



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina.

PAPEL DE LA N-ACETILGLUCOSAMINILACIÓN Y
FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU EN UN
MODELO DE TOXICIDAD POR AMILOIDE β 25-35.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

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

P R E S E N T A

LILIANA LOZANO RODRÍGUEZ.

**DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE
GUEVARA FONSECA.**

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 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.

I. AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al posgrado en Ciencias Biológicas por todas las facilidades y apoyos proporcionadas durante los años de formación.

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico ofrecido durante el desarrollo de la investigación CVU: 228874.

A los apoyos recibidos por UNAM PAPIIT IN214609 and IN212108"

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velazco Suarez .

Al comité académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y al Programa de Fomento a la Titulación de la Titulación de la Coordinación de Estudios de Posgrado-UNAM.

A mi Tutor. Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca, por el apoyo recibido durante los años de formación.

Agradezco al comité evaluador por el apoyo ofrecido a la elaboración de esta tesis, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Camilo Ríos Castañeda y Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo.

Al Dr. Noé Alvarado, por sus aportaciones en el desarrollo de este propósito y por toda su disponibilidad, cooperación y asesoría.

A la Dra. Viviana Somoza, por su incondicional asesoría, orientación y apoyo para poder aclarar mis dudas, compartir su amistad y tiempo.

Al Dr. Juan Valadéz, por todo su apoyo en la parte neuroanatómica de este trabajo.

II. AGRADECIMIENTOS

A Aarón Emilio Cuevas Lozano, La luz alegre, que llena mi mundo de amor y matices. Por toda la paciencia, cooperación y ternura que me has brindado estos años.

A Eduardo Cuevas Aguirre, por tu amor, paciencia, apoyo, confianza y por enseñarme que lo importante no es lo que tanto se hace si no cuanto se disfruta lo que se está haciendo.

A mi madre la Sra. Elvira Rodríguez Skewes, por su amistad incondicional y apoyo, pero sobre todo por confiar siempre en mí.

A mi padre el Sr. Conrado Lozano Pérez, quien me enseñó con ejemplos, a nunca darme por vencida.

A la Sra. M. J. Verence Aguirre Rosas y el Sr. Eduardo Cuevas Covarrubias, ya que sin el apoyo incondicional que ustedes me brindaron, no habría podido seguir estudiando.

A mis hermanos, David, Javier y Gerardo, por nunca dejar de quererme.

A mi abuela la Sra. Elvira Skewes Río Frío, por creer en mí.

A todos los miembros de la familia Rodríguez, por hacer de mí una persona valiosa y amada.

A Karla y Samanta, por su compañerismo y apoyo.

A Nancy, Elvis, Mtra. Minerva Calvillo, Dra. Juana Villeda, por sus enseñanzas y apoyo.

A Chilly, Willy y todos los héroes anónimos, ya que sin su participación este trabajo no podría haber sido realizado.

A mi padre con todo mi amor, quien siempre quiso que alguno de sus hijos lo superara académicamente.

INDICE	Pag.
1.- Enfermedad de Alzheimer	1
2.- Introducción.	3
3.- Hipocampo.	5
3.1 Histología del hipocampo.	6
3.2 Lesiones comunes de la enfermedad de Alzheimer.	9
3.3 Otras alteraciones asociadas con la Enfermedad de Alzheimer.	11
4.- Placas Neuríticas.	12
4.1 Impacto metabólico del amiloide β .	16
4.2 Glicolisis y metabolismo de la glucosa.	17
5.-Marañas neurofibrilares	19
5.1 La proteína tau	19
5.2 Modificaciones postraduccionales de la proteína tau	21
6. Glicosilación	21
6.1 O-GlcNac	23
6.2 O-GlcNac-Transferasa	24
7. Fosforilación de tau.	25
7.1 Causas potenciales de hiperfosforilación de tau en enfermedad de Alzheimer.	28
7.2 Cinasas.	29
7.3. GSK 3β .	30
7.4. Disminución de insulina como facilitador de hiperfosforilación.	31
8.-Planteamiento del problema	32
9.- Hipótesis	32
10.- Objetivos	32
11.- Material y métodos	33
11.1.- Animales de laboratorio	33
11.2.- Protocolo de administración de medicamentos.	33
11.3.-Técnicas histológicas.	34
12.- Resultados	36
12.1. Respuesta metabólica	36
12.2. Modificaciones morfológicas	38
12.3. Glicosilación y fosforilación por P-tau Tre 231.	43
12.4. Glicosilación y fosforilación por P-tau Ser 396.	45
12.5. Glicosilación y fosforilación por P-tau Ser 404.	49
12.6. Cambios en la expresión de la OGT y de la GSK- 3β .	50
13.- Discusión de resultados.	51
14.- Conclusiones	63
15.- Perspectivas	65
16.- Anexos.	65
17.- Bibliografía	70

INDICE DE FIGURAS		Pag.
	Modificaciones de la glicosilación en cerebro de paciente control y en cerebros de	
1	pacientes con enfermedad de Alzheimer.	1
2	Estructuras del hipocampo.	6
3	Dobles pirámides de Ramón y Cajal.	7
4	Estratos del hipocampo	8
5	Distribución de las láminas del hipocampo	10
6	Vías de entrada y salida de la información en el hipocampo	10
7	Placa neurítica	12
8	Maraña neurofibrilar	19
9	Gen humano de tau 17q21	20
10	Glicosilación y alteraciones.	22
11	Glicosilación y alteraciones en el ensamble de microtúbulos.	27
12	Morfología de hipocampo CA1	38
13	Morfología de hipocampo CA3	39
14	Morfología de giro dentado	40
15	Cambios en la O-GlcNac y fosforilación por P-tau Tre 231	43
16	Cambios en la O-GlcNac y fosforilación por P-tau Ser 396.	45
17	Cambios en la O-GlcNac y fosforilación por P-tau Ser 396, en fibras musgosas del hipocampo.	46
18	Cambios en la O-GlcNac y fosforilación por P-tau Ser 404.	48
19	Resultados de OGT y GSK 3 β	50
20	Conclusiones	64
INDICE DE GRAFICOS		Pag.
1	Alteraciones metabólicas de peso en rata	36
2	Alteraciones metabólicas de glucosa en rata.	37
INDICE DE TABLAS		Pag.
1	Modificaciones morfológicas	41
2	Glicosilación y fosforilación por P-tau Tre 231.	44
3	Glicosilación y fosforilación por P-tau Ser 396.	47
4	Glicosilación y fosforilación por P-tau Ser 404.	48
5	Cambios en la expresión de la OGT y de la GSK-3 β .	51

RESUMEN

En la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por marañas neurofibrilares provocadas por modificaciones postraduccionales de proteína tau y placas neuríticas del péptido amiloide β ($A\beta$), donde a los cambios metabólicos se les ha considerado, potenciales factores de riesgo para la enfermedad. En este estudio se pretende identificar cambios entre la O-GlcNAcilación y la fosforilación inducido por efecto de la administración del péptido $A\beta$ 25-35. Para lo que se generó la presencia concomitante de alteraciones metabólicas, mediante cambios en la glicemia por estreptozotocina (STZ) sistémica y la administración de $A\beta$ 25-35 intrahipocampal, comparandolos mediante el uso de la lectinas WGA, específica para GlcNAc y anticuerpos contra aminoácidos fosforilados de la proteína Tau: Tre 231, Ser 396 y Ser 404, así como de la O-N-acetilglucosaminiltransferasa (OGT) y la glicógeno cinasa sintasa- 3β (GSK- 3β). Los resultados obtenidos fueron cambios asociados con la distribución, cantidad y características de los cuerpos celulares al compararlos con los controles. Nuestros resultados indican menor marcaje de la lectinas WGA en los animales tratados en la región del giro dentado en las células musgosas, disminución de la expresión de O-GlcNAc en el grupo $A\beta$ +STZ, así como hiperfosforilación de los residuos P-Ser 396 y P-Ser 231, mientras que la P-Ser404 tuvo discreta expresión, así mismo hubo un aumento en la expresión de GSK- 3β y una disminución de la expresión de OGT. En el grupo de STZ indican menor marcaje de la lectinas WGA, en la región del giro dentado en las células granulosas, en los animales tratados disminución de la expresión de O-GlcNAc en el grupo $A\beta$ +STZ, así como hiperfosforilación de los residuos P-Ser 396 y P-Ser 231, mientras que la P-Ser404 no mostró expresión, así mismo hubo falta en la expresión de GSK- 3β y un aumento de la expresión de OGT. En el grupo de $A\beta$ indican mayor marcaje de la lectinas WGA, en los animales tratados en la región del giro dentado en las células granulosas, aumenta la expresión de O-GlcNAc en el grupo $A\beta$, así como menor hiperfosforilación de los residuos P-Ser 396 y P-Ser 231, mientras que la P-Ser404 no mostró expresión, así mismo hubo falta en la expresión de GSK- 3β y un aumento de la expresión de OGT. Esto sugiere que alteraciones metabólicas poseen menor disponibilidad de O-GlcNAc, favoreciendo la hiperfosforilación, y al aumentar la expresión de GSK- 3β en el grupo de $A\beta$ +STZ, indica que esta cinasa se activa a pesar de que es inhibida por la STZ. La asociación entre las alteraciones producidas por $A\beta$ y STZ genera más cambios en conjunto que al estudiarlas por sí solas, demostrando que ambos eventos comparten vías asociadas con la enfermedad de Alzheimer.

ABSTRACT

Neurofibrillary tangles and Neuritic plaques pathologically characterize Alzheimer's disease. Those lesions are caused by postraductional modifications of tau protein and amyloid- β ($A\beta$), respectively. In the present study we identify changes between the O-GlcNAcylation and the phosphorylation induced by the effect of the administration of the $A\beta$ 25-35 peptide. Concomitant presence of metabolic alterations was generated through changes in the glicemia by systemic administration of streptozotocin (STZ) and the intrahippocampal administration of the $A\beta$ 25-35. We compared lectins WGA (specific for GlcNAc) and antibodies against phosphorylated tau protein (at positions Tre 231, Ser 396 and Ser 404), as well as O-linked GlcNAc transferase (OGT) and Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β). While changes associated with the distribution, quantity and characteristics of the cellular bodies no changes we found on the controls. Our results indicate minor labeling of lectins WGA in the animals treated at the region of the dentate gyrus including the mossy fiber. We also found a decrease of the O-GlcNAc expression in the $A\beta$ +STZ group, as well as hiperphosphorylation in the P-Ser 396 and P-Ser 231 residues. At the same time the P-Ser404 had a discrete expression, the GSK-3 β increased expression and the OGT expression decreased. In the group of STZ, the lectin WGA demonstrated a low labeling at the region of dentate gyrus of the granule cell in the treated animals. While a decrease of the O-GlcNAc labeling in the group $A\beta$ +STZ was found, the hiperphosphorylation of the residues P-Ser 396 and P-Ser 231, and the P-Ser404 did not show expression. We did not find GSK-3 β expression but an increase of OGT. We identified the higher labeling for WGA lectin in the $A\beta$ treated animals. Dentate gyrus in the granule cell expressed an increase of O-GlcNAc. There is also less phosphorylation of the P-Ser 396 and P-Ser 231 residues; meanwhile the P-Ser404 did not show expression. There was also a lack of expression in the GSK-3 β , and an increase of OGT expression.

Our results suggest that the metabolic alterations reduce the availability of O-GlcNAc, which induce the hiperphosphorylation as well as the expression GSK-3 β . The association produced by $A\beta$ and STZ, generates more metabolic changes than separately. This demonstrated that both events share associated pathway in Alzheimer's disease.

1.- LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

La enfermedad de Alzheimer (EA), es la primera causa de demencia en adultos mayores de 65 años (Alberca *et al.*, 2002). Este trastorno es demencial, con alteración de las funciones corticales, incluidas, la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio. Se adquiere de forma, crónica, degenerativa, progresiva, e insidioso, que evoluciona lentamente, por un periodo de años, (Brookmeyer *et al.*, 1998; Alberca *et al.*, 2002; Graever *et al.*, 1997). La EA, tiene un origen genético en el 5 a 10% de los casos y es esporádico en el 90 a 95% de los casos, siendo más común en personas mayores de 65 años (Alberca *et al.*, 2002).

En estudios postmortem de los cerebros de pacientes con EA, se ve una disminución del peso de entre 300 a 400g, en el volumen y espesor de la corteza cerebral, dando mayor profundidad en los surcos, con circunvoluciones más pronunciadas y ventrículos dilatados (Berg and McKeel, 1998). En la EA, existe una afectación a poblaciones neuronales, dañando gravemente la corteza cerebral, la corteza entorrinal, y parahipocampal (Berrios, 1989) (fig 1).



FIGURA 1. Cambios anatomopatológicos de la Enfermedad de Alzheimer.

En hipocampo, se presenta una pérdida progresiva de neuronas, principalmente en la región de CA1 que afectan, las neuronas proyectivas y a interneuronas, generando una reducción en las aferencias entorrinales. En la corteza cerebral existe una afectación, de todos los lóbulos cerebrales, pero principalmente en el temporal y las neuronas piramidales del hipocampo (Berrios, 1990).

Se calcula que para el 2025 cerca de 12 billones de personas que viven en países en vías de desarrollo tendrán más de 60 años. (Libre *et al.*, 2008; Raj *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2004). En el 2005, la Sociedad Alzheimer's Disease International (ADI) realizó un consenso de prevalencia en demencia en 14 países; existen aproximadamente 24.2 millones de personas con EA, con una presencia de 4 a 6 millones de nuevos casos cada año. Se ha demostrado que la prevalencia de demencia según el DSM-IV, en regiones urbanas de Latino América es similar a lo previamente encontrado en países de Europa y otros países desarrollados que permanece consistente con los reportes de regiones menos desarrolladas (Libre *et al.*, 2008; Raj *et al.*, 2008). La prevalencia de demencia en regiones rurales de Latinoamérica e India es cuatro veces menor a lo que se ve en Europa (Libre *et al.*, 2008). Se sabe que tanto la EA como la Diabetes mellitus (DM) son las enfermedades crónico-degenerativas más prevalentes en sociedades occidentales (Arvanitakis *et al.*, 2004). Se ha encontrado que los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) tienen de un 30-65% de riesgo de desarrollar EA (Ho *et al.*, 2004)). Estudios experimentales se han enfocado en la resistencia a la insulina del cerebro como un posible mecanismo de asociación entre DM 2 y EA (Arvanitakis *et al.*, 2004).

2.- INTRODUCCION.

Las EA se caracteriza por cambios macroscópicos y microscópicos en la corteza cerebral y el hipocampo, caracterizados histopatológicamente por la formación de placas neuríticas, (PNs) y marañas neurofibrilares (MNFs), se asocian con muerte neuronal (Hyslop, 2001).

Las placas neuríticas se forman a partir de la Proteína Precursora de amiloide PPA que produce agregados extracelulares insolubles de amiloide β , que se origina mediante el corte, de la proteína precursora de amiloide (APP). La fracción peptídica 25-35 del A β se le ha implicado como uno de los principales fragmentos neurotóxicos, asociados con agregación del péptido, pérdida neuronal, disminución de acetil colina y alteraciones de memoria (Butterfield and Lauderback, 2002; Mattson, 1999).

Las marañas neurofibrilares se conforman principalmente de agregados intracelulares de proteína asociada a tubulina (tau) en estado hiperfosforilado, que en condiciones no patológicas estabiliza los filamentos helicoidales pareados de los microtúbulos (Checler *et al.*, 1995; Joseph *et al.*, 2001). En la EA la neurodegeneración neurofibrilar, contribuye a la patogénesis molecular de esta enfermedad, (Riley *et al.*, 2002). El número de marañas neurofibrilares en los cerebros de pacientes con EA correlaciona tanto con los síntomas de demencia como con el número de placas neuríticas (Riley *et al.*, 2002; Brack and Brack, 1994). La distribución jerárquica de las lesiones de marañas neurofibrilares son la amígdala, la formación hipocampal, el giro parahipocampal, y en la corteza de asociación temporal (Riley *et al.*, 2002).

La presencia del A β favorece la redistribución del metabolismo de glucosa en células nerviosas (Soucek *et al.*, 2003). El A β y el envejecimiento, incrementan los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la reducción en la eficiencia de la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial aumentando la producción de superóxidos y peróxido de hidrógeno (Schubert, 2005).

Este aumento en los ROS activa mecanismos antioxidantes, como el Factor Inductor de Hipoxia-I (HIF-1), responsable de la inducción de genes, como lo son: los genes de la Adenilato cinasa-3, los genes para transportadores de glucosa 1 y 3 (GLUT 1 y 3) (Soucek, 2003), donde su expresión actúa como neuroprotector favoreciendo un aumento en la producción de Nicotidamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y Nicotidamida adenina dinucleótido (NADH) aumentando así los niveles de Glutación reducido (GSH) que es el principal antioxidante celular (Butterfield and Lauderback, 2002 ; Mattson, 1999; Schubert, 2005).

En el cerebro de adultos mayores control, se disminuye la actividad de la vía de la hexocinasa a partir de los 65 años (Schubert, 2005) y las alteraciones en el metabolismo de la glucosa coinciden con la disminución de receptores de glucosa como son GLUT 1 y GLUT 3 (abundantes en las neuronas) lo que limita la glucosa intracerebral y reduce la actividad de vías metabólicas como la vía biosintética de las hexosaminas, donde el metabolito final de ésta es el Uridin di fosfo N- Acetil Glucosamina (UDP-GlcNAc), que es el donador común de la O-glicosilación intranuclear y citoplasmática de O-GlcNAc, que mediante una O-GlcNAc transferasa (OGT), une el azúcar a los residuos de serina y treonina de la proteína tau, de manera análoga a la fosforilación de estos residuos, determinados por secuencias primer de fosforilación (Butterfield and Lauderback, 2002 ; Mattson, 1999).

Se sabe que el principal componente de las marañas neurofibrilares es la proteína tau anormalmente hiperfosforilada, en la enfermedad de Alzheimer (EA) la neurodegeneración neurofibrilar, contribuye a la patogénesis molecular de esta enfermedad.

El número de marañas neurofibrilares en los cerebros de pacientes con EA correlaciona tanto con los síntomas de demencia como con el número de placas neuríticas (Souček, 2005; Ksiazek-Reding *et al.*, 1990; Köpke *et al.*, 1993).

La proteína tau en condiciones normales contiene de 2 a 3 moles de fosfato por cada mol de proteína tau mientras que en los cerebros de pacientes con EA, se encuentra de tres a cuatro veces más fosforilada (Liu *et al.*, 2006). En los de pacientes controles adultos, se encuentran seis isoformas diferentes de la proteína tau mediante empalmes alternativos del mismo gen, y las seis isoformas se encuentran hiperfosforiladas y agregadas dentro de las marañas neurofibrilares, (Gong *et al.*, 2006).

Se conocen más de 30 sitios de fosforilación identificados de la proteína tau (de los cuales la Ser396, Ser404 y Thr-231 se han visto implicados en el proceso de hiperfosforilación). Se ha observado que la hiperfosforilación de la proteína tau causa la disociación de tau de los microtúbulos, con el consecuente aumento de la proteína tau hiperfosforilada intracelular es suficiente para iniciar la formación de marañas neurofibrilares (Gong *et al.*, 2006).

Algunas de las cinasas que pueden estar implicadas en la hiperfosforilación de tau *in vivo*, son la glicógeno sintasa cinasa- 3β (GSK-3 β) y la ciclina dependiente de cinasa 5 (cdk5), la cAMP-dependiente de proteína cinasa (PKA), calcio/calmodulina-activada de proteína cinasa II (CaMKII) (Johnson y Stoothoff, 2004). Se ha descubierto que la proteína tau es susceptible de ser glicosilada por O-GlcNAc en residuos de serina y treonina, quien puede actuar como un regulador entre la glicosilación y fosforilación de dicha proteína, mediante un mecanismo en el cual las alteraciones por metabolismo de la glucosa toman un rol fundamental en la hiperfosforilación de tau y la neurodegeneración fibrilar, (Lefebvre *et al.*, 2003).

La glicosilación de proteínas se refiere a la transferencia enzimática de N-acetilglucosamina (GlcNAc) por la Uridindifosfo- N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) donador de grupos hidroxilo en los residuos de serina y treonina a proteínas vía cadenas O-glicosídicas. Este proceso es catalizado O-GlcNAc transferasa (OGT), (Hart *et al.*, 1997).

La UDP-GlcNAc se sintetiza de la vía biosintética de la hexosamina por lo que el metabolismo de la glucosa interviene en la concentración de este metabolito. Por otro lado, los grupos GlcNAc pueden

ser removidos mediante la catálisis de la O-N-acetil-glucosaminidasa (O-GlcNAcase) y se ha propuesto un balance entre la glicosilación y la fosforilación de las proteínas, en los mismos residuos de serina y treonina, siendo importante su modificación en las cascadas de transducción de señales (Hart *et al.*, 2001).

Estas modificaciones postraduccionales cobran importancia en enfermedades como el Alzheimer donde se ha encontrado que el equilibrio entre estas dos modificaciones es fundamental para la estabilización de los microtúbulos. Si los sitios de glicosilación de la proteína tau no son ocupados por O-GlcNAc estos se encuentran disponibles para las proteínas cinasas que se encargan de agregar grupos fosfato (Gong *et al.*, 2006), como la proteína cinasa C (PKC) o la Glucógeno sintetasa Cinasa 3 (GSK3) implicadas en la hiperfosforilación de la proteína tau que favorece la agregación de la proteína en marañas neurofibrilares desensamblando los microtúbulos. Dicho desensamble compromete al transporte axonal ocasionando neurodegeneración favoreciendo la demencia (Wanga *et al.*, 2008).

La O-GlcNAc y la fosforilación compiten por los mismos residuos de serina y treonina, esta situación presenta a la glicosilación como un mecanismo regulador de la hiperfosforilación de la proteína tau (Wanga *et al.*, 2008). Podría existir una relación directa entre la neurotoxicidad del A β y la disminución de la O-GlcNAc como facilitador de la hiperfosforilación de tau.

3.- HIPOCAMPO.

Embriológicamente el hipocampo, se forma dentro de la novena semana al desarrollarse la corteza cerebral, algunos grupos de fibras, las comisuras, conectan entre sí aéreas correspondientes a los hemisferios cerebrales, la comisuras primarias, formando tanto la comisura anterior, como la comisura del hipocampo o fornix, entre los hipocampos derecho e izquierdo, conectan partes cerebrales antiguas desde el punto de vista filogenético. La comisura anterior conecta el bulbo olfatorio y áreas relacionadas del hemisferio con las del lado opuesto, (Valadez, 2006; Moore, 2004).

3.1.-HISTOLOGÍA DEL HIPOCAMPO.

Los elementos celulares partiendo de la superficie ventricular del mismo son:

Las fibras mielinicas forman el alveus y la fimbria del hipocampo se forma de fibras mielinicas condensadas, (Valadez, 2006).

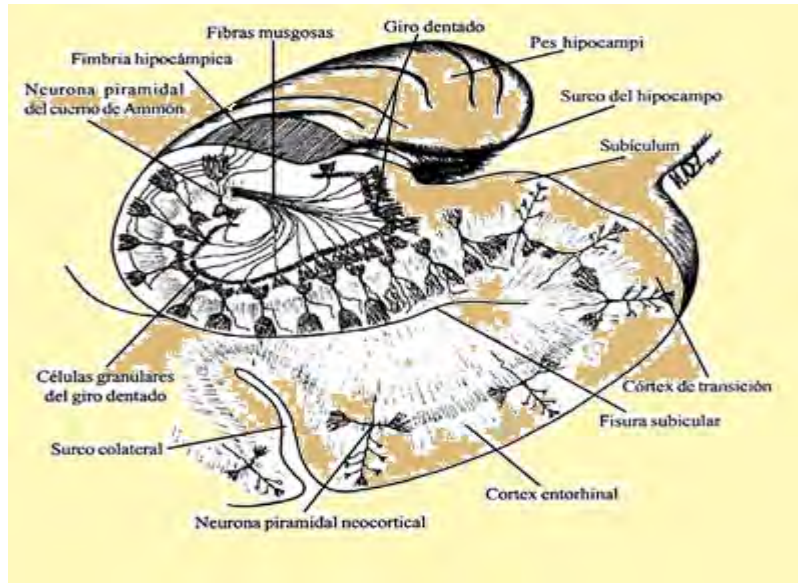


FIGURA 2. Estructuras del hipocampo.

Alveus (Capa I): Se compone de materia blanca, de los axones de células piramidales (Hanes, 2004).

El estrato oriens (Capa II): Esta capa tiene dos subregiones la inferior o subzona límite del alveus y la subzona superior que tiende hacia la línea de las células piramidales. Las células de la segunda subzona, son densamente empaquetadas y regresan hacia la capa molecular. Los Axones llegan a pertenecer a la capa piramidal dentro del estrato radiato, y el arco regresa a las células piramidales o también regresan por el estrato oriens (Issacson, 1974; Hanes, 2004).

El estrato piramidal (Capa III): Son células piramidales con arborizaciones dendríticas de la superficie y hasta el alveus, por lo que también han sido denominadas dobles pirámides, (Issacson, 1974; Hanes, 2004), (fig 3).

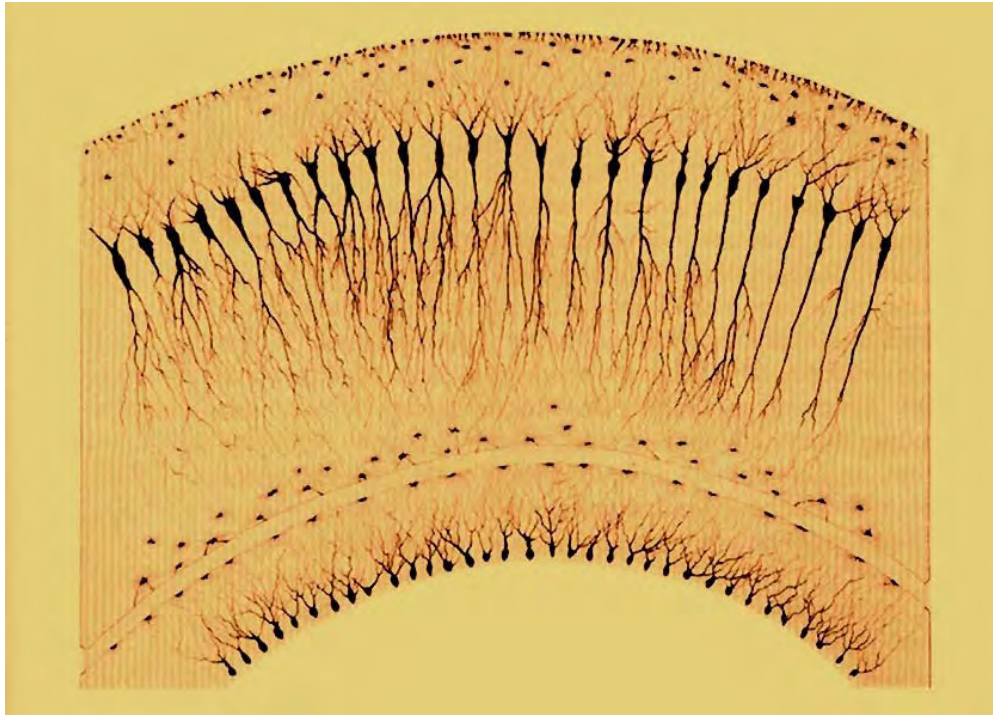


FIGURA 3. Dobles pirámides de Ramón y Cajal. Esta imagen permite observar como los cuerpos neuronales se quedan en un solo estrato mientras las ramificaciones dendríticas y axonales corren a través de otros estratos.

El estrato radiatum (Capa IV): Este estrato se encuentra entre el estrato piramidal y el lacunosum, y contiene algunas arborizaciones dendríticas de las células piramidales, por lo que contiene una menor población celular. Este estrato cuenta con fibras de varios puntos de origen que contactan con las dendritas de las células piramidales (Issacson, 1974; Hanes, 2004).

El estrato lacunosum (Capa V): Consiste en muchos espacios irregulares, con gran número de fibras, que corren horizontalmente por el estrato lacunosum por algunas distancias. Algunas fibras terminan en esta capa mientras otras ascienden al estrato molecular, algunas de estas fibras corren en paralelo a las células piramidales, y otras fibras regresan al alveus, ciertas fibras ascienden directamente de este punto hasta el área vertical del axón, otras fibras van del alveus hacia el área piramidal y llegan al estrato lacunosum (Issacson, 1974; Hanes, 2004).

El estrato molecular (Capa VI): en la porción más profunda, que constituye al estrato granuloso, que contiene muchas fibras nerviosas pero pocas células, algunas de sus fibras corren horizontalmente en las zonas moleculares. Otras fibras en esta zona entran en el hipocampo, y un último grupo de fibras, corren en paralelo a la dirección del estrato molecular (Issacson, 1974; Hanes, 2004).

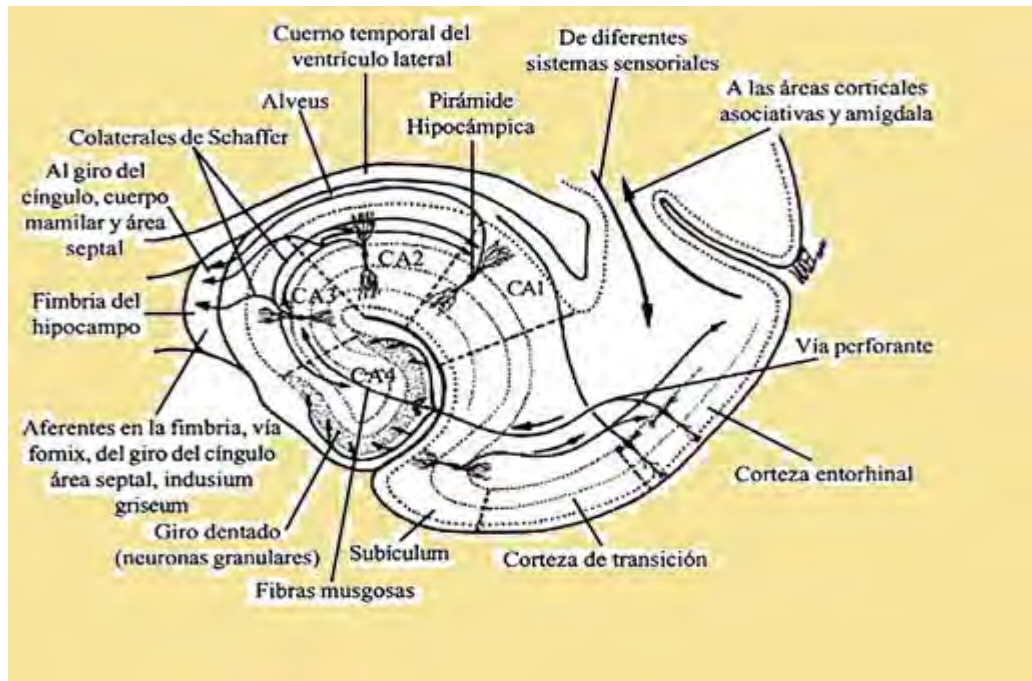


FIGURA 4. Estratos del hipocampo.

La forma de las capas celulares por su distribución, semejando a un cuerno de carnero, se le denominó Cuerno de Ammón, se conforma por los sectores CA1, CA2, CA3 Y CA4 (Carlson, 2004; Issacson, 1974) (fig 4).

El sector CA4, ocupa la parte profunda del hipocampo, adyacente al giro dentado, hasta la región de CA3.

El sector CA3, inicia cuando comienzan las pirámides y continúa hasta donde la capa piramidal cambia de dirección, da paso a la región CA2.

El sector CA2 es del cambio de dirección de la capa piramidal y hasta la región CA1.

La región CA1 va del cambio de dirección de la curva lateral de la fisura hipocámpica, (Hanes, 2004).

Las conexiones hipocámpicas son de dos tipos, las intrínsecas y las extrínsecas. Las intrínsecas, son aferentes y las extrínsecas, son tanto aferentes como eferentes (Hanes, 2004).

3.2.- LESIONES COMUNES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Las lesiones más severas se encuentran en la corteza entorrinal, en la región CA1, y en el subínculo del hipocampo, la amígdala y otras áreas altas de la corteza de asociación en el lóbulo temporal. (Brun and Gustafson, 1976; Arnold *et al.*, 1991, Graham and Lantos, 1997). En el sistema límbico y paralímbico así como en áreas de los polos temporales, la insula, el cíngulo, y el giro parahipocámpal en inmediata posición entre las cortezas de asociación, y la corteza medial del lóbulo temporal (Wanga *et al.*, 2008). El patrón distintivo de las marañas neurofibrilares, ocurre en una distribución laminar con algunas laminas severamente afectadas como las laminas de la corteza entorrinal, II y IV, con una amplia línea de protección, que contenía marañas neurofibrilares pero en las laminas III y IV son relativamente pocas. En la corteza de asociación, las neuronas piramidales en las láminas II, III y V son muy afectadas de similar forma. En la corteza de asociación visual (área de Brodmann 18), se encuentra una marcada distribución bilaminar de marañas neurofibrilares. Las láminas II, III y IV son marcadamente afectadas. (Lain, *et al* 2006). En general las marañas neurofibrilares se encuentran en presencia de las largas neuronas piramidales, que son principalmente glutamatérgicas, que se marcan con anticuerpos para neurofilamentos hiperfosforilados. La distribución jerárquica de las placas seniles se encuentra en el neocórtex frontal, y en los lóbulos temporales y parietales. El patrón de las placas seniles es más uniforme y se asocia con las cortezas en general, siendo la más importante, la corteza sensorial primaria y las cortezas motoras. Las estructuras del lóbulo ténporo medial, incluyendo la formación hipocámpal se encuentran por lo general menos afectadas por las placas seniles que las áreas neocorticales.

Las placas seniles frecuentemente ocurren en la lámina molecular del giro dentado, la zona terminal de la vía perforante. (Lain, *et al*/2006).

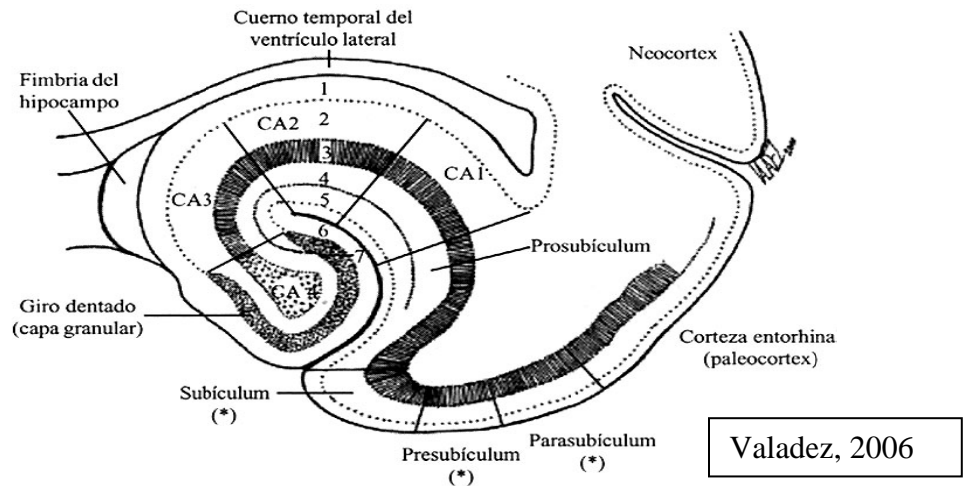


FIGURA 5. Distribución de las laminas del hipocampo

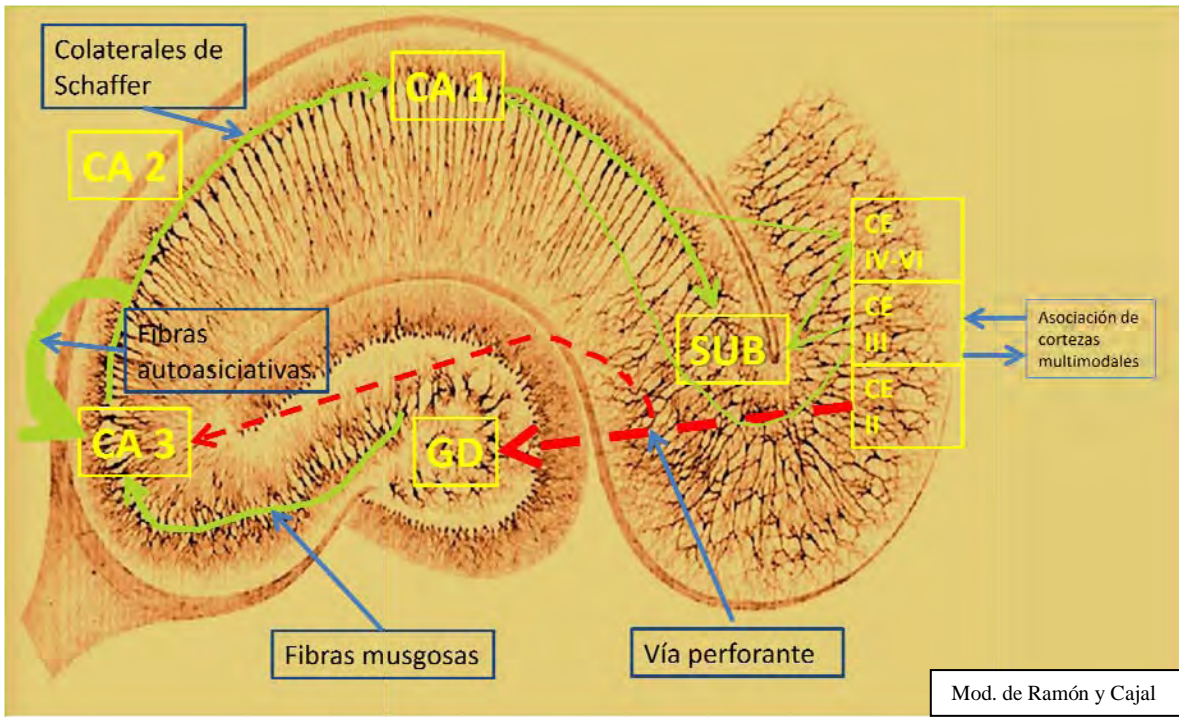


FIGURA 6. Vías de entrada y salida de la información del hipocampo

La vía perforante recorre de la corteza entorrinal II hacia el giro dentado y a Ca3.

Las colaterales de Schaffer recorren desde el giro dentado hacia CA3, pasando por las fibras autoasociativas, pasa a CA2, Ca1, de allí al subinculo regresando a la corteza entorrinal IV-VI con asociación a las cortezas multimodales mediante la corteza entorrinal III.

3.3.- OTRAS ALTERACIONES ASOCIADAS CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

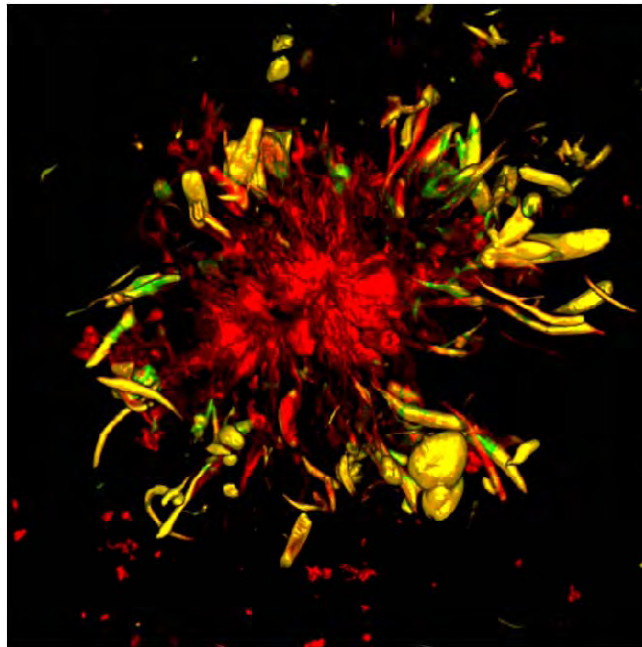
La pérdida de sinaptofisina, favorece la evidencia de la desconexión del hipocampo, como ocurre en la capa molecular del giro dentado, la pérdida de glutamato en esta región y una robusta plasticidad en respuesta a una sugestiva reinervación, de la formación hipocampal eferente (Wang y Lipton, 2005).

La plasticidad reactiva, los hinchamientos dendríticos, la sinaptogénesis reactiva, la presencia de astrocitos reactivos, y las meganeuritas son algunos otros de los cambios encontrados en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Espinosa *et al* 2003).

En pacientes con Alzheimer, se ha encontrado datos de Astroglia reactiva, alrededor de las placas neuríticas, lo que es un marcador común de los cambios patológicos en los pacientes afectados con EA (Nagele, *et al* 2004; Pákáski, *et al* 2008). La actividad de células microgliales, representa la principal característica de inflamación en los cerebros con EA. Los componentes fibrilares, y algunos otros de las placas neuríticas, pueden activar a la microglia que son las células representantes, de los procesos de inflamación que tiene la capacidad de remover agentes tóxicos, las células de la microglia pueden incrementar de manera dramática en las placas neuríticas (Pákáski, *et al* 2008; Jiang *et al* 1994). La microglia activada produce factores quimioatrayentes, que favorecen la activación de un cierto número de proteínas del complemento que son citotóxicas, pueden activar a C1q y así activar esta vía despertando la cascada del complemento (Jiang, *et al* 1994; Yasojima, *et al* 1999). La microglia y los astrocitos, pueden producir una amplia variedad de citocinas y quimiosinas, incluyendo la interleucina 1b interleucina 6 y factor de necrosis tumoral alfa, los cuales se conocen por sus reacciones tanto inmunológicas como inflamatorias que han sido poco reguladas en cerebros afectados por la enfermedad de Alzheimer. (Maccioni y Barbeito, 2001).

4.- PLACAS NEURÍTICAS.

Las placas neuríticas generan daños significativos en la memoria, de pacientes con EA. Se ha encontrado una correlación entre el A β y los daños cognitivos encontrados en pacientes con EA (Bartoo *et al.*, 1997; Naslund *et al.*, 2000). Estas placas seniles se sitúan preferentemente en las regiones cerebrales relacionadas con la memoria (hipocampo) y las funciones cognitivas superiores, como el pensamiento (corteza cerebral) (Haroutunian *et al.*, 2000). Las placas neuríticas son una lesión originada por el producto de un corte transmembranal de la Proteína Precursora de Amiloide (APP), que se efectúa por endoproteólisis de tres proteasas, la α , β y γ . La actividad realizada por la α -secretasa se asocia con miembros de la familia a- desintegrina y metaloproteasa (ADAM), la α secretasa genera péptidos no amiloidogénicos generando una parte soluble N-terminal del A β y carboxilo terminal de C83. (Buxbaum *et al.*, 1998).



Guevara, et al 1994

FIGURA 7. Placas Neuríticas.

Micrografía con microscopía confocal en verde se marca la proteína tau hiperfosforilada por AD-2 y en rojo se marcan las proteínas β -Plegadas y en amarillo se ven las áreas donde hay colocalización de tau hiperfosforilada con las proteínas β -Plegadas.

Las proteínas responsables de la regulación de las β -secretasas son las Aspartil proteasas y las BASE (enzimas de corte en el sitio- β del APP). La β -secretasa corta al APP en el carboxilo terminal de la secuencia A β , dando una conformación de amino terminal (N) y Carboxilo terminal (C) generando el fragmento C 99 generando así una forma de amiloide del péptido. (Hussain *et al.*, 1999). El corte por la γ secretasa se media por diversas proteínas como son: la neurofisisina, enzima degradadora de insulina, y presenilinas. La γ secretasa realiza un corte que forma a P3, (Elsler *et al.*, 2002).

La APP genera formas amiloidogénicas, y no amiloidogénicas, producto de la acción de una β -secretasa que actúa en el residuo 612, dando una proteína no amiloidogénica de 10-11 kDa en el área Carboxilo-terminal, de características hidrofílicas con estructura de alfa-hélice. La β secretasa corta en el residuo 596 generando un fragmento de 8-12 kDa, que contiene la secuencia del A β . Cuando actúa un tercer tipo de secretasa, la β -secretasa, ésta corta en un sitio que se presume se encuentra integrado en la membrana, produciendo un fragmento extracelular de 39-43 aminoácidos, que se propone ocurre en el aminoácido 584 en asociación con el C-terminal, con una conformación de beta-plegada, (Kirkitadze y Kowalska, 2005).

Cuando los niveles netos de A β , son aumentados pueden entonces tomar características patológicas. (Smith *et al.*, 1990). En las placas de los pacientes con enfermedad de Alzheimer se pueden determinar formas truncadas de, los amiloides β 1-40 A β 1-42, incluyendo regiones: A β - 25-35, A β 17-40, y A β 17-42. (Gowing *et al.*, 1994; Kubo *et al.*, 2002). La capacidad agregativa del A β , y su neurotoxicidad tienen una alta correlación donde al péptido 25-35 muestra agregación y neurotoxicidad. El fragmento 25-35 se emplea frecuentemente sustituyendo el amiloide completo. (Jarrett *et al.*, 1993; Casoli *et al.*, 2002; Monji *et al.*, 2002). Se sabe que los residuos 17-21 y 30-35 son las regiones más importantes para la agregación, ya que contienen gran número de residuos hidrofóbicos, por lo que se propone como la principal región de agregación (Jarrett *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2004). La neurotoxicidad inducida por el A β 42, A β 40 y A β 42 (-36-40) y A β 40 (-36-40), es mucho mayor que en otros péptidos truncados, (Liu *et al.*, 2004). Los fragmentos truncados 17-21, 22-24 y 25-35, muestran un incremento significativo en las regiones 17-21 y 25-35 por lo que su rol es importante en la neurotoxicidad generada por el A β , (Liao *et al.*, 2007).

La presencia de péptidos amiloidogénicos, puede modificar el calcio indicando que la activación de canales de potasio, son mediados por la actividad de la APP al disminuir las concentraciones de Ca⁺⁺, donde, la modulación de la excitabilidad neuronal pueden ser el principal mecanismo por el cual

el APP regula el desarrollo y plasticidad sináptica en el sistema nervioso central, (Furukawa *et al.*, 1996). Cuando la APP es cortada por la secretasa beta se favorece la formación de los fragmentos C89, C83 favoreciendo neurodegeneración de neuronas en la neocorteza, el hipocampo y degradación de mielina por la acumulación de APP-C terminal. (Rockenstein *et al.*, 2005).

Las presenilinas dependientes de la regulación de neurofisiología, son mediadas por amiloides de dominio intracelular (AICDS) que le da la capacidad fisiológica de modular los niveles de A β , mediante el control de la actividad de la gamma secretasa. (Pardossi-Piquard *et al.*, 2004). La actividad neuronal, es regulada por la formación y secreción de A β péptidos en laminas de hipocampo con sobreexpresión de APP, (Kamenetz *et al.*, 2003).

La forma no agregada y el corte no patológico de la APP, causa cambios en las concentraciones iónicas de las neuronas favoreciendo la regulación de los canales en membranas neuronales (Ramsden *et al.*, 2002). El A β , es un péptido con capacidad de modulación de canales de potasio como lo es el Kv4.2 o Kv4, el A β es un importante regulador fisiológico de los canales involucrados en la excitabilidad neuronal (Plant *et al.*, 2003; Katzman *et al.*, 2002; Butterfield *et al.*, 2002).

La fibrilación del A β es dependiente de la concentración total de A β que puede ser una determinante crítica para la formación de fibrillas (Kirkitadze and Kowalska, 2005). En cerebros de controles sanos mayores, la producción de A β está más incrementada que el aclaramiento (Lambert *et al.*, 1998). Las protofibrillas se producen a partir de pequeños oligómeros que se asocian a A β derivados de ligandos. Todo ensamble oligomérico, de A β , tiene como intermediarios, paranucleos, oligómeros, protofibrillas y algunas fibrillas maduras de A β , que son neurotóxicos y pueden ser la clave de la neurotoxicidad en la EA ya que se ha sugerido que los oligómeros inhiben la viabilidad neuronal 10 veces más que las fibrillas, (Dahlgren *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la fase inicial de la oligomerización involucra la formación de pentámeros o hexámeros llamados paranucleos que son las estructuras mínimas para comenzar el proceso de oligomerización y formar largos oligómeros, protofibrillas y fibrillas (Bitan *et al.*, 2003b). Durante la formación de protofibrillas son esenciales para los cambios en la estructura de la proteína de α -hélice A β -plegada, ya que la oxidación de residuos de metionina, puede ser cambiada, de un residuo hidrofóbico, en uno hidrofílico generando que la metionina 35 altere las propiedades de la proteína dando cambios conformacionales importantes, de α -hélice a β -plegada. El cambio conformacional de A β , se asocia con el Carboxilo-terminal hidrofóbico que promueve la oligomerización (Smith *et al.*, 1996; Devi *et al.*, 2006). El rol crítico, de Met-35 en la EA, es que se reporta como necesaria para la promoción de la neurotoxicidad,

agregación y generación de ROS (Bitan *et al.*, 2003c; Dahlgren *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1996; Devi, *et al.* 2006). La presencia de ROS facilita la peroxidación lipídica, nitración de proteínas y oxidación del DNA. (Bosetti F *et al.*, 2002). La formación de aldehídos como el 4-hidroxinonenal (HNE) y el malondialdehído se han encontrado en cerebros de pacientes con EA (Bosetti *et al.*, 2002; Ojaimi *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 1981). Estos aldehídos reaccionan con nucleófilos celulares como el DNA, proteínas, lípidos y elevan los niveles de HNE como ocurre en pacientes con EA, por lo que pueden generarse radicales libres. (Reddy, 2009; Abramov and Duchon, 2005; Butterfield *et al.*, 2002; Pike *et al.*, 1993; Liaoa *et al.*, 2007).

Las disfunciones mitocondriales son una prominente falla de la EA, se cuentan con diferentes líneas causales como son: (Gibson *et al.*, 1998; Maurer *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1996). La asociación con el incremento en los radicales libres, favorece la peroxidación lipídica, daño oxidativo al DNA, así como oxidación proteica que disminuye el ATP y la viabilidad celular en cerebros de pacientes con EA (Gibson *et al.*, 1998; Maurer *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1996; Devi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005).

Muchos grupos encontraron a A β en membranas mitocondriales, siendo el responsable de la generación de radicales libres y de la disfunción mitocondrial inicial. (Hirai *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2005; Manczak *et al.*, 2005).

Otra alteración importante de la formación de las marañas son las alteraciones en la homeostasis del calcio se han observado en pacientes con EA, donde las mutaciones en las presenilinas se representan por un incremento en los niveles de Ca⁺⁺, intracelular en neuronas de cerebros con EA que promueven la entrada de Ca⁺⁺ mitocondrial. (Brown *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2006). El incremento de Ca⁺⁺ mitocondrial facilita el daño de las membranas, generando alteraciones tanto funcionales como estructurales. El oligomero del A β 1-42, favorece la entrada masiva del calcio promoviendo así la salida de Ca⁺⁺ mitocondrial, los oligomeros pueden inducir, permeabilidad mitocondrial que favorezca cambios en la transcripción, así como muerte celular. Se sugiere que el AB induce el Ca⁺⁺ intracelular, promoviendo su movilización hacia la mitocondria, ocasionando alteraciones estructurales y funcionales, (Naga *et al.*, 2007; Bezprozvanny *et al.*, 2008).

4.1.-IMPACTO METABÓLICO DEL AMILOIDE BETA.

En pacientes que han sufrido severos o crónicos periodos de hipoxia, como ocurre en EA, (Desmond *et al.*, 2002), la hipoxia incrementa la producción de A β con numerosas consecuencias para la función celular (Taylor, *et al*/1999). Este efecto es dependiente de un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que derivan de las mitocondrias (Guzy *et al.*, 2005).

La protección que se recibe deriva aparentemente de la producción del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), el cual favorece la estabilización del la subunidad 1 α del regulador transcripcional, factor inductor de hipoxia (HIF-1 α). Mediante la inducción farmacológica de HIF-1 α se promueve la supervivencia neuronal, mediante el VEGF exógeno (Li D, Marks JD, Schumacker PT, *et al*/2005, Soucek T, Cumming R, 2003). Las relaciones entre el HIF-1, el A β , y el metabolismo de glucosa en el sistema nervioso central implican cambios en la actividad metabólica mediante la vía de la glicolisis, las hexosas y la vía de monofosfatos, se encontró que niveles bajos de A β pueden inducir HIF-1 y proteger así las células de la toxicidad (Soucek, *et al*/2003).

El cerebro es el órgano con el consumo basal más alto de glucosa en el organismo el 20%, debido a que sólo puede alimentarse de glucosa o acetoacetato y 3-hidroxiacetato, que se encuentran en los cuerpos cetónicos, que pueden metabolizarse hacia Acetil-CoA y de esta forma reemplazar parcialmente la falta de glucosa, aunque esta es solo una solución a un corto plazo, ya que es precisa la regulación del metabolismo de la glucosa para un buen funcionamiento en el SNC (Shubert, 2005).

La mayoría de la energía generada por la oxidación de la glucosa es empleada para la mantener los balances iónicos y energéticos asociados con la actividad sináptica. Cuando el sistema nervioso se expone a estrés oxidativo, como ocurre en el envejecimiento y trastornos neurodegenerativos, se redistribuyen las vías metabólicas de la glucosa, para fomentar la producción de moléculas antioxidantes (Shubert, 2005; Soucek, 2003). Estas situaciones dependen en parte por el factor de transcripción HIF-1. Las implicaciones clínicas en estos cambios en el metabolismo de glucosa, se involucran con los procesos de envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer (Shubert, 2005).

4.2.- GLICOLISIS Y METABOLISMO DE GLUCOSA.

Estudios asociados con diabetes y cáncer han demostrado que la glucosa modula diversos factores de transcripción, que están involucrados con la división celular. La biodisponibilidad de la glucosa puede determinar la forma y la eficiencia de la energía metabólica celular (Rodríguez-Enriquez *et al.*, 1998).

La glucólisis o glicolisis, es la vía metabólica encargada de oxidar o fermentar la glucosa y así obtener energía para la célula (Nelson *et al.*, 2004; Romano *et al.*, 1996).

Es la vía inicial del catabolismo (degradación) de carbohidratos, y tiene tres funciones principales: Primera, la generación de moléculas de alta energía (ATP y NADH) como fuente de energía celular en procesos de respiración aeróbica (presencia de oxígeno) y anaeróbica (ausencia de oxígeno). La segunda, la generación de piruvato que pasará al Ciclo de Krebs, como parte de la respiración aeróbica. La tercera la producción de intermediarios de 6 y 3 carbonos que pueden ser ocupados por otros procesos celulares (Nelson *et al.*, 2004; Romano *et al.*, 1996).

La glucosa es metabolizada mediante la vía glicolítica a partir del ácido pirúvico en presencia de oxígeno, el cual es completamente oxidado a CO₂ y agua por la mitocondria. En presencia de oxígeno, la glicolisis prepara a la glucosa para entrar al ciclo del ácido cítrico, por su rompimiento en Acetil CoA, el principal donador de carbonos del ciclo. Entonces, es cuando ocurren tres de los cuatro pasos de deshidrogenación del ciclo mediante el empleo de NAD como un aceptor de electrones en la mitocondria, donde la cadena respiratoria es la vía final común para el oxígeno, (Rodríguez-Enriquez *et al.*, 1998). Algunos aspectos de esta vía son relevantes para el envejecimiento y enfermedades del SNC. Una de las principales cuatro vías para el metabolismo de la glucosa que es importante con fines de señalización celular, es la ruta biosintética de las hexosaminas (Nelson *et al.*, 2004; Shubert, 2005; Marshall *et al.*, 1991a; Marshall *et al.*, 1991b).

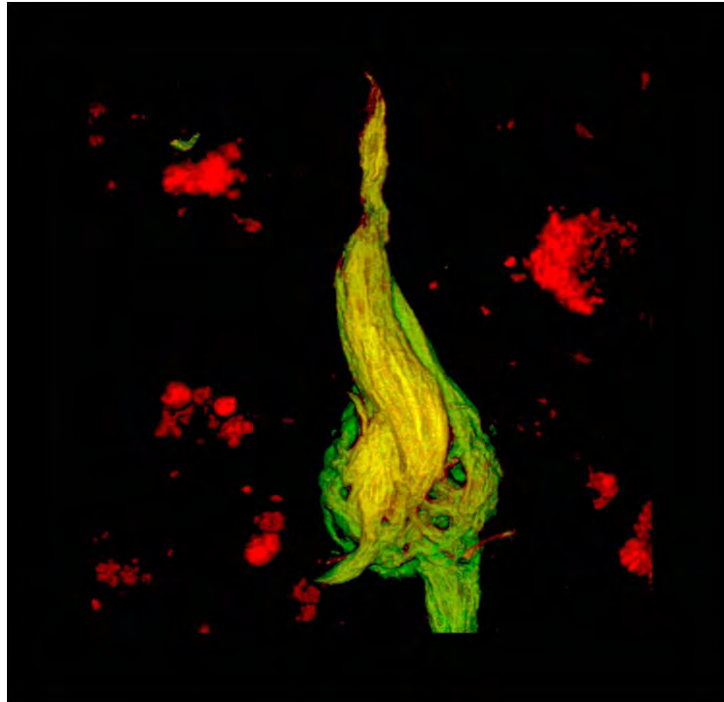
La reacción es catalizada por la 6-fosfofructocinasa para entrar a la vía de la hexosamina por conversión de glucosamina 6-fosfato, catalizada por la glucosamina-fructosa 6-fosfato aminotransferasa (GFAT). Que son las dos enzimas requeridas para la síntesis de UDP-GlcNAc. Solo el 6% de la glucosa que entra en las células es enviado a través de esta vía, la velocidad y el flujo por esta vía es ampliamente regulado por los niveles de glucosa y la enzima limitante GFAT, que ha sido implicada como una de las causas de resistencia a la insulina (Chen *et al.*, 1997; Kolm-Litty *et al.*, 1998; Nerlich *et al.*, 1998; Weigert *et al.*, 2001; Hawkins *et al.*, 1996). En este modelo la glucosa que entra en las células se envía a la ruta biosintética de las hexosaminas induce la

producción de UDP-GlcNAc. Esta elevación puede dar dos efectos en la vía el primero que la concentración de UDP-GlcNAc inhiba por retroalimentación negativa la GFAT deteniendo su síntesis y el segundo que esta entrada acelere la glicosilación de las proteína mediante la OGT (Nerlich *et al.*, 1998; Weigert *et al.*, 2001; Hawkins *et al.*, 1996; Rossetti *et al.*, 1995). El metabolismo de la glucosa es esencial para la función neural, estos tejidos pueden ser particularmente susceptibles a los bajos niveles de glicosilación, ya que esta reducción en O-GlcNAc puede generar algunas de las alteraciones postransduccionales observadas en la enfermedad de Alzheimer pudiendo ser parte de las manifestaciones patológicas de la enfermedad (Griffith *et al.*, 1995).

Las lectinas o aglutininas son un grupo de proteínas o glicoproteínas, con gran afinidad por azúcares, la reacción de lectina-azúcar muestra semejanzas con las reacciones antígeno-anticuerpo, una cualidad en la asociación de lectina-azúcar, es que además de ser reversible, no modifican bioquímicamente a los carbohidratos con los que se unen, característica que las distingue de las enzimas, las lectinas pueden interaccionar con azúcares libres, oligosacáridos, residuos de azúcares de polisacáridos, glicoproteínas o glicolípidos (Sharon *et al.*, 1998). Las lectinas han sido empleadas como herramientas en la identificación de residuos de carbohidrato, incluso, la presencia de residuos de GlcNAc específicos para la lectina *Triticum vulgare* (WGA) que ha sido empleada para marcar residuos de O-Glc NAc asociados con la proteína tau (Liu *et al.*, 2006).

5.- MARAÑAS NEUROFIBRILARES.

La proteína Tau fue descubierta como una proteína asociada a microtúbulos (MAP) que estimula el ensamble de tubulina en microtúbulos en las neuronas cerebrales (Harada *et al.*, 1994). En la última década esto ha cobrado importancia ya que se han visto a las MAPs como el principal componente de los filamentos helicoidales pareados (PHFs) o marañas neurofibrilares (NTFs) (Liu *et al.*, 2007).



Guevara, et al 2004

FIGURA 8. Maraña neurofibrilar.

Micrografía con microscopía confocal en verde se marca la proteína tau hiperfosforilada por AD-2 y en rojo se marcan las proteínas β -Plegadas y en amarillo se ven las áreas donde hay colocalización de tau hiperfosforilada con las proteínas β -Plegadas.

5.1.-PROTEINA TAU.

La proteína tau cuenta con un cierto grupo de funciones biológicas en el cerebro, se asocian con actividades de protección (Harada *et al.*, 1994). La mayor función biológica de tau es promover el ensamble de microtúbulos, y mantener la estabilidad de los formados previamente, lo que es indispensable para el transporte axonal de las neuronas. Adicionalmente, la interacción de tau con

diversas estructuras y funciones, juega roles cruciales, no solo en la arquitectura normal si no en los signos de transducción de las neuronas. Se ha encontrado que la fosforilación de tau participa en la regulación de la viabilidad celular (Liu *et al.*, 2007).

La proteína tau cuenta con seis isoformas diferentes codificadas a través del empalme alternativo del gen del cromosoma 17, por la presencia o ausencia de uno o dos insertos de 29 a 58 aminoácidos, en el N-terminal, a partir de la presencia o ausencia de tres de tres o cuatro secuencias de repetición, en el carboxilo terminal medio, que son los dominios por los cuales tau se asocia a los microtúbulos (Harada *et al.*, 1994; Tucker *et al.*, 2001; Oyama *et al.*, 2004). Cada una de las seis isoformas posibles de la proteína tau tiene un particular rol fisiológico, con otras actividades biológicas, porque ellos se expresan en desigual manera durante diferentes etapas del desarrollo estimulando el ensamble de microtúbulos con diferente eficiencia (Zhang *et al.*, 2005). La proporción alterada de varias isoformas de tau ha sido bien observada en severas enfermedades neurodegenerativas como la demencia frontotemporal y Parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (FTDP-17) y la enfermedad de Pick (Avila *et al.*, 2004).

El efecto benéfico de tau es la estabilización de los microtúbulos, permitiendo a las neurítas la extensión y estabilización. El efecto negativo es que tau puede competir con la proteína motora cinecina por el ensamble de los microtúbulos, dando una disminución del transporte axonal (Harada *et al.*, 1994; Tucker *et al.*, 2001; Oyama *et al.*, 2004).

Estudios en ratones transgénicos para la expresión de tau demostraron que tau no es indispensable para el transporte axonal *in vivo* (Zhang *et al.*, 2005).



FIGURA 9. Gen humano de tau 17q21.

5.3.-MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA PROTEÍNA TAU.

Las modificaciones postranscripcionales de la proteína tau y sus efectos durante el desarrollo normal, ocurre con varias modificaciones postraduccionales, incluyendo ubiquitinación, truncación, nitración, glicosilación y fosforilación como las más importantes (Wanga *et al.*, 2008). El incremento y alteración en algunas de estas se ha encontrado en un gran número de enfermedades neurodegenerativas (Wanga *et al.*, 2008). La ubiquitinación se da cuando la proteína tau se encuentra en PHF o en marañas, como cuando es aislada de cerebros de pacientes con EA, es modificada mediante cadenas de poliubiquitinas (Perry *et al.*, 1987). Las proteínas después de su asociación a la ubiquitina, son principalmente degradadas por la maquinaria del sistema ubiquitina proteasoma ATP-dependiente (Avila *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005a).

La truncación es la modificación que produce el corte de una proteína en regiones específicas promoviendo así alteraciones en su función. La función estabilizadora de tau en los microtúbulos, la truncación del carboxilo terminal de la proteína tau se ha propuesto como el evento temprano resultante de la formación de inclusiones intracelulares en la EA (Guillozet-Bongaarts *et al.*, 2005).

Tau truncada en la Glu 931 existe en las marañas neurofibrilares, en las neuritas anormales y en los cerebros de pacientes con EA (Guillozet-Bongaarts *et al.*, 2005).

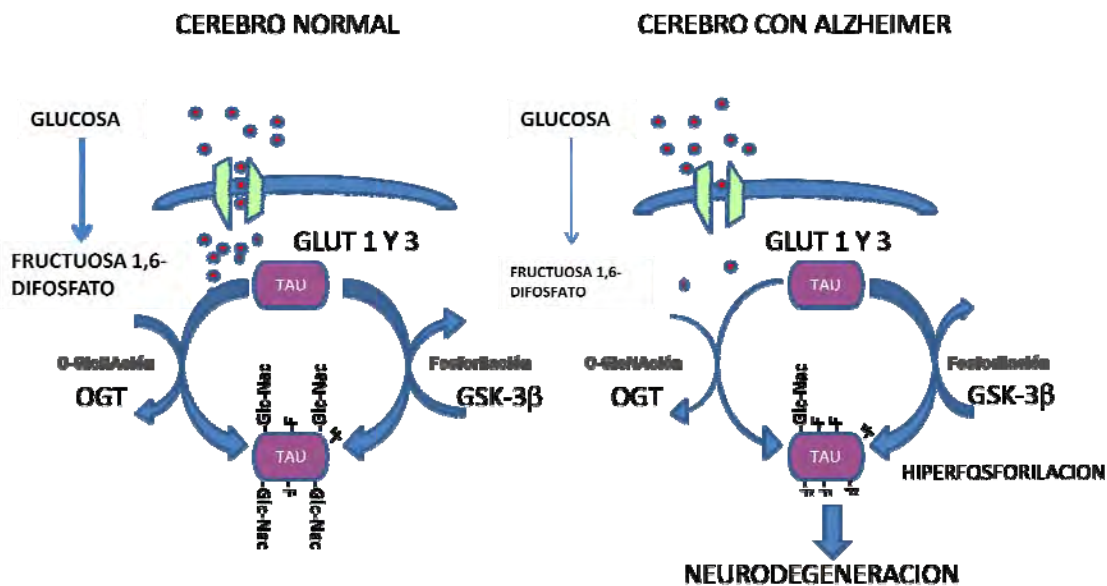
La nitración de proteínas ocurre cuando se agregan nitritos a las cadenas protéicas. El incremento de la nitración de las proteínas en cerebros con EA se ha reportado, demostrando que PHF-tau son nitradas y estas colocalizan con las marañas neurofibrilares en los cerebros de pacientes con EA. La nitración ocurre en residuos específicos Tyr 18, Tyr29, Tyr 197 y Tyr 394, donde la nitración de Tyr 29 es encontrada sólo en los cerebros de pacientes severamente afectados con EA, pero no en controles normales, por lo que esta nitración sea propuesto como un evento relacionado con la EA (Reynolds *et al.*, 2006). La glicosilación se define, como la reacción mediante la cual los oligosacáridos son asociados covalentemente con proteínas con ayuda de una glicosiltransferasa. De acuerdo con las columnas glicosídicas, estas pueden ser clasificadas como O- y N-glicosilaciones. La N-glicosilación muestra que el azúcar es asociado con la cadena proteica del grupo amida de las asparaginas, mientras que la O-glicosilación denota que el azúcar es asociado es una N-acetilglucosamina O-asociada, (O-GlcNac), que interactúa con el grupo hidroxilo de una serina o treonina en proximidad a un residuo de prolina (Gong *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2002a; Robertson *et al.*, 2004).

En los cerebros de pacientes con EA se han encontrado alteraciones metabólicas que se encuentran asociadas con la vía de la hexosinasa, donde la UDP-GlcNAc que se encarga de donar O-GlcNAc a los residuos de serina y treonina de la proteína tau que se ve disminuida en pacientes con EA (Liu *et al.*, 2002a). Las alteraciones de la glicosilación de la proteína tau en la EA se verá más ampliamente en el capítulo 6.

La fosforilación es otra modificación postraduccional que se da por la adición de un grupo de fosfato a una proteína, mediante cinasas. En la EA se han encontrado algunas serinas y treoninas altamente fosforiladas como lo son la treonina 231, Ser 396 y Ser 404 (Liu *et al.*, 2002b), como se verá más ampliamente en el capítulo 7.

6.- GLICOSILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU.

La N-glicosilación normalmente ocurre en el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi. Por medio del uso de diferentes lectinas, se sabe que la N- glicosilación se encuentra aumentada en las PHF comparada con lo encontrado en tau normal.



Mandelkow, et al. J. Neurochem. (2005).

FIGURA 10. Modificaciones de la glicosilación en cerebro de paciente control y en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

La glicosilación anormal de tau puede ser representada por daños en la fluidez de las membranas de las neuronas afectadas. En estudios *in vitro* sobre glicosilación aberrante, se ha encontrado que la hiperfosforilación de tau se da como reacción ante la activación de la fosforilación con AMPc-

dependiente de proteínas cinasas (PKA), GSK-3 β y ciclina dependiente de cinasa-5 (cdk5) o en su defecto por alteraciones en el proceso de inhibición de la defosforilación de tau mediante PP2a y PP5, activando la fosforilación de tau en sitios específicos (Liu *et al.*, 2002b; Wang *et al.*, 1996b).

A diferencia de la N-glicosilación, en la O- glicosilación hay disminución en el nivel de O-GlcNacilación como es encontrado en los pacientes con EA (Liu *et al.*, 2002a; Liu *et al.*, 2002b). Los cambios en la O-GlcNacilación de tau pueden ocurrir como respuesta a alteraciones en el metabolismo de glucosa, generando una rápida disminución de la O-GlcNacilación de tau, dejando sitios disponibles para las cinasas, lo que favorece la hiperfosforilación (Liu *et al.*, 2002a).

La relación entre la fosforilación y la glicosilación de la proteína tau puede jugar un rol importante en la localización nuclear de tau. Verdaderamente la incorporación de O-GlcNac dentro de tau disminuye cuando tau es hiperfosforilada, y simultáneamente, el transporte nuclear de tau es disminuido (Lefebvre *et al.*, 2003).

Estas evidencias sugieren que las alteraciones en el metabolismo de glucosa pueden contribuir a la patogénesis de la EA.

6.1.- O- GlcNAc.

En 1984, Torres y Hart describieron la presencia de enlaces O-Glicosídicos con monosacáridos de GlcNAc, (Torres *et al.*, 1984; Comer and Hart, 2000).

Un par de años después se describió la existencia de O-GlcNAc modificando proteínas nucleocitoplasmáticas (Holt *et al.*, 1986; Hanover *et al.*, 1987; Comer y Hart 2000; Lance *et al.*, 2003). Luego se demostró que estas modificaciones postransduccionales ocurren ampliamente en las proteínas nucleares y que estas modificaciones son esenciales para la vida (Shafi *et al.*, 2000; Vosseller *et al.*, 2002; Zachara *et al.*, 2002; Furukawa *et al.*, 1992; Lance *et al.*, 2003; Hanover, 2001). La O-GlcNAc es una modificación, que ocurre en los sitios de serina y treonina que son susceptibles de ser fosforilados. La interrelación entre Ser/Thr O-GlcNAc, y la fosforilación son complejas ya que, aún y cuando ambos eventos ocurren sobre los mismos aminoácidos, solo ocurre alguna de las dos sobre el mismo aminoácido, (Comer y Hart, 2000; Lance *et al.*, 2003; Hanover, 2001; Vosseller *et al.*, 2001). La O-GlcNAc juega un rol crítico en procesos transcripcionales, activación de factores de transcripción (como en los represores de acetilasas de histonas), tráfico de proteínas (implicada con el transporte vesicular y glicosilación de nucleoporinas en la translocación nuclear), estabilidad de proteínas (modificando proteínas para ser protegidas de su degradación

proteosomal). Muchas evidencias sugieren que O-GlcNAc puede jugar un rol crítico, en enfermedades como cáncer, diabetes y enfermedades neurológicas como la EA (Lefebvre *et al.*, 2005; Comer and Hart, 2000; Wells *et al.*, 2003; Hanover, 2001; Vosseller *et al.*, 2001).

Esto se ha establecido en base a que el metabolismo de glucosa se encuentra reducido en neuronas viejas, la reducción en el metabolismo de glucosa, resulta en la disminución del flujo de glucosa en UDP-GlcNAc, lo que genera niveles bajos de proteínas modificadas por O-GlcNAc. Existen una gran variedad de proteínas modificadas por O-GlcNAc en el cerebro, como ocurre en las neuronas con la proteína tau, la proteína Precursora de Amiloide- β , neurofilamentos, microtúbulos asociados a proteínas, Clatrina, ensamble de proteínas (AP3 y AP180), synapfisina I, etc (Arnold *et al.*, 1996; Griffith *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 1993; Ding *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1994; Cole *et al.*, 1999; Cole *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 1998). El microtúbulo asociado a proteína tau, se encuentra hiperfosforilado en las marañas neurofibrilares, lo que sugiere que la O-GlcNAc en tau puede proteger a tau de su agregación.

La expresión de proteínas modificadas con O-GlcNAc, fue poco regulada en cerebros de pacientes con EA, en comparación con los controles. Se encontró que el nivel de O-GlcNAc es 22% menor en cerebros de pacientes con EA en comparación con los controles, concluyendo que existe una disminución de O-GlcNAc en cerebros de pacientes con EA (Lefebvre *et al.*, 2005; Comer y Hart, 2000; Wells *et al.*, 2003; Hanover, 2001; Vosseller *et al.*, 2001).

6.2.- O-GlcNAc-TRANSFERASA.

La O-asociación con N-acetilglucosaminiltransferasa (OGT) es una glicosiltransferasa que cataliza la adición de un residuo de N- acetilglucosamina, en una asociación O-glicosídica, en residuos de serina y treonina (Ding *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 1998; Comer y Hart, 2000; Wells *et al.*, 2003; Hanover, 2001). La modificación por O-GlcNAc ocurre en una amplia variedad de proteínas, lo que sugiere un rol fisiológico en procesos celulares como es: transporte, transcripción, comunicación celular, señalización celular y apoptosis (Lefebvre *et al.*, 2005).

El gen de OGT puede producir 3 transcritos con el mismo gen Xq13, cada transcrito codifica para una isoforma diferente de OGT (Lefebvre *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la OGT y O-GlcNAc son abundantes en el cerebro en particular en las neuronas hipocampales y células de Purkinje, encontrando gran cantidad de OGT en los núcleos, pericarion y dendritas. La OGT es abundante en

Eucromatina, matriz citoplasmática y en terminales nerviosas así como en la periferia de microtúbulos y dendritas (Hanover, 2001).

La OGT modifica proteínas mediante la adición de O-GlcNAc, sugiriendo así una regulación mediante modificaciones postraduccionales para la actividad de OGT que es potencialmente inhibida por UDP, por el producto de su reacción. La enzima es sensible, a UDP-GlcNAc-UDP y otros rangos fisiológicos de concentraciones de azúcares. Muchas concentraciones celulares de UDP-GlcNAc aprovechan el ATP con el 2-5% del total del azúcar empleada para mantener los nucleótidos (Comer and Hart, 2000; Wells *et al.*, 2003; Hanover, 2001).

7.- FOSFORILACIÓN DE TAU.

Dentro de todas las modificaciones postraduccionales de la proteína tau la fosforilación es la principalmente estudiada. La habilidad de cambiar la conformación de una proteína entre dos formas diferentes permite un control regulatorio sobre la actividad de la proteína. La fosforilación (la adición de un grupo de fosfato a una proteína) por las cinasas es un proceso reversible, y las proteínas pueden ser defosforiladas (removiendo un grupo de fosfato) por enzimas que se conocen proteína-fosfatasa. Estos dos grupos de enzimas a menudo trabajan juntas para "apagar" y "encender" las señales celulares. Las cinasas juegan un papel muy importante en varios procesos de señalización intracelular, incluyendo aquellos que controlan el crecimiento y la división celular. (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a.) Tau es una fosfoproteína, que contiene normalmente de 1 a 3 moles de fosfato por mol de proteína tau. En autopsias de cerebros de pacientes con EA, los niveles de fosforilación es de tres o cuatro veces mayor que los encontrados en cerebros de pacientes control (Grundke-Iqbal *et al.*, 1984). Desde el aislamiento y caracterización de los filamentos helicoidales pareados (PHF) de cerebros con EA descubrieron que tau es el principal componente proteico de las PHF y que tau en estas marañas se encuentra anormalmente hiperfosforilado (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Kosik *et al.*, 1986; Wood *et al.*, 1986). La hiperfosforilación de tau juega un rol principal en las enfermedades neurodegenerativas, especialmente en la EA. La expresión y fosforilación de tau algunas veces es regulado por etapas del desarrollo. En estadios embrionarios, y en el periodo temprano posnatal, las isoformas cortas de tau expresan un alto nivel de fosforilación, siendo mucho menor en el cerebro adulto saludable también se ha detectado simultáneamente la aparición de varias isoformas (Goedert *et al.*, 1993).

Tanto la expresión como la fosforilación de tau reportan ser reguladas durante el desarrollo. En el cerebro fetal humano, sólo se expresan las formas cortas de tau. En comparación con los adultos, la tau fetal, es altamente fosforilada en ciertos sitios como ocurre en los cerebros con la enfermedad de Alzheimer.

La tau fetal mediante sus altas hiperfosforilaciones es funcional y no se polimeriza en marañas neurofibrilares. La hiperfosforilación de tau de cerebros con Alzheimer inhibe el ensamble de los microtúbulos y favorece su polimerización dentro de las marañas neurofibrilares (Alonso *et al.*, 1994; Alonso *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2006; Iqbal *et al.*, 1989; Yoshida *et al.*, 2006). La expresión de tau se encuentra incrementada bruscamente en el desarrollo del cerebro en el estado embrionario.

Después del nacimiento el nivel total de tau en el cerebro permanece relativamente estable. Durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario, sólo las isoformas cortas de tau se expresan en el cerebro de rata, además las isoformas largas de tau comienzan a aparecer después del 5º día posnatal. La mayoría de estos cambios de expresión de varias isoformas de tau ocurren entre el día 15 posnatal, y el mes posnatal. Después del día 15 sólo se ven algunos datos de fosforilación. Después en las ratas adultas mayores de 3 meses, la hiperfosforilación de tau desaparece, (Takuma *et al.*, 2003). La fosforilación de tau total cuenta con 14 sitios de fosforilación. En base a los patrones de cambio durante el desarrollo, esos sitios de fosforilación pueden dividirse dentro de tres grupos. Grupo I (Ser 202, Thr212, Ser 356, Ser 214, Ser 262 y Ser 422) donde tau se encuentra altamente fosforilada durante el desarrollo hacia el día 15 prenatal los niveles de fosforilación de tau son altos en niveles de desarrollo embrionario, GRUPO II (Thr181, Ser199, Thr205, Ser214, Ser262, y Ser422) incrementan drásticamente durante el estadio embrionario, durante la etapa posnatal de los primeros 5 días, (Thr181, Thr205, Ser262, y Ser422) y estos últimos cuatro residuos hasta los 15 días, de vida, después del máximo de fosforilación, en estos sitios comienza a disminuir la hiperfosforilación, para que a la edad de los tres meses, estos permanezcan aparentemente sin cambios por el resto de la vida.

En el grupo III de fosforilación los sitios (Tre 231y Ser 396) que no cuentan con cambios importantes de fosforilación hacia el día 19 posnatal, hasta los 24 meses. La expresión de tau en el día 15 prenatal es muy baja. Gong *et al.*, (2006)

Aun que tau se fosforila tanto en condiciones normales del desarrollo como en el caso de la EA, la hiperfosforilación ocurre en varios sitios, donde sólo los últimos inhiben la actividad estimulando el ensamble de microtúbulos y polimerizándolo dentro de marañas neurofibrilares. El cambio funcional

y formación de marañas son el resultado principal de la fosforilación anormal (Gong *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 1998; Hardy *et al.*, 2002; Weingarten *et al.*, 1975; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Neve *et al.*, 1986; Goedert *et al.*, 1989). Estos resultados sugieren que los diferentes sitios de fosforilación en tau en cerebros de rata en desarrollo como en cerebros con EA podrían jugar un rol en la conversión de tau de una molécula con actividad biológica en una que inhibe el ensamble de microtúbulos y se polimeriza dentro de marañas neurofibrilares (Davis *et al.*, 1998; Hardy *et al.*, 2002; Weingarten *et al.*, 1975; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Neve *et al.*, 1986; Goedert *et al.*, 1989; Goode *et al.*, 1994). Tau tiene la característica de hiperfosforilarse durante la neurodegeneración, sugiriendo una relación entre el desarrollo neuronal y la degeneración. La fosforilación de tau es también funcionalmente regulada. Se ha sugerido que la hiperfosforilación de tau puede inducir el ciclo celular neuronal (Andorfer *et al.*, 2005; Khurana *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007).

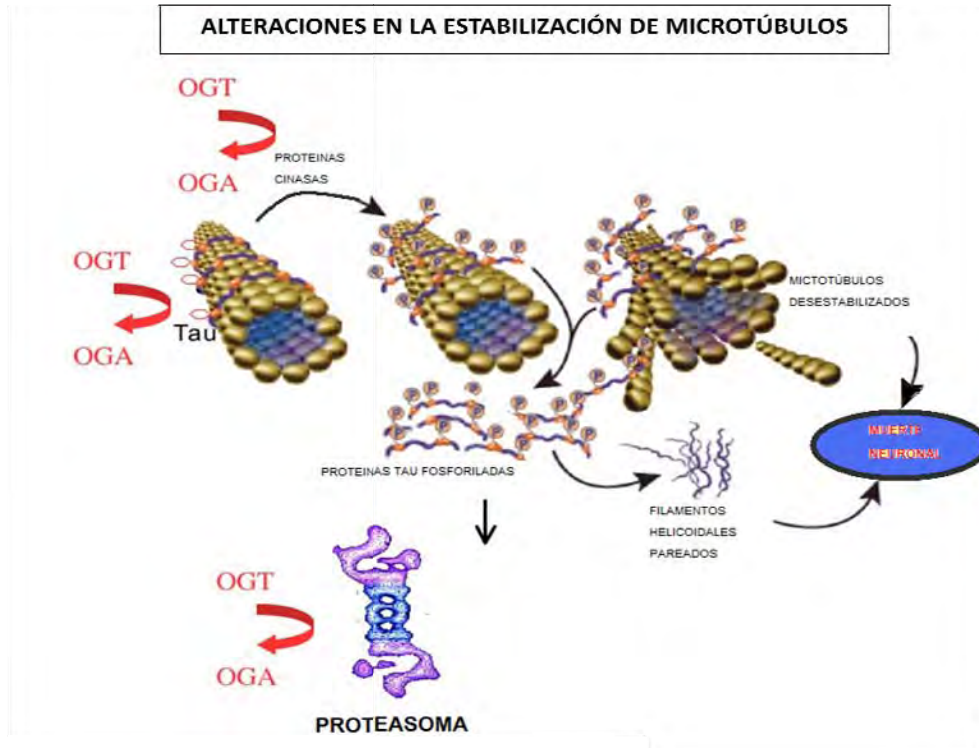


FIGURA 11. Glicosilación y alteraciones en el ensamble de microtúbulos.

En la EA hay datos de que existen 40 o más sitios de fosforilación aislados de cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer, estudios cinéticos *in vitro* de las fosforilaciones fisiológicas de tau sugieren que Ser199/Ser202/Thr205, Thr212, Thr231/Ser235, Ser262/Ser356, y Ser422, promueven la autoagregación de tau dentro de marañas neurofibrilares, (Liu *et al.*, 2006). Esto implica que la

fosforilación de tau en ciertos sitios impacta la actividad y agregación colectiva. La fosforilación de tau en la cola del C-terminal, incrementa la actividad fosforilativa y agregación colectiva. La fosforilación de tau se asocia con sitios ricos en prolina, (Liu *et al.*, 2007).

La hiperfosforilación de tau le confiere capacidades tóxicas, con la habilidad de secuestrar a la tau normal y a otras MAPs, como la MAP1 y la MAP2, y causan el desensamble de microtúbulos (Alonso *et al.*, 2009; Morsch *et al.*, 1999; Lovestone *et al.*, 1997; Johnson and Hartigan, 1998), y al desfosforilarse ellos pierden esta capacidad tóxica. (Gong *et al.*, 2008).

7.1.- CAUSAS POTENCIALES DE LA HIPERFOSFORILACION DE TAU EN EA.

Los niveles normales de la fosforilación de tau son la consecuencia de una regulación dinámica de cinasas y fosfatasas. Numerosos estudios, de la década pasada han identificado las principales cinasas y fosfatasas en el cerebro. La principal cinasa en el cerebro incluye a la Glicógeno-Sintasa-Cinasa-3 β (GSK-3 β), Ciclina-dependiente de proteína cinasa 5 (cdk5), cAMP- dependiente de proteína cinasa. (PKA), y el estrés activador de proteínas cinasas (Ferrer *et al.*, 2005; Mazanetz *et al.*, 2007), Cierta tipo de proteínas cinasas y protein fosfatasas usualmente tienen predilección por sustratos específicos, (Goedert *et al.*, 1995; Sontag *et al.*, 1996; Gong *et al.*, 2000; Grundke-Iqbal *et al.*, 2005).

Tanto la actividad como la expresión, de la PP2A se encuentran disminuidas en los cerebros de pacientes con EA (Tsujiro *et al.*, 2005; Tanimukai *et al.*, 2005). En suma tanto las alteraciones en cinasas como en las fosfatasas, alteran la conformación de tau, los sustratos de estas enzimas juegan un rol en la hiperfosforilación y en la agregación, además de la fosforilación de los residuos de serina y treonina, la proteína tau es modificada por monosacáridos β -N-acetilglucosamina (GlcNAc) mediante enlaces glicosídicos, este tipo de modificaciones son mejor conocidas como OGlcNAcación (Arnold *et al.*, 1996; Lefebvre *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004). Lo más relevante de esta OGlcNAcación es que tiene la capacidad de regular la fosforilación de tau tanto *in vitro* como *in vivo* (Lefebvre *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). La OGlcNAcación de tau, se ha encontrado importantemente disminuida en los cerebros con la enfermedad de Alzheimer lo que correlaciona directamente con la hiperfosforilación de la proteína tau (Liu *et al.*, 2006). Ya que la OGlcNAcación es directamente regulada por el metabolismo de glucosa que suple la Uridine-difosfato (UDP) -GlcNAc, es un donador para la proteína de O-GlcNAcación, se propone una novedosa hipótesis, que explica el mecanismo por el cual las alteraciones metabólicas

de la glucosa alteran el metabolismo en cerebros con enfermedad de Alzheimer, lo que se es bien conocido contribuye a la neurodegeneración. En cerebros con EA, las alteraciones en el metabolismo de la glucosa, pueden ser causa de la disminución de la O-GlcNAcilación de tau (Gong *et al.*, 2008).

7.2 CINASAS

Son un gran número de enzimas que regulan la actividad de otras proteínas y, más indirectamente, las actividades de las células. La fosforilación de las proteínas, la adición de un grupo de fosfato a una cadena del aminoácido, es una acción regulatoria muy importante, ya que cada grupo de fosfato lleva consigo dos cargas negativas, la adición de un fosfato puede alterar la forma de la proteína. La forma alterada de una proteína es a menudo relacionada con la actividad alterada de la proteína (Nelson *et al.*, 2004).

Las proteínas cinasas tienen la capacidad de fosforilar proteínas, de acuerdo con sus actividades específicas, estas, pueden ser divididas en dos principales grupos el dirigido a prolina proteína cinasa (PDPKs) y el no dirigido a prolina proteína cinasa (NPDPKs). El PDPKs incluye signos de regulación extracelular, señales de regulación cinasa $\frac{1}{2}$ (erk $\frac{1}{2}$), división celular del ciclo 2 cinasa (cdc-2), ciclina dependiente de cinasa 2 (CDK-2) y ciclina dependiente de cinasa 5 (cdk5) (Reynolds *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2005). Los NPDPKs incluyen al calcio y calmodulina dependiente de proteína cinasa II (CaMKII), Protein cinasa A (PKA), Protein cinasa C (PKC), casein cinasa I, casein cinasa II (Drewes *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2002a; Liu *et al.*, 2002b; Reynolds *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2005). La mayoría de las cinasas involucradas en la fosforilación de tau son parte de las proteína cinasas asociadas a prolina PDPKs, lo cual incluye a las proteína cinasas mitógeno activadas (MAP), otras cinasa que intervienen son, CDK5, ERKs y JNKs, PKA, CaMKII, DyrkA y GSK3- β (Kondoh *et al.*, 2007). Las MAP Cinasas o MAPK son vías de señalización, altamente evolucionadas, conservadas e involucradas con diversas funciones celulares, así como de proliferación celular, diferenciación y respuestas al estrés (Liu *et al.*, 2002b; Reynolds *et al.*, 2000). CDK5 es otra importante cinasa, la cual se activa asociada a sus activadores, P35 o P25 (Lee *et al.*, 2004; Ferrer *et al.*, 2005). La expresión de Cdk5 se incrementa durante el desarrollo y tiene su pico a los 15d posnatal. Entonces esta se mantiene sin cambio hasta los 24 meses posnatales (Reynolds *et al.*, 1997; Pei *et al.*, 1998). La proteína cinasa A, (PKA) es otra importante cinasa de tau (Jicha *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2006; Wegiel *et al.*, 2004). El desarrollo de la regulación de la

expresión de las dos principales isoformas cerebrales de las subunidades PKA encontrando que todos sus niveles se incrementan durante el desarrollo antes del P5d (Reynolds *et al.*, 1997; Pei *et al.*, 1998). CaMKII fosforila a un amplio rango de sustrato de proteínas incluyendo tau (Lindwall *et al.*, 1984; Baudier *et al.*, 1987). Se encontró que la CaMKII tiene una actividad gradualmente incrementada después del P15d. La glicógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), que es la cinasa de tau que se encuentra asociada a tubulina, así como La GSK-3 β se encuentra altamente expresada en el cerebro, se encuentra en las neuronas en asociación con la proteína tau (Gong *et al.*, 2006). La GSK-3 β , se asocia con los microtúbulos sobre expresándose en células en estado de hiperfosforilación, encontrándose dramáticamente incrementada su actividad en los cerebros de pacientes con EA. (Liu *et al.*, 2008).

7.3.- GSK-3 β

La GSK-3 β tiene dos isoformas GSK-3 β y GSK-3 α , de las cuales GSK-3 β es la principal cinasa de tau y esta participa tanto en la patología amiloide de EA (Takashima *et al.*, 2006), como en asociación con la muerte neuronal y la formación de PHF-tau, la retracción neurítica así como la disminución de las habilidades cognitivas. *In vitro*, GSK-3 β , es la cinasa más efectiva para la fosforilación de tau recombinante y la PP2A-defosforilada, PHF/tau es aislada de cerebros de pacientes con EA (Wang *et al.*, 2007a), la GSK-3 β , hiperfosforila residuos aminoácidos, como los encontrados en las PHF (Wang *et al.*, 2007a). La sobre expresión de GSK-3 β , provoca hiperfosforilación de tau y neurodegeneración (Lucas, *et al* 2001). Las neuronas con inclusiones tipo maraña en cerebros de pacientes con EA, son positivos a la actividad de la GSK-3 β (Pei *et al.*, 1997), Pei *et al.*, 1999).

La activación específica de esta cinasa se da por la defosforilación de la ser 9 para GSK-3 β , o en la ser 21 para la GSK-3 α , esta activación, con la subsecuente hiperfosforilación de tau, sugieren una regulación sinérgica *in vivo* por PKC en GSK-3 (Liu *et al.*, 2003). El A β , puede activar GSK-3 mediante la inhibición de la actividad de PKC y el peroxinitrito puede activar GSK-3 por inducción del estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2006b). La GSK-3 β es la cinasa de tau mayormente implicada en la hiperfosforilación de tau (Ferrer *et al.*, 2005; Aghdam *et al.*, 2007).

7.4.- DISMINUCIÓN DE INSULINA COMO FACILITADOR DE HIPERFOSFORILACIÓN.

Las enfermedades neurodegenerativas demenciales como el Alzheimer, pueden ser exacerbadas, mediante la interacción de diversos factores de riesgo como lo son, la predisposición genética, la acumulación de amiloide, toxinas ambientales, trauma craneoencefálico, asociación a mecanismos excitotóxicos, así como alteraciones metabólicas. (Aronson *et al.*, 1991). Estos factores de riesgo pueden interactuar e incrementar los factores de susceptibilidad a la neurodegeneración por contribuir a la neurotoxicidad. Se ha demostrado que la acumulación de amiloide en asociación con hipoglicemia y daño excitotóxico incrementan de modo progresivo los déficits metabólicos y acumulación de amiloide con la edad. (Mattson *et al.*, 1992). Para evaluar la interacción entre las alteraciones del metabolismo de glucosa in vivo que permita investigar las alteraciones asociadas con la hiperglicemia crónica en sujetos con daño por toxicidad con A β , en el envejecimiento normal estudios por Tomografía por Emisión de Positrones (PET) han demostrado la disminución en el metabolismo de glucosa a nivel cerebral correlacionándolo con la reducción del metabolismo en pacientes con la EA (Koh *et al.*, 1990; Buchsbaum *et al.*, 1991; Duara *et al.*, 1986). La disminución de la utilización de glucosa en pacientes con EA se ha asociado con alteraciones en la memoria, por alteraciones en la capacidad de transporte para la glucosa (Kalaria *et al.*, 1989). La estreptozotocina (STZ), es una nitosurea, que ha mostrado un espectro de actividad antibiótica y antineoplásica y también se ha empleado para inducir diabetes mellitus en modelos animales experimentales mediante sus efectos tóxicos sobre las células β pancreáticas, por su potente actividad como agente alquilante que es conocido como metilador directo del DNA, produciendo fracturas en los filamentos de DNA, en sitios lábiles a álcali, (Lewis *et al.*, 1959; Herr *et al.*, 1967).

La síntesis de DNA se muestra con aberraciones cromosomales, micronucleos, cambios en cromatidas hermanas, y muerte celular (Bolzán *et al.*, 2002).

La STZ, induce destrucción de las células beta pancreáticas, generando elevaciones crónicas de los niveles de glucosa de manera dosis-dependiente. A nivel de barrera hematoencefálica reduce un 44% de su transporte e incrementa el transporte de cuerpos cetónicos (Matthaei *et al.*, 1986). La administración de STZ periférica da mínima toxicidad directa nivel de SNC, por lo que la administración de estreptozotocina periférica induce hiperglicemia generando un modelo para investigar los roles de la disfunción metabólica en asociación con el AB y su asociación con la EA (Kanter *et al.*, 1990).

8.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

- Si a un modelo de toxicidad con amiloide β 25-35 se genera la presencia concomitante de alteraciones metabólicas, mediante alteraciones en la glucemia debe existir alteraciones metabólicas que disminuyen la expresión de O-Nacetilglucosamina lo que favorece la hiperfosforilación de tau.

9.- HIPÓTESIS.

- La presencia concomitante de Alteraciones metabólicas mediante alteraciones en la glicemia y la presencia de amiloide β 25-35 incrementan la hiperfosforilación de tau.

10.- OBJETIVOS.

- Determinar la asociación O-GlcNac con la fosforilación de proteína *tau* en neuronas hipocampales en un modelo in vivo de neurotoxicidad con A β 25-35 + STZ.
- Determinar el daño estructural causado en el modelo de A β 25-35 + STZ.
 - Evaluar la expresión de O-GlcNac en relación con la expresión de P-tau 231, 396 y 404 en el modelo de A β 25-35 + STZ.
 - Determinar la expresión de OGT en relación a la GSK 3- β en el modelo de A β 25-35 + STZ.

11.- MATERIAL Y MÉTODOS.

11.1.- Animales de laboratorio

Todos los experimentos fueron realizados con la aprobación del comité de Ética para uso de animales de experimentación de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) de acuerdo con la "Norma Oficial Mexicana 062" y de acuerdo estrictamente con "the Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research". Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 180 a 200g. Los animales fueron facilitados por el Bioterio de la Facultad de Medicina UNAM y empleados a lo largo del estudio. Los animales fueron alojados en cajas acrílicas en grupos de cuatro a seis animales por caja, que tuvieron ciclos de 12hrs de luz por 12 de oscuridad que se mantienen con agua y comida a libre demanda. Se empleó una N de 6 animales divididas en cuatro grupos, el primero que se le aplicó Buffer de Fosfatos (PBS) Intrahipocampal y Buffer de citratos pH 4.45 intramuscular. El segundo grupo se administró STZ disuelta en Buffer de citratos pH 4.45

intramuscular. El tercer grupo se le administró Amiloide β 25-35, intrahipocampal, más STZ disuelta en Buffer de citratos pH 4.45 intramuscular. El cuarto grupo se le administró Amiloide β 25-35, intrahipocampal.

11.2.- Protocolo de administración de medicamentos.

Procedimiento de cirugía estereotáxica. Se realizó en ratas con un peso de 180 a 200 g. Se anestesiaron con pentobarbital (40mg/kg). Se adaptaron al aparato estereotáxico, se realizó una incisión anteroposterior sobre el cráneo y se localizaron coordenadas a partir del bregma, Las coordenadas para el hipocampo son: anteroposterior -4.2 ; lateral 3.0 respecto a bregma y profundidad de -2.9 respecto a la duramadre (Paxinos, 1979), luego se procedió a la realización del trepano mediante mototool en el punto determinado por las coordenadas hasta antes de las meninges. Se realizó la medición y se da la profundidad adecuada, apara cada hemisferio.

Preparación del péptido. Veinticuatro horas previas, se disolvió el péptido con dilución 1:10 a una concentración de $100\mu\text{M}$ EN PBS A pH de 7.4 (Pike et al., 1995) y se incuba a 37°C por 24hrs para que se polimerice (Maurice et al., 1996), se deposita, intrahipocampalmente $1\mu\text{l}$, de el A β 25-35, que se administró en cinco minutos lentamente, se midió con Jeringa Hamilton previamente colocada al aparato estereotaxico, luego se salió y se realizo la medición para el lado contralateral y se repite el procedimiento.

Administración de estreptozotocina. Después de 7 días se diabetogenizó a las ratas previa glucosa capilar inferior a 60mg/dl lograda mediante ayuno de 8 hrs, luego se procedió a la administración de dosis única intramuscular en el muslo derecho del animal (previa antisepsia mediante torunda con algodón), de Estreptozotocina (30mg/kg) diluida en Buffer de citratos a pH de 4.45 Se les consideró hiperglicémicas, con una glucosa superior a 200mg/dl . (Alvarado-Vasquez et al., 2003). A la semana de la aplicación.

Monitoreo de glucosas y pesos. El monitoreo de glucosa se realizó mediante medidor de Glucosa capilar Accucheck Active de Roche, mediante obtención de sangre por punción del extremo terminal de la cola previa desinfección con alcohol 70% y esperando a que se seque una vez por semana durante las cuatro semanas posteriores a la administración de estreptozotocina así como el registro de peso de los animales.

11.6.- Técnicas histológicas

Obtención de cerebros, fijado y congelación de los tejidos. Los cerebros se obtuvieron mediante decapitación con guillotina, las cabezas se colocaron sobre hielo, y se extrajeron los cerebros, la mitad derecha se congeló en nitrógeno líquido a -70°C y la mitad izquierda se fijó con paraformaldehído al 4%. A las 24 hrs de colocarlos en paraformaldehído, se preparó una solución de sacarosa al 20%, disuelta en agua destilada, se colocaron los cerebros y se mantuvieron en refrigeración durante una noche, hasta que quedaron en el fondo del envase. Se emplean recipientes para manejo de bloques por congelación de plástico y se agregó Tissue-Tek 4583 O.C.T. como medio de montaje, se colocan los cerebros sin burbujas con orientación de anterior a posterior. En un vaso de precipitado, se coloca Isopentano 200ml y se coloca en un envase con nitrógeno líquido, hasta que la base del vaso se cubre de una capa blanca de nieve, alcanzando los -156°C , entonces se toma el recipiente con el tejido y se coloca allí por 1.15min, se saca y se pone en un envase en nitrógeno líquido a -70 y se guarda en el Revco por 24hrs a -70°C .

Se sacan los bloques y se montan en las bases del MICROM HM 520 Se ponen dentro a -25°C y se cortan montándolas en Laminillas previamente silanizadas y rotuladas.

Se empleó metodología por congelación ya que facilitó la recuperación antigénica, disminuye la degradación vía autólisis. (Saddler *et al.*, 2009).

Técnica de Hematoxilina y eosina para microscopía de luz en campo claro. Para el estudio de los tejidos mediante microscopía de campo claro se realizó este procedimiento para poder visualizar las estructuras localizar el sitio de estudio así como sus características histológicas básicas Anexo I.

Técnica de Nissl para microscopía de luz en campo claro. Este método se utilizó para teñir específicamente células sistema nervioso central con base en sus características lipídicas y se emplea para identificar más fácilmente las diferentes estructuras del tejido como se explica en el Anexo II.

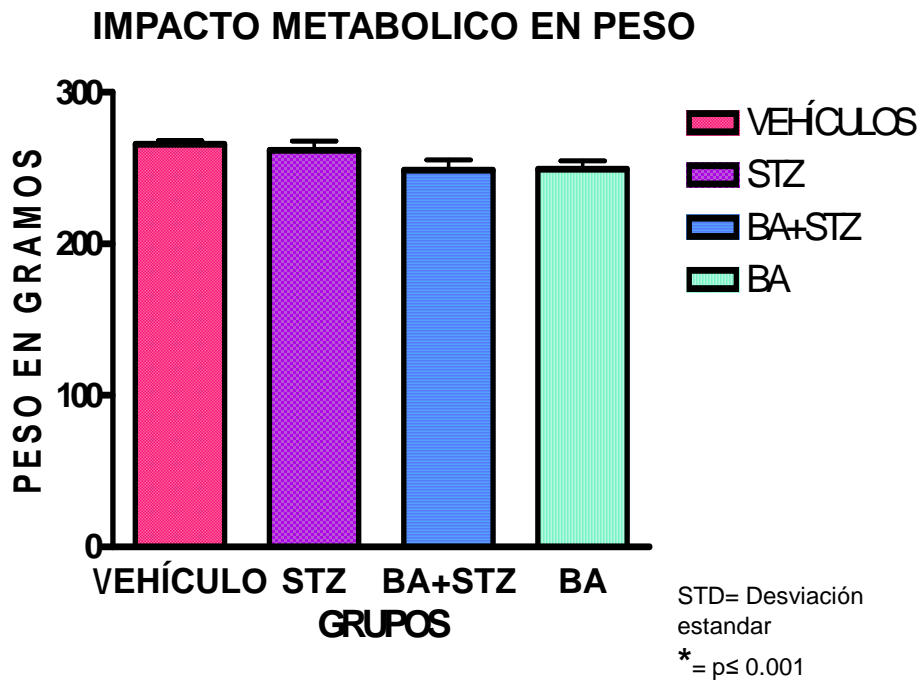
Inmunohistoquímica HRP para microscopía de luz en campo claro. Este método permitió ver la expresión de un anticuerpo específico en nuestro tejido, como se ve en el Anexo III.

Inmunohistoquímica para microscopía de fluorescencia. El inmunoensayo mediante lectina WGA para ver la expresión de O-GlcNAc asociada a FITC y anticuerpos Sigma- PS396 y Millipor PT231 y PS404 para ver la hiperfosforilación de la proteína tau. Se emplearon cortes coronales del hemisferio izquierdo de $5\ \mu\text{m}$ cada $30\ \mu\text{m}$ de la lesión se montan en laminillas silanizadas, se calientan las laminillas y se rehidratan en PBS 1X y, después se sumerge en albumina al 2%

después se sumerge en tritón al 0.2% , se lava con PBS para los anticuerpos o PBS CA ++ si es para lectina y después, se enjuaga con PBS y se coloca el primer anticuerpo secundario ya sea con FITC o con Rhodamina, se espera y se enjuaga con PBS y se aplica el segundo anticuerpo, se aplica Vectashield-plus DAPI, se sella con barniz de uñas. La adquisición y el procesamiento fue mediante el microscopio de fluorescencia Leica (Leica Microsystems Wetzlar, Germany) microscope fitted with a Leica DC 300F digital-imaging el sistema empleado por Leica Imagees el software de adquisición Manager 1000, Ver anexo III.

12.- RESULTADOS

12.1.- CAMBIOS METABÓLICOS

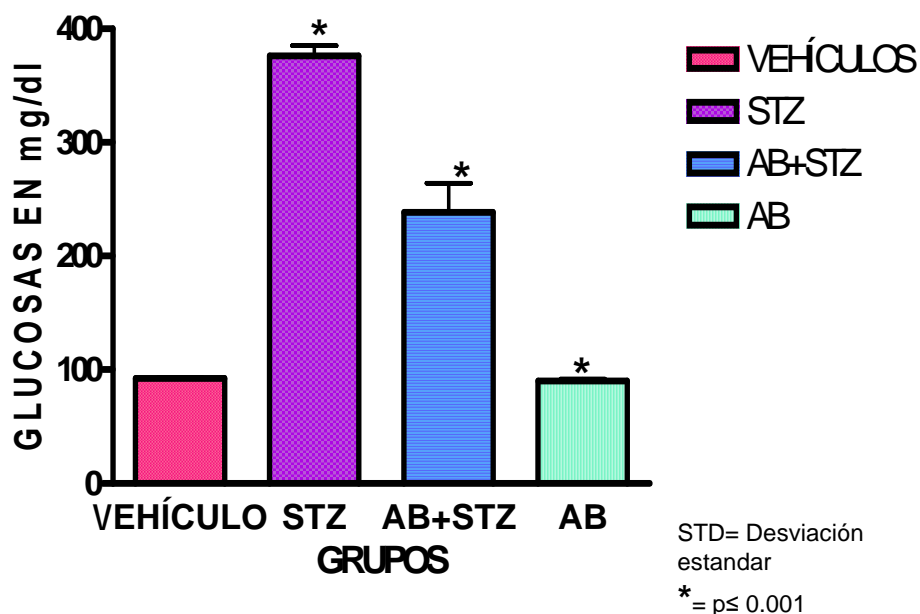


En la gráfica 1. se ve como el peso de los animales tiende a continuar aumentando aun que en el caso del grupo de estreptozotocina y beta-amiloide estreptozotocina se ve como el aumento es menor que en los otros dos grupos.

El peso de los animales mostraron un aumento, parcial no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($F(3,115)=1.075, p<0.363$).

media pesos superior que en el grupo de $A\beta+STZ$ manteniendo valores semejantes entre las medias del grupo de vehículos de 270 g y amiloide- β de 268 g, sin embargo en el grupo de solo estreptozotocina se tienen pesos con una media de 265 g mientras en el caso de $A\beta+STZ$ es de 263 g.

IMPACTO METABOLICO EN GLUCOSA



Gráfica 2, Determinación de glucosa en los cuatro grupos de ratas que fueron tratadas con estreptozotocina (STZ), Vehículo (V), A β y A β +estreptozotocina, se ve como hay diferencia entre el grupo de estreptozotocina y A β +estreptozotocina con respecto al que solo tiene amiloide o solo vehículo, y se ve también como en el grupo de A β +estreptozotocina los niveles de glucosa son menores que en el caso de solo estreptozotocina.

En las mediciones de glucosa en los animales se encontraron diferencias significativas ($p = .000$ F (3,115) = 31.93). Aunado a esto es importante señalar que en el caso del grupo de Estreptozotocina la media de glucosa superior que en el grupo de A β +STZ manteniendo valores semejantes entre las medias del grupo de vehículos de 92.44 mg/dl y amiloide- β de 90.12 mg/dl, sin embargo en el grupo de solo estreptozotocina se tienen glucosas con una media de 376.06 mg/dl mientras en el caso de A β +STZ es de 236.35 mg/dl.

12.2. Modificaciones morfológicas.

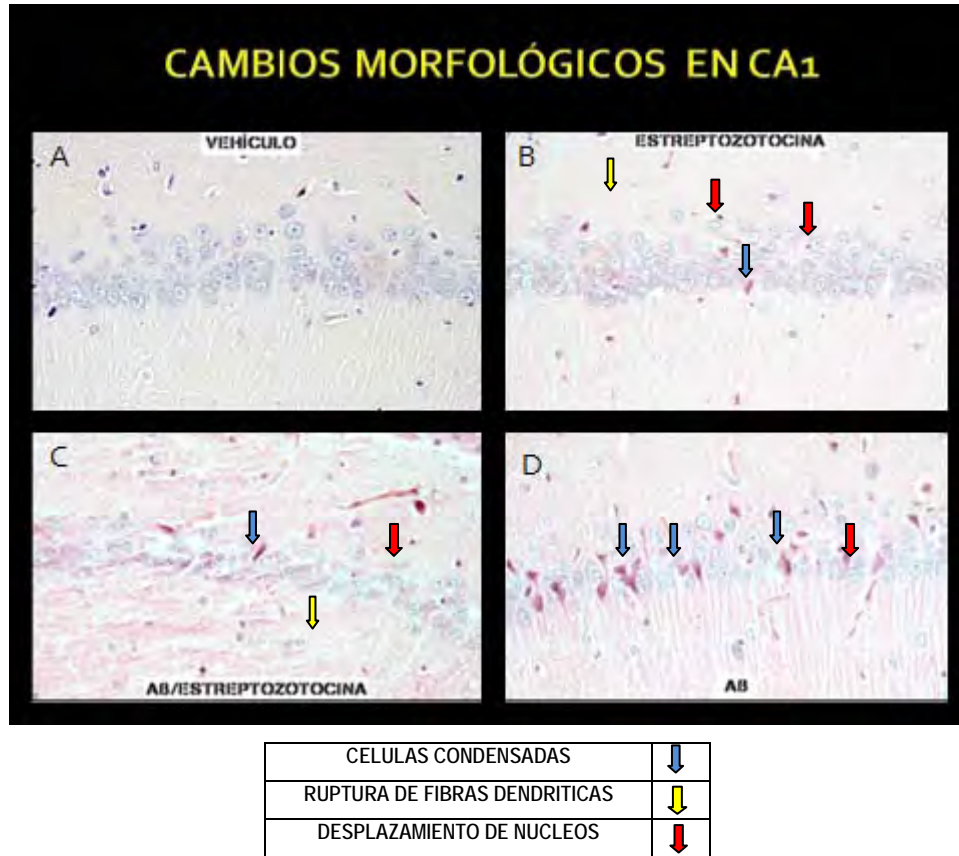


Figura 12. Se realizó microscopía óptica el área del hipocampo CA1 con un aumento de 40X y tinción de hematoxilina y eosina. En A se encuentra el grupo control, en B se encuentra el grupo de STZ, en C se encuentra el grupo de A β +STZ y por ultimo en D se ve el grupo de A β .

Modificaciones morfológicas, se aprecia el área del hipocampo CA1 con un aumento de 40X y tinción de hematoxilina y eosina. En el grupo control se ve conservada la citoarquitectura neuronal, con un hipocampo conservado con células con núcleos centrales y citoplasma íntegro, se ven definidos y ordenados los procesos dendríticos. En el grupo de STZ se encuentra una importante pérdida de la estructura neuronal así como disminución de su tamaño, los núcleos tienden hacia la periferia, su forma ya no es tan regular y se ve perdida la nitidez y menos orden de los procesos dendríticos, secundario al manejo con STZ. En el grupo de A β +STZ se encuentra una importante pérdida de la estructura neuronal alteraciones estructurales, así como disminución de su tamaño,

con pérdida importante de cuerpos neuronales los núcleos ya no guardan una relación clara con las otras estructuras celulares y se ve una marcada pérdida del orden de los procesos dendríticos de los estratos lacunosum y radiatum. En el grupo de A β se muestra como hay una pérdida de la estructura neuronal de la citoarquitectura de las células los núcleos se encuentran en la periferia y el citoplasma en algunas neuronas se encuentra completamente condensado se una desorganización y engrosamiento de los procesos dendríticos.

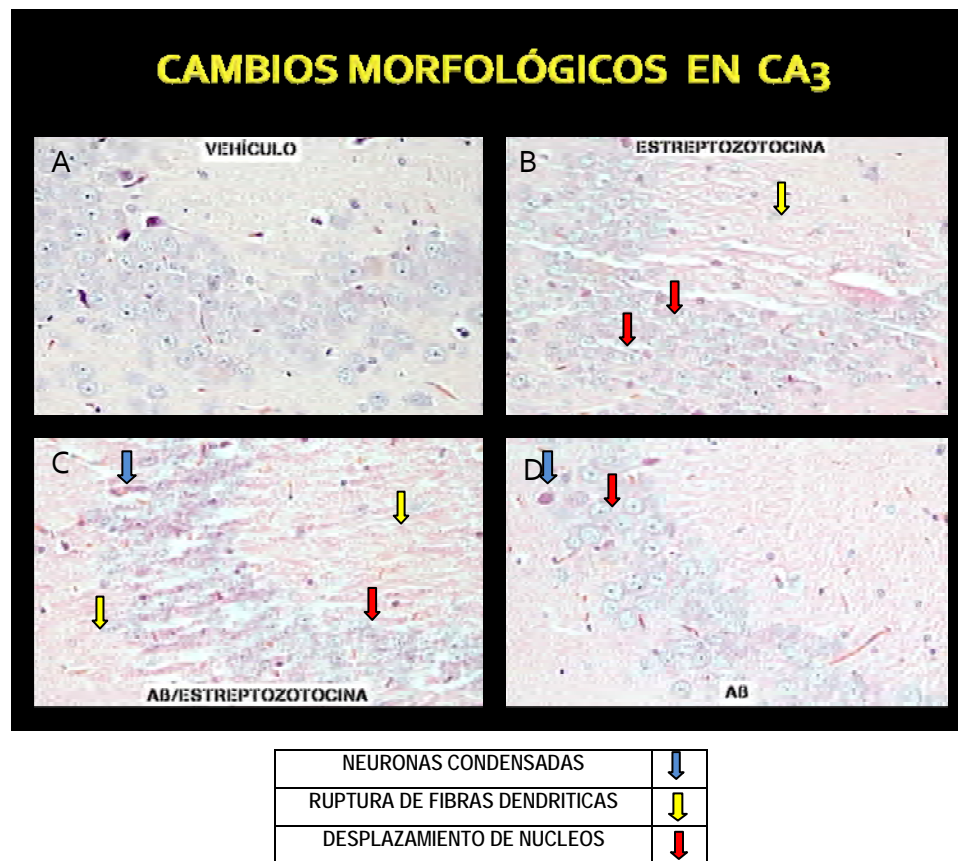


Figura 13. Se realizó microscopía óptica en el área del hipocampo CA3 con un aumento de 40X y tinción de hematoxilina y eosina. En A se encuentra el grupo control, en B se encuentra el grupo de STZ, en C se encuentra el grupo de A β +STZ y por ultimo en D se ve el grupo de A β .

En el grupo control se ve conservada la citoarquitectura neuronal, con un hipocampo conservado con células con núcleos centrales y citoplasma integro. Se encuentra una importante pérdida de la estructura neuronal así como disminución de su tamaño, con alteraciones en la orientación nuclear

y se ve una marcada pérdida de la arquitectura con ruptura de las fibras de los estratos lacunosum y radiatum, pertenecientes a procesos dendríticos. Se encuentra una importante pérdida de la estructura neuronal, así como disminución de su tamaño, con pérdida importante de cuerpos neuronales, alteraciones del citoplasma y pérdida de núcleo con amplia desorganización y ruptura de procesos dendríticos de los estratos lacunosum y radiatum y se ve una marcada pérdida de la organización. Se muestra como hay una importante pérdida de la estructura neuronal de la citoarquitectura en algunas de las células los núcleos se encuentran en la periferia y el citoplasma en algunas neuronas se encuentra completamente condensado se ve un mayor orden de los procesos dendríticos, y la distribución de las neuronas es más regular.

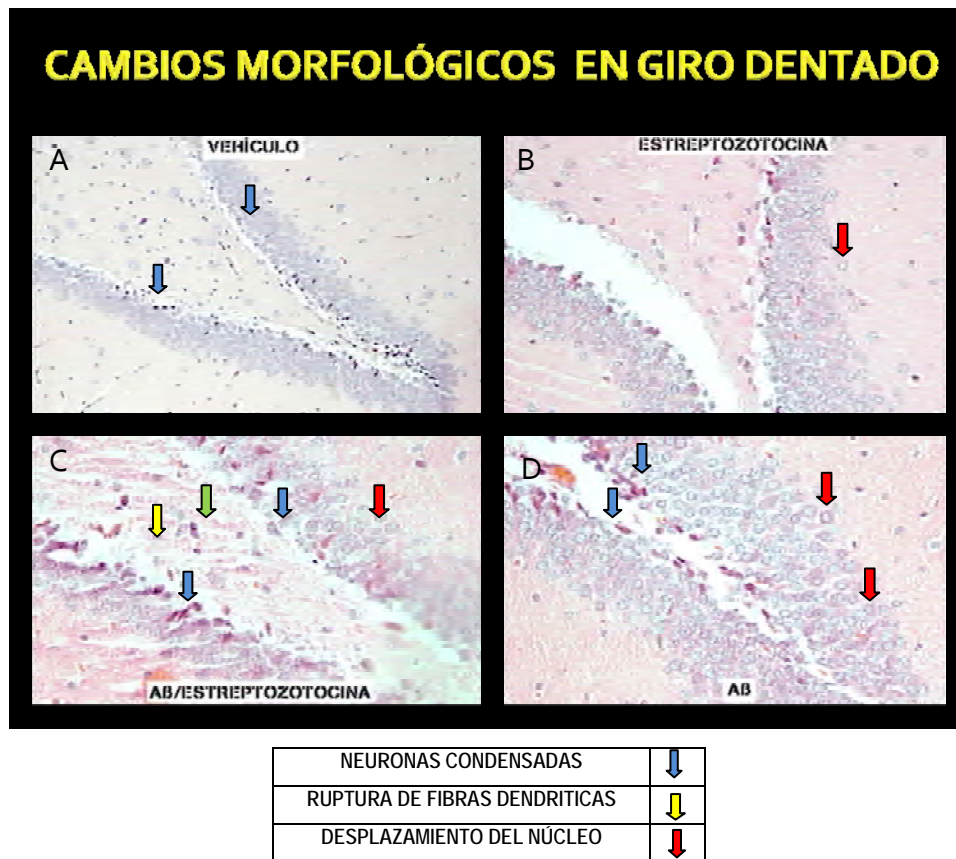


Figura 14. Se realizó microscopía óptica en el giro dentado con un aumento de 40X y tinción de hematoxilina y eosina. En A se encuentra el grupo control, en B se encuentra el grupo de STZ, en C se encuentra el grupo de A β +STZ y por ultimo en D se ve el grupo de A β .

En el grupo control se ve conservada la citoarquitectura neuronal, con un hipocampo conservado con células con núcleos centrales y citoplasma integro. En el grupo STZ se ve perdida de la estructura neuronal así como disminución del tamaño neuronal, con núcleos hacia las orillas y se ven alteraciones de la arquitectura del giro dentado. En el grupo de A β +STZ se encuentra una importante pérdida de la estructura neuronal, así como disminución de su tamaño, con pérdida importante de cuerpos neuronales, los núcleos se encuentran en la periferia y se ve una marcada perdida de la arquitectura del hipocampo y giro dentado, con marcada ruptura de las fibras axonales con pérdida de la organización y condensación de los cuerpos neuronales. En el grupo de A β hay una importante pérdida de la estructura neuronal de la citoarquitectura de las células los núcleos se encuentran en la periferia y el citoplasma en algunas neuronas se encuentra completamente condensado se ve una marcada perdida de la arquitectura del giro dentado pero se conservan más los procesos axonales.

En el caso de las modificaciones morfológicas en los experimentos con microscopia de luz nos muestran alteraciones de estructura, distribución y alteraciones en la citoarquitectura. (fig. 12, 13 y 14)

La mayor parte de las marañas neurofibrilares suelen afectar en una distribución laminar dañando a una subpoblación neuronal específica, con la principal afección de las láminas hipocampales III y IV. (Figs. 12, 13 y 14. Tabla 1).

En los grupos control se aprecia que las estructuras celulares guardan una distribución y volumen semejante en el área de CA1, CA3 y Giro dentado, donde la morfología celular es adecuada y permanecen los núcleos centrales y con los procesos dendríticos se mantiene con adecuado orden y estructura, mientras que en los grupos de estreptozotocina se encuentran datos de disminución del volumen de los cuerpos celulares, los núcleos de encuentran orientados a la periferia y hay ruptura de los procesos dendríticos, con pérdida de la distribución de los cuerpos celulares, condensación de los cuerpos neuronales de las células piramidales, en CA3, hay una marcada espongirosis, así como desorganización de los cuerpos neuronales con alteración en la organización celular y distribución de los núcleos hacia la periferia, en la región de CA1, se mantiene la citoarquitectura pero se encuentran cambios a nivel de la distribución celular con núcleos a la periferia y se conserva la distribución de las fibras dendríticas. (Figs. 12, 13 y 14 Tabla1).

Con lo que respecta a los grupos de amiloide- β más estreptozotocina, se ven datos de pérdida de la citoarquitectura, con ausencia de cuerpos neuronales, con ruptura de fibras dendríticas y ligera

condensación de los cuerpos neuronales, el daño en el grupo del giro dentado presenta pérdida de los cuerpos neuronales, cambios en la citoarquitectura y ruptura de las fibras a nivel de las células granulosas y musgosas, además de condensación en los escasos cuerpos neuronales. (Figs. 12, 13 y 14 Tabla1).

El área correspondiente a CA3 se estima pérdida de los cuerpos neuronales, ruptura de las fibras dendríticas y espongirosis que alteran la citoarquitectura. En la región de CA1, se localiza, ruptura y desorganización de las fibras musgosas y granulares con una disminución en la organización de los procesos dendríticos, con ausencia de cuerpos neuronales. (Figs. 12, 13 y 14 Tabla1).

Por último, en los grupos de amiloide- β se ven cambios en la distribución de los núcleos, con espongirosis y presencia condensación de los cuerpos neuronales, en el Giro dentado, hay pérdida de los cuerpos neuronales, mientras en la región de CA3 hay datos de espongirosis, en la región de CA1 se ve condensación de los cuerpos neuronales (Figs. 12, 13 y 14 Tabla1).

CAMBIOS MORFOLOGICOS					
<i>GRUPO</i>	<i>PÉRDIDA DE CITO-ARQUITECTURA</i>	<i>NUCLEOS ALTERADOS</i>	<i>CITOPLASMA CONDENSADO</i>	<i>DAÑO EN GIRO DENTADO</i>	<i>PERDIDA DE CUERPOS NEURONALES</i>
VEHÍCULO		+	++	+	+
STZ	+++	+++	+++	+++	+++
A β +STZ	++++	++++	++++	++++	++++
A β	++	+++	+++	+++	+++

MARCA	SIGNIFICADO	++	LEVE EXPRESION
	SIN EXPRESION	+++	MODERADA EXPRESION
+	ESCASA EXPRESION	++++	ELEVADA EXPRESIÓN

Tabla 1.

12.3. Cambios en la O-GlcNac y fosforilación por P-tau Tre 231.

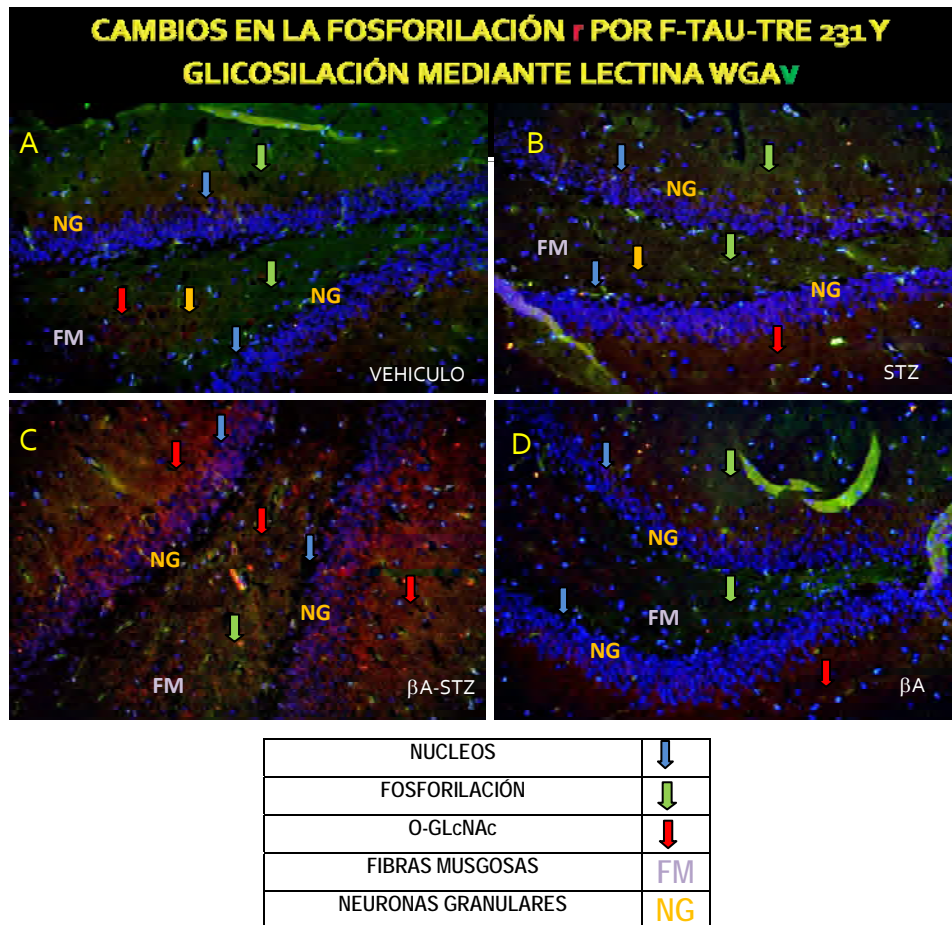


Figura 15. Microscopia de fluorescencia del giro dentado con un aumento de 40X y mediante inmunohistoquímica de dobles marcas teñido con DAPI (azul) FITC (verde) WGA y con Rodamina (rojo) P-tau-Tre-231. En A se encuentra el grupo control, en B se encuentra el grupo de STZ, en C se encuentra el grupo de A β +STZ y por ultimo en D se ve el grupo de A β .

En el caso de los vehículos se ve actividad de glicosilación a nivel de la región granular del hilio del hipocampo en el estrato granuloso y un poco más expresado en el estrato molecular, con glicosilación notoria en el tejido de células granulosas. Se encuentra presencia de fosforilación citoplasmática discreta en la periferia de los cuerpos celulares de las células granulosas en las regiones. En el grupo de STZ, se encuentra expresión de O-GlcNac y leve fosforilación a nivel de región granular del hilio del hipocampo, leve glicosilación en las células granulosas, y escasa en

células piramidales en estratos IV y V. En el caso del grupo de A β +STZ, se ve de moderada a alta expresión de O-GlcNAc y alta expresión de fosforilación a nivel de región granular del hilio del hipocampo, moderada fosforilación en las células granulosas, y moderada en células piramidales en estratos IV y V. En este grupo de A β se ve leve expresión de O-GlcNAc y moderada fosforilación, con leve fosforilación a nivel de región granular del hilio del hipocampo, leve glicosilación en las células granulosas, y escasa en células piramidales en estratos IV y V.

Al marcar con la lectina de germen de trigo WGA en el carril verde encontramos que para el grupo control es en el que mayor expresión de la O-GlcNAc hay, en el grupo de A β se ve una mayor expresión de la O-GlcNAc, mientras es menor la expresión, en el grupo de STZ y de A β +STZ en la cual, se ve una menor expresión de esta a nivel de los cuerpos de las neuronas piramidales.

En el caso del anticuerpo específico para la P-Tre 231 se encuentra expresado en los cuatro grupos siendo mayor en el grupo de A β +STZ, siendo predominante en los márgenes de las fibras musgosas y en el área de las capas de las células granulares del giro dentado que pertenecen a las vías de aferentes de la información (Fig.15 Tabla 2).

CAMBIOS EN LA FOSFORILACIÓN Y POR F-TAU-TRE 231 Y GLICOSILACIÓN MEDIANTE LECTINA WGA V					
GRUPO	O-GlcNAc	FOSFORILACION	CAMBIOS EN CÉLULAS GRANULOSAS	CAMBIOS EN NEURONAS PIRAMIDALES	AREA AFECTADA
VEHÍCULO	+++	++	++ FOSFORILACIÓN	+ GLICOSILACIÓN	CA4 ESTRATOS 4Y5
STZ	++	++	++ GLICOSILACIÓN	+ FOSFORILACIÓN	CA4 ESTRATOS 4Y5
A β +STZ	+++	++++	+++ FOSFORILACION	++ GLICOSILACIÓN	CA4 ESTRATOS 4Y5
A β	++	+++	++ FOSFORILACION	++ GLICOSILACIÓN	CA4 ESTRATOS 4Y5

MARCA	SIGNIFICADO	++	LEVE EXPRESION
	SIN EXPRESION	+++	MODERADA EXPRESION
+	ESCASA EXPRESION	++++	ELEVADA EXPRESIÓN

Tabla 2.

12.4. Cambios en la O-GlcNac y fosforilación por P-tau Ser 396.

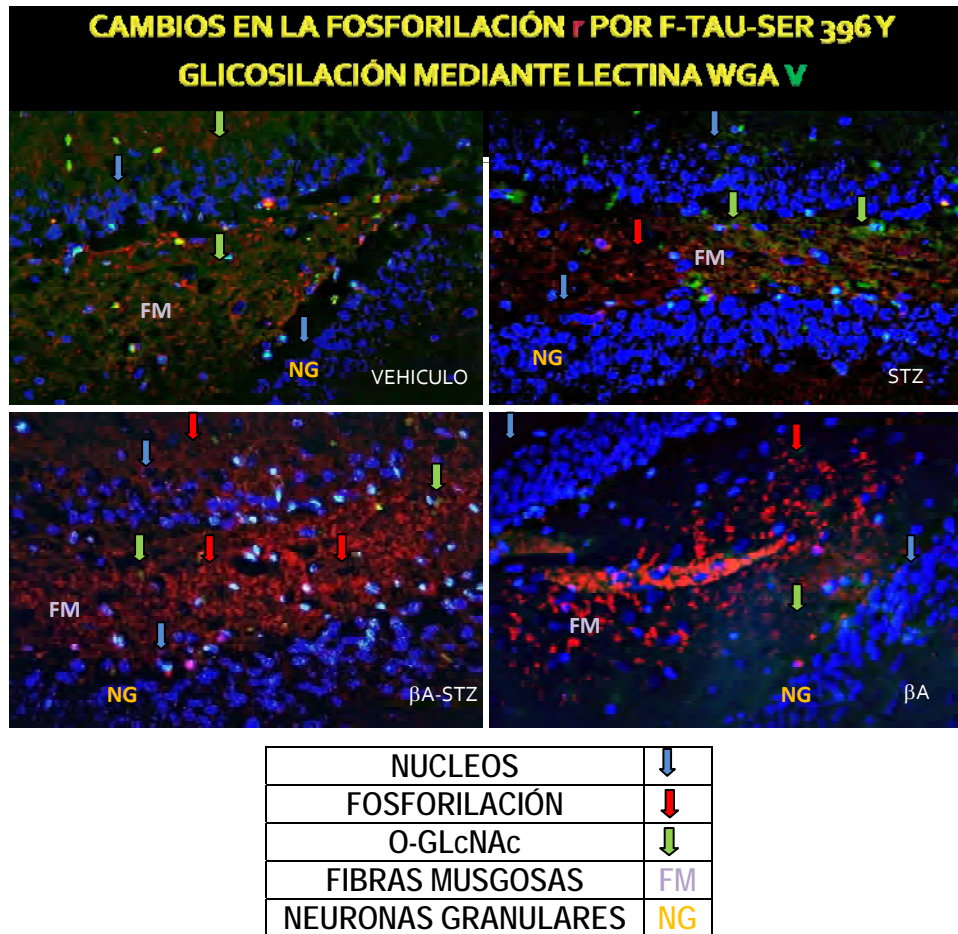


Figura 15. Microscopia de fluorescencia del giro dentado con un aumento de 40X y mediante inmunohistoquímica de doble marca teñido con DAPI (azul) FITC (verde) WGA y con Rodamina (rojo) P-tau-Tre-231. En A se encuentra el grupo control, en B se encuentra el grupo de STZ, en C se encuentra el grupo de $A\beta$ +STZ y por último en D se ve el grupo de $A\beta$.

En el grupo de vehículos se ve moderada expresión a nivel de giro dentado y del hilio del hipocampo en los estratos IV y V con predominante O-GlcNAc aun que discreta expresión de fosforilación a nivel de células piramidales. En el grupo de STZ se ve expresión de O-GlcNAc así como en el hilio hipocampal, con leve fosforilación con discreto impacto en células granulosas y moderada

fosforilación a nivel de neuronas piramidales de las células granulosas implicando los estratos IV, V y VI. En el grupo de A β -STZ se encontró de moderada a alta expresión de O-GlcNAc así como leve en el hilio hipocampal, con escasa fosforilación con alta expresión de fosforilación en células granulosas y alta fosforilación a nivel de neuronas piramidales implicando los estratos V, VI y VII. En el grupo de A β se ve leve expresión de O-GlcNAc así como moderada hiperfosforilación en el hilio hipocampal, con leve fosforilación con alto impacto en células granulares y moderada fosforilación y escasa O-GlcNAc a nivel de neuronas piramidales CA4 implicando los estratos V, VI y VII.

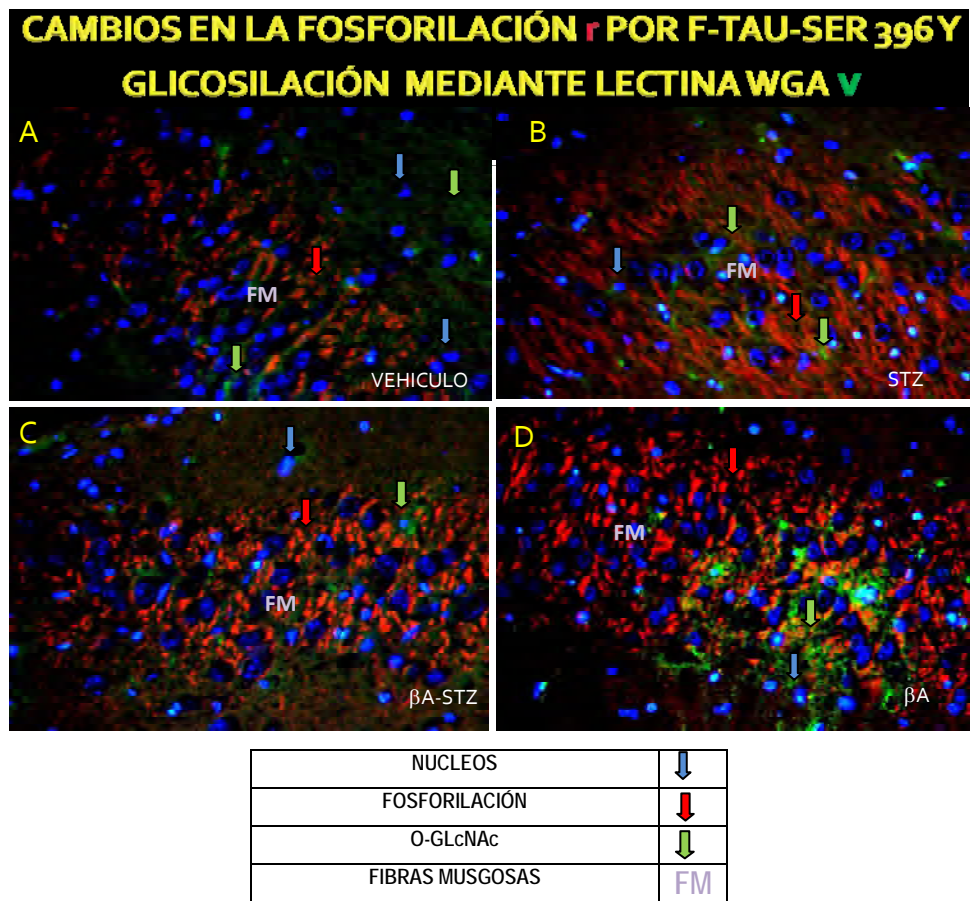


Figura 16. Microscopia de fluorescencia del giro dentado con un aumento de 40X y mediante inmunohistoquímica de dobles marcas teñido con DAPI (azul) FITC (verde) WGA y con Rodamina (rojo) P-tau-Tre-396. En A se encuentra el grupo control, en B se encuentra el grupo de STZ, en C se encuentra el grupo de A β +STZ y por ultimo en D se ve el grupo de A β .

En el grupo de vehículos se ve moderada expresión a nivel de giro dentado y del hilio del hipocampo en los estratos IV y V con predominante O-GlcNAc aun que discreta expresión de fosforilación a nivel de células piramidales. En el grupo de STZ se ve expresión de O-GlcNAc así como en el hilio

hipocampal, con leve fosforilación con discreto impacto en células granulosas y moderada fosforilación a nivel de neuronas piramidales de las células granulosas implicando los estratos IV, V y VI. En el grupo de A β -STZ se encontró de moderada a alta expresión de O-GlcNAc así como leve en el hilio hipocampal, con escasa fosforilación con alta expresión de fosforilación en células granulosas y alta fosforilación a nivel de neuronas piramidales implicando los estratos V, VI y VII. En el grupo de A β se ve leve expresión de O-GlcNAc así como moderada hiperfosforilación en el hilio hipocampal, con leve fosforilación con alto impacto en células granulares y moderada fosforilación y escasa O-GlcNAc a nivel de neuronas piramidales CA4 implicando los estratos V, VI y VII.

El anticuerpo específico para la P-Ser 396, se ve mayor expresión a nivel de las células musgosas del la capa VI, y a nivel de los estratos lacunares capa V, en todos los grupos pero con gran expresión en el grupo de A β +STZ , moderada para el grupo de STZ y A β , siendo ligera para el grupo de vehículos con afectación de las fibras musgosas que forman parte de la entrada de la vías penetrantes de la información, mientras la expresión de O-GlcNAc mediante la lectina WGA, se encuentra en los cuatro grupos pero es mayor en los vehículos y A β (Fig. 15 y 16 Tabla 3).

CAMBIOS EN LA FOSFORILACIÓN \uparrow POR F-TAU-SER 396 Y GLICOSILACIÓN WGA \downarrow					
GRUPO	O-GlcNAc	FOSFORILACION	CAMBIOS EN CÉLULAS GRANULOSAS	CAMBIOS EN NEURONAS PIRAMIDALES	AREA AFECTADA
VEHÍCULO	+++ EN HILIO DE CA ₄ +	++ EN HILIO DE CA ₄ +++	+++ GLICOSILACIÓN FOSFORILACION	++ GLICOSILACIÓN	CA ₄ ESTRATOS 4, 5 Y 7
STZ	+ EN HILIO DE CA ₄ ++	+++ EN HILIO DE CA ₄ +++	++++ FOSFORILACIÓN ++ GLICOSILACIÓN	+++ FOSFORILACIÓN	CA ₄ ESTRATOS 5, 6 Y 7
A β +STZ	+++ EN HILIO DE CA ₄ ++	+ EN HILIO DE CA ₄ +++	++++ FOSFORILACIÓN ++ GLICOSILACIÓN	++++ FOSFORILACIÓN	CA ₄ ESTRATOS 5, 6 Y 7
A β	++++ EN HILIO DE CA ₄ ++++	++ EN HILIO DE CA ₄ ++++	+++ FOSFORILACIÓN ++ GLICOSILACIÓN	++ GLICOSILACIÓN	CA ₄ ESTRATOS 5, 6 Y 7

MARCA	SIGNIFICADO	++	LEVE EXPRESION
	SIN EXPRESION	+++	MODERADA EXPRESION
+	ESCALA EXPRESION	++++	ELEVADA EXPRESIÓN

Tabla 3.

12.5. Cambios en la O-GlcNac y fosforilación por P-tau Ser 404.

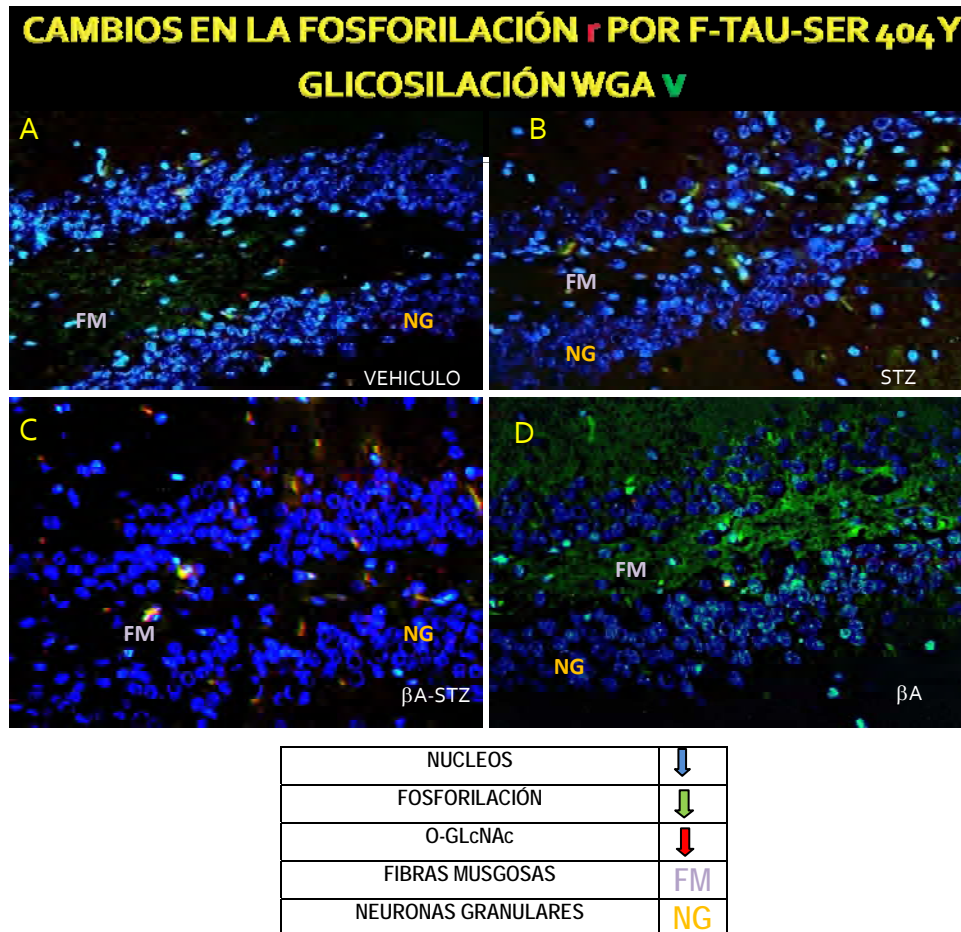


Figura 17. Microscopia de fluorescencia del giro dentado con un aumento de 40X y mediante inmunohistoquímica de doble marca teñido con DAPI (azul) FITC (verde) WGA y con Rodamina (rojo) P-tau-Tre-231. En A se encuentra el grupo control, en B se encuentra el grupo de STZ, en C se encuentra el grupo de A β +STZ y por ultimo en D se ve el grupo de A β . En el grupo de vehículos se ve una leve expresión de O-GlcNac y escasa fosforilación con discreto impacto en células granulosas y escasa O-GlcNac a nivel de neuronas piramidales de CA4, implicando los estratos VI y VII. En el grupo de STZ se presenta expresión de O-GlcNac y leve fosforilación tanto en células granulosas de CA4 como en neuronas piramidales. En el grupo de A β -STZ presenta moderada a alta expresión de O-GlcNac y escasa fosforilación tanto en células granulosas como en neuronas piramidales de CA4 implicando los estratos V, VI y VII. En el grupo

de A β presenta leve expresión de O-GlcNAc y escasa expresión de fosforilación alta en células granulosas y leve O-GlcNAc en neuronas piramidales impactando estratos V, VI y VII.

En el caso de del anticuerpo específico para la P-Ser 404 hay una menor actividad en comparación con los otros dos anticuerpos, pero hay leves cambios en el grupo de STZ y A β +STZ donde a nivel de las fibras musgosas se ve mayor fosforilación mientras en los demás grupos se da en muy bajo grado, siendo más notoria la O-GlcNAc tanto en el grupo de los vehículos como el del A β , en comparación con los de STZ y A β +STZ (Fig. 17 Tabla 4.)

CAMBIOS EN LA FOSFORILACIÓN r POR F-TAU-SER 404 Y GLICOSILACIÓN WGA V					
GRUPO	O-GlcNAc	FOSFORILACION	CAMBIOS EN CÉLULAS GRANULOSAS	CAMBIOS EN NEURONAS PIRAMIDALES	AREA AFECTADA
VEHÍCULO	++	+	++ GLICOSILACIÓN	+ GLICOSILACIÓN	CA ₄ ESTRATOS 6Y 7
STZ	++	++	++ GLICOSILACIÓN	+ FOSFORILACIÓN	CA ₄ ESTRATOS 6Y 7
A β +STZ	+++	+	+++ FOSFORILACION	++ GLICOSILACIÓN	CA ₄ ESTRATOS 5, 6Y 7
A β	++++	+	++++ FOSFORILACIÓN	+ + GLICOSILACIÓN	CA ₄ ESTRATOS 5, 6Y 7

MARCA	SIGNIFICADO	++	LEVE EXPRESION
	SIN EXPRESION	+++	MODERADA EXPRESION
+	ESCASA EXPRESION	++++	ELEVADA EXPRESIÓN

Tabla 4.

12.6. Cambios en la expresión de la OGT y de la GSK-3 β .

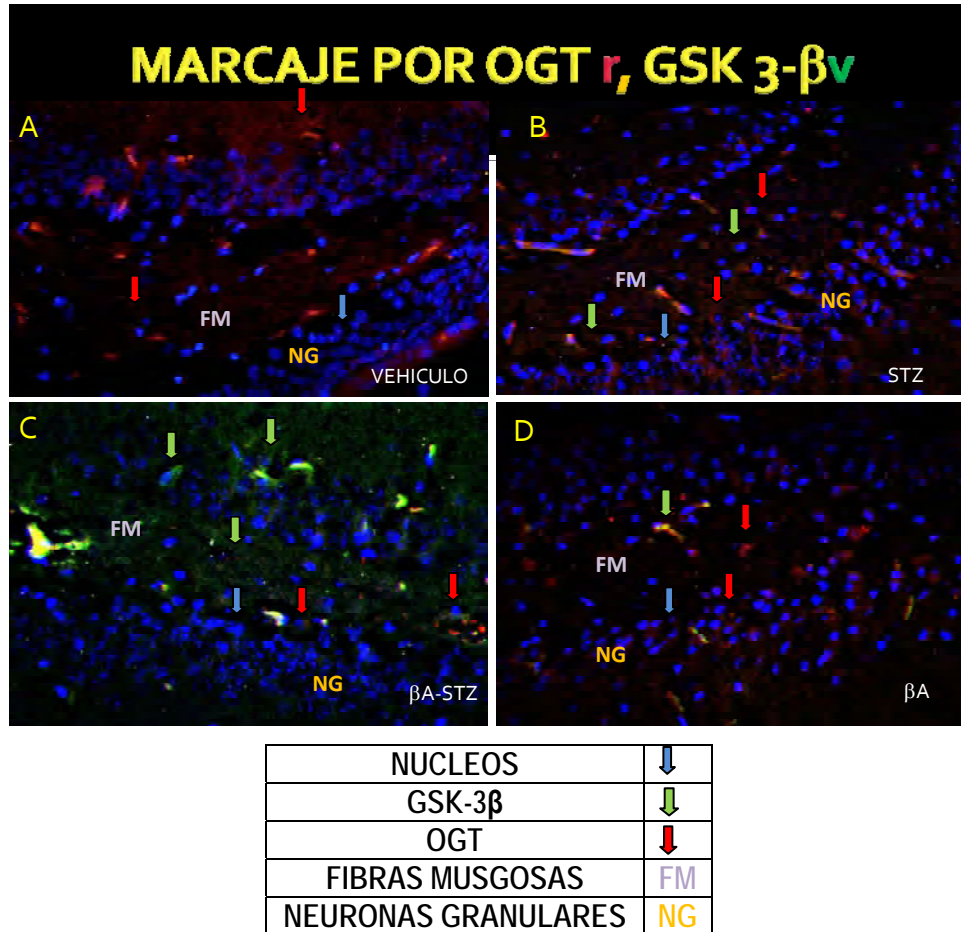


Figura 18. Microscopia de fluorescencia del giro dentado con un aumento de 40X y mediante inmunohistoquímica de doble marca teñido con DAPI (azul), FITC (verde) para GSK-3 β y con Rodamina (rojo) para OGT. En A se encuentra el grupo control, en B se encuentra el grupo de STZ, en C se encuentra el grupo de A β +STZ y por último en D se ve el grupo de A β . En el caso de los vehículos, para OGT se ve una moderada actividad, con leve actividad en fibras musgosas de CA4 y moderada actividad en neuronas piramidales impactando estratos VI y VII. Para GSK 3 β se ve una leve expresión, con leve actividad en células granulosas y mínima actividad en neuronas piramidales impactando estratos VI y VII. En el caso del grupo de STZ, para OGT se ve una moderada actividad, con leve actividad en fibras musgosas y modelada actividad en neuronas

piramidales de CA4 impactando estratos VI y VII. Para GSK 3 β se ve una leve expresión, con leve actividad en células granulosas y mínima actividad en neuronas piramidales de CA4 impactando estratos VI y VII. En el caso del grupo de A β +STZ, para OGT se ve una escasa actividad, con leve actividad en fibras musgosas de CA4 y escasa actividad en neuronas piramidales impactando estratos V, VI y VII. Para GSK 3b se ve una alta expresión, moderada actividad en células granulosas y moderada actividad en neuronas piramidales impactando estratos V, VI y VII. En el caso del grupo de A β , para OGT se ve una moderada actividad, con leve actividad en células granulosas y modelada actividad en neuronas piramidales impactando estratos V, VI y VII. Para GSK 3b se ve una escasa expresión, con leve actividad en células granulosas y mínima actividad en neuronas piramidales impactando estratos V, VI y VII.

En el caso de los anticuerpos contra OGT y se muestra actividad para el grupo de vehículo, A β y en STZ mientras que en el caso de A β +STZ es muy reducida lo contrario de lo que ocurre con la GSK-3 β donde hay actividad para el grupo de A β +STZ pero escasa para los otros tres grupos de predominio en el espacio de las células granulosas capa VI y en el estrato lacunosum capa V. (Fig.18 Tabla 5)

MARCAJE POR OGT \uparrow, GSK 3-β \downarrow					
GRUPO	OGT	GSK 3- β	CAMBIOS EN CÉLULAS GRANULOSAS	CAMBIOS EN NEURONAS PIRAMIDALES	AREA AFECTADA
VEHÍCULO	+++	++	++	+ ++ OGT	CA ₄ ESTRATOS 6 Y 7
STZ	+++	+	++	+ ++ OGT	CA ₄ ESTRATOS 5, 6 Y 7
A β +STZ	+	++++	+++	+++ GSK 3- β	CA ₄ ESTRATOS 5, 6 Y 7
A β	+++	+	++	+++ OGT	CA ₄ ESTRATOS 5, 6 Y 7

MARCA	SIGNIFICADO	++	LEVE EXPRESION
	SIN EXPRESION	+++	MODERADA EXPRESION
+	ESCASA EXPRESION	++++	ELEVADA EXPRESIÓN

Tabla 5.

14.- DISCUSION

Alrededor de 4 a 6 millones de nuevos casos de demencia se van a agregar cada año, (Libre *et al.*, 2008). Se sabe que tanto la Enfermedad de Alzheimer como la Diabetes mellitus (DM) son las enfermedades crónico-degenerativas más prevalentes en sociedades occidentales (Arvanitakis *et al.*, 2004).

Uno de los principales factores de riesgo para estas enfermedades es la edad. Recientes estudios describen que los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) tienen de un 30-65% de riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer (Ho *et al.*, 2004). Por lo que nosotros proponemos un modelo que conjunta la toxicidad del A β 25-35, ya que presenta componentes neurotóxicos asociados con agregación del péptido, pérdida neuronal, disminución de acetil colina y alteraciones de memoria (Butterfield y Lauderback, 2002; Mattson, 1999).

El implementar alteraciones metabólicas como puede ser mediante el empleo de STZ que anteriormente ha sido utilizado, como un modelo de inducción de cambios metabólicos asociados a hiperglicemia.

La administración de STZ periférica da mínima toxicidad directa nivel de SNC, por lo que la administración de estreptozotocina periférica induce hiperglicemia generando un modelo para investigar los roles de la disfunción metabólica en asociación con el AB y su asociación con la EA (Kanter *et al.*, 1990).

Se ha demostrado que los cerebros de las personas mayores, disminuyen la actividad de la vía de la hexocinasa a partir de los 65 años (Schubert, 2005), lo que reduce la actividad de vías metabólicas como la vía biosintética de las hexosaminas, donde el metabolito final de ésta es el Uridin di fosfo N-

Acetil Glucosamina (UDP-GlcNAc), que es el donador común de la O-glicosilación intranuclear y citoplasmática de O-GlcNAc, mediante una O-GlcNAc transferasa (OGT), (Butterfield y Lauderback, 2002 ; Mattson, 1999).

Lo anterior explica la disminución de la expresión de O-GlcNAc en nuestros tejidos manipulados mediante STZ, favoreciendo la disponibilidad de sitios susceptibles de fosforilación porque, la OGT une el azúcar a los residuos de serina y treonina de la proteína tau, de manera análoga a la fosforilación de estos residuos, determinados por secuencias primer de fosforilación (Butterfield y Lauderback, 2002 ; Mattson, 1999). Lo que concuerda con nuestro modelo donde se aumenta la presencia de proteínas fosforiladas en asociación con la disminución de O-GlcNAc.

Las lectinas han sido empleadas como herramientas en la identificación de residuos de carbohidrato, incluso, la presencia de residuos de GlcNAc específicos para la lectina *Triticum vulgare* (WGA) que ha sido empleada para marcar residuos de O-GlcNAc asociados con la proteína tau (Liu *et al.*, 2006). Por lo que en nuestro modelo se empleó la lectina WGA para identificar la presencia de O-GlcNAc como estrategia para estudiar los cambios, en el SNC.

En la EA la neurodegeneración neurofibrilar, contribuye a la patogénesis molecular de esta enfermedad (Riley *et al.*, 2002).

La disminución de la utilización de glucosa en pacientes con EA se ha asociado con alteraciones en la memoria, por alteraciones en la capacidad de transporte para la glucosa (Kalaria *et al.*, 1989). La STZ, se ha empleado para inducir diabetes mellitus en modelos animales experimentales mediante sus efectos tóxicos sobre las células β pancreáticas (Lewis *et al.*, 1959; Herr *et al.*, 1967).

La STZ induce la destrucción de las células beta pancreáticas generando elevaciones crónicas de los niveles de glucosa de manera dosis-dependiente. Lo que nos permitió emplear dosis suficientes para generar alteraciones en el metabolismo de la glucosa, sin generar cambios marcados el

metabolismo, que generen daño por mecanismos asociados con producción masiva de cuerpos cetónicos desbalance hidroelectrolítico.

El peso de los animales mostro un aumento, parcial no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($F(3,115)=1.075$, $p<0.363$), media pesos superior que en el grupo de $A\beta$ +STZ manteniendo valores semejantes entre las medias del grupo de vehículos de 270 g y amiloide- β de 268 g, sin embargo en el grupo de solo estreptozotocina se tienen pesos con una media de 265 g mientras en el caso de $A\beta$ +STZ es de 263 g.

La STZ a nivel de barrera hematoencefálica reduce un 44% de su transporte por la BHE y también incrementa el transporte de cuerpos cetónicos (Matthaei *et al.*, 1986). La administración de STZ periférica da mínima toxicidad directa nivel de SNC, por lo que la administración de estreptozotocina periférica induce hiperglicemia generando un modelo para investigar los roles de la disfunción metabólica en asociación con el AB y su asociación con la EA (Kanter *et al.*, 1990).

En la mediciones de glucosa realizadas se comprobó la existencia de cambios metabólicos, en los animales se encontraron diferencias significativas ($p= .000$ $F(3,115)= 31.93$). Aunado a esto es importante señalar que en el caso del grupo de Estreptozotocina la media de glucosa superior que en el grupo de $A\beta$ +STZ manteniendo valores semejantes entre las medias del grupo de vehículos de 92.44 mg/dl y amiloide- β de 90.12 mg/dl, sin embargo en el grupo de solo estreptozotocina se tienen glucosas con una media de 376.06 mg/dl mientras en el caso de $A\beta$ +STZ es de 236.35 mg/dl.

Se encuentran cambios en los niveles de glicemia en los diferentes grupos que son estadísticamente significativos en entre el grupo de STZ sola, se encuentra una media de glucosa 139.71 mg/dl más alto que el grupo al cual se le administró $A\beta$ +STZ, lo que es interesante ya que el grupo de amiloide, solo presenta niveles de glucosa semejante al de los controles, es decir que no favorece condiciones de hipoglicemia.

En trabajos de Souceck, en el 2003, describen un modelo sobre cultivos celulares donde, se demuestra que el A β , juega un papel neuroprotector donde sobre activan, vías glucogénicas como la vía de la hexosamina, la vía de la glucosa 6 fosfato, y piruvato cinasa, donde se ve que las células expuestas a A β lograron aumentar la actividad de estas vías (Souceck, 2003). Nosotros pensamos que esto podría estar ocurriendo en nuestro grupo de A β +STZ, ya que aun y cuando los niveles de glucosa se mantuvieron superiores a los 200mg/dl, fueron menores que el grupo que solo fue expuesto a STZ .

La disminución de la utilización de glucosa en pacientes con EA se ha asociado con alteraciones en la memoria, por alteraciones en la capacidad de transporte para la glucosa (Kalaria *et al.*, 1989).

La distribución jerárquica de las lesiones de marañas neurofibrilares en la EA son la amígdala, la formación hipocampal, el giro parahipocampal, y en la corteza de asociación temporal (Riley, *et al* 2002).

En la EA, las lesiones más severas se encuentran en la corteza entorrinal, en la región cuerno de Amon 1 (CA1), y en el subínculo del hipocampo, la amígdala y otras áreas altas de la corteza de asociación en el lóbulo temporal. (Brun y Gustafson, 1976; Arnold *et al.*, 1991; Graham and Lantos, 1997).

En el hipocampo, se presenta una pérdida progresiva de neuronas, principalmente en la región de CA1 que afectan, las neuronas proyectivas y a interneuronas, generando una reducción en las aferencias entorrinales. En la corteza cerebral, existe una afectación, de todos los lóbulos cerebrales, pero principalmente en el temporal y las neuronas piramidales del hipocampo (Berrios, 1990).

Estos cambios son semejantes a los ocasionados tanto en el grupo de STZ, como de A β , siendo más importantes en el grupo de STZ+A β . En el caso de las modificaciones morfológicas en los

experimentos con microscopia de luz nos muestran alteraciones de estructura, distribución y alteraciones en la citoarquitectura (fig. 12, 13 y 14).

En estudios postmortem de los cerebros de pacientes con EA, se ve una disminución del peso de entre 300 a 400 g, en el volumen y espesor de la corteza cerebral, dando mayor profundidad en los surcos, con circunvoluciones más pronunciadas y ventrículos dilatados (*Berg y McKeel, 1998*).

En los grupos control, se aprecia que las estructuras celulares, guardan una distribución y volumen semejante en el área de CA1, CA3 y Giro dentado, donde la morfología celular es adecuada y permanecen los núcleos centrales y con los procesos dendríticos, se mantiene con adecuado orden y estructura, mientras que en los grupos de estreptozotocina, se encuentran datos de disminución del volumen de los cuerpos celulares. Los núcleos se encuentran orientados a la periferia y hay ruptura de los procesos dendríticos, con pérdida de la distribución de los cuerpos celulares, condensación de los cuerpos neuronales de las células piramidales. En CA3, hay una marcada esponjiosis, así como desorganización de los cuerpos neuronales, con alteración en la organización celular y distribución de los núcleos hacia la periferia. En la región de CA1, se mantiene la citoarquitectura pero se encuentran cambios a nivel de la distribución celular con núcleos a la periferia y se conserva la distribución de las fibras dendríticas (Figs. 12, 13 y 14 Tabla1). Lo que podría semejar a los cambios encontrados en pacientes con EA, donde existe una afectación a poblaciones neuronales, dañando gravemente la corteza cerebral, la corteza entorrinal, y parahipocampal (Berrios, 1989).

Con lo que respecta a los grupos de amiloide- β más estreptozotocina, se ven datos de pérdida de la citoarquitectura, con ausencia de cuerpos neuronales, con ruptura de fibras dendríticas y ligera condensación de los cuerpos neuronales. El daño en el grupo del giro dentado presenta pérdida de los cuerpos neuronales, cambios en la citoarquitectura y ruptura de las fibras a nivel de las células

granulosas y musgosas, además de condensación en los escasos cuerpos neuronales (Figs. 12, 13 y 14; Tabla1).

Lo que podía ser el inicio de los cambios, como los encontrados en la EA en el hipocampo, que presenta una pérdida progresiva de neuronas, principalmente en la región de CA1 que afectan, las neuronas proyectivas y a interneuronas, generando una reducción en las aferencias entorrinales. Que hay que recordar que forman parte de la vía perforante que lleva las fibras de la corteza entorrinal hacia el giro dentado (Fig.6).

En la corteza cerebral existe una afectación de todos los lóbulos cerebrales, pero principalmente en el lóbulo temporal y las neuronas piramidales del hipocampo (Berrios, 1990). Lo que podría explicar también, los cambios que encontramos en el área correspondiente a CA3, estimando la pérdida de los cuerpos neuronales, ruptura de las fibras dendríticas y espongiosis como factores que alteran la citoarquitectura. En la región de CA1, se localiza, ruptura y desorganización de las fibras musgosas y granulares con una disminución en la organización de los procesos dendríticos, con ausencia de cuerpos neuronales (Figs. 12, 13 y 14 Tabla1).

En la EA, muestra que el patrón de las placas seniles es más uniforme y se asocia con las cortezas en general, siendo la más importante, la corteza sensorial primaria y las cortezas motoras. Las estructuras del lóbulo ttemporo medial, incluyendo la formación hipocampal donde se encuentran menos afectadas, por las placas seniles que las áreas neocorticales.

Las placas seniles frecuentemente ocurren en la lámina molecular del giro dentado, la zona terminal de la vía perforante, (Lain *et al.*, 2006), lo que concuerda con los cambios encontrados en el grupo de amiloide- β se ven cambios en la distribución de los núcleos, con espongiosis y presencia condensación de los cuerpos neuronales, en el Giro dentado, hay pérdida de los cuerpos neuronales, mientras en la región de CA3 hay datos de espongiosis, en la región de CA1 se ve condensación de los cuerpos neuronales (Figs. 12, 13 y 14. Tabla1).

En los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer se han encontrado alteraciones metabólicas que se encuentran asociadas con la vía de la hexosinasa, donde la UDP-GlcNAc que se encarga de donar O-GlcNAc a los residuos de serina y treonina de la proteína tau que se ve disminuida en pacientes con EA (Liu, *et al* 2002a).

Estos cambios favorecen cambios sobre los residuos de serina y treonina lo que modifica la existencia de O-GlcNAc. En nuestro modelo los vehículos tienen actividad de glicosilación a nivel de la región granular del hilio del hipocampo, en el estrato granuloso y un poco más expresado en el estrato molecular, con glicosilación notoria en el tejido de células granulosas.

Se encuentra presencia de fosforilación citoplasmática discreta en la periferia de los cuerpos celulares de las células granulosas en las regiones.

En el grupo de STZ, se encuentra expresión de O-GlcNAc y leve fosforilación a nivel de región granular del hilio del hipocampo, leve glicosilación en las células granulosas, y escasa en células piramidales en estratos IV y V.

El patrón distintivo de las marañas neurofibrilares, ocurre en una distribución laminar con algunas laminas severamente afectadas como las laminas de la corteza entorrinal, II y IV, en el grupo de estreptozotocina se encuentran cambios en los niveles de glicosilación a nivel del estrato IV y V mientras en la EA con una amplia línea de protección, que contenía marañas neurofibrilares pero en las laminas III y IV son relativamente pocas, opuesto a lo visto en el grupo de STZ, A β +STZ y A β .

En la corteza de asociación, las neuronas piramidales en las láminas II, III y V son muy afectadas de similar forma (Lain *et al.*, 2006), mientras en nuestro modelo sólo se ve afección de los estratos IV y V.

Al marcar con la lectina de germen de trigo WGA que marca O-GlcNAc en el carril verde encontramos que para el grupo control es en el que mayor expresión de la O-GlcNAc tiene, en el grupo de A β , se ve una mayor expresión de la O-GlcNAc, mientras la expresión es menor.

En el grupo de STZ y de A β +STZ en la cual, se ve una menor expresión a nivel de los cuerpos de las neuronas piramidales, lo que es de esperarse ya que al reducir los niveles de insulina, se translocan los receptores de GLUT 1, y 3 lo que reduce las concentraciones de UDP-GlcNAc, disminuyendo la disponibilidad de O-GlcNAc.

En la enfermedad de Alzheimer (EA), hay datos de que existen 40 o más sitios de fosforilación aislados de cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer, estudios cinéticos *in vitro* de las fosforilaciones fisiológicas de tau sugieren que Ser199/Ser202/Thr205, Thr212, Thr231/Ser235, Ser262/Ser356, y Ser422 (Liu *et al.*, 2008).

En nuestro estudio se decidió estudiar la Tre231, a la Ser 396 y a la Ser 404, ya que se han visto implicadas en el inicio de futuras fosforilaciones en Thr231, Ser396, y Ser422 promueven la autoagregación de tau dentro de marañas neurofibrilares, (Liu *et al.*, 2006).

En el caso del anticuerpo específico para la P-Tre 231, se encuentra expresado en los cuatro grupos siendo mayor en el grupo de A β +STZ, siendo predominante en los márgenes de las fibras musgosas y en el área de las capas de las células granulares del giro dentado, que pertenecen a las vías de aferentes de la información (Fig.14 Tabla 2).

En los estudios de Clodfelder-Miller *et al.*, 2003, a los tres días de iniciado el tratamiento con estreptozotocina se ve un amplio incremento de la fosforilación en áreas de la corteza cerebral e hipocampo incluyendo treonina 231, serina 396 y 404 donde la treonina-231 se considera inductora de la hiperfosforilación de tau (Buffie J *et al.*,2003). Esto podría explicar el incremento de la actividad de esta serina en el modelo, y a su vez podría estar facilitando la activación de otros residuos en nuestro caso sobre todo, en el caso de la Tre-396.

En estos grupos se ven cambios en el estrato V lo que coincide con cambios mostrados en pacientes con EA, que muestran cambios en la corteza de asociación, las neuronas piramidales en las láminas II, III y V son muy afectadas de similar forma (Lain *et al.*, 2006). Los sitios de tau (Thr

231 y Ser 396) se encontraban altamente fosforiladas en etapas del desarrollo embrionario, que después del día 19 posnatal, hasta la edad de los 24 meses, en estas regiones se normalizan hasta prácticamente no ser aparentes en etapas posnatales en ratas normales (Yang Yu et al., 2009).

En el caso de cerebros de pacientes con Alzheimer estas regiones se encuentran importantemente hiperfosforiladas (Gong *et al.*, 2006; Yang Yu *et al.*, 2009; Liu Y *et al.*, 2009). En nuestro trabajo encontramos que la Tre 231 se encuentra sobre expresada en el grupo de A β +STZ y de STZ, encontrándose presente en los vehículos y en el grupo de A β , sin embargo, en estos dos grupos se encuentra una mayor expresión de la lectina WGA.

Tau es hiperfosforilada durante el desarrollo embrionario y en los periodos posnatales tempranos, algunos sitios de fosforilación incluyen Thr181, Ser198, Ser199, Ser202, Thr217, Thr231, Ser235, Ser396, Ser400, Thr403, Ser404 y Tyr394 que son algunos de los sitios que se encuentran en neuronas con degeneración en la enfermedad de Alzheimer (Liu et al., 2004b).

En el modelo con asociación a la Fosfo Ser 396 el grupo de vehículos se ve moderada expresión a nivel de giro dentado y del hilio del hipocampo en los estratos IV y V con predominante O-GlcNAc aun que discreta expresión de fosforilación a nivel de células piramidales.

En el caso del anticuerpo específico para la P-Ser 396, se ve mayor expresión a nivel de las células musgosas de la capa VI, y a nivel de los estratos lacunares capa V, en todos los grupos pero con gran expresión en el grupo de A β +STZ, moderada para el grupo de STZ y A β , siendo ligera para el grupo de vehículos con amplia afectación de las fibras musgosas que forman parte de la entrada de la vías penetrantes de la información, mientras la expresión de O-GlcNAc mediante la lectina WGA, se encuentra expresada en los cuatro grupos pero es mayor en el grupo de los vehículos y A β (Fig. 15 y 16 Tabla 3).

El grupo de P-Ser 396 se ve mayormente expresado en los grupos de pacientes con enfermedad de Alzheimer que puede sobre expresarse de 10 y hasta 100 veces más (Liu *et al.*, 2007) lo que

contribuye a la pérdida biológica de actividad, favoreciendo la polimerización en marañas neurofibrilares al exponer la actividad del carboxilo terminal de la Ser 396, Ser 404 y Ser 422 que son altamente fosforilados en la enfermedad de Alzheimer.

Mientras se encuentra sólo de ligera a moderada fosforilación en los estadios de desarrollo embrionarios, lo que puede favorecer que tau se agregue en marañas neurofibrilares. En consistencia con estos hallazgos in vitro la fosforilación de los residuos carboxilo terminales es mediado por la GSK-3 β , lo que promueve su auto-agregación (Liu et al., 2007).

En nuestro trabajo se encuentra un aumento en la expresión de Ser 396, que se correlaciona con el aumento de la expresión de GSK-3 β en el grupo de A β +STZ mostrado por (Liu et al., 2007).

El grado y extensión de la fosforilación mediante proteín cinasas, es dependiente en un inicio de los primers (iniciadores) de fosforilación, donde Ser 396 es fosforilada después de Ser 400 (Li and Paudel., 2006).

En el caso de del anticuerpo específico para la P-Ser 404 hay una menor actividad, en comparación con los otros dos anticuerpos, pero hay leves cambios en el grupo de STZ y A β +STZ, donde a nivel de las fibras musgosas, se ve mayor fosforilación. En los demás grupos se da en muy bajo grado, siendo más notoria la O-GlcNAc tanto en el grupo de los vehículos como el del A β , en comparación con los de STZ y A β +STZ (Fig. 17 Tabla 4.)

Se ha encontrado que la proteína tau se encuentra hiperfosforilada en asociación con Diabetes y Alzheimer, localizándose cerca de 10 sitios de fosforilación de los cuales Thr 205 y 231 no se encontraron aumentados mientras que en la Ser 396 y Ser 404, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Ying Liu et al., 2009).

En nuestros resultados si se encontraron cambios en la Tre 231 y en Ser 396, pero la expresión de la Ser 404, es débil a diferencia de lo reportado por Liu et al., 2009. En nuestro trabajo la causa de la

baja actividad de Ser 404 podría estar relacionada con el tiempo ya que los cerebros se extrajeron a las cuatro semanas de la administración de Estreptozotocina.

Los anteriores resultados concuerdan con los de nuestro grupo en relación con lo mostrado por las células PC12 en el sentido de que no hay hiperfosforilación importante en los la serina 404 mientras que en los resultados de (Liu *et al.*, 2004), para tejidos de cerebros de rata se hiperfosforila para la Ser 404.

Se observó que la fosforilación de Ser396/Ser404 en la región carboxilo terminal, de tau mediante GSK-3 β estimula su actividad favoreciendo el ensamble de los microtúbulos.

En nuestro trabajo observamos un aumento importante de la fosforilación del grupo de A β +STZ y correlaciona con la alta actividad de GSK-3 β , en lo que respecta al grupo de Ser 396 pero no es así para la serina 404 donde la fosforilación es incipiente (Liu *et al.*, 2004).

La OGT se encuentra ampliamente distribuídas en el cerebro, mediante o-glicosilados se ha implicado en la regulación de cinasas, alterando niveles de transcripción (Liu *et al.*, 2006b).

En los anticuerpos contra OGT y se muestra actividad para el grupo de vehículo, A β y en STZ mientras que en el caso de A β +STZ es muy reducida lo contrario de lo que ocurre con la GSK-3 β donde hay actividad para el grupo de A β +STZ pero escasa para los otros tres grupos de predominio en el espacio de las células granulosas capa VI y en el estrato lacunosum capa V (Fig.18 Tabla 5).

Las modificaciones postransduccionales de proteínas por O-GlcNAc, impacta en la transcripción, transducción, tráfico de organelos, degradación proteosomal. La glicosilación ha sido implicada en el desarrollo de enfermedades humanas incluida la diabetes tipo II y la neurodegeneración, que requieren de la presencia de dos enzimas, O-GlcNAc-transferasa y la N-acetil glucosaminidasa (OGA), donde la O-GlcNAc sirve como un sensor de nutrientes, afectando la maquinaria celular en el sistema neuroendócrino y el sistema nervioso central. (Lazarus *et al.*, 2009; Brooke et al., 2009),

En el caso de los anticuerpos contra OGT y se muestra actividad para el grupo de vehículo, A β y en STZ mientras que en el caso de A β +STZ es muy reducida lo contrario de lo que ocurre con la GSK-3 β donde hay actividad para el grupo de A β +STZ pero escasa para los otros tres grupos de predominio en el espacio de las células granulosas capa VI y en el estrato lacunosum capa V. lo que asocia que en nuestro modelo el grupo de A β +STZ, se encuentre importantemente activada la Tre231 y la GSK3- β .

En mamíferos hay enfermedades que involucran bajos niveles de insulina periférica se asocian con resistencia a la insulina o diabetes tipo II que a nivel de sistema nervioso central favorece la neurodegeneración y se ha visto que la glicosilación tiene un rol muy importante en la neurodegeneración (Cohen and Dillin, 2008).

La GSK3 fue inhibida después del empleo de STZ lo que se determinó al comprobar la fosforilación en la serina 9 lo que inhibe su actividad (Liu *et al.*, 2006b). Lo que explica porque en el caso de nuestro estudio no se ve actividad de la GSK3 en el grupo de estreptozotocina, sin embargo, al encontrarse en combinación con el amiloide β , se ve un marcado aumento de su actividad, probablemente por permitir el aumento de actividad en la treonina 231 que activa nuevamente las cascadas de fosforilación, (Liu *et al.*, 2006b).

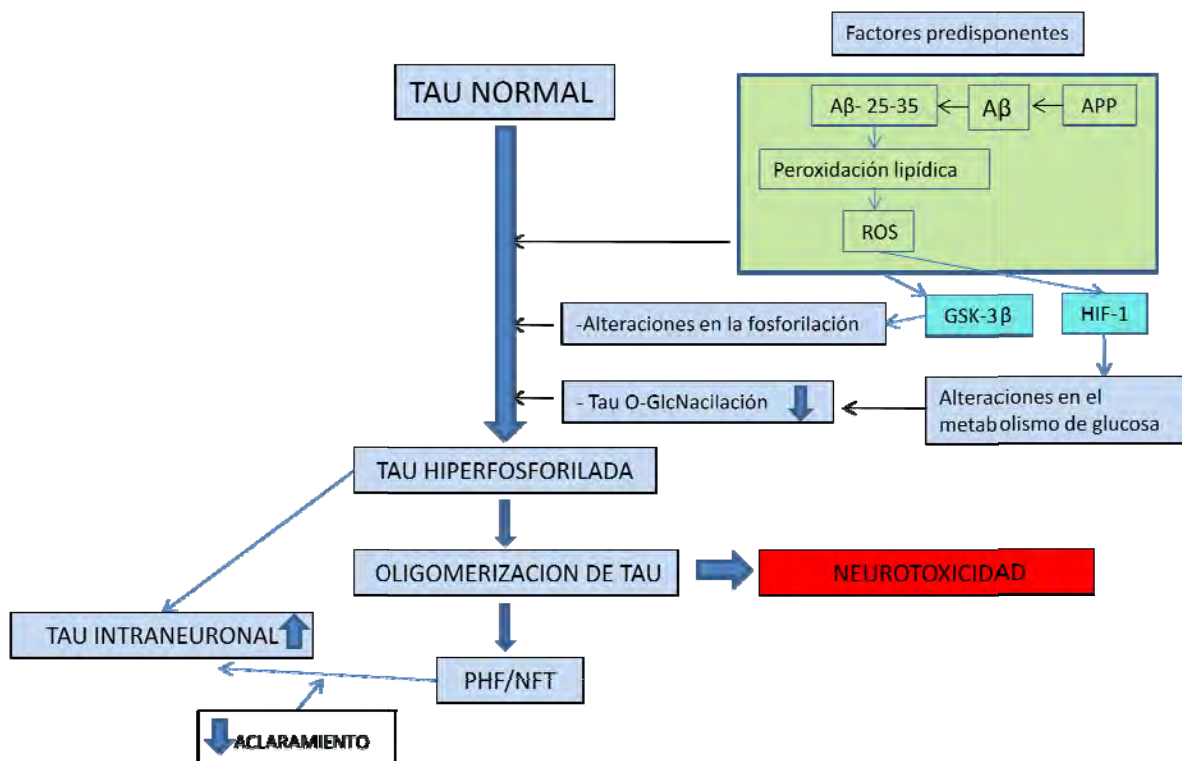
Las primeras fosforilaciones de tau se suelen dar en sitios como Ser198/199/202 y Thr231, que han demostrado ser fosforiladas por la GSK 3- β (Gong et al., 2005; Reynolds et al., 2000). Un inicio de fosforilación de tau en la Thr231 por GSK 3- β tiene un rol crítico en la regulación de la estabilización de microtubulos mediada por tau mediante la GSK 3- β (Liu et al., 2004b).

15.- CONCLUSIONES

Los cambios registrados en los niveles de glucosa entre los grupos nos explica, como la presencia de amiloide beta genera modificaciones en el manejo de glucosa.

Los cambios en la biodisponibilidad de glucosa a nivel de sistema nervioso central interfiere en la biodisponibilidad de O-GlcNAc, lo que origina que la actividad de la transferasa OGT, se encuentre disminuida en estos grupos, favoreciendo que cinasas como la GSK3- β , tanto por acción del amiloide beta como por la biodisponibilidad de sitios fosforilables, se active fosforilando residuos como el de la Ser 231 que ha mostrado ser un punto de inicio para comenzar las cascadas de fosforilación de otros residuos, lo que implica alteraciones a nivel del transporte axonal como se muestra en el rompimiento importante de las fibras de axones y de las fibras musgosas lo que predispone deurodegeneración.

Por lo que la acumulación de placas amiloides en asociación con alteraciones en el metabolismo de la glucosa es un importante facilitador de hiperfosforilacion.



19.- Conclusiones. Los cambios metabólicos favorecidos por la acción del amiloide- β , mediante la disminución de insulina periférica, generan una menor disponibilidad de N-

acetilglucosamina, lo que a su vez, reduce la actividad de la OGT, favoreciendo que residuos como la Tre231 estén más expuestos a las cinasas ,como la GSK3- β , que favorece la hiperfosforilación de más residuos, generando la hiperfosforilación de la proteína tau generando alteraciones del adecuado transporte axonal.

15.- PERSPECTIVAS

- Cuantificar el nivel de glicosilación y fosforilación por métodos de Western Blott.
- Determinar mediante Hibridación *in situ* la distribución de la OGT y la GSK-3.
- Valorar el modelo con administración de glicina.
- Valorar el modelo ante estados de hipoglicemia.
- Deglicosilar para ver la distribución de los carbohidratos.
- Valorar los cambios en la glicosilación a diferentes tiempos.

16.-ANEXOS

I.- Técnica de Hematoxilina y eosina para microscopía de luz en campo claro.

TECNICA DE TINCION

HEMATOXILINA Y EOSINA

Filtrar la hematoxilina previamente

Xilol 30 minutos

Alcohol-Xilol 30 minutos

Alcohol 100 I 3 minutos

Alcohol 100 II 3 minutos

Alcohol 96 I 3 minutos

Alcohol 96 II 3 minutos

Agua destilada

Hematoxilina 3 a 7 minutos

Lavado con agua corriente 2 lavados

Carbonato de litio

Lavar en agua corriente

Eosina 1 a 2 minutos

Lavado con agua corriente

Alcohol 70 lavado rápido

Alcohol 96 I lavado rápido

Alcohol 96 II lavado rápido
Alcohol 100 I 3 minutos
Alcohol 100 II 3 minutos
Alcohol-Xilol 3 minutos
Xilol I 3 minutos
Xilol II 3 minutos se pueden quedar hasta 24 hrs.
Poner resina y cubreobjetos

RESULTADOS

Núcleos, depósitos de calcio y bacterias.....Azul
Mucina, cartílago.....Azul pálido
Células sanguíneas, eosinófilos.....Rojos
Citoplasma.....Rojo

HEMATOXILINA DE HARRIS

Se pone a hervir 1000ml de agua destilada y ya que esta hirviendo se aleja del fuego y se le agrega 100grs. De Sulfato de aluminio y amonio, se disuelve bien en el agitador y se le agrega la Hematoxilina (5gr. de Hematoxilina se disuelven en 50ml de alcohol absoluto) y se pone a hervir nuevamente, una vez que hirvió de nuevo, se aleja del fuego y se le agrega 2.5 de Oxido Rojo de mercurio poco a poco y se vuelve a poner en el fuego hasta que tome un color morado oscuro. Después se enfría y se le agregan 30ml de acido acético concentrado y se filtra, una vez preparado se guarda en una botella ámbar y se pone en un lugar obscuro.

CARBONATO DE LITIO

Se usa en una solución concentrada a saturación se puede hacer a diferentes volúmenes.

EOSINA

Solución stock de eosina

Eosina o eosina amarillenta
Eosina stock.....5gr.
Agua destilada.....100ml
Alcohol de 96.....400ml

Solución de trabajo de eosina

3 partes de alcohol al 80
1 parte de eosina solución stock

II.- Técnica de Nissl para microscopía de luz en campo claro.

Método de violeta de cresilo de Vogt para Sustancia de Nissl

- Fijación en formol 10%
- Cortes de 6 a 10 micras
- Desparafinar e hidratar hasta 2º cambio de alcohol al 100% por 2 hrs.
- Se pasan a solución de violeta de cresilo de 40 a 60 min.
- Pasar rápidamente en alcohol al 96%
- Deshidratar en alcoholes graduales.
- Aclarar con xilol 2 cambios cada uno.
- Sustancia de Nissl- Púrpura intenso
- Núcleos- Púrpura.
- Fondo – Claro.

Soluciones:

Sol. Estabilizadora de acetato de sodio.

Acetato de sodio-2.0 gr

Agua destilada 1000ml

Ácido acético 3.0ml.

Sol. Matriz de violeta de cresilo – 2.0 gr

Violeta de cresilo 2.0 gr

Agua destilada 100ml.

Solución diaria de violeta de Cresilo.

Sol. Matriz de violeta de cresilo – 1ml

Sol. Estabilizadora 100ml.

III.- Inmunohistoquímica para microscopía de luz en campo claro.

TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA

1.- DESPARAFINADO Y REHIDRATACION DE LOS CORTES DE TEJIDO.

- Xilol por 10 minutos.
- Xilol por 5 minutos.
- Xilol-Alcohol (100%) (1:1) por 10 minutos.
- Alcohol 100% por 10 minutos.
- Alcohol 100% por 5 min.
- Alcohol 96% por 10 minutos.
- Alcohol del 96% por 5 min.
- Agua Corriente (máximo 5min.)

- 2.- ENJUAGUE CON BUFFER DE FOSFATOS, Ph 7.4 (PBS) POR 5 MINUTOS.
 - 3.- BLOQUEO DE LA PEROXIDASA ENDÓGENA:
 - Inmersión en Köplin con 1200µl de peróxido de hidrógeno en 150ml de agua desionizada por 15 minutos (500µl de peróxido de hidrógeno en 50ml de agua)
 - 4.- ENJUAGUE CON PBS (0.1M) POR 5 MINUTOS.
 - 7.- INMERSION EN SOLUCIÓN DE TRITÓN X-100 0.2%
 - Colocar 50ml de PBS y 100µl de Tritón. Mezclar
 - Dejar 10 min mínimo en el Köplin.
 - 8.- ENJUAGUE CON PBS POR 5 MIN (PBS Ca₂ 1mM+ PARA LECTINAS)
 - 9.- INCUBACIÓN CON EL PRIMER ANTICUERPO PRIMARIO diluido en albúmina al 1% o lectina biotinilada por 2hrs en cámara húmeda a 37°C.
 - 10.- Lavar con PBS por 5 minutos (PBS Ca₂ 1mM+ PARA LECTINAS).
 - 11.- Utilizar Kit Liquid DAB system (DakoCytomation, K3468). Bionina frasco Amarillo 1 gota durante 1h.
 - 12.- Realizar dos lavados con PBS por 5 min (PBS-Ca₂+ 1mM por 5 min en caso de lectina).
 - 13.- Utilizar Kit Liquid DAB system (DakoCytomation, K3468). Streptavidin HRP frasco rojo 1 gota por 30min.
 - 14.- Realizar lavado con PBS por 5 min (PBS-Ca₂+ 1mM por 5 min en caso de lectina).
 - 15.- Utilizar Kit Liquid DAB system (DakoCytomation, K3468). Revelado con diaminobencidina (DAB). Mezclar 1000µl de Buffer (frasco marrón Grande) y aplicar de inmediato 20µl de DAB (frasco pequeño marrón).
- NOTA: La DAB es un elemento tóxico carcinogénico que se absorbe por vía respiratoria y cutánea, por tanto el procedimiento se debe realizar con cubre-bocas, guantes y lentes teniendo precaución de no contaminarse. Los residuos de DAB así como el resultado del enjuague de la reacción DEBEN ser vertidos en una solución concertada de cloro.
- 16.- Enjuagar con agua destilada por 5 minutos.
 - 17.- Contraintinción de núcleos con Hematoxilina de Gill, aproximadamente por un minuto.
 - 18.- ENJUAGAR CON AGUA CORRIENTE.
 - 19.- DESHIDRATACIÓN DE LOS CORTES DE TEJIDO.
 - Alcohol 96% por 10 minutos.
 - Alcohol 96% por 5 minutos.
 - Alcohol 100% por 5 min
 - Alcohol 100% por 10 min
 - Xilol-Alcohol (100%) (1:1) por 10 minutos
 - Xilol por 5 minutos.
 - Xilol por 10 minutos.
 - 20.- Montado de las preparaciones en resina Hidrofóbica.

IV.- Inmunohistoquímica para microscopía de fluorescencia.

TECNICA DE INMUNIHISTOQUIMICA DE TRIPLES MARCAS ANTICUERPO

1.- DESPARAFINADO Y REHIDRATACION DE LOS CORTES DE TEJIDO.

- Xilol por 10 minutos.
- Xilol por 5 minutos.
- Xilol-Alcohol (100%) (1:1) por 10 minutos.
- Alcohol 100% por 10 minutos.
- Alcohol 100% por 5 min.
- Alcohol 96% por 10 minutos.
- Alcohol del 96% por 5 min.
- Alcohol al 80% por 10 min.
- Alcohol al 70% por 10 min.

2.- ENJUAGUE CON BUFFER DE FOSFATOS, Ph 7.4 (PBS) POR 5 MINUTOS.

3.- RECUPERACION ANTIGÉNICA (OPCIONAL Y DEPENDE DE LA FIJACIÓN DEL TEJIDO AL TEÑIR).

- Colocar en köplin de plástico las laminillas, agregar 50ml de buffer de citratos (Amortiguador de citratos 10mM, pH6).
- Solución stock ácido: 0.1M de ácido cítrico.
- Solución stock básico: 0.1M de citrato de sodio.
- Solución de trabajo: 9ml de solución A, 41ml de solución B, llevar a 500nl con agua desionizada. Se almacena en refrigeración entre 2 y 8°C.
- En el horno de microondas se coloca el Köplin abierto dentro de un recipiente con agua.
- Se deja hervir durante 3:30min.
- Se deja enfriar a temperatura ambiente o sumergida en agua fría durante 5 min.

4.- ENJUAGUE CON PBS (0.1M) POR 5 MINUTOS.

5.- INMERSION EN ALBUMINA LIBRE DE IgG 2% (EN PBS) 2g de albumina en 1 ml

- Secar las laminillas, en especial alrededor del corte
- Marcar con plumón hidrofóbico alrededor de la muestra.
- Colocar dentro de la cámara húmeda.
- Colocar 150µl de albúmina a cada corte, cubriendo la muestra hasta los bordes internos del marcador.
- Dejar 20 min mínimo en la cámara húmeda cerrada a temperatura ambiente.
- Agregar 20 mg por cada mililitro de PBS para albumina 2%

6.- ENJUAGUE CON PBS POR 5 MIN.

- 7.- INMERSION EN SOLUCIÓN DE TRITÓN X-100 0.2%
 - Colocar 50ml de PBS y 100µl de Tritón. Mezclar
 - Dejar 10 min mínimo en el Köplin.
- 8.- ENJUAGUE CON PBS POR 5 MIN (PBS Ca2 1mM+ PARA LECTINAS)
- 9.- INCUBACIÓN CON EL PRIMER ANTICUERPO PRIMARIO diluido en albúmina al 1% por 2hrs en cámara húmeda a 37°C o toda la noche en refrigeración a 4°C. (PBS Ca2 1mM+ PARA LECTINAS).
- 10.- Lavar con PBS por 5 minutos (PBS Ca2 1mM+ PARA LECTINAS).
- 11.- INCUBACIÓN CON PRIMER ANTICUERPO SEGUNDARIO diluido en PBS 1X POR 2HRS A 37°C en cámara húmeda a oscuras.
- 12.- Lavar con PBS por 5 minutos (PBS Ca2 1mM+ PARA LECTINAS).
- 13.- INCUBACIÓN CON SEGUNDO ANTICUERPO PRIMARIO diluido en albúmina al 1% por 2hrs en cámara húmeda a 37°C o toda la noche en refrigeración a 4°C.
 - Sacudir y secar rápidamente las laminillas en especial alrededor del corte.
 - Colocar 150µl del anticuerpo por cada corte o lo necesario para cubrir el tejido.
 - Colocar en cámara húmeda Cerrada.
- 14.- Enjuagar con PBS 1X por 5 min.
- 15.- INCUBACIÓN CON SEGUNDO ANTICUERPO SEGUNDARIO diluido en PBS 1X por 2hrs a 37°C en cámara húmeda a oscuras.
- 16.- Enjuagar con PBS 1X por 5min.
- 17.- Montaje con VectaShield-DAPI, 15µl por laminilla a oscuras.
- 18.- Sellado con Barniz de uñas alrededor del cubreobjetos.

17.- BIBLIOGRAFIA.

- Alonso A, Grundke-Iqbal I, and Iqbal K, (2009) Hyperphosphorylated tau from Alzheimer disease brain is toxic only when not polymerized into filaments, *J Biol Chem* (Under revision)
- Alonso A, Li B, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, (2006). Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8864–8869.
- Alonso A, Mederlyova A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, (2004). Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J. Biol.Chem.* 279, 34873–34881.
- Alonso A, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5562–5566
- Alvarado-Vasquez N, Zamudio P, Ceron E, Vanda B, Zenteno E, Carvajal-Sandoval G, (2003). Effect of glycine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comparative Bioch. and Phys.: Part C. Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 134, 521–527.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* ;290:457–65.
- Andorfer C, Acker CM, Kress Y, Hof PR, Duff K, Davies P, (2005). Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *J. Neurosci.* 25, 5446–5454.
- Andrey Y, and Duchon MR, (2005). The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides *Phil. Trans. R. Soc. B* 360, 2309–2314.
- Arnold CS, Johnson GV, Cole RN, Dong DL, Lee M, Hart GW, (1996) The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine, *J. Biol. Chem.* 271 28741–28744.
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. (1991)The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic in cerebral cortex of patients with Alzheimer’s disease. *Cer. Cortex* : 1: 103-16.
- Aronson MK, Ooi WL, Geva DL, Basur D, Blau A, Frishman W, (1991) Dementia, age-dependent incidence, prevalence, and mortality in the old. *Arch. Intl. Med* 151: 989-992.
- Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienios JL, Evans DA, (2004) Diabetes Mellitus and Risk of Alzheimer Disease and decline in Cognitive function. *Arch. Neurol.* 61, 661-666.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F, (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.* 54, 361–384.
- Bartoo GT, Nochlin D, Chang D, Kim Y, Sumi SM, (1997) The mean A load in the hippocampus correlates with duration and severity of dementia in subgroups of Alzheimer disease, *J. Neuropathol.Exp. Neurol.* 56 531–540
- Baudier J, Cole RD, (1987) Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer’s brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *J Biol Chem* ;262:17577–17583.
- Berg L, McKeel D W, Millar P, (1998). Clinicopathologic Studies in Cognitively Healthy Aging and Alzheimer disease. *Arch Neurol* (55) 326-325.
- Berrios GE and Freeman H, (1991) *Alzheimer and the Dementias*. London, Royal Society of Medicine 125: 15359–15365. .
- Berrios GE, (1989) Non-cognitive symptoms and the diagnosis of dementia. Historical and clinical aspects. *B. Journ. of Psych.* 154: 11–16.

- Berrios GE, (1990) Alzheimer's disease: a conceptual history. *Inter. Jour. of Geria. Psychiatry* 5: 355–365.
- Bezprozvanny I, Mattson MP, (2008). Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 31, 454–463.
- Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers , Benedek GB, Teplow DB (2003a) Amyloid β -protein ($A\beta$) assembly: $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 330–335.
- Bitan G, Tarus B, Vollers , Lashuel HA, Condron MM, Straub JE, Teplow DB (2003b) A molecular switch in amyloid assembly: Met35 and amyloid β -protein oligomerization *J Am Chem Soc* 125: 15359–15365.
- Bitan G, Vollers SS, Teplow DB (2003c) Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid β - protein oligomerization. *J Biol Chem* 278: 34882–34889.
- Bondarreff W. Mountjoy C., Roth M. and Hauser D. (1989). Neurofibrillary degeneration and neuronal loss in Alzheimer disease. *Neurobiol. aging.* 10:709-715.
- Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, Mancuso M, Siciliano G, Tendi EA, Murri L, Rapoport SI, Solaini G, (2002) Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* ;23: 371–6.
- Braak H and Braak E, (1994). Neurofibrillary changes confined to the entorhinal region and abundance of cortical amyloid in cases of preseniline and senile dementia. *Acta Neuropathology* 22 :.479-486.
- Braak H and Braak E, (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* ;82:239-59.
- Brookmeyer R, Gray S, Kawas C (1998). Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health* 88 (9): 1337–42.
- Brown MR, Geddes JW, Sullivan PG, (2004). Brain region-specific, age-related, alterations in mitochondrial responses to elevated calcium. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 401–406.
- Brown MR, Sullivan PG, Geddes JW, (2006). Synaptic mitochondria are more susceptible to Ca^{2+} overload than nonsynaptic mitochondria. *J. Biol. Chem.* 281, 11658–11668.
- Brun A and Englund E, (1986). Brain Changes in Dementia of Alzheimer's type relevant to new imaging diagnostic methods. *Neuro. Psicopharmacol Biol. Psychiatr.* 10:297-308.
- Brun A, Gustafson L, (1976) Distribution of cerebral degeneration in Alzheimer Disease. *Arch Psychiat Nevenk*; 223: 13-33.
- Buchsbaum M, Kesslak J, Lynch GS, Chui H, Wu J, Sicotte N, Hazlett E, Teng E, Cotman C., (1991) Temporal and hippocampal metabolic rate during an olfactory memory task assessed by positron emission tomography in patients with dementia of the Alzheimer type and controls. *Arch. Gen. Psychiatr.* 48:840-847
- Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Jennifer Drake (2002). Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death *Neurobiol. of Aging* 23 655–664.
- Butterfield DA, And Lauderback CM, (2002). Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's Disease brain: potential causes and consequences involving Amyloid peptide-associated free radical oxidative stress" *Free Rad. Biol. & Med.* 32 : 1050-1060.
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, (1998). Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursors. *J Biol Chem* 278: 27765–27767.
- Carlson *Neurofisiología* (2004) Ed 4 McWraw Hill- Interamericana

- Casoli T, Di Stefano G, Delfino A, Solazzi M, Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Guidi M, Scarpino O, Giunta S, Galeazzi L, (2002). Beta-amyloid fragment 25–35 selectively damages platelets from patients with Alzheimer's disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 977, 296–302.
- Caspersen C, Wang N, Yao J, Sosunov A, Chen X, Lustbader JW, Xu HW, Stern D, McKhann G, Yan SD, (2005). Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 19, 2040–2041
- Checler F, (1995) Processing of the β -amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease, *J. Neurochem.*, 65: 1431- 1444.
- Chen H, Ing BL, Robinson KA, Feagin AC, Buse M G, Quon M J, (1997) Effects of overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) and glucosamine treatment on translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 135, 67–77
- Chen YR, Huang HB, Chyan CL, Shiao MS, Lin TH, y Chen YC, (2006) The effect of Ab conformation on the metal affinity and aggregation mechanism studied by circular dichroism spectroscopy. *J. Biochem.* 139, 733–740.
- Clodfelder-Miller BJ, Zmijewska AA, Johnson GVW, Jope RS, (2006) Tau Is Hyperphosphorylated at Multiple Sites in Mouse Brain In Vivo After Streptozotocin-Induced Insulin Deficiency. *Diabetes*, Vol. 55, 3320-3325
- Cohen E, Dillin A. (2008) The insulin paradox: aging, proteotoxicity and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2008;9:759–67.
- Cole RN, Hart GW, (1999) Glycosylation sites flank phosphorylation sites on synapsin I: O-linked N-acetylglucosamine residues are localized within domains mediating synapsin I interactions, *J. Neurochem.* 73 418–428.
- Cole RN, Hart GW, (2001) Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals, *J. Neurochem.* 79 1080–1089.
- Coskun PE, Beal MF, Wallace DC, (2004). Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10726–10731.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*;378:785–789.
- Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB Jr, Baker LK, Kra GA, LaDu MJ (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 277: 32046–32053
- Davis J. and Van Nostrand WE, (1996). Enhanced pathologic properties of Dutch-type mutant amyloid b-protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2996–3000.
- Davis KL, Samuels SC, (1988). *Pharmacological Management of Neurological and Psychiatric Disorders*. Enna, SJ.; Coyle, JT., editors. McGraw-Hill; New York: .p. 267-316.
- Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK, (2006). Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* 26, 9057–9068.
- Ding M and Vandre DD, (1996). High molecular weight microtubule-associated proteins contain O-linked-N-acetylglucosamine, *J. Biol. Chem.* 271 12555–12561.
- Dong DL, Xu ZS, Chevrier MR, Cotter RJ, Cleveland DW, Hart GW, (1993) Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M, *J. Biol. Chem.* 268 16679–16687.

- Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, Meyer HE, Mandelkow EM, Mandelkow E, (1995). Microtubule-associated protein /microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J. Biol. Chem.* 270, 7679–7688.
- Duara R, Grady C, Haxby J, Sundaram M, Clater NR, Heston L, Moore A, Schlageter N, Larson S, Rapoport SI, (1986). Positron emission tomography in Alzheimer's disease. *Neurology* 36: 879-887
- Elsler WP, Wolfe MS, (2002) A portrait of Alzheimer secretases new features and familiar faces. *Science* 293: 1449–1454.
- Espinosa B, Guevara J, Hernandez P, Slonkhy MC, Guzmán A, Martínez Cairo S, Zenteno E (2003) Characterization of an O-glycosylated plaque associated protein from Alzheimer disease brain, *Neuropathology Exp, Neurology* 62(1): 34-41.
- Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribe E, Dalfo E, Avila J. (2005) Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res*;2:3–18.
- Furukawa K, Kobata A, (1992). Protein glycosylation, *Curr. Opin. Biotechnol.* 3 554–559.
- Gail VW, Johnson, William H, Stoothoff, (2004), Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J. of cell Science* 117: 5721-5729.
- Gao Y, Wells L, Corner FI, Parker GJ, Hart GW, (2001) Dynamic o-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem* 276: 9838-9845.
- Gibson GE, (2002) Interactions of oxidative stress with cellular calcium dynamics and glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 12(32):1061–70.
- Gibson GE, Sheu KF, Blass JP, (1998). Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J. Neural Transm.* 105, 855–870.
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Six J, Lubke U, Vandermeeren M, Cras P, Trojanowski JQ, Lee VMY, (1993). The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5066–5070.
- Goedert M, Jakes R, Qi Z, Wang JH, Cohen (1995) *P. J. Neurochem* 65:2804–2807.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989). *Neuron*; 3:519–526
- Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, (2006) Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation *Jour. of Alz. Dis.* 9: 1-12
- Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. J. (2000) *Biol. Chem* 124:769–782.
- Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2006). Dysregulation of protein phosphorylation/dephosphorylation in Alzheimer's disease: a therapeutic target. *J Biomed Biotechnol* 38106-31825.
- Gong, C.X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., (2005). Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 112, 813–838
- Goode BL, Feinstein SC. J (1994). *Cell. Biol*; 124:769–782.
- Gowing E, Roher AE, Woods AS, Cotter RJ, Chaney M, Little SP, Ball MJ, (1994) Chemical characterization of Ab 17–42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 269, 10987–10990.

- Graever MB, Kösel S, Egnesperger R, Banati RB, Müller U, Bise K, Hoff P, Möller HJ, Fujisawa K, Mehraein P. (1997) Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer en 1911: historial, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics*, 1:73-80.
- Graham DI, Peter L (1997)Lantos Ed. Arnold Greenfield's Sixth Edition
- Griffith L S, Mathes M, Schmitz B, (1995) Beta-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Neurosci. Res.* 41, 270–278 116.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LU, (1986b). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4913– 4917.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Wisniewski HM, (1984). Alzheimer paired helical filaments: immunochemical identification of polypeptides. *Acta Neuropathol.* 62, 259–267
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM, (1986a). Microtubule- associated protein tau: a component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084–6089.
- Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, Vazques C, Luna T, Perry G. Mena R. (1998) Altered glycosilation pattern of proteins in Alzheimer disease. *J. Neuropatología. Exp. Neurol* 57(10): 185-91.
- Guevara J, Dilhuydy H, Espinosa B, Delacourte A, Quirion R, Mena R, Joannette Y, Zenteno E, Robitaille Y,(2004)Coexistence of reactive plasticity and neurodegeneration in Alzheimer diseased brains. *Hist., histopatology* 19 (9) 1075-84.
- Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Reynolds MR, Horowitz PM, Fu YF, Wang TY, Cahill ME, Bigio EH, Berry RW, Binder LI, (2005). Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 26, 1015–1022.
- Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD *et al.* (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* 1, 401–408
- Hanes DE, (2004) Neuroanatomy 4tr Edition
- Hanover JA, Cohen CK, Willingham MC, Park MK, (1987). Olinked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins, *J. Biol. Chem.* 262 9887–9894.
- Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N (1994) Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369:488–491.
- Hardy J, Selkoe DJ. *Science* (2002) ;297:353–356.
- Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT, (1997) Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol* 4: 119–125.
- Hart GW, (1997) Dynamyc O-Linked Glycosilation of nuclear and cytoeskeletal proteins *AnnRev Biochem* 66: 315-335.
- Hawkins M, Barzilai N, Chen W, Angelov I, Hu M, Cohen P, Rossetti L, (1996) Increased hexosamine availability similarly impairs the action of insulin and IGF-1 on glucose disposal. *Diabetes* 45, 1734–1743
- Herr RR, Jahnke AD, Argoudelis AD (1967) The structure of Streptozotocin, *J. Am. Chem. Soc.* 89 4808–4809
- Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak, SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA, (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J.*

Neurosci. 21, 3017–3023.

- Ho L, Qin W, Pompa PN, Xiang Z, Peng Y, Cambareri G, Rocher A, Mobbs CV, Passinetti GM, (2004) Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 18, 902-904.
- Holt GD, Hart GW,(1986). The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein– saccharide linkage, O-linked GlcNAc, *J. Biol. Chem.* 261 8049–8057.
- Hussain I, Powell D, Howle DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase. *Mol Cell Neurosci* 14: 419–427.
- Hyslop G, (2001) Unravelling the disease process *Lancet.* 358 Suppl: S1.
- 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 disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 5646–5650.
- Issacson, (1974)R.L. Limbic Sistem. Plenum Press USA
- J.E. Murphy J.E., Hanover J.A., Froehlich M., DuBois G., Keen J.H., (1994). Clathrin assembly protein AP-3 is phosphorylated and glycosylated on the 50-kDa structural domain, *J. Biol. Chem.* 269 21346–21352.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury Jr PT, (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for theseeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693–4697.
- Jesus Gabriel Silva Escobedo, Dr. Jorge Islas Marroquin (2004) Neurodegeneración y enfermedad de Alzheimer, *Revista Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría* 37 (1) 25-28.
- Jiang H, Nurdick D, Glabe GG, Cotman CW, Tenner AJ (1994)Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagenlikedomain of the C1q A chain. *J Immuno;* 152:5050.
- Jicha GA, Weaver C, Lane E, Vianna C, Kress Y, Rockwood J, Davies P. cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1999;19:7486–7494.
- Joseph J, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Martin A, Perry G, Smith MA: (2001) Copernicus revisited: amyloid beta in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22: 131–146.
- Kalaria RN, Harik SI, (1989) Reduced glucose transporter at the blood brain barrier in cerebral cortex in Alzheimer Disease *J. Neurochem* 53: 1083-1088
- Kalaria RN, Mestre GE, Arizaga R, Friedland RP, Galasko D, Hall K, Lichsinger JA, Ogunniyi A, Perry EK, Potocnik F, Prince M, Stewart R, Wimo A, Zang ZX, Antuono P, (2008) Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurolo* 7: 812-826.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S & Malinow R, (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925–937.
- Kanter PM, Bullard GA, West CR, Pavelic ZP, (1990) Preclinical toxicity study of streptozotocin infused into the internal carotid artery of dogs and baboons *J. Exp. Path.* 5:133-142
- Kar S, Slowikeaski SPP, Westawas D, Mountt HI, (2004) Interactions between beta- amyloid and central cholinergic neurons: Implications for alzheimer's disease. *J. Psichiatry Neuroscience* 29 (6) 427-41.

- Katzman R, Saitoh T, (2002). Advances in Alzheimer's disease. *FASEB J* 1991 ;4:278–86. *Neurobiology of Aging* 23 655–664
- Ke Q, Costa M (2006). Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) *Mol Pharmacol* 70:1469–1480.
- Khurana V, Lu Y, Steinhilb ML, Oldham S, Shulman JM, Feany MB, (2006). TOR-mediated cell-cycle activation causes neurodegeneration in a *Drosophila* tauopathy model. *Curr. Biol.* 16, 230–241.
- Kirkitadze MD, Kowalska A (2005) Molecular mechanisms initiating amyloid β -fibril formation in Alzheimer's disease *A. Bioch. Polonica* 52 (2), 417–423
- Koh J, Yang L, Cotman CW, (1990). B-Amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res.* 533:315-320
- Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher E D (1998) High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J. Clin. Invest* 101, 160–169
- Kondoh K, Nishida E (2007) "Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases" *Biochimica et Biophysica Acta* 1773 1227–1237
- Köpke E, Tung YC, Shaikh S, . Alonso AC, Iqbal K, Grundke-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.
- Ksiezak-Reding , Binder LI , Yen SH, (1990) Alzheimer's disease proteins (A68) share epitopes with tau but show distinct biochemical properties, *J Neurosci Res* 25 (1990), 420–430.
- Kubo T, Nishimura S, Kumagai Y, Kaneko I, (2002). In vivo conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser26]Ab1–40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser26]Ab25–35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J. Neurosci. Res.* 70, 474–483.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, (1998) Diffusible, non-fibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6448–6453.
- Lazarus BD, Love DC, Hanover AJ, (2009) O-GlcNAc cycling: Implications for neurodegenerative disorders *The Int. Jour. of Bioc. & Cell Biology* 41 2134–2146
- Le Vine H, (1995) Soluble multimeric Alzheimer β (1–40) pre-amyloid complexes in dilute solution. *Neurobiol Aging* 16: 755–764.
- Lee G, Thangavel R, Sharma VM, Litersky JM, Bhaskar K, Fang SM, Do LH, Andreadis A, Van Hoesen G, Ksiezak-Reding H, 2004. Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 24, 2304–23012.
- Lee VM, Balin BJ, Otvos L, Trojanowski JQ, (1991). A 68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science* 251, 675–678.
- Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussi re T, Dupire MJ, Delacourte A, Michalski JC, Caillet-Boudin ML. (2003). Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins- a role in nuclear localization. *Bioch. et Bioph. Acta* 1619: 167-176.
- Lefebvre T, Guinez C, Dehennaut V, Beseme-Dekeyser O, Morelle W, Michalski JC, (2005). Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases? *Future Drugstore Expert Rev Proteomics* 2(2) 265-275.
- Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussi re T, Dupire MJ, Delacourte A, Michalski JC, Caillet-Boudin ML, (2003). Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins: a role in nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta* 1619, 167–176.

- Lesne S, Ali C, Gabriel C, Croci N, MacKenzie ET, Glabe CG, (2005). NMDA receptor activation inhibits alpha-secretase and promotes neuronal amyloid-beta production. *J Neurosci* 25, 9367–9377.
- Lewis C, Barbiers AR (1960) Streptozotocin, a new antibiotic. In vitro and in vivo evaluation, *Antibiot. Ann.* 7 247–254
- Li D, Marks JD, Schumacker PT, Young RM & Brorson JR, (2005). Physiological hypoxia promotes survival of cultured cortical neurons. *Eur J Neurosci* 22, 1319–1326.
- Li T, Paudel HK, (2006). Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Bioch.* 45, 3125–3133.
- Li X, Lu F, Wang JZ, Gong CX. *Eur. J. Neurosci* 2006;23:2078–2086.
- Liao MQ, Tzenga YJ, Lea YX, Huangc HB, Lind TH, Chyane CL, Chen YC, (2007) The correlation between neurotoxicity, aggregative ability and secondary structure studied by sequence truncated Ab peptides *FEBS Letters* 581 1161–1165
- Libre JJR, Ferri CP, Acosta D, Guerra M,(2008). Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey. *The lancet* (372) 464-474.
- Lin MT, Simon DK, Ahn CH, Kim LM, Beal MF, (2002). High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain. *Hum. Mol. Genet.* 11, 133–145.
- Lindwall G, Cole RD, (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*;259:5301–5305.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX, (2005) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation *Europ. Jour. of Neuros.*, 22, pp. 1942–1950
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX.(2005) *Eur. J. Neurosci* 22:1942–1950.
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart G W, Gong CX, (2004)O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: A mechanism involved in Alzheimer's disease *PNAS J* 101 (29) 10804–10809
- Liu F, Liang Z, Wegiel J, Hwang YW, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Ramakrishna N, Gong CX. (2008) Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *FASEB J*
- Liu F, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX, (2002a). Aberant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience* 115, 829–837
- Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Merkle RK, Gong, C.X, (2002b). Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 512, 101–106.
- Liu GP, Zhang Y, Yao XQ, Zhang CE, Fang J, Wang Q, Wang JZ, (2007). Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits protein phosphatase-2A and the underlying mechanisms. *Neurobiol. Aging* (Epub ahead of print).
- Liu R, McAllister C, Lyubchenko Y, Sierks MR, (2004) Residues 17–20 and 30–35 of beta-amyloid play critical roles in aggregation. *J. Neurosci. Res.* 75, 162–171.
- Liu SJ, Zhang AH, Li HL, Wang Q, Deng HM, Netzer WJ, Xu H, Wang JZ, (2003). Overactivation of glycogen synthase kinase-3 by inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial memory. *J. Neurochem.* 87, 1333–1344.
- Liu SJ, Zhang JY, Li HL, (2004). Tau becomes a more favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain. *J Biol Chem* 279:50078–50088.

- Liu SJ, Zhang JY, Li HL, Fang ZY, Wang Q, Deng HM, Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wang JZ, (2004b). Tau becomes amore favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain. *J. Biol. Chem.* 279,50078–50088
- Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX, (2009). Brain glucose transporters, O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer disease. *J Neurochem.* October ; 111(1): 242–249
- Lovestone S, Reynolds CH, (1997). The hyperphosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes, *Neuroscience* 78 309–324.
- Lucas JJ, Hernández F, Gómez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Avila J, (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J.* 20, 27–39.
- Manczak M, Park BS, Jung Y, Reddy PH, (2004). Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Neuromol. Med.* 5, 147–162
- Marshall S, Bacote V, Traxinger R. R. (1991a) Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 266, 4706–4712
- Marshall S, Bacote V, Traxinger RR, (1991b) Complete inhibition of glucose-induced desensitization of the glucose transport system by inhibitors of mRNA synthesis. Evidence for rapid turnover of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. *J. Biol. Chem.* 266, 10155–1061
- Matthaei S, Horuk R, Olfsky JM, (1986) Blod-brain glucose transfer in diabetes mellitus. Decreased number of glucose transporting at blood-brain barrier. *Diabetes* 35: 1181-1184
- Mattson M, Cheng B, Davis D, Bryant, K, Lieberburg I, Rydel R, (1992). beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci* 12:376-389
- Mattson MP, (1999) Impairment of membrane transport and signal transduction systems by amyloidogenic proteins. *Int. J. Devl Neuroscience.* 16: 737-753.
- Maurer I, Zierz S, Moller HJ. (2000) A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging*; 21:455–62.
- Maurer K, Volk S, Gerbaldo H, (1997) Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349: 1546–1549.
- Maurice T, Lockhart BP, Privat A, (1996). Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res.* 706, 181–193
- Mazanetz MP, Fischer PM. (2007) *Nat. Rev. Drug Discov* 6:464–479.
- McGeer PL, McGeer EG, (1995) The inflammatory response system of brain. *Brain Res Rev* ;21:195.
- Monji A, Utsumi H, Ueda T, Imoto T, Yoshida I, Hashioka S, Tashiro K, Tashiro N, (2002) Amyloid-beta protein (Ab) (25–35)-associated free radical generation is strongly influenced by the aggregational state of the peptides. *Life Sci.* 70, 833–841.
- Moore (2004) *Embriologia Clinica* Pag 479. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. Pag 479
- Morsch R, Simon W, Coleman PD, (1999). Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles, *J Neuropathol ExpNeurol* 58 188–197.
- Naga KK, Sullivan PG, Geddes JW, (2007). High cyclophilin D content of synaptic mitochondria results in increased vulnerability to permeability transition. *J. Neurosci.* 27, 7469–7475.

- Nasele RG, Wesiely, Venkateraman V, Imaki H, Wang KC, Wegiel J. (2004) Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's Disease. *Neurobiology Aging* 25 (5): 663-74.
- Naslund J, Haroutunian V, Moh R, Davis K.L., Davies P, Greengard P, Buxbaum J.D, (2000) Correlation between levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline, *JAMA* 283 1571–1577.
- Nelson D and Cox M (2004). *Glycolysis, Gluconeogenesis and the Pentose Phosphate Pathway*, Lehninger's Principles of Biochemistry.
- Nerlich AG, Sauer U, Kolm-Litty V, Wagner E, Koch M, Schleicher E D (1998) Expression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in human tissues: evidence for high variability and distinct regulation in diabetes. *Diabetes* 47, 170–178
- Neve DL, McPhie YC, (2000). Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Res* ;886:54.
- Ojaimi J, Masters CL, McLean C, Opeskin K, McKelvie P, Byrne E, (1999). Irregular distribution of cytochrome c oxidase protein subunits in aging and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* ;46:656–60.
- Olaiz-Fernández G, Rojas R, (2007) Diabetes mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000 *Salud pública Méx* vol.49 suppl.3.
- Oyama F, Kotliarova S, Harada A, Ito M, Miyazaki H, Ueyama Y, Hirokawa N, Nukina N, Ihara Y, (2004) Gem GTPase and tau: morphological changes induced by gem GTPase in cho cells are antagonized by tau. *J Biol Chem* 279:27272–27277.
- Pákási M, Kálmen J, (2008) Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer Disease. *Neurochem Int, Neuro* 5 (5) 103-11.
- Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves D (2004) Control of the A beta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of beta APP and APLP. *Neuron* 46, 541–554.
- Paxinos G, Watson C, (1997). Hippocampal fissure. In: Paxinos, G., Watson, C. (Eds.), *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, pp. 30–46.
- Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF, (1999). Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 1010–1019.
- Pei JJ, Gong CX, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Wu QL, Winblad B, Cowburn RF. (1998) Subcellular distribution of protein phosphatases and abnormally phosphorylated tau in the temporal cortex from Alzheimer's disease and control brains. *J Neural Transm* 105:69–83.
- Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, (1997). Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 70–78
- Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V, (1987). Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 3033–3036
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW, (1993). Neurodegeneration Induced by Amyloid Peptides in vi&o: The Role of Peptide Assembly State *The Jour. of Neurosci.* 13(4): 1676-1687
- Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW, (1995). Structure–activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem.* 64, 253–265.

- Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C & Pearson HA, (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci* 23, 5531–5535.
- Plyte SE, Hughes K, Nikolakaki E, Pulverer BJ, Woodgett JR, (1992). Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim Biophys Acta* 1114 :147–162.
- R. Alberca, S. Lopez-Pousa. (2002) Enfermedad de Alzheimer y otras demencias 2ª Ed Panamericana.
- Ramsden M, Henderson Z & Pearson HA, (2002). Modulation of Ca²⁺ channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid beta protein (1–40) is dependent on solubility status. *Brain Res* 956, 254–261
- Reddy PH, (2009) Amyloid beta, mitochondrial structural and functional dynamics in Alzheimer's disease *Experimental Neurology* 218 286–292
- Reddy PH, Beal MF, (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* 14, 45–53.
- Reddy PH, McWeeney S, Park BS, Manczak M, Gutala RV, Partovi D, Jung Y, Yau V, Searles R, Mori M, Quinn, J, (2004). Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: upregulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1225–1240.
- Reynolds CH, Betts JC, Blackstock WP, Nebreda AR, Anderton BH, (2000). Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. *J. Neurochem.* 74, 1587–1595.
- Reynolds MR, Reyes JF, Fu Y, Bigio EH, Guillozet-Bongaarts AL, Berry RW, Binder LI, (2006). Tau nitration occurs at tyrosine 29 in the fibrillar lesions of Alzheimer's disease and other tauopathies. *J. Neurosci.* 26, 10636–10645.
- Reynolds, Petersen RB, Nunomura A, Lee HG, Casadesus G, Perry G, Smith MA, Zhu X. (1997). Signal transduction cascades associated with oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2007;11:143–152.
- Ricardo B. Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L (2001) The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders *Archives of Medical Research* 32 367–381
- Riley KP, Snowdon DA, Markesbery WR, (2002) Alzheimer's neurofibrillary pathology and the spectrum of cognitive function: findings from the Nun Study, *Ann Neurology* 51: 567-577.
- Robertson LA, Moya KL, Breen KC, (2004). The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 6, 489–495.
- Robins. (2002) Patología estructural y funcional 6ª Ed. 30 1377-1379.
- Rockenstein E, Mante M, Alford M, Adame A, Crews L, Hashimoto M (2005). High beta-secretase activity elicits neurodegeneration in transgenic mice despite reductions in amyloid-beta levels: implications for the treatment of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280, 32957–32967
- Rodriguez-Enriquez S, Moreno-Sanchez R, (1998). Intermediary metabolism of fast-growth tumor cells. *Arch. Med. Res.* 29, 1–12.
- Romano AH & Conway T. (1996), Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Res Microbiol.* 147(6-7):448-55
- Rossetti L, Hawkins M, Chen W, Gindi J, Barzilai N, (1995). In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not in hyperglycemic conscious rats. *J. Clin. Invest.* 96, 132–140

- Sadler TR, Khodavirdi AC, Hinton DR, Holschneider DP, (2009). Snap-Frozen Brain Tissue Sections Stored With Desiccant at Ambient Laboratory Conditions Without Chemical Fixation are Resistant to Degradation for a Minimum of 6 Months *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 17(2): 165–171
- Schubert, D. (2005); "Glucose metabolism and Alzheimer's disease". *Ageing Research Reviews* 4:240-57.
- Selkoe, D.J. (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487–498.
- Selkoe, D.J.(2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy, *Physiol. Rev.* 81 741–766.
- Serpell LC, Smith JM, (2000) Direct visualisation of the beta-sheet structure of synthetic Alzheimer's amyloid. *J. Mol. Biol.* 299, 225–231.
- Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW, Marth JD (2001). Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc, *Science* 291 2376–2378.
- Sharon N. (1998) Lectins: From obscurity into the limelight *Prot Sci* 7: 2042-2048.
- Shubert D, (2005) Glucosa Metabolism and Alzheimer's Disease. *Ageing Res Rev.* 2005 May;4(2):240-57
- Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, Kowall N,(1996). Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 382, 120–121.
- Smith RP, Higuchi DA & Broze GJ Jr, (1990). Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* 248, 1126–1128.
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Bloom GS, Mumby MC. *Neuron* 1996; 17:1201–1207
- Soucek T, Cumming R, Dargusch R, Maher P & Schubert D, (2003). The regulation of glucose metabolism by HIF-1 mediates a neuroprotective response to amyloid beta peptide. *Neuron* 39, 43–56.
- Standaert G, Young B, (1996). Tratamiento de los trastornos neurodegenerativos. Goodman G., Hardman G, Limbrid E., Mollinoff B. y Ruddon W. (Eds) Novena edición McGraw-Hill Interamericana 539-551.
- Takashima A, (2006). GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 9, 309–317
- Takuma H, Arawaka S, Mori H, (2003). Isoforms changes of tau protein during development in various species. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 142, 121–127
- Tanimukai H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. *Am. J. Pathol* 2005;166:1761–1771.
- Tanzi RE, Bird ED, Latt SA, Neve RL, (1987) The amyloid beta protein gene is not duplicated in brains from patients with Alzheimer's disease. *Science* 238, 666–669.
- Taylor SC, Batten TF & Peers C,(1999). Hypoxic enhancement of quantal catecholamine secretion. Evidence for the involvement of amyloid beta-peptides. *J Biol Chem* 274, 31217–31222.
- Terry RD, Hansen LA, DeTeresa R, Davies P, Tobias H, Katzman R, (1987). Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* ; 46:262. 13.
- Torres CR, Hart GW, (1984). Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc, *J. Biol. Chem.* 259 3308–3317.
- Tsujio I, Zaidi T, Xu J, Kotula L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2005) *FEBS Lett* 579:363–372.

- Tucker KL, Meyer M, Barde YA, (2001). Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci* 4:29–37.
- Valadez J, (2006) *Neuroanatomía Funcional*. Primera edición, Ediciones de Neurociencias México
- Vavra JJ, Deboer C, Dietz A, Hanka LJ, Sokolski WT, (1960) Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic, *Antibiot. Ann.* 7 :230–235.
- Vosseller K, Sakabe K, Wells L, Hart GW, (2002). Diverse regulation of protein function by O-GlcNAc: a nuclear and cytoplasmic carbohydrate post-translational modification, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6 851–857.
- Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB, (1999). Amyloid β -protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* 274: 25945–25952.
- Wang DS, Lipton RB, Katzon J, Davies P, Buscket, Kuslansky G, Verghese J, Younking SG, Eckman C, Dickson DW, (2005). Decreased Neprilysin immunoreactivity in Alzheimer Disease. *Neuropatol Exp. Neurol* 64(5) 378-85.
- Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA, (2005). Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*93, 953–962.
- Wang JZ, Liu F, (2008) Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Progress in Neurobiology* 85 148–175
- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, (1996). Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with protein phosphatase-1, -2A and -2B. *Mol. Brain Res.* 38, 200–208.
- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, (2007). Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur. J. Neurosci.* 25, 59–68.
- Watson C, (2000) 4th Ed. Little Brown and company
- Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, (2004). Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain Res* 2004;1010:69–80.
- Weigert C, Brodbeck K, Lehmann R, Haring HU, Schleicher ED, (2001). Overexpression of glutamine: fructose- 6-phosphate-amidotransferase induces transforming growth factor-beta1 synthesis in NIH-3T3 fibroblasts. *FEBS Lett.* 488, 95–99
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ;72:1858–1862.
- Wells L, Stephen A, Whelan, Gerald W, (2003). O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302 435–441.
- Whitehouse P, Price D, Clark A, (1985). Alzheimer's disease: evidence for a selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurology*, 17:573-7.
- Wilson LA, Gallagher M, Eichenbaum H, Tanila H, (2006) Neurocognitive aging: prior memories hinder new hippocampal encoding *TRENDS in Neurosciences* 29 (12)435-441.
- Wong A, Luth HJ, Deuther-Conrad W, Dukic-Stefanovic S, Gasic-Milenkovic J, Arendt T, Munch G. (2001). Advanced glycation endproducts co-localize with inducible nitric oxide synthase in Alzheimer's disease. *Brain Res*;920:32–40.
- Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI, (1986). Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4040–4043
- Yamamoto H, Hiragami Y, Murayama M, Ishizuka, K, Kawahara M, Takashima A, (2005). Phosphorylation of tau at serine 416 by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in neuronal soma in brain. *J. Neurochem.* 94, 1438–1447.

- Yao PJ, Coleman PD, (1998) Reduced O-glycosylated clathrin assembly protein AP180: implication for synaptic vesicle recycling dysfunction in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 252 33–36.
- Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL, (1999) Upregulated production and activation of the complement system in Alzheimer disease brain. *Am J Pathol* ;154:927.
- Yong W, Lomakin A, Kirkitadze MD, Teplow DB, Chen SH, Benedek GB, (2002). Structure determination of micelle-like intermediates in amyloid β -protein fibril assembly by using small angle neutron scattering. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 150–154.
- Yoshida M, (2006). Cellular tau pathology and immunohistochemical study of tau soforms in sporadic tauopathies. *Neuropathology* 26, 457–470.
- Zachara NE, Hart GW, (2002). The emerging significance of OGlcNAc in cellular regulation, *Chem. Rev.* 102 431–438.
- Zachara NE, Hart GW, (2006). Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Bioch. et Bioph. Acta* 1761: 599-617.
- Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, Lee EB, Xie SX, Joyce S, Li C, Toleikis PM, Lee VM, Trojanowski JQ (2005b) Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:227–231.
- Zhang JY, Liu SJ, Li HL, Wang JZ, (2005a). Microtubule-associated protein tau is a substrate of ATP/Mg²⁺-dependent proteasome protease system. *J. Neural Transm.* 112, 547–555.
- Zhang YJ, Xu YF, Liu YH, Yin J, Li HL, Wang Q, Wang JZ, (2006). Peroxynitrite induces Alzheimer-like tau modifications and accumulation in rat brain and its underlying mechanisms. *FASEB J.* 20, 1431–1442.
- Zhu LQ, Wang SH, Liu D, Yin YY, Tian Q, Wang XC, Wang Q, Chen JG, Wang JZ, (2007). Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J. Neurosci.* 27, 12211–12220.
- Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, Smith MA. (2002) The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 11:270–281.