 1992;9:204-8
35. Varki A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J* 1997;11:248-55
36. Roche AC, Monsigny M. Limulin (*Limulus polyphemus* lectin). Isolation, physicochemical properties, sugar specificity and mitogenic activity. *Prog Clin Biol Res* 1979;29:603-16
37. Kanami Y, Yamamoto K, Osawa T, Irimura T. Strong affinity of *Maackia amurensis* hemagglutinin for sialic acid-containing ser/thr-linked carbohydrate chains of N-terminal octapeptides from human glycophorin A. *FEBS Letts* 1994;342:334-38
38. Blum AS, Barnstable CJ. O-acetylation of a cell-surface carbohydrate creates discrete molecular patterns during neural development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:8716-20
39. Araujo H, Menezes M, Mendez-Otero R. Blockage of 9-O-acetyl gangliosides induces microtubule depolymerization growth cones and neurites. *Eur J Cell Biol* 1997;72:202-13
40. De la Monte SM, Ng SC, Hsu DW. Aberrant GAP-43 gene expression in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1995;147:934-46
41. Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: An intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 1997;20:84-91
42. Masliah E, Fagan AM, Terry RD, DeTeresa R, Mallory M, Gage FH. Reactive synaptogenesis assessed by synaptophysin immunoreactivity is associated with GAP-43 in the dentate gyrus of the adult rat. *Exp Neurol* 1991;113:131-42
43. Neve RL, Finch EA, Bird ED, Benowitz LI. Growth-associated protein GAP-43 is expressed selectively in associative regions of the adult human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:3638-42
44. Savage D, Mattson G, Desai S, Nielander G, Morgensen S, Conklin E. Avidin-biotin chemistry: A handbook. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Co., 1992

Received October 3, 2000

Revision received January 3, 2001 and February 5, 2001

Accepted February 6, 2001

Characterization of an O-Glycosylated Plaque-Associated Protein from Alzheimer Disease Brain

BLANCA ESPINOSA, MS, JORGE GUEVARA, PHD, PEDRO HERNÁNDEZ, PHD, MARIE-CHRISTINE SLOMIANNY, PHD,
AIDA GUZMÁN, MS, SALVADOR MARTÍNEZ-CAIRO, MD, AND EDGAR ZENTENO, MD, PHD

Abstract. In this work we characterized a 90-kDa glycoprotein from Alzheimer disease (90Azgp) brain extracts that is recognized by the GalNAc-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus* (ALL), as determined through Western blot. The 90Azgp was purified by electro-elution, and its amino acid sequence determined from peptides obtained after trypsin digestion through MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight), and compared with the relative values obtained from the NCBI (Swiss-Prot 10/01/2001) database. The 90Azgp showed 32% and 42% homology with the KIAA0310 protein from human brain and the human gastric mucin, respectively. Presence of O-glycosidically linked glycans in the proteins recognized by ALL was confirmed by inhibition of the lectin-glycoprotein interaction through hapten-inhibition assays and also by elimination of the O-glycosidically linked glycans after treatment with O-glycanase from *Diplococcus pneumoniae*. Electron transmission microscopy confirmed that the receptor recognized by the lectin is processed in the Golgi apparatus of AD neurons. Although the specific role of this glycoprotein has not been identified, considering that the presence of this lectin receptor co-localized with neuritic plaques and in AD sprouting neurons, it could suggest that the O-glycosyl-protein identified by the *A. leucocarpus* lectin participates in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

Key Words: Alzheimer disease; *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL); O-glycosylated proteins; Proteome analysis; T-specific lectin; Tn-specific lectin.

INTRODUCTION

Alzheimer disease (AD) is characterized pathologically by the appearance of parenchymal amyloid deposits with and without neuritic elements and by intraneuronal changes, including neurofibrillary tangles and synaptic loss (1-3). Reactive plasticity, including axonal and dendritic sprouting and reactive synaptogenesis, has been proposed to contribute to the pathogenesis of several neurological disorders (4-6). Neuritic plaques are formed by an amyloid- β deposit that is surrounded by dystrophic neurites, reactive astrocytes, and microglia (7, 8). Amyloid- β is a 39-42 amino acid residue cleavage product from the larger β -amyloid precursor protein (β APP), a glycosylated transmembrane protein (9). Several post-translational modifications have been reported in β APP, including N-glycosylation (characterized by GlcNAc branched on Asp in a peptide backbone) and O-glycosylation (characterized by GalNAc on Ser/Thr residues), phosphorylation, and tyrosine O-sulfation (10, 11). It has been demonstrated that an altered N-glycosylation pattern

of tau and the presence of O-acetyl-neuraminic acid residues could correlate with the degree of cognitive failure in AD (12, 13).

Previous results using lectins have suggested the presence of specific modifications in O-glycosylation in neurodegenerative diseases that were represented by different levels of complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis (14). O-glycosylation is the product of multiple transferases that could be active in the presence of specific amino acid sequences (15), suggesting the active participation of diverse proteins susceptible to O-glycosylation in the pathogenesis of AD.

Lectins with specificity for O-glycosidically linked glycans have been widely used in fractionation of glycoproteins, cellular sub-populations, and histopathology (16, 17). The lectin from *A. leucocarpus* (ALL) interacts specifically with GalNAc and has been proven to be a useful tool to recognize O-glycosidically linked glycans in different tissues and cells (18-20), and it has been recently demonstrated to interact with O-glycosidically linked proteins in some neurodegenerative processes, such as AD (13). Recent works indicated that ALL co-localizes with anti- β -amyloid antibodies in neuritic plaques and sprouting neurons from AD (6, 13). To identify further and to understand the possible role of O-glycans in AD pathogenesis, we isolated the ALL receptor from AD brain-protein extracts and determined its amino acid sequence, analyzing the peptides obtained by trypsin digestion through matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF).

MATERIALS AND METHODS

Tissue

The whole hippocampus from 7 autopsied brains, ascertained both clinically and morphologically for AD according to

From Departamento de Bioquímica (BE, PH), Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México City, Mexico; Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas (JG, AG), Instituto Nacional de Neurología, México City, Mexico; Laboratoire de Chimie Biologique (M-CS), Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France; Unidad de Investigación (SM-C), Centro Médico Nacional S XXI, IMSS, México City, Mexico; Laboratorio de Inmunología (EZ), Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México City, Mexico.

Correspondence to: E. Zenteno, Dep. Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM, P.O. Box 70159, 04510, México D.F. E-mail: ezenteno@servidor.unam.mx

This work was supported in part by CONACyT (G38590N), Programa de Investigación Estratégica en Salud SSA-CONACyT 2000, DGA-PA-UNAM (PAPIIT-IN207901).

NINCDS-ADRDA criteria, were included in this study (21, 22). AD patients had a mean age of 74.6 ± 7.9 yr. Five nondemented control brains without any neurological impairment were used for this study (age 74 ± 6.9 yr). All the tissues were sampled within 24 h after death. AD brains were fixed in 4% paraformaldehyde buffered solution. Samples were then embedded in paraffin and cut in 6- μ m-thick sections and prepared according to different histo- and immunohistochemistry protocols (6, 13).

Reagents

Amaranthus leucocarpus syn *hypocondriacus* seeds were obtained (Tulyehualco, Mexico) and the lectin was purified by affinity chromatography on a column containing human erythrocyte type O^v membranes physically entrapped in Sephadex G-25 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), as described previously (18). The ALL was labeled with the N-hydroxysuccinimide ester of biotin (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) at a label/protein ratio of 2:1 (23). Electrophoresis and blotting reagents were obtained from Bio-Rad Lab. Inc. (Richmond, CA). Avidin-peroxidase, enzymes, sugars, O-glycanase (endo-N-acetylgalactosaminidase from *Diplococcus pneumoniae*), N-peptide glycosidase F (from *Flavobacterium meningosepticum*), and chemical reagents were from Sigma Chemical Co. Antibodies against ALL were obtained from rabbit immunized sera, as described previously (18).

Histochemistry with ALL

Lectin histochemistry was performed using biotin-labeled lectins according to previous reports (6, 13, 24), and lectin binding was indirectly recognized with extravidin-FITC conjugated (Sigma). Control experiments consisted of omission of the lectin or prior incubation of the lectin with 200 mM of GalNAc (19).

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded blocks from AD and normal control brains were cut in 6- μ m-thick sections. Selected sections were labeled with the lectins, and monoclonal antibodies against human synaptophysin (MAB332, dilution 1:1,000; Chemicon International Inc., Temecula, CA), or PHF-tau hyperphosphorylated (6) (mAb AD2, dilution 1:500), or amyloid- β (mAb M087201, dilution 1:100; Dako Corporation, Carpinteria, CA). The monoclonal antibody AD2 (24) was kindly provided by Dr. Andre Delacourte (INSERM, Lille, France). Lectin binding was indirectly recognized with extravidin-FITC conjugated (Sigma). Primary antibodies were indirectly recognized by secondary antibodies Red X-conjugated (Jackson ImmunoResearch, Hornby, Canada). In all cases, slides were pretreated in 80% formic acid for 5 min to enhance amyloid- β reactivity (6, 13). Finally, the samples were washed and mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Double-labeled slides were viewed with an inverted NIKON microscope equipped with epillumination and a Bio-Rad laser confocal system.

Tissue Localization of the ALL Receptor

AD brain samples were fixed in 4% paraformaldehyde buffered solution and used to localize the ALL receptor with transmission electron microscopy (TEM) using gold particles of 20

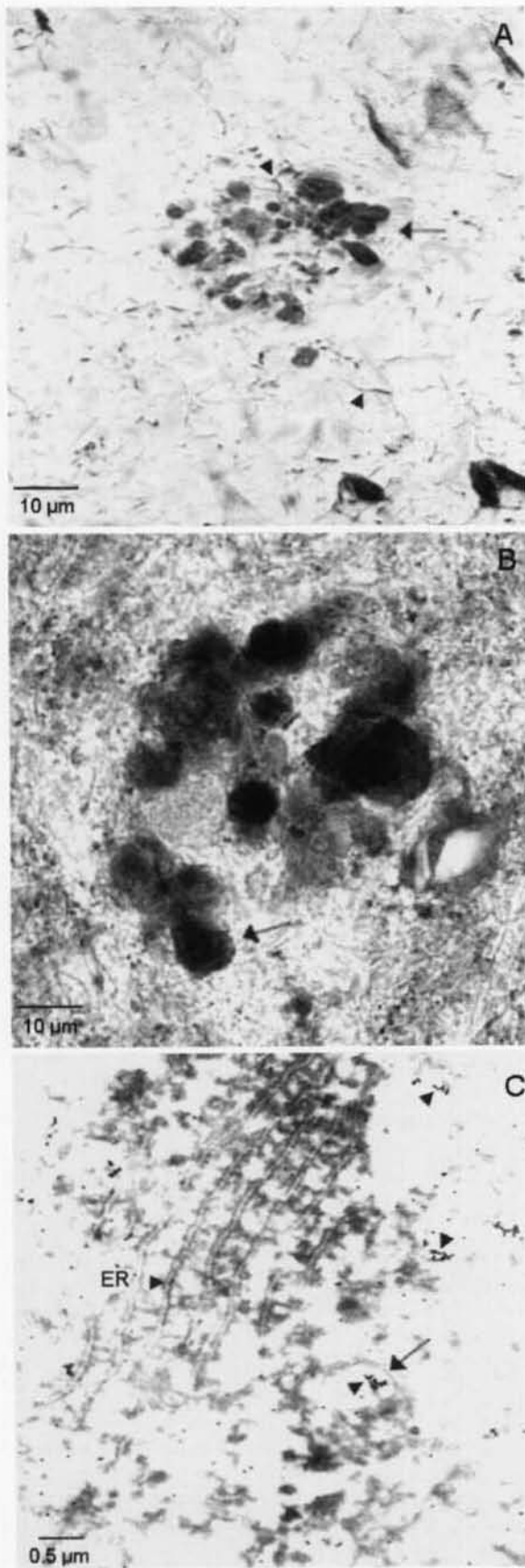
nm. Tissue was dehydrated in crescent methyl alcohol concentrations beginning with 30% for 5 min at 4°C, 50% for 5 min at 4°C, followed by 70% and 90% for 5 min at -20°C, then embedded in Lowicryl K4M (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA), and 90% methyl alcohol (1:1) for 1 h. The resin concentration was increased to a 2:1 proportion for 1 h and followed by the use of pure Lowicryl resin overnight. The resin was polymerized in gelatin capsules under an ultraviolet lamp for 48 h at 4°C. The tissue was cut with glass knives to 60 to 120 nm and mounted on gold grids. Grids were washed successively in PBS-Ca⁺⁺ for 5 min, incubated in PBS-2% Albumin IgG free (Sigma) for 30 min, washed in PBS-Ca⁺⁺ and incubated with the biotinylated ALL lectin in PBS-Ca⁺⁺ (dilution 1:50) for 2 h at 37°C in a humidified chamber, washed in PBS-Ca⁺⁺ and incubated in extravidin-gold conjugated particles of 20 nm (Sigma) for 1 h at 37°C in a humidified chamber. Then, grids were washed again 3 times in PBS-Ca⁺⁺ bi-distilled water for 5 min. Grids were only lightly contrasted in uranyl acetate (Merck, Darmstadt, Germany) for 5 min, finally washed, air dried, and observed under a TEM and photographed.

Cleavage of O-Glycans

Proteins were extracted from brain samples as follows: 500 mg of a frozen brain sample was placed in 5 ml of 30 mM phosphate buffer, pH 8.4 (PBS), containing 1 μ g/ml aprotinin A, 1 μ g/ml pepstatin, 2 μ g/ml leupeptin, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.2% SDS, and 0.5% β -mercaptoethanol, then the tissue was boiled for 5 min at 100°C. Cell debris was removed by centrifugation for 30 min at 18,000 g, the pellets were eliminated, and the clear supernatant was kept at -70°C until use. Cleavage of glycosidically linked structures was performed in extracts containing 500 μ g of protein extracts per milliliter incubated overnight at 37°C with 80 mU of N-peptide glycosidase F (PNGase) (19) or at 37°C for 48 h with 1 mU of O-glycanase (19). Brain extracts were then boiled for 1 min to stop the enzymatic treatment and further used for electrophoresis assays. Protein concentration was determined by the method of Bradford (25), using bovine serum albumin as standard.

Protein Blotting

AD and control brain extracted proteins (100 μ g/each) were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in 12% separating and 4% stacking gels in a slab gel apparatus according to the method of Laemmli (26). Coomassie brilliant blue R-250 was used for staining. Resolved proteins were transferred to nitrocellulose membranes using a semidry blotting apparatus (Bio-Rad) under conditions recommended by the manufacturer. Membranes containing transferred proteins were blocked overnight with TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7.6, and 0.1% Tween 20) and 5% skimmed milk, washed in TBS, and the ALL receptor was detected with ALL-biotin labeling (1 μ g/ml) and revealed with extravidin conjugated with horseradish peroxidase in an enhanced chemiluminescence detection system. Protein blotting was also performed using samples treated previously with PNGase or O-glycanase. Negative controls were performed using biotin-labeled antibodies raised against ALL, which revealed no interaction with brain protein extracts. Specificity of the interaction between ALL and brain



extracts was assessed using ALL-biotin labeling, previously incubated with its specific sugar inhibitor (200 mM GalNAc), which revealed no interaction to the nitrocellulose-transferred proteins.

Amino Acid Sequencing

Amino acid sequencing of the identified 90-kDa glycoprotein from AD brain protein extracts was determined through MALDI-TOF in peptide fragments obtained by trypsin digestion. After electrophoresis on SDS-PAGE, the 90-kDa band was excised with a scalpel, electro-eluted using a model 422 electro-eluter (Bio-Rad), and electrophoresed again. The band containing 200 pM of protein was excised and incubated with 0.5 μ g trypsin using Promega sequencing grade (Promega, Madison, WI) in 500 μ l ammonium bicarbonate, pH 8.0, at 37°C for 24 h. The enzyme digest was evaporated to dryness using a Speed Vac concentrator (GMI, Inc., Albertville, MN) and re-evaporated with water ($2 \times 100 \mu$ l). Samples were prepared by mixing directly onto the target 1 μ l of the reaction products (containing 50 pM) and 1 μ l of a 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix (12 mg/ml in acetonitrile/H₂O, 80:20, v/v) and allowing the mixture to crystallize at room temperature. Positive ions of the peptides were measured by MALDI-TOF on a Vision 2000 time-of-flight mass spectrometer (Finnigan MAT, Bremen, Germany) equipped with a 337 nm UV laser. The mass spectra were acquired in reflectron mode under 8 keV acceleration voltage and positive detection. Control assays were performed using trypsin alone to identify self-digested peptide mass and with angiotensin I as standard (Mr 1296.7) (27). The mass of [M + H]⁺ ions from peptides produced by tryptic digestion was compared with those obtained from NCBItr (Swiss-Prot 10/01/2001) database. Putative glycosylation sites were determined by the NetOGlyc 2.0 pattern search method.

RESULTS

Diagnostic

The use of ALL, a GalNAc-specific lectin, allowed us to find a particular glycosylation pattern linked to sprouting mechanisms, characterized particularly by the presence of meganeurites reactive to AD2 (Fig. 1A) and to synaptophysin (Fig. 1B) in AD. Double labeling with ALL and AD2 or synaptophysin or amyloid- β in these lesions identified the neuronal nature of the glycosylated meganeurites (Fig. 2A–D). Analysis with FITC-ALL in

←

Fig. 1. **A:** Meganeurites (arrow) immunoreactive to AD2 antibody in AD brains. Dystrophic neurites associated with a plaque are also intensely recognized by this antibody (arrowheads). Light microscopy. **B:** Meganeurites recognized by anti-human synaptophysin antibody in AD (arrow). Peroxidase staining in transmitted light channel for confocal microscopy. **C:** Localization of ALL putative sites of receptors with gold particles in AD neurons. Gold particles are distributed mainly in intracellular vesicles of remnant Golgi cisterns (arrow) at the edge of the endoplasmic reticulum (ER), where some gold particles were found (arrowheads). Transmission electron microscopy of autopsied brain.

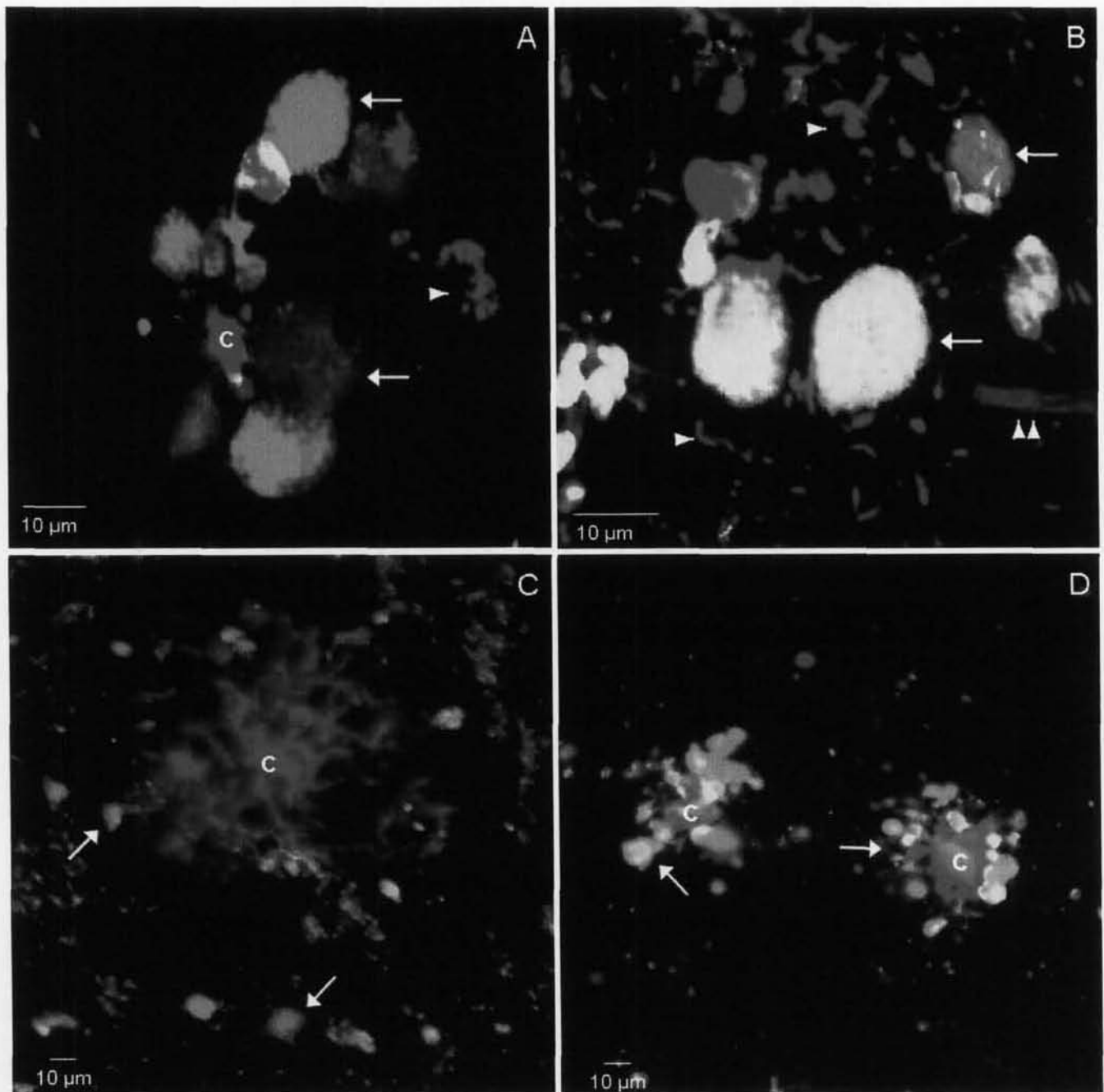


Fig. 2. Double-labeled slides with lectins and antibodies in confocal microscopy. Lectin labeling was observed simultaneously in amyloid- β core (**A, C, D**). The amyloid- β core is indicated by (c). **A**) Meganeurites recognized by ALL in AD (arrows). These meganeurites are clustered in groups around an amyloid- β deposit (c). Autofluorescent lipofuscin deposits are frequently observed (arrowhead). **B**): Double labeling for meganeurites recognized by ALL and AD2 in AD (arrows), AD2 recognized dystrophic neurites (arrowhead) and ALL the vessels (double arrowhead). **C**): Double labeling for synaptophysin and amyloid- β . Meganeurites immunoreactive to synaptophysin (arrows) are associated with an amyloid- β core (c). **D**): Double labeling for AD2 and amyloid- β . Meganeurites (arrows) are localized around an amyloid- β core (c) (see Fig. 1A).

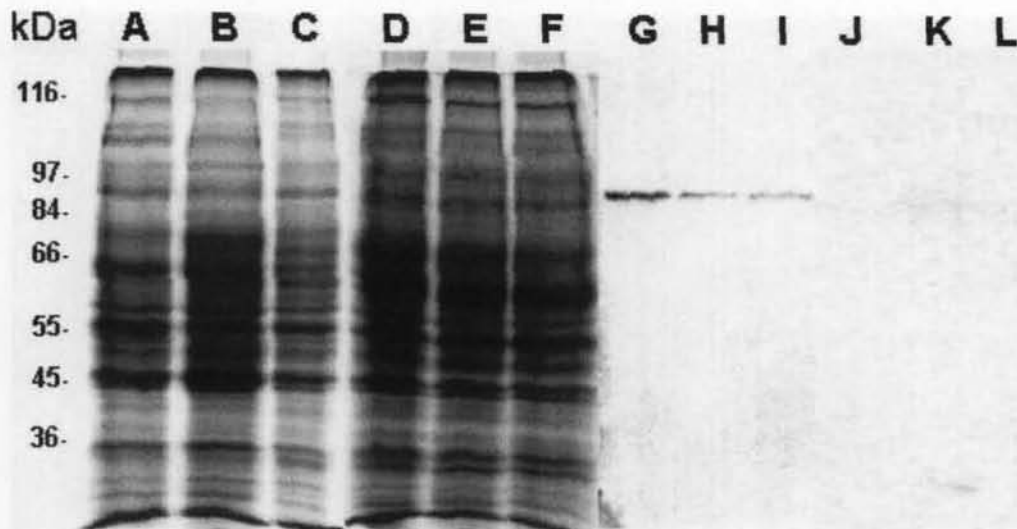


Fig. 3. Protein blotting of brain extracts. AD brain extracts (100 µg) (A–C) and aging normal control (D–F) were electrophoresed in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (A–C, typical patterns), transferred to nitrocellulose filters, and analyzed with biotin-labeled ALL and revealed with extravidin peroxidase in an enhanced chemiluminescence detection system for AD (G–I) and aging normal control (J–L). The molecular weight markers are *E. coli* β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97 kDa), and fructose-6-phosphate kinase (84 kDa) from rabbit muscle, bovine serum albumin (66 kDa), bovine liver glutamic dehydrogenase (55 kDa), hen ovalbumin (45 kDa), and rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa). Specificity of the ALL-AD brain extract was detected by adding ALL previously incubated with its specific sugar inhibitor (200 mM GalNAc).

double-labeled AD tissue slides in confocal microscopy showed a consistent lectin binding in meganeurites in AD, whereas only vessels bound lectins in normal nondemented control brains (not shown). In all cases, amyloid- β deposits were observed and constituted as a core (c) and related to meganeurites (Fig. 2A, C, D).

Protein Blotting

As determined by SDS-polyacrylamide electrophoresis and Western blot analysis (Fig. 3), the fraction recognized by ALL is a 90-kDa glycoprotein (further termed as 90Azgp). Because incubation of ALL with 200 mM of GalNAc for 30 min prior to Western blot analysis yielded negative results and no bands were revealed, the specificity of the interaction of ALL with the 90Azgp was determined by hapten inhibition assays. The glycosidic nature of this fraction was confirmed by the fact that treatment with the O-glycanase from *D. pneumoniae*, but not PNGase treatment, abolished its recognition by ALL in protein blotting analysis (not shown).

Amino Acid Sequence

Amino acid sequence of the 90Azgp was analyzed from peptides obtained after trypsin digestion by MALDI-TOF and compared with the relative values obtained from the NCBI (Swiss-Prot 10/01/99) database. Digestion of the glycoprotein with trypsin yielded 11 peptides with an *m/z* range of 634 to 2379. When we compared the *m/z* values with the relative values obtained from the NCBI database, a homology of 32% with a KIAA0310

protein from human brain and a 42% homology with the protein from human gastric mucin were found (Table). Glycosylation sites determined by the NetOGlyc 2.0 pattern search indicated that the 90Azgp showed no putative N-glycosylation sites; whereas, serine residues at positions 5, 65, and 67 of predicted sequence showed to be O-glycosylated (Table).

Transmission Electron Microscopy

TEM of postmortem AD tissue revealed a particular distribution of the gold particles in the tissue. Figure 1C demonstrates a specific gold labeling observed in AD neurons. Consistently, particles were distributed more densely at the end or immediately after the rough endoplasmic reticulum, particularly clustered in vesicles. Under high magnification, the bulk of gold particles was seen to lay directly in vesicles or cavities of the remnant Golgi cisterns at the edge of the rough endoplasmic reticulum (Fig. 1C). Gold-labeled particles were more often observed in intracellular large cavities. In contrast, no labeling was found directly in the rough endoplasmic reticulum (Fig. 1C).

DISCUSSION

Neurofibrillary tangles, neuritic plaques, and neuronal loss are the main neuropathological features of AD (21, 22, 28). Several studies have suggested that post-translational modifications of proteins, such as glycosylation, could be correlated with specific alterations of AD as well as with other neurodegenerative encephalopathies (6, 13,

TABLE
Amino Acid Sequence of a 90-kDa Protein from AD Brain Extract Determined from Tryptic Peptides through Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF)

m/z	Residue No.	Sequence	Homologous protein
1477.10	1-13	MEQVSSRPTSPEK	K31
1200.60	63-74	KLSPSCP DALAPKD	MUC
1699.90	116-131	RQNGTVVGT DIAELLRD	K31
1794.4	138-152	RYAQACHEVGT CVCLRT	MUC
634.9	190-194	RGDCLRD	MUC
2367.4	234-254	RFANSLPINDPLQTVYQLMSGRM	K31
1255.2	291-302	RTMATMGDTLASRG	K31
2378.90	303-324	RGLLDAAHFCYLMAQAGFGVYTKK	K31
1901.80	518-536	RLLPSAPQTL PDGPLASPARV	K31
2379.20	743-763	RCTWTKWFDVDFPSPGPHGGDKE	MUC
2004.50	792-809	KSHPEVSIEHLGQVVQCSRE	MUC

K31 is a 95.2-kDa human protein KIAA0310 (32% homology). Muc is a 91.8-kDa human mucin (42% homology). Underlined amino acids indicate putative O-glycosylation sites.

29, 30). Previous works have shown that the labeled GalNAc-specific ALL co-localizes with antibodies against β -amyloid in neuritic plaques as well as in sprouting meganeurites (6, 13), suggesting the active participation of O-glycosidically linked proteins in AD. In this work, we identified a 90-kDa glycoprotein that is recognized by ALL (90Azgp) and characterized its amino acid sequence by analyzing the peptides obtained after trypsin digestion through MALDI-TOF and comparing them with the relative values obtained from the NCBI database.

Our results revealed that 90Azgp depicts different rates of homology with 2 main glycoproteins: KIAA0310 (32%) and the human gastric mucin (42%). KIAA genes correspond to a group of proteins that seems to be related to cell signaling/communication, nucleic acid management, and cell structure/motility. The expression profiles of these genes in 14 different tissues have been analyzed by RT-PCR, and 8 genes were found predominantly expressed in the brain (31). Our data also indicate that the 90Azgp showed homology with human gastric mucin, a highly glycosylated protein characteristically composed by tandem repeat sequences (15, 34). It has been shown that many glycoproteins containing O-glycosidically linked glycans (conforming mucin and mucin-like structures) play important roles in modulating the immune response, inflammation, and tumor genesis (15, 32-34), since they are responsible for the 3-dimensional organization of many glycoproteins (15, 34).

The ability of lectins to bind carbohydrate structures found in glycoconjugates depends on their 3-dimensional structure (35, 36). In the presence of glycoproteins containing O-glycosidically linked glycans, the specificity of ALL is directed to the inner core of class I O-glycosidically linked glycans containing Gal β 1-3 GalNAc α 1-0Ser/Thr and GalNAc α 1-0Ser/Thr (18), but a specific distance among the O-glycosylable sites is the determinant

for ALL specificity (37). This indicates that mucin-type sequences are present in neuritic plaques. The specific role of this mucin-like receptor identified by ALL in AD brains has not yet been identified; however, since the 90Azgp was expressed in the Golgi apparatus of AD pathologic neurons (as demonstrated by TEM), it is possible that this receptor could interact with the Gal receptor reported in other cellular groups. The neuritic plaques formed by an amyloid- β deposit are surrounded by dystrophic neurites, reactive astrocytes, and microglia (3, 7, 38). Microglia, the tissue macrophages of the brain, play a crucial role in recognition and phagocytic removal of apoptotic neurons, and although the microglial receptors for recognition of apoptotic neurons are not yet characterized, some reports suggest that the uptake of apoptotic neurons involves asialoglycoprotein lectin (39). Recent data suggest that specific interaction through O-glycosidically linked glycans on the surface of phagocytic cells could alter the organization of microtubules and microfilaments, which, in the case of microglia, might be considered as a specific signal to release trophic factors that also participate in the formation of neurites (40).

NetOGlyc 2.0 pattern searches indicated the absence of putative N-glycosylation sites in the 90Azgp, whereas, serine residues at positions 5, 65, and 67 of predicted sequence were shown to be O-glycosylated. O-glycosylation of the specific receptor for ALL in AD brains was confirmed by treating the glycoprotein brain extracts with an O-glycanase or the PNGase, specific for N-glycans (results showed that only O-glycanase abolished ALL interaction). As for other glycoproteins, 90Azgp seems to mature within the trans-Golgi network. This glycoprotein was identified by indirect positive labeling of ALL receptors with gold particles packaged into vesicles for trafficking through the late secretory pathway into Golgi and trans-Golgi network (41-44). Further characterization of the 90-kDa glycoprotein described in this work and its

specific role remain to be determined. Based on the aforementioned data, our results suggest that the lectin from *A. leucocarpus* represents a tool for the study of mucin structures and their biological role in neurodegenerative diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gisela Martínez (UNAM) for technical work and Enrique López for the photographic and art work.

REFERENCES

- Geddes JW, Monaghan DT, Cotman CW, Lott IT, Kim RC, Chui HC. Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science* 1985;230:1179-81
- Ihara Y. Massive somatodendritic sprouting of cortical neurons in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1988;459:138-44
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991;30:572-80
- Zhan SS, Beyreuther K, Schmitt HP. Quantitative assessment of the synaptophysin immunoreactivity of the cortical neuropil in various neurodegenerative disorders with dementia. *Dementia* 1993;4:66-74
- DeKosky ST, Scheff SW, Styren SD. Structural correlates of cognition in dementia: Quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration* 1996;5:417-21
- Espinosa B, Zenteno R, Mena R, Robitaille Y, Zenteno E, Guevara J. O-glycosylation in sprouting neurons in Alzheimer's disease, indicating reactive plasticity. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:441-48
- Terry RD, Gonatas NK, Weiss M. Ultrastructural studies in Alzheimer's preneuritic dementia. *Am J Pathol* 1964;44:269-97
- Terry RD, Wisniewski HM. Ultrastructure of neuritic dementia and of experimental analogs. *Aging and the brain*. In: Gaitz CM, ed. *Advances in behavioral biology*. New York: Plenum Press, vol. 3. 1972:89-116
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, et al. The precursor of Alzheimer disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987;325:733-36
- Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, et al. Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J* 1988;7:949-57
- Weidemann A, Koning G, Bunke D, et al. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 1989;57:115-26
- Sato Y, Naito Y, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Endo T. Analysis of N-glycans of pathological tau: Possible occurrence of aberrant processing of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 2001;496:152-60
- Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, et al. Altered glycosylation patterns of proteins in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:905-14
- Tomita S, Kirino Y, Suzuki T. Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism. *J Biol Chem* 1998;273:6277-84
- Tetaert D, Ten Hagen KG, Richet C, Boersma A, Gagnon J, Degand P. Glycopeptide N-acetylgalactosaminyltransferase specificities for O-glycosylated sites on MUC5AC mucin motif peptides. *Biochem J* 2001;357(Pt. 1):313-20
- Van Damme EJ, Peumans WJ, Barre A, Rouge P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1998;33:209-58
- Lascrain R, Chávez R, Gorocica P, Pérez A, Montañón LF, Zenteno E. Recognition of CD4⁺ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology* 1994;83:410-13
- Hernandez P, Bacilio M, Porras F, et al. A comparative study on the purification of the *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin. *Prep Biochem Biotech* 1999;29:219-34
- Zenteno E, Lascrain R, Montañón LF, Vazquez L, Debray H, Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycocon J* 1992;9:204-8
- Zenteno E, Ochoa JL, Parra C, et al. Mitogenic immunosuppressive and phagocytic activity of *Macharocerus eruca* and *Amaranthus leucocarpus* lectin. In: Bög-Hansen TC, Breborowicz J, eds. *Lectins-biology, biochemistry, clinical biochemistry*. Walter de Gruyter 1985;4:537-46
- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, et al. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991;41:479-86
- Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1985;42:1097-1105
- Savage D, Mattson G, Desai S, Nielander G, Morgensen S, Conklin E. *Avidin-biotin chemistry: A handbook*. Rockford IL: Pierce Chemical Co., 1992
- Buée-Scherrer V, Condamines O, Mourton-Gilles C, et al. AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 1996;39:79-88
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 1976;37:157-223
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-85
- Hellman U, Wernstedt C, Gonez J, Heldin CH. Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* 1995;224:451-55
- Gómez-Isla T, Price LJ, McKeel WD Jr, Morris CJ, Growdon HJ, Hyman TB. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neuroscience* 1996;16:4491-4500
- Dickson DW, Sinicropi S, Yen HS, et al. Glycation and microglial reaction in lesions of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996;17:733-43
- Mann DM, Purkiss MS, Bonshek RE, Jones D, Brown AM, Stoddart RW. Lectin histochemistry of cerebral microvessels in ageing, Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neurobiol Aging* 1992;13:137-43
- Ishikawa K, Nagase T, Nakajima DS. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VIII. 78 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* 1997;4:307-13
- Wenyu W, Punt JA, Granger L, Sharrow SO, Kearse KP. Developmentally regulated expression of peanut agglutinin (PNA)-specific glycans on murine thymocytes. *Glycobiology* 1997;7:349-56
- Gerken AT, Owens LC, Pasumarthy M. Determination of the site-specific O-glycosylation pattern of the porcine submaxillary mucin tandem repeat glycopeptide. Model proposed for the polypeptide: galnac transferase peptide binding site. *J Biol Chem* 1997;272:9709-19

34. Boland CR, Chen YF, Rinderle SJ, et al. Use of the lectin from *Amaranthus caudatus* as a histochemical probe of proliferating colonic epithelial cells. *Cancer Res* 1991;51:657-65
35. Rini M. Lectin structure. *Annu Rev Biomol Struc* 1995;24:551-77
36. Sharma V, Surolia A. Analysis of carbohydrate recognition by legume lectin: Size of the combining site loops and their primary specificity. *J Mol Biol* 1997;267:433-45
37. Hernández P, Debray H, Jaekel H, et al. Chemical characterization of the lectin from *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* by 2-D proteome analysis. *Glycocon J* 2001;18:321-29
38. Terry RD, Wisniewski HM. Ultrastructure of neuritic dementia and of experimental analogs. Aging and the brain. In: Gaitz CM, ed. *Advances in behavioral biology*. New York: Plenum Press, vol. 3, 1972;89-116
39. Witting A, Muller P, Herrmann A, Kettenmann H, Nolte C. Phagocytic clearance of apoptotic neurons by microglia/brain macrophages in vitro: Involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *J Neurochem* 2000;75:1060-70
40. Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, et al. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: The potential role of a "cytokine cycle" in disease progression. *Brain Pathol* 1998;8:65-72
41. Tomita S, Kirino Y, Suzuki T. A basic amino acid in the cytoplasmic domain of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein (APP) is essential for cleavage of APP at the alpha-site. *J Biol Chem* 1998;273:19304-10
42. Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, et al. Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:742-47
43. Lippincott-Schwartz J, Cole NB, Donaldson JG. Building a secretory apparatus: Role of ARF1/COPI in Golgi biogenesis and maintenance. *Histochem Cell Biol* 1998;109:449-62
44. Drecktrah D, de Figueiredo P, Mason RM, Brown WJ. Retrograde trafficking of both Golgi complex and TGN markers to the ER induced by nordihydroguaiaretic acid and cyclofenil diphenol. *J Cell Sci* 1998;111(Pt. 7):951-65

Received April 1, 2002

Revision received September 6, 2002

Accepted September 20, 2002

Abriendo las puertas al **ENVEJECIMIENTO**

De lo biológico a lo social



COMPILADOR
ENRIQUE HERNÁNDEZ GUERSON

Universidad Veracruzana | Instituto de Estudios de la Vejez

Abriendo las Puertas al ENVEJECIMIENTO

De lo biológico a lo social

Enrique Hernández Guerson
COMPILADOR

Xalapa, Veracruz, México 2005

Universidad Veracruzana Instituto de Salud Pública

Abriendo las puertas al envejecimiento

De lo biológico a lo social

1ª Edición: 2005

D.R. © Universidad Veracruzana. Instituto de Salud Pública. 03-2005-063012333700-01

Todos los derechos reservados. Este libro está protegido por los Derechos de Autor. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, almacenada en un sistema de recuperación, o transmitida en forma alguna y por ningún medio electrónico o mecánico incluyendo fotocopias, sin autorización previa del Editor.

ISBN: 970-9939-00-9

El libro "Abriendo las puertas al envejecimiento" se editó con recursos provenientes del Programa para el Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) a través del cuerpo académico Salud Pública y del fideicomiso del Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana. El contenido de los capítulos es responsabilidad exclusiva de los autores.

Diseño y portada: Ing. Gustavo Vargas Merino

Corrección de estilo: Mtro. Antonio Pino Méndez.

Impresión: Ediciones e Impresiones Paspartú

Impreso en Xalapa, Veracruz, México

ENVEJECIMIENTO CEREBRAL NORMAL Y PATOLÓGICO: PLASTICIDAD CEREBRAL REACTIVA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Jorge Guevara Fonseca,
Blanca Espinosa Mancilla,
Minerva Calvillo Velasco,
Edgar Zenteno Galindo.

Introducción

Los cambios observados en el cerebro durante el proceso de envejecimiento, presentan una gran variedad de alteraciones anatómicas e histológicas. La identificación de cambios específicos en estas condiciones es muy difícil. Un ejemplo de esto es la diferenciación de los cambios acumulativos provocados por el medio ambiente. Durante el envejecimiento normal se puede observar una pérdida neuronal moderada y algún grado de pérdida de volumen neuronal. Estudios recientes sugieren que la magnitud de estas pérdidas es mucho menor de lo que se había pensado (Terry *et al.*, 1987), y que la complejidad de la conectividad dendrítica en individuos cognoscitivamente intactos, muestra una continua plasticidad neuronal aún sobre la octava década de vida (Buell y Coleman, 1979). Con mayor frecuencia ocurren cambios vasculares durante el envejecimiento, la mayoría de los cuales se pueden atribuir a condiciones sistémicas producto de causas como la hipertensión y la arteroesclerosis. Los cambios vasculares asociados con el envejecimiento no se consideran que estén ligados a condiciones como los cambios arteroescleróticos hialinos, con formación de tortuositis arterial en los vasos intracraneales pequeños, y de los cambios radiográficos que se observan en la sustancia blanca cerebral profunda, conocidos como leucoaraiosis (Inzitari *et al.*, 1987). El envejecimiento también se acompaña de un incremento en la activación de las células gliales, de daño oxidativo sobre proteínas, lípidos y ADN, y de cambios histopatológicos cerebrales que se relacionan con la enfermedad de Alzheimer. En la actualidad, existen criterios que pueden ser aplicados para describir los cambios anatómicos o funcionales, y como parte del proceso de envejecimiento normal (Hof *et al.*, 1996; Troncoso *et al.*, 1996; Mraz *et al.*, 1997). Abordaremos, a continuación, algunos aspectos relacionados con los cambios anatómicos (plasticidad cerebral), fisiológicos y moleculares que ocurren durante el envejecimiento. Discutiremos las teorías bioquímicas y genéticas y analizaremos la plasticidad cerebral asociada al proceso degenerativo que caracteriza a la enfermedad de Alzheimer.

Cambios anatómicos del cerebro durante el envejecimiento

Los cambios anatómicos que se han descrito durante el proceso de envejecimiento son en realidad muy sutiles. Un gran número de estudios realizados en el cerebro humano ha revelado que en todos los casos existen cambios demostrables. Por tal razón, cuando se utiliza un cerebro como patrón de comparación se debe considerar que hay cambios que se consideran normales y otros anormales. Los claramente patológicos son distinguibles fácilmente, como por ejemplo los infartos, mientras que otros son considerados normales, como la acumulación de agregados del péptido amiloide- β . Existen otros cambios que son de prevalencia prácticamente universal, que deben ser considerados como parte del envejecimiento normal (en sentido cualitativo), pero se convierten claramente en patológicos cuando sobrepasan una densidad umbral (por ejemplo, las marañas neurofibrilares como las que se presentan en la enfermedad de Alzheimer). Sin embargo, existen cambios tan comunes en todos los cerebros que, si se tuviera un criterio de selección realmente estricto, no se contaría con cerebros normales para establecer comparaciones. Por lo tanto, se ha propuesto que los criterios de selección de los pacientes sean aquellos que permitan tener los cerebros en las mejores condiciones de estudio (Dickson *et al.*, 1992). De acuerdo con esta propuesta, los pacientes que lleguen al servicio de neuropatología deberán cumplir con los

siguientes criterios para ser considerados como controles: sanos, cognoscitivamente intactos, ancianos, por muerte repentina y que llegan al servicio de examen *post mortem* lo más rápido posible y con un mínimo de cambios histológicos inevitables en el cerebro.

Cambios macroscópicos cerebrales

Se considera que el cerebro es un órgano post-mitótico, ya que las neuronas se pierden sin que su número se recupere a lo largo de la vida. Con base en el análisis del peso promedio del cerebro, se ha demostrado que durante el envejecimiento el número promedio de neuronas disminuye progresivamente. Se considera que en la población abierta, en individuos neurológicamente normales, se inicia una reducción gradual del peso cerebral después de los 60 años. Se pierden de 2 a 3 gramos por año en un individuo normal en promedio (considerando la masa encefálica promedio de 1400 g en el hombre y de 1250 g en la mujer). La disminución en el peso del cerebro es atribuible, principalmente, a los cambios en la sustancia blanca y acentuado en los lóbulos frontales.

La atrofia cerebral que caracteriza el cerebro de los ancianos se evidencia por un ensanchamiento ventricular y se determina por la medición de los volúmenes intracraneal y cerebral. El volumen cerebral se mantiene constante hasta en un 95% a los 60 años, y a partir de entonces se observa una disminución progresiva de hasta el 80% de este volumen en los nonagenarios. Esta disminución progresiva del volumen cerebral ha sido atribuida a variaciones genéticas y a factores ambientales (Mrak *et al.*, 1997). Ciertas zonas del cerebro también sufren modificaciones de volumen durante el envejecimiento normal. Por ejemplo, el volumen de los ventrículos laterales y del tercer ventrículo, asciende de 15 ml³ en individuos jóvenes, a 55 ml³ en sujetos mayores de 60 años. El volumen hemisférico se reduce a partir de los 20 años. Se observa de manera más acentuada en los hombres, quienes pierden aproximadamente el 3.5% del volumen por década. En las mujeres, el volumen hemisférico disminuye el 2% por década (Mrak *et al.*, 1997). La pérdida de volumen inicial ocurre principalmente en la sustancia gris de la corteza y posteriormente en la sustancia blanca subcortical. La imagenología ha contribuido al conocimiento de algunos de estos cambios en el volumen cerebral, confirmados en las mediciones observadas durante la autopsia. Sin embargo, a pesar de estos cambios reportados, existe una gran variabilidad entre casos. Por lo tanto, un número considerable de ancianos normales no presenta cambios detectables del volumen cerebral.

En general, los cambios anatómicos que sufre el cerebro durante el envejecimiento se interpretan como un reflejo en la pérdida de la población de interneuronas, lo que parece influir en los cambios cognoscitivos asociados al mismo. La demostración fehaciente de la pérdida neuronal en el cerebro humano envejecido es complicada. A este respecto, estudios iniciales realizados para demostrar los cambios celulares asociados al envejecimiento sobre la sexta década de vida, estiman que existe una pérdida neuronal que puede oscilar entre el 15 y el 35% (Terry *et al.*, 1987). El análisis computarizado de las imágenes en la corteza cerebral de pacientes sexagenarios también muestra que existe una pérdida neuronal de hasta un 40% (Terry *et al.*, 1987). Sin embargo, algunos de estos cambios han sido más bien atribuidos a los cambios en la talla de las neuronas que a la disminución.

Cambios microscópicos cerebrales

Las neuronas son estructuras biológicas muy complejas. Los cambios degenerativos (morfológicos) asociados con el envejecimiento ocurren en la complejidad de su árbol dendrítico y en el número de las sinapsis. Los cambios regresivos en el árbol dendrítico neuronal asociados al envejecimiento normal han sido descritos con predominio en las cortezas frontal y temporal, así como en el sistema límbico (Nakamura *et al.*, 1985). Estos cambios han sido descritos, inicialmente, en el número de las espinas dendríticas, seguido de diversos cambios tanto en la talla como en la forma de las ramas laterales y del cuerpo neuronal. Esta secuencia de cambios degenerativos concluye tardíamente con la pérdida de las dendritas apicales y basales (Buell y Coleman, 1979). Con el envejecimiento se presentan también cambios

en la densidad sináptica, principalmente en la neocorteza. A pesar de la constancia de estos cambios neurodegenerativos en el marco del envejecimiento, Buell y Coleman (1979), han demostrado que en individuos normales, aún en la octava década de vida, puede existir más que una disminución, un crecimiento constante tanto en las dendritas mismas como en la complejidad de su arborización en las neuronas piramidales parahipocampales. En este mismo estudio que se basó en el uso de las impregnaciones argénticas de Golgi-Cox, se evidenció que en el llamado "envejecimiento normal", al menos durante la octava década de vida, el mantenimiento de la plasticidad sináptica es una característica común, y que los cambios asociados con el envejecimiento, que realmente son patológicos, son los que llevan a la disminución de la población neuronal y a la pérdida de su complejidad dendrítica.

Acumulación de lipofuscina

La lipofuscina es un pigmento intracelular insoluble que se acumula progresivamente en lisosomas secundarios de las neuronas y en otras células post-mitóticas durante el envejecimiento celular. La naturaleza bioquímica de los gránulos de lipofuscina ha sido difícil de caracterizar debido principalmente a su alta insolubilidad. A pesar de esto, se sabe que contienen residuos polimerizados de lípidos peroxidados y proteínas (Figura 1D). Se ha observado, por ejemplo, que a los animales de experimentación, a los que se les ofrecen suplementos alimenticios con antioxidantes como la vitamina β -tocoferol, se les induce una disminución de la acumulación de la lipofuscina en el cerebro (Ma *et al.*, 1996). En la actualidad, no se conoce con precisión si la lipofuscina tiene alguna función importante en las neuronas, más bien se ha considerado como un producto de desecho residual acumulable durante el envejecimiento neuronal y, por lo tanto, asociado con el funcionamiento metabólico celular global del proceso del envejecimiento (Moore *et al.*, 1995).

Cambios vasculares

La gran mayoría de los cambios vasculares que se presentan con la edad suelen estar asociados con ateromas pequeños que usualmente no implican un compromiso significativo del diámetro de los vasos intracraneales. En el tallo cerebral de los individuos ancianos normotensos, estos depósitos raramente afectan vasos con un diámetro menor a los 2 mm. En contraste, cambios hialinos arterioscleróticos que ocurren en los vasos intracraneales pequeños (<1 mm de diámetro) en los individuos ancianos, afectan la capa íntima de esos vasos, lo que provoca un engrosamiento por el incremento concéntrico de tejido conectivo. Además, se presenta un reemplazo del músculo liso de las paredes vasculares por tejido fibroso. Los vasos se hacen más gruesos y más rígidos, así como engrosados y tortuosos. Se localizan especialmente en las interfases de la sustancia gris y blanca de la región insular y en las áreas adyacentes a éstas.

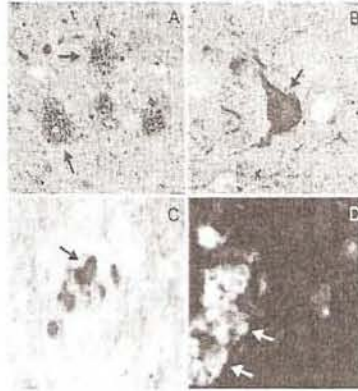


Figura 1.

Cambios histopatológicos. A. Placas neuríticas en la enfermedad de Alzheimer, donde se observa la acumulación de amiloide- β y neuritas distróficas (flechas) teñidas con la técnica de Bielschowsky. B. Maraña neurofibrilar en el tejido cerebral de un paciente con enfermedad de Alzheimer (flecha) teñida con la técnica de Bielschowsky. C. Estructuras meganeuríticas (flecha) en un cerebro con la enfermedad de Alzheimer, reconocidas inmunohistoquímicamente con el anticuerpo anti-sinaptofisina humana. Las meganeuritas también son reconocidas con factores tróficos (ver texto). D. Acumulación de lipofuscina en las neuronas (flechas) de un cerebro normal. Estos depósitos son indistinguibles de los observados en la enfermedad de Alzheimer.

Técnica de microscopía de fluorescencia: tejido cerebral provisto amablemente por la Dra. Francisca Tristán. H. Psiquiatría "Fray Bernardino Alvarez", México, D.F. y del Instituto Nacional de Neurología)

Los estudios de imagenología, como la tomografía computarizada y especialmente la resonancia magnética, revelan cambios en las capas profundas de la sustancia blanca de los cerebros de los individuos ancianos que no habían sido profundados con otros métodos diagnósticos. Estos cambios fueron inicialmente interpretados como infartos en la sustancia blanca, conocidos como la "enfermedad de Binswanger", pero se les conoce más adecuadamente ahora como "leucoaraiosis". Algunos de estos pacientes presentan demencia, pero muchos otros no muestran ningún síntoma de deterioro intelectual importante. Los pacientes con leucoaraiosis, por lo general tienen una historia clínica de daño cerebral por infarto en alguna etapa de su vida adulta y aparentemente son más propensos a presentar nuevos daños del mismo tipo, lo que sugiere que existe una asociación directa con un problema vascular (Pantoni y Garcia, 1995).

Cambios histopatológicos del tipo Alzheimer

El cerebro de las personas afectadas con la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la aparición de depósitos extracelulares formados principalmente de fibrillas insolubles del péptido amiloide- β que están rodeados por elementos neuríticos distróficos de los procesos neuronales (Figura 1A). Otra lesión típica de la enfermedad la constituyen las marañas neurofibrilares que están constituidas por acumulaciones masivas de filamentos anormales en el citoplasma de las neuronas susceptibles (Figura 1B). Además de los depósitos de amiloide- β y de las marañas neurofibrilares, la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer también se caracteriza por la presencia otros dos tipos de inclusiones citoplásmicas de las células: la degeneración granulovacuolar y los cuerpos de Hirano. Todos estos cambios histológicos pueden encontrarse aunque en menor grado, en los cerebros de los ancianos cognoscitivamente intactos, lo que ha dificultado el entendimiento de su participación en la fisiopatogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Existen datos que indican que la acumulación cerebral

de depósitos de amiloide- β puede ocurrir normalmente durante el proceso de envejecimiento, lo que descarta, en parte, que estas lesiones representen un estadio inicial (o preclínico) de la enfermedad de Alzheimer. En apoyo de esta propuesta, en los últimos años han aparecido numerosas publicaciones que indican que la agregación y número de los depósitos de amiloide- β no se correlacionan con el grado de deterioro cognoscitivo de los pacientes (Blessed *et al.*, 1968; Delaère *et al.*, 1991; Dickson *et al.*, 1992; Crystal *et al.*, 1993; Arriagada *et al.*, 1992; Guevara *et al.*, 2004). Estudios neuropatológicos recientes han mostrado que en la enfermedad de Alzheimer, el cerebro presenta cambios estructurales a nivel neuronal y de sus proyecciones, diferentes a las lesiones descritas anteriormente (Guevara *et al.*, 2004). Estos cambios morfológicos incluyen la pérdida considerable del número de neuronas, la presencia de neuritas distróficas disgregadas y la pérdida del 40% de las terminales presinápticas en las láminas 2, 3 y 5 de las cortezas frontal, temporal y parietal. En relación con esto, se ha descrito que la pérdida sináptica en áreas específicas de la corteza se correlaciona con las alteraciones clínicas observadas en la enfermedad de Alzheimer (Masliah *et al.*, 1992).

Cambios en la producción de neurotransmisores

Un gran número de estudios demuestra que existen cambios drásticos en la enfermedad de Alzheimer en el sistema colinérgico. Como consecuencia, se ha observado un avance notable en el conocimiento de la forma en la que los neurotransmisores cambian durante el envejecimiento. Tanto los niveles de la enzima acetil-colin-transferasa (útil en la producción de acetilcolina) como la unión de la acetilcolina a los receptores muscarínicos decrecen conforme aumenta la edad.

El sistema dopaminérgico (dopamina) ha recibido una atención muy particular, principalmente porque está involucrado en el deterioro clínico que caracteriza a la enfermedad de Parkinson. Durante el envejecimiento normal, se han encontrado disminuciones de los niveles de los sitios que capturan a la dopamina, de los transportadores y de los niveles de este neurotransmisor (Bannon *et al.*, 1992). El sistema serotoninérgico (serotonina) también se ha observado disminuido en relación con la edad, principalmente en la corteza cerebral, y particularmente, sobre los receptores que se unen a la serotonina (Allen *et al.*, 1983).

Por otro lado, el sistema adrenérgico (adrenalina) muestra un decremento que está asociado con la edad, en los niveles de los receptores α corticales y β 1, pero no toda la población de los adrenoreceptores- β . Igualmente, la innervación gabaérgica se ve afectada como consecuencia de la edad. También varía considerablemente la concentración del aspartato y glutamato en un número discreto de áreas del cerebro humano de los individuos viejos.

Cambios en la glia

Durante el envejecimiento las poblaciones astrocíticas y de microglia se hacen más prominentes. También se presenta un aumento de la inmunorreactividad a la proteína ácida glial fibrilar (de sus siglas en Inglés: GFAP) en la corteza cerebral humana después de la octava década de vida. En estas condiciones, los astrocitos activados producen la citocina S100 β , que se asocia con la formación de los depósitos de amiloide- β en la enfermedad de Alzheimer (Mrak *et al.*, 1996). La microglia también muestra algunos cambios asociados con la edad. Cuando se activa, expresa la citocina interleucina-1 de manera significativa en pacientes sanos no dementes mayores de 60 años de edad. En este mismo grupo de edad, se observan además cambios en la morfología de las poblaciones gliales. Asimismo, el número de células alargadas y fagocíticas se incrementan con la edad, pero no son significativas las poblaciones de células gliales activadas (Mrak *et al.*, 1996).

El fenómeno de plasticidad cerebral

Los mecanismos hasta ahora conocidos en la plasticidad cerebral indican que se requieren varios elementos estructurales en las neuronas, especialmente en la sinapsis, que permitan que este proceso se lleve a cabo en forma adecuada. Las estructuras sinápticas en crecimiento son, sin duda, las más importantes para este proceso. Sin embargo, no se puede concebir la plasticidad cerebral sin los elementos neuronales, el crecimiento neurítico y el contacto íntimo entre por lo menos dos células neuronales. Los efectos fisiológicos de la plasticidad cerebral permiten que un organismo se adapte al entorno mediante el aprendizaje de nuevas actividades y conductas. En particular, se debe destacar que el mejoramiento de los métodos para la medición de la densidad sináptica ofrece actualmente la oportunidad de contar con datos más precisos al respecto.

La sinapsis

Las sinapsis, por definición, son las zonas de contacto estrecho y el espacio que se forma entre dos terminales nerviosas o bien entre una terminal nerviosa y una célula neuronal o muscular. La sinapsis es una de las estructuras que define a las neuronas y puede ser clasificadas por sí misma de acuerdo a sus tipos y propiedades, incluyendo morfología, tipo de vesículas y de neurotransmisor que contiene.

Una de las herramientas más útiles para el estudio de estos cambios son los anticuerpos monoclonales. En especial, la utilidad de los anticuerpos desarrollados contra la sinaptofisina humana, proteína integral de la membrana de las vesículas sinápticas, es uno de los marcadores más eficaces para demostrar, indirectamente, el número de las sinapsis. La identificación y localización de la sinaptofisina, al igual que para otras proteínas integrales de vesículas sinápticas, permite por medio de métodos inmunohistoquímicos (que incluyen a las microscopías electrónica de transmisión y confocal) su cuantificación, de tal forma que se considera como la medición indirecta de la densidad de terminales pre-sinápticas en el tejido cerebral. La densidad sináptica, entonces, se evalúa por métodos de análisis de imágenes capaces de demostrar una disminución de la densidad de las terminales sinápticas en la enfermedad de Alzheimer (Terry *et al.*, 1991; Alford *et al.*, 1994). Sin embargo, existen muy pocos reportes que sugieren que la concentración de estas proteínas son prácticamente los mismos cuando se comparan con las densidades sinápticas de los controles normales sin demencia (Zhan *et al.*, 1993; Guevara, 1998; Guevara *et al.*, 2004). De igual manera, estos métodos han sido empleados para medir los niveles de proteínas sinápticas de algunas otras enfermedades (Honer *et al.*, 1992; 1994; Zhan *et al.*, 1993).

La patología sináptica ha sido considerada de una relevancia particular en un gran número de padecimientos neuropsiquiátricos. Datos recientes de diversos grupos apoyan la posibilidad de que los procesos de regeneración y plasticidad cerebral compensen sobre manera y, en su defecto, aumenten la expresión de las proteínas sinápticas (Geddes *et al.*, 1985; 1986; Hyman *et al.*, 1985; Gertz *et al.*, 1987; Lassmann *et al.*, 1992). Se considera que los contactos sinápticos son estructuras extremadamente dinámicas, capaces de tener un proceso de remodelación constante y de acuerdo con las diferentes condiciones de estimulación. Datos importantes a este respecto, del grupo de Bertoni-Freddari (1990) demuestran que el tamaño de la sinapsis se ve incrementado durante el envejecimiento fisiológico, así como en la enfermedad de Alzheimer. En apoyo a estos datos, nuestro grupo de trabajo ha encontrado que la presencia de niveles altos de proteínas sinápticas sugieren un proceso de plasticidad aberrante (Guevara *et al.*, 1997; Guevara, 1998; Guevara *et al.*, 2004).

La densidad sináptica en el envejecimiento normal y patológico

Los mecanismos de plasticidad cerebral requieren varios elementos estructurales para que ésta se lleve a cabo. Incluyen la existencia de neuronas y circuitos neuronales específicos, expresión anormal de proteínas sinápticas y altos niveles de factores tróficos, así como la presencia de las estructuras sinápticas en crecimiento, que son, quizás, las más importantes. Se consideraba, hasta hace poco, que en los cerebros con Alzheimer existe una pérdida considerable de las proteínas sinápticas, en especial de la sinaptofisina

(Terry et al., 1991; Scheff et al., 1993; DeKosky et al., 1996). Se ha reportado una disminución en la densidad sináptica hasta del 40 % en la corteza cerebral de los casos con enfermedad de Alzheimer, comparados con controles normales (Masliah et al. 1991a, b y c). Sin embargo, existe un número menor de publicaciones que apoyan la idea de que no existe una diferencia significativa de la densidad sináptica en la enfermedad de Alzheimer, cuando se compara contra los controles sanos (Zhan et al., 1993; Guevara, 1998; Guevara et al., 2004). Se acepta que existe una disminución considerable de la densidad sináptica cuando se comparan las diferentes zonas de la corteza cerebral que contienen un gran número de placas o marañas, contra aquellas zonas cerebrales que no presentan estas lesiones (Masliah et al., 1990; 1992a). Sin embargo, la precisión en la cuantificación de las densidades de estas lesiones, con frecuencia es difícil de determinar debido a la marcada necrosis y pérdida tisular.

Lo que sugiere nuestro grupo es que, tanto en el envejecimiento normal como en la enfermedad de Alzheimer, el tamaño o el número de la sinapsis se ve incrementado. En términos formales, la pérdida sináptica durante el envejecimiento normal ha sido explicada por:

- a. Un efecto neurotóxico que está mediado por un receptor o la producción de sustancias endógenas (por ejemplo el amiloide- β) o exógenas (como la neurotensina).
- b. La existencia de una falla en los mecanismos que modulan el mantenimiento de la integridad sináptica, debida a la expresión alterada o en el procesamiento de moléculas involucradas en la señalización y sobrevivencia celulares.
- c. La acumulación de productos de degradación en la sinapsis que producen como resultado la interferencia de la neurotransmisión y de la plasticidad. Estas mismas propuestas han sido empleadas para explicar los cambios sinápticos asociados a la enfermedad de Alzheimer (Masliah et al., 1992a).

En la actualidad, no está del todo claro si el crecimiento significativo de las sinapsis en la enfermedad de Alzheimer con respecto a los controles normales, representa un mecanismo de plasticidad ante la degeneración neuronal masiva en las diferentes áreas del hipocampo (Guevara et al., 2004). Por tal motivo, la formación de los depósitos de amiloide- β , asociados con grandes cantidades de neuritas distróficas, podría representar áreas focales de nucleación donde las terminales sinápticas se remodelaron en forma anormal. Pero se podría deber a la presencia del amiloide- β mismo, en el parénquima cerebral. La consecuencia sería la formación de circuitos sinápticos no-funcionales por un crecimiento sináptico anormal. Como reflejo del proceso de agregación neurítica a partir de las estructuras que anormalmente están creciendo, eventualmente se podría potenciar el proceso de degeneración (Figura 1).

En particular, hemos evidenciado la presencia de estructuras que denominamos "meganeuríticas", por su apariencia dendrítica (Figura 1C). Estas alteraciones sinápticas fueron encontradas únicamente en los cerebros de los casos de Alzheimer (Guevara et al., 1998; Espinosa et al., 2001; Guevara et al., 2004) y su diámetro promedio está fuera de los estándares reportados hasta el momento (DeKosky y Scheff, 1990; Masliah et al., 1991a; 1993b y c; Honer et al., 1992; Scheff et al., 1996). Otra estructura sináptica que detectamos presenta crecimiento anormal de las neuritas perineuronales en el área CA/4 del hipocampo (Guevara et al., 2004). No encontramos este tipo de lesión fuera de esta zona, que es de gran importancia anatómica, ya que recibe las proyecciones colinérgicas de los núcleos basales (Hyman et al., 1987; Witter et al., 1991; Scheff et al., 1996).

Plasticidad cerebral y los factores tróficos

El estudio de la expresión y localización de receptores a factores tróficos neuronales ha permitido evaluar mejor si el sistema nervioso central tiene algún cambio plástico. En relación con los fenómenos plásticos asociados con la enfermedad de Alzheimer, han sido estudiadas con más atención las proteínas GAP-43

(del Inglés, Growth associated-peptide) y el IGF-II (Espinosa *et al.*, 2001;2003; Guevara *et al.* 2004) (del Inglés, Insulin-like Growth Factor II).

Las fosfoproteínas GAP-43 y el IGF-II son factores tróficos que se liberan en forma casi exclusiva en el estado fetal y no en el estado adulto del sistema nervioso central humano (De la Monte *et al.*, 1995; Kar *et al.*, 1993). El GAP-43 está asociado con el crecimiento dendrítico neuronal y se expresa en grandes cantidades durante el desarrollo fetal, la regeneración axonal y el crecimiento y remodelaje neuríticos (Basi *et al.*, 1987; De la Monte *et al.*, 1995; Rosenthal *et al.*, 1987). El GAP-43 es quizás una de las proteínas más específicas que se pueden encontrar durante la plasticidad sináptica y en aquellos procesos involucrados con la memoria y el aprendizaje (Masliah *et al.*, 1992a, y b; Ng *et al.*, 1988; Kalil *et al.*, 1986; Neve *et al.*, 1988). La expresión del gen del GAP-43 en neuronas maduras es importante, probablemente porque participa en la remodelación estructural de las sinapsis que se requieren durante la adquisición de memoria. La presencia de una gran cantidad de neuritas aberrantes en la enfermedad de Alzheimer ha sido interpretada como una expresión anormal del gen del GAP-43 (Espinosa *et al.*, 2001; Guevara *et al.*, 2004). Más aún, se ha postulado que esta sobre-expresión podría bien contribuir con el desencadenamiento de la cascada de eventos de la neurodegeneración (Masliah *et al.*, 1992a, y b). A este respecto, se ha encontrado que la enfermedad de Alzheimer puede ser distinguida de los controles normales por la presencia de abundantes agregados de GAP-43 en las terminales neuríticas. En el mismo sentido, la densidad de la inmunoreactividad de este péptido, en la corteza cerebral, se correlaciona significativamente con la demencia (Guevara, 1998).

Por otro lado, la expresión anormal del receptor al factor de crecimiento similar a la insulina tipo II o IGF-II en la corteza cerebral de la enfermedad de Alzheimer, es otro marcador específico del crecimiento neurítico (Guevara, 1998). El IGF-II pertenece a la familia de los receptores a la insulina y existen dos tipos conocidos: I y II. El IGF-II tiene un sistema de retroalimentación positiva, es decir, a mayor concentración del péptido mayor número de receptores disponibles para interactuar con el péptido IGF-II (Roth *et al.*, 1988; Breese *et al.*, 1991). El IGF-II, además, se expresa en condiciones normales sólo durante el abundante crecimiento del sistema nervioso en el estado fetal (Kar *et al.*, 1993), a diferencia del IGF-I, que se expresa únicamente en el estado adulto. Datos farmacológicos preliminares obtenidos por el grupo del Dr. Quirion y colaboradores (Dore *et al.*, 1997a), demuestran que los factores tróficos IGF-I y II tienen una potente acción bloqueadora de la neurotoxicidad provocada por la intoxicación con los péptidos de la amiloide- β en neuronas en cultivo. Por todas estas evidencias se sugiere que estos péptidos puedan tener aplicaciones terapéuticas en las enfermedades neurodegenerativas (Kar *et al.*, 1996; Dore *et al.*, 1997a y b).

Todos estos datos apoyan la idea de que la expresión tanto del GAP-43 como del IGF-II son eventos anormales que ocurren en la corteza cerebral de los casos de Alzheimer (Guevara *et al.*, 2004). Por lo tanto, su presencia en las neuritas distróficas en los cerebros afectados de Alzheimer, sumado a la mayor densidad de las proteínas sinápticas, apoyan cada vez más la presencia de un proceso de plasticidad reactiva en la enfermedad de Alzheimer (Espinosa *et al.*, 2001).

La plasticidad reactiva, que involucra el crecimiento axonal y dendrítico, así como la sinaptogénesis, ha sido asociada con la patogénesis de diversos desórdenes neurológicos. Usando lectinas como determinantes de la plasticidad reactiva para demostrar residuos glicosilados anormales, hemos probado diferencias importantes en el proceso degenerativo y regenerativo en la enfermedad de Alzheimer (Espinosa *et al.*, 2001; 2003; Guevara *et al.*, 2004). Afirmamos que en la enfermedad de Alzheimer se producen proteínas O-glicosiladas (NeuAcá2,6Galá1,3GalNacá1,0 Ser/Thr o antígeno Sialil-T) determinadas con el uso de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) y la de *Macrobrachium rosenbergii* (MRL). Estos residuos sacarídicos los hemos demostrado en estructuras neuríticas en crecimiento en la enfermedad de Alzheimer.

En estudios inmunohistoquímicos, nuestro grupo ha demostrado que las lectinas ALL y MRL reconocen de manera específica los procesos de crecimiento en las terminales sinápticas y en estructuras meganeuríticas en la enfermedad de Alzheimer. Para confirmar estas observaciones, hemos utilizado el reconocimiento de la sinaptofisina y del péptido asociado al crecimiento neuronal (GAP43), que

reconocen las meganeuritas. De esta forma, los resultados sugieren que los patrones específicos de O-glicosilación de las proteínas están relacionados íntimamente con la plasticidad neuronal en la EA. En suma, nuestros resultados sugieren fuertemente que las alteraciones en la plasticidad cerebral se podrían deber a la participación diferencial de O-glicosil y sialil-transferasas a través del procesamiento de las proteínas en el aparato de Golgi y por ende participar en la plasticidad reactiva.

En conclusión, podemos asegurar que existe un fenómeno de plasticidad en la enfermedad de Alzheimer. En relación con la recuperación funcional, este proceso de regeneración no es claro si pudiese compensar la muerte neuronal (formación de las marañas neurofibrilares) o si definitivamente es un evento patológico. La consecuencia sería, entonces, la desconexión córtico-cortical que conduce a los pacientes a profundo deterioro cognoscitivo. Es importante, entonces, enfocar los esfuerzos en el conocimiento de los mecanismos degenerativos, así como al proceso de regeneración que abre la expectativa de poder diseñar estrategias para inducir la recuperación funcional de las redes neuronales en el cerebro.

i
r
i

o
o
r
e
i
la

L
as
el
ue

Bibliografia:

1. Alford MF, Masliah E, Hansen LA, Terry RD. A simple dot-immunobinding assay for quantification of synaptophysin-like immunoreactivity in human brain. *J Histochem Cytochem* 1994;42:283-287.
2. Allen SJ, Benton JS, Goodhardt MJ, et al. Biochemical evidence of selective nerve cell changes in the normal ageing human and rat brain. *J Neurochem* 1983;41:256-265.
3. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte T, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 1992;42:631-639.
4. Bannon MJ, Poosch MS, Xia Y, Goedel DJ, Cassin B, Kapatos G. Dopamine transporter mRNA content in human substantia nigra decreases precipitously with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7095-7099.
5. Basi GS, Jacobson RD, Virag I, Schilling J, Skene JHP. Primary structure and transcriptional regulation of GAP-43, a protein associated with nerve growth. *Cell* 1987;49:785-791.
6. Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Casoli T, Meier-Ruge W, Ulrich J. Morphological adaptive response of the synaptic junctional zones in the human dentate gyrus during aging and Alzheimer's disease. *Brain Res* 1990;517:69-75.
7. Blessed G, Tomlison BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of neuritic change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* 1968;114:797-811.
8. Breese C, D'Costa A, Booze R, Sonntag W. Distribution of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and 2 (IGF-2) receptors in the hippocampal formation of rats and mice. *Adv Exp Med Biol* 1991;293:449-58.
9. Buell SJ, Coleman PD. Dendritic growth in the aged brain and failure of growth in senile dementia. *Science* 1979;206:854-856.
10. Crystal H, Dickson D, Fuld P, et al. Clinico-pathologic studies in dementia: non-demented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurology* 1988;38:1682-1687.
11. DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 1990;27:457-464.
12. DeKosky ST, Harbaugh RE, Schmit FA, Bakay RAF, Choi HC, Knopman DS, Reeder TM, Schetter AG, Senter HJ, Markesbery WR, IBS Group. Cortical biopsy in Alzheimer's disease: Diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological and cognitive correlations. *Ann Neurol* 1992;32:625-632.
13. DeKosky ST, Scheff SW, Styren DS. Structural correlates of cognition in dementia: Quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration* 1996;5:417-421.
14. Delaère P, Duyckaerts C, Masters C, Beyreuther K, Piette F, Haw J-J. Large amounts of neocortical β A4 deposits without neuritic plaques nor tangles in a psychometrically assessed, non-demented persons. *Neurosci Lett* 1990;116:87-93.
15. Delaère P, He Y, Fayet G, Duyckaerts C, Hauw J-J. β A4 deposits are constant in the brain of the oldest old: an immunocytochemical study of 20 French centenarians. *Neurobiol Aging* 1993;14:191-194.
16. De la Monte SM, Ng SC, Hsu DW. Aberrant GAP-43 gene expression in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1995;147:934-946.
17. Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, et al. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* 1992;13:179-189.

18. Dore S, Kar S, Quirion R. Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against beta-amyloid and human amylin-induced toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997(a);9:4772-4777.
19. Dore S, Kar S, Quirion R. Rediscovering an old friend, IGF-I: potential use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 1997(b);8:326-331.
20. Espinosa B, Zenteno R, Mena R, Robitaille Y, Zenteno E, Guevara J. O-Glycosylation in Sprouting Neurons in Alzheimer's Disease, Indicating Reactive Plasticity. *J. Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:152-155.
21. Espinosa B, Guevara J, Hernández P, Slomianny MC, Guzmán A, Martínez-Cairo S, Zenteno E. Characterization of an O-glycosylated plaque-associated protein from Alzheimer's disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:34-41.
22. Geddes JW, Monaghan DT, Cotman CW, Lott IT, Kim RC, Chui HC. Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science* 1985;230:1179-1181.
23. Geddes JW, Anderson KJ, Cotman CW. Senile plaques as aberrant sprout stimulating structures. *Exp Neurol* 1986;94:767-776.
24. Gertz H, Cervos-Navarro J, Ewald V. The septo-hippocampal pathways in patients suffering from senile dementia of Alzheimer's type. Evidence for neuronal plasticity?. *Neurosci Lett* 1987;76:228-232.
25. Guevara J, Dilhuydy H, Fortin K, Mena R, Quirion R, Gauvreau D, Robitaille Y. Aberrant hippocampal perineuronal synaptic sprouting is strongly associated with overexpression of the APOE 4 allele. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:616.
26. Guevara J. Enfermedad de Alzheimer: Estudio por microscopía confocal de la densidad de las lesiones histopatológicas, su asociación con factores tróficos y con marcadores de glicosilación, y con el grado de demencia. Tesis de doctorado. Programa de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN. Septiembre, 1998.
27. Jorge Guevara, Hugo Dilhuydy, Edgar Zenteno Galindo, Blanca Espinosa, André Delacourte, Remi Quirion, Raúl Mena, Yves Joannette, Yves Robitaille. Coexistence of reactive plasticity and neurodegeneration in Alzheimer diseased brains. *Histology and Histopathol* (in press, 2004).
28. Hof PR, Giannakopoulos P, Bouras C. The neuropathological changes associated with normal brain aging. *Histol Histopathol* 1996;11:1075-1088.
29. Honer WG, Dickson DW, Gleeson J, Davies P. Regional synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1992;13:375-382.
30. Honer WG, Beach GT, Hu L, Berry K, Dorovini-Zis K, Wayne MGR, Woodhurst B. Hippocampal synaptic pathology in patients with temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol* 1994;87:202-210.
31. Hyman BT, Eslinger, Damasio AR. Effect of naltrexone on senile dementia of the Alzheimer type. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985;48:1169-1171.
32. Hyman BT, Kromer LJ, Van Hoesen GW. Reinnervation of the hippocampal perforant pathway zone in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1987;21:259-267.
33. Inzitari D, Diaz F, Fox A, et al. Vascular risk factors and leuko-araiosis. *Archiv Neurol* 1987;44:42-47.
34. Kalil K, Skene JHP. Elevated synthesis of an axonally transported protein correlates with axon outgrowth in normal and injured pyramidal tracts. *J Neurosci* 1986;6:2563-2570.
35. Kar S, Baccichet A, Quirion R, Poirier J. Entorhinal cortex lesion induces differential responses in (125)Insulin-like growth factor I, (125)Insulin-like growth factor II and (125)Insulin receptor binding sites in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 1993;1:69-80.

36. Kar S, Seto D, Gaudreau P, Qurion R. Beta-amyloid peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J Neurosci* 1996;3:1034-1040.
37. Lassmann H, Weiler R, Fischer P, Bancher C, Jellinger K, Floor E, Danielczyk W, Seitelberger F, Winkler H. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: immunological data for markers of synaptic and large dense-core vesicles. *Neuroscience* 1992;46:1-8.
38. Ma XY, Su YB, Zhang FR, Li JF. Effects of vitamin E on the blastogenic response of splenocytes and lipofuscin contents in the hearts and brains of aged mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1996;15:51-53.
39. Masliah E, Terry RD, Mallory M, Alford M, Hansen L. Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer disease. *Am J Pathol* 1990;137:1293-1297.
40. Masliah E, Hansen L, Albright T, Mallory M, Terry RD. Immunoelectron microscopic study of synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1991(a);81:428-433.
41. Masliah E, Mallory M, Hansen L, Alford M, Albright T, De Teresa R, Terry RD, Baudier J, Saitoh T. Patterns of aberrant sprouting in Alzheimer disease. *Neuron* 1991(b);6:729-739.
42. Masliah E, Terry R, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA. Cortical and subcortical patterns of synaptophysin-like immunoreactivity in Alzheimer disease. *Am J Pathol* 1991(c);138:235-246.
43. Masliah E, Mallory M, Hansen L, Alford M, De Teresa R, Terry RD, Baudier J, Saitoh T. Localization of amyloid precursor protein in GAP-43 immunoreactive aberrant sprouting neurites in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1992;574:312-316.
44. Masliah E, Mallory M, Ge N, Saitoh T. Amyloid precursor protein is localized in growing neurites of neonatal rat brain. *Brain Res* 1992(a);593:323-328.
45. Moore WA, Davey VA, Weindruch R, Waldford R, Ivy GO. The effect of caloric restriction on lipofuscin accumulation in mouse brain with age. *Gerontology* 1995;41(Suppl 2):173-185.
46. Mrak R, Shen JG, Griffin WST. Correlation of astocytic S100 β expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:273-279.
47. Mrak R, Griffin SW, Graham ID. Aging-associated changes in human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:1269-1275.
48. Nakamura S, Akiguchi I, Kameyama M, Mizuno N. Age-related changes of pyramidal cell basal dendrites in layers III and V of human motor cortex: A quantitative Golgi study. *Acta Neuropathol* 1985;65:281-284.
49. Neve RL, Finch EA, Bird DE, Benowitz LI. Growth-associated protein GAP-43 is expressed selectively in associative regions of the adult human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:3638-3642.
50. Ng SC, De la Monte SM, Conboy GL, Karns LR, Fishman MC. Cloning of human GAP-43: growth association and ischemic resurgence. *Neuron* 1988;1:133-139.
51. Pantoni L, Garcia JH. The significance of cerebral white matter abnormalities 100 years after Binswanger's report. A review. *Stroke* 1995;26:1293-1301.
52. Rosenthal A, Chan SY, Henzel W, Hashell C, Kuang WJ, Chen E, Wilcox JN et al. Primary structure and mRNA localization of protein F1, a growth-related protein kinase C substrate associated with synaptic plasticity. *EMBO* 1987;6:3641-3646.
53. Roth RA. Structure of the receptor for insulin-like growth factor II: the puzzle amplified. *Science* 1988;239:1269-1271.
54. Scheff SW, DeKosky ST, Price DA. Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1990;11:29-37.

55. Scheff SW, Price D. Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1993;33:190-199.
56. Scheff SW, Sparks DL, Price DA. Quantitative assessment of synaptic density in the outer molecular layer of the hippocampal dentate gyrus in Alzheimer's disease. *Dementia* 1996;7:226-232.
57. Terry RD, De Teresa R, Hansen LA. Neocortical cell counts in normal human adult aging. *Ann Neurol* 1987;21:530-539.
58. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, De Teresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991;30:572-580.
59. Troncoso JC, Martin LJ, Dal Forno G, Kawas CH. Neuropathology in controls and demented subjects from Baltimore longitudinal study of aging. *Neurobiol Aging* 1996;17:365-371.
60. Witter MP, Amaral DG. Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus and subicular complex. *J Comp Neurol* 1991;307:437-459.
61. Zhan S, Beyreuther K, Schmit H. Quantitative assessment of the synaptophysin immunoreactivity of the cortical neuropil in various neurodegenerative disorders with dementia. *Dementia* 1993;4:66-74.