



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CAMBIOS EN LA O-GlcNAcilación EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE**

**ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**LOZANO RODRÍGUEZ LILIANA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUIN ESPINOSA DE LOS MONTEROS.**  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

**DR. LUIS FELÍPE JIMÉNEZ GARCÍA.**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**CD. MX., MAYO, 2017.**



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.



Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de noviembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **LOZANO RODRÍGUEZ LILIANA** con número de cuenta **94217513**, con la tesis titulada **"CAMBIOS DE LA O-GLUCNACILACIÓN EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER"**, realizada bajo la dirección del **DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO**:

Presidente: DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN  
Vocal: DR. MIGUEL ANGEL JORGE GUEVARA FONSECA  
Secretario: DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS  
Suplente: DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN  
Suplente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 07 de abril de 2017

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS.**

- Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM. Por los conocimientos brindados dentro de su programa. Esta tesis es parte de los requisitos para obtener el doctorado en Ciencias de Liliana Lozano Rodríguez .

- Por los apoyos económicos ofrecidos por:

PAEP 2013, PAPIIT (IN 204315); CONACYT (0129932) y ECOS Francia-México (M09S02) -CONACYT (189.453).

- A mi tutor principal: Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo

- A los miembros del comité tutorial:

Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros.

Dr. Luis Felipe Jiménez García.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL.**

Este trabajo es el resultado del esfuerzo conjunto de diversos equipos de trabajo que creyeron y apoyaron una idea, es un trabajo, que no hubiese podido culminarse sin el apoyo de todas y cada una de las personas que participaron en todas y cada una de sus diferentes fases.

Un agradecimiento especial al Dr. Edgar Zenteno tutor principal de este trabajo, por esforzar mis límites más allá de lo que creí posible, y permitirme ver el mundo desde otro ángulo.

Dra. Guadalupe Maldonado.

Lic. Iván Emanuel Ramos.

Dr. Armando Pérez

Personal del Departamento de bioquímica Facultad de Medicina UNAM

**-Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias INNER.**

**\*Departamento de bioquímica.**

**Dr. Noe Alvarado.**

Dra. Patricia Gorocica Rossette

Dra. Blanca Espinosa

Est. Ashanti Guzmán.

**\*Departamento de cirugía experimental.**

**Dr. Rogelio Jasso.**

**\*Bioterio**

**Dr. Alberto Pizaña.**

**"Glycobiologie des voies de signalisation et pathologies associées-Fonctions associées à la O-GlcNAcylation"**

**Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle. Lille France.**

**PhD. Tony Lefebvre.**

PhD. Jean-Claude Michalski

PhD. Vannesa Dehennaut-Lefebvre

PhD. Celine Guinez

PhD. Yobana Pérez

PhD. Stephanie Olivier

Tec. Anne-Marie Mir

A la Profesora Guadalupe Maldonado por su gran apoyo y compañerismo en todo el proceso de este estudio, Lic. Iván E. Ramos, al Profesor Simón Blas.

Al personal de los diferentes laboratorios del departamento de bioquímica con quienes tuve la fortuna de colaborar durante este proyecto.

Al Dr. Noe Alvarado por todo su apoyo, colaboración, orientación y retroalimentación en las diferentes fases de este proyecto.

Al PhD Tony Lefebvre, por todas sus enseñanzas, su paciencia, su apoyo al diseñar experimentos y pipetear conmigo durante mis estancias en Lille.

A todos y cada uno de los miembros del equipo de investigación en Lille Francia.

A Yobana, Stephany, Stephy, Ane Sophy, Socorro, Adelma, Vannessa, Ludivine, Agatha, Marry Anne.

A mi madre por el gran pilar y apoyo que ha sido, por tu amor y amistad.

A Eduardo por su gran apoyo.

A Papá, que siempre estará conmigo.

A mi hermosa familia, hermanos, tíos, primos y sobrinos por siempre tener una palabra, un consejo o un abrazo.

## ***DEDICATORIA.***

A mi hijo Aarón Emilio por darme un poco de magia y luz cada día.





## **INDICE.**

Índice de abreviaturas	i
1 Resumen	1
2 Abstract	2
3 Introducción	3
4 Modificaciones postransduccionales	5
4.1 Modificaciones postransduccionales en enfermedad de Alzheimer	6
5 Glicosilación	8
5.1 C-Glicosilación	9
5.2 N-Glicosilación	9
5.3 O-Glicosilación	10
5.4 O-GlcNacilación	12
6 Enzimas implicadas en la O-GlcNacilación	14
6.1 O-Glicosiltransferasa (OGT)	14
6.2 O-N-acetilglucosaminidasa	16
7 La OGT como sensor de nutrientes	18
8 La O-Glicosiltransferasa nucleocitoplasmática (OGTnc) en las proteínas celulares	19
9 Importancia de la mitocondria en el metabolismo energético	22
10 Diabetes y el daño mitocondrial	24

11	Péptido AB y daño a la mitocondria	25
12	Neurotoxicidad por glucosa en el cerebro.	26
13	Modificacones por OGTm	27
14	OGT en DM y Neurodegeneración.	28
15	Planteamiento del problema	31
16	Hipótesis	31
17	Objetivos	31
18	Metodología	32
18.1.-	Animales de laboratorio	32
18.2.-	Cirugía estereotáxica	32
18.3.-	Preparación del péptido A $\beta$ 25-35	33
18.4.-	Administración de estreptozotocina	33
18.5.-	Monitoreo de glucosa y peso	33
18.6.-	Obtención de cerebros	33
18.7.-	Obtención de sangre	33
18.8.-	Reactivos	34
18.9.-	Determinación de Insulina	34
18.10.-	Determinación de peso	35
18.11.-	Hematoxilina y eosina para microscopía de luz	35
18.12.-	Técnica de Nissl para microscopía de luz en campo claro	35

18.13.- Inmunohistoquímica HRP para microscopía de luz	35
18.14.-Inmunohistoquímica para microscopía de fluorescencia	35
18.15.- Técnicas de fraccionamiento y separación celular	36
18.16.- Western Blott	36
18.17.- Análisis estadístico	36
19     Resultados	38
19.1 Cambios metabólicos	38
19.2.-Resultados histológicos	43
19.3.- Tinción argénica	47
19.4.- Microscopia de fluorescencia	49
19.5.- Resultados por western blot	55
19.6.- Western blot fraccion mitocondrial	60
20     Discusión	67
21     Conclusiones	74
22     Literatura citada	76
23     Anexo A Publicaciones	92
A.I.- ARTICULO REQUISITO. Effect of Amyloid $\beta$ -(25-35) in hyperglycemic and hyperinsulinemic rats, on phosphorylation and O-GlcNAcylation of tau protein.	92
A.II.- ARTÍCULO DE REVISIÓN. The mitochondrial O-linked N-acetylglucosamine transferase (mOGT) in the diabetic patient could be the initial tigger to develop Alzheimer disease.	114

24	Anexo B Técnicas	124
	I.- Determinación De Hemoglobina Glicosilada	124
	II.-Fijado Y Congelación De Los Tejidos Para Cortes Con Criostato	126
	III. Técnica De Hematoxilina Y Eosina Para Microscopía De Luz En Campo Claro	127
	IV.- Hematoxilina De Harris	128
	V.- Técnica De Nissl Para Microscopía De Luz En Campo Claro	129
	VI.- Inmunohistoquímica Para Microscopía De Luz En Campo Claro	130
	VII.- Inmunohistoquímica Para Microscopía De Fluorescencia	132
	VIII.- Tincion Argantica	135
	IX.- Fraccionamiento Y Separación Celular	136
	X.- Western Blot	138



## **INDICE DE ABREVIATURAS.**

**Acetil-CoA** Acetil coenzima A

**ADN** Ácido desoxiribonucleico

**AGEs** Productos de la glicosilación avanzada

**Akt** Proteina Cinasa B

**APP** Proteína precursora de Amiloide

**ARN** Ácido Ribonucleico.

**ARNm** Ácido Ribonucleico mensajero.

**ARNt** Ácido Ribonucleico de transferencia.

**A $\beta$**  Amiloide Beta.

**A $\beta$  (25-35)** Amiloide Beta 1-42 fracción 25 a 35.

**CA1** Hipocampo región Cuerpo de Amón 1

**-CH<sub>3</sub>** Grupo Metilo

**DAB** Diaminobencidina

**DCCT** Diabetes Control and Complications Trial Research Group

**DM** Diabetes mellitus

**DM1** Diabetes dependiente de insulina.

**DM2** Diabetes no insulino dependiente.

**EA** Enfermedad de Alzheimer



**ER** Retículo endoplásmico

**ERN** Especies reactivas de nitrógeno

**ERO** Especies reactivas de oxígeno.

**GFAT** glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa

**Glc** Glucosa

**GlcNAc** N-acetil glucosamina.

**Gln** Glutamina

**Glu** Glutamina

**GLUT** Transportador de glucosa

**GSK 3 $\beta$**  Glicogeno sintasa sinasa 3 beta.

**Hb** Hemoglobina

**HbA1c** Glicosilación de la proteína hemoglobina A1c

**hIOGA** O-N-acetylglucosaminidasa isoforma larga

**HRP** Enzima peroxidasa del rábano.

**HsOGA** O-N-acetylglucosaminidasa isoforma corta

**HSP** Proteínas de choque térmico

**IFCC** International Federation of Clinical Chemistry

**KDa** KiloDaltones

**NFTs** Marañas neurofibrilares



**NGSP** Glycohemoglobin Standardization Program

**NO\*** Radical óxido nítrico

**NO<sub>2</sub>\*** Dióxido de nitrógeno.

**NO<sub>2</sub><sup>+</sup>** Radical catión nitronio

**OGA** O-N-acetilglucosaminidasa

**OGT** O-Glucosaminil transferasa.

**OGT<sub>m</sub>** O-Glucosaminil transferasa mitocondrial.

**OGT<sub>nc</sub>** O-Glucosaminil transferasa nucleocitoplásmica.

**OGT<sub>s</sub>** O-Glucosaminil transferasa corta.

**ONNO-** Peroxinitrito.

**PBS** Buffer de fosfatos

**PI3K** Fosfatidilinositol 3 cinasa

**PKC** Proteína Cinasa C

**PS** Presenilina

**PTM** Modificaciones postraduccionales.

**RL** Radicales libres.

**Ser** Serina

**STZ** Estreptozotocina.

**Tau** Proteína asociada a microtúbulos

**Thr** Treonina

**Tyr** Tirosina

**UDPGlcNAc** Uridindifosfo N-acetil glucosamina.

**WGA** Lectina de trigo

## **1.-RESUMEN.**

La enfermedad de Alzheimer es un padecimiento neurodegenerativo caracterizado por la presencia de placas neuríticas, compuestas por Amiloide Beta ( $A\beta$ ) y marañas neurofibrilares formadas por proteína tau hiperfosforilada, fomentada por reducción en la enfermedad de Alzheimer, los cambios en la O-GlcNacilación son afectados cuando el transporte y uso de la glucosa se encuentran reducidas en el cerebro, por estos cambios se considera a la diabetes un factor de riesgo en la enfermedad de Alzheimer. Por lo que generamos un modelo de toxicidad mediante  $A\beta_{25-35}$  en estado de hiperglicemia mediante el uso de estreptozotocina (STZ), para mostrar sus efectos sobre la O-GlcNacilación de la proteína tau en ratas Wistar macho, se dividieron en grupos (N = 20): a) control, b) con péptido  $A\beta_{25-35}$  (100 mM) en la región CA1, c) tratados con  $A\beta_{25-35}$  en región CA1 y STZ (40 mg / kg), y d) tratados con STZ. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en el peso medio, los niveles de glucosa, la concentración de insulina, y el porcentaje de HbA1c entre tratados y no tratados con STZ grupos (P <0,05). Nuestros resultados mostraron una disminución de O-GlcNacilación y OGTnc, así como un gran aumento de P-tau-Ser-396, y GSK3 $\beta$  en el área del hipocampo del grupo tratado con  $A\beta_{25-35}$  y STZ, aumento de O-GlcNacilación y cambios en la presencia de OGTm en extractos mitocondriales. La mitocondria se ve particularmente afectada por altas concentraciones de glucosa, ya que se altera la forma mitocondrial, el metabolismo de la glucosa y la generación de energía. Encontrando cambios en los niveles de O-GlcNacilación a nivel mitocondrial para los grupos  $A\beta$  en presencia de elevadas concentraciones de glucosa. Por lo que consideramos que la presencia conjunta de  $A\beta_{25-35}$  e hiperglicemia favorecen la activación de vías de señalización a nivel mitocondrial en enfermedad de Alzheimer. Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer; proteína tau, Amiloide  $\beta$ , hiperglicemia, hiperinsulinemia, OGTnc, OGTm, O-GlcNAcylation, GSK 3 $\beta$ .

## **2.- ABSTRACT.**

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease characterized by the presence of neuritic plaques of beta amyloid and neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau protein, promoted by reduced levels of O-GlcNAcylation, which is an important posttranslational change in Alzheimer's disease, changes in the O-GlcNAcylation are affected when transport and glucose utilization are reduced in the brain, these changes are considered to diabetes a risk factor in Alzheimer's disease. As we generate an experimental model of toxicity by using A $\beta$ 25-35 state of hyperglycemia by using streptozotocin (STZ) to show its effects on O-GlcNAcylation of tau protein in male Wistar rats, four groups were (N = 20): a) control b) A $\beta$ 25-35 peptide (100  $\mu$ M) in CA1, c) region and A $\beta$ 25-35 treated with STZ (40 mg / kg) and d) treated with STZ. The results showed statistically significant differences in average weight, glucose levels, insulin levels, and the percentage of HbA1c between treated and untreated STZ group (P <0.05). Our results showed a decrease of O-GlcNAcylation and OGT nc as well as a large increase in P-tau-Ser-396, and GSK3 in the hippocampus area of the A $\beta$ 25-35 and STZ-treated group, increased O-GlcNAcylation and OGT in mitochondrial extracts. High glucose concentrations particularly affect mitochondria, as they alter the mitochondrial form, glucose metabolism and energy generation. Finding changes in O-GlcNAcylation levels at mitochondrial level for A $\beta$  groups in the presence of high glucose concentrations. Therefore, we believe that the presence of A $\beta$ 25-35 and hyperglycemia favor the activation of mitochondrial signaling pathways in Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease; tau protein, amyloid  $\beta$ , hyperglycemia, hyperinsulinemia, OGTnc, OGTm, O-GlcNAcylation, GSK 3 $\beta$ .

### **3.-INTRODUCCIÓN.**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo y una causa frecuente de demencia en los ancianos (Maccioni et al, 2001.; Kelley y Petersen, 2007). Se encuentra presente en más de 44.3 millones de personas en el mundo (Jones et al., 2016, Querfurth y LaFerla, 2010), y afecta a aproximadamente 4.2 millones de norteamericanos mayores de 65 años o más (Jones et al., 2016., Hebert et al., 2003). EA es también una de las causas principales de demencia en las personas que envejecen y tiene similitudes la demencia asociada a diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Histológicamente, la enfermedad se caracteriza por pérdida de sinapsis, presencia extracelular de agregados de péptidos beta amiloide (A $\beta$ ), y presencia intracelular de marañas neurofibrilares (NFTs) formadas por agregados de proteína tau hiperfosforilada (Aleardi et al., 2005). Algunos trabajos consideran que el A $\beta$ , es en parte generado por escisión proteolítica, de la proteína precursora de amiloide (APP), existe en dos formas importantes, el A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 (Gangy, 2001); La presencia de oligómeros solubles de A $\beta$ , con capacidad agregativa, presentan mayor toxicidad para la célula (Viola et al., 2008). La enfermedad EA se divide en dos grupos: EA familiar (10%), que pueden ser causadas por mutaciones en el gen de la proteína precursora  $\beta$  amiloide (APP), o en los genes de presenilina 1 (PS1) y 2 (PS2) (Suárez-Calvet et al, 2014; Wahlster et al, 2013.) y EA esporádica (90%), donde se han identificado varios factores de riesgo, entre ellos padecer diabetes. (Botero et al., 2012., Piaceri et al., 2013).

Estudios previos apoyan, la asociación entre DM2 y la EA. Sin embargo, cómo es que la diabetes favorece el desarrollo de la EA todavía no está claro. La diabetes mellitus (DM) es un importante problema de salud pública. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud existen 346 millones de personas en todo el mundo con DM (ADA, 2014; OMS, 2013). DM se divide en tipo 1 (DM1), caracterizado por una falta de insulina por destrucción de las células beta pancreáticas y DM2, que incluye tanto una

disminución de la secreción de insulina, así como resistencia a la insulina (ADA, 2014; Kerner y Brückel, 2014). La DM2 es un factor de riesgo importante para el desarrollo de demencia o procesos neurodegenerativos (Verdile et al, 2015). Se considera que la DM2 aumenta dos veces el riesgo de demencia, y que uno de cada 10 casos de demencia en todo el mundo se asocia con DM2 (Biessels et al., 2014).

Algunos estudios se han centrado en el papel de la insulina y la resistencia a la insulina como posibles vínculos entre la DM y la EA (Cai et al, 2015.). La hiperglucemia es un factor de riesgo para la disfunción cognitiva y la demencia (Tomlinson y Gardiner, 2008). Aunque la fisiopatología de la EA se conoce sólo en parte, una de las hipótesis implica la vía amiloide (Hardy y Selkoe, 2002). El precursor de la proteína amiloide se procesa en A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 (Hardy y Selkoe, 2002). De estas isoformas, se han generado diferentes péptidos sintéticos de fracciones de la secuencia completa del péptido amiloide, de entre los cuales, la fracción A $\beta$ 25-35, ha demostrado contar con características citotóxicas y una buena capacidad agregativa, semejantes al A $\beta$ 1-40. El péptido A $\beta$ 25-35 se ha asociado con daño a las células nerviosas en el hipocampo, región del Cuerpo de Amon 1 (CA1) (Cuevas et al, 2009., Xing et al., 2011) y parece afectar la captación de glucosa por las neuronas del hipocampo (Prapong et al., 2002; Montiel et al., 2006). La reducción en la captación de glucosa afecta a su vez la presencia de UDPGlc-NAc principal donador de O-GlcNAc, implicada en los procesos de O-GlcNAcilación. La O-GlcNAcilación, a su vez, regula la fosforilación de la proteína tau, que es un proceso importante para mantener la estructura y la funcionalidad del citoesqueleto celular (Liu et al, 2005; Gong et al., 2006). O-GlcNAcylation se ha asociado con la resistencia a la insulina y la toxicidad de la glucosa (Lozano et al., 2014). La fosforilación de la proteína tau se puede ver aumentada por la actividad de la glucógeno sintasa quinasa-3beta (GSK3), que es una cinasa que reconoce a 27 de los 45 sitios de fosforilación de la proteína tau (Hanger y Noble, 2011). Algunos

de esos sitios específicos de fosforilación para la proteína tau son; Thr231, Ser396 y Ser 404, los cuales, en particular, se consideran críticos ya que afectan la capacidad de la proteína Tau para unirse y estabilizar a los microtúbulos, (Li y Paudel, 2006; Wanga et al., 2008). Se ha sugerido también, el papel de la GSK3 en la regulación de la acción de la insulina en pacientes obesos con DM2. (Henriksen, 2010); Por otra parte, la poca regulación de la actividad de GSK-3 $\beta$ , se ha implicado en el desarrollo tanto de EA como de DM2 (Dandona et al., 2011).

#### **4.-MODIFICACIONES POSTRANSDUCCIONALES.**

Las modificaciones postraduccionales (PTM) son críticas en la regulación de la estructura y función de las proteínas. Las PTM más comunes incluyen la acetilación, metilación, nitración, carbonilación, ubiquitinación, truncación, fosforilación y glicosilación. La ACETILACION es la reacción que introduce un grupo acetilo dentro de un compuesto químico, como ocurre en las histonas para la regulación génica o en las túbulinas para ayudar al ensamble de los microtúbulos. La NITRACIÓN es un proceso químico mediante el cual se introduce un grupo nitro dentro de un compuesto químico orgánico semejantes al A $\beta$ 1-40 las especies reactivas de nitrógeno (ERN) incluyen especies derivadas de nitrógeno que pueden o no ser radicales libres, (RL). Entre las ERN se encuentran los radicales de óxido nítrico (NO $\cdot$ ) y dióxido de nitrógeno (NO $_2\cdot$ ) y los no radicales cationes nitronio (NO $_2^+$ ) y peroxinitrito (ONOO $^-$ ), entre otros. Dentro de las ERN, el NO $\cdot$  es de gran importancia debido a que es una molécula de señalización que está involucrada en numerosos procesos biológicos. La METILACIÓN consiste en agregar un grupo metilo (-CH $_3$ ) a una molécula, y este proceso es muy importante en el silenciamiento genético siendo muy importante en las alteraciones por transcripción génica. La CARBONILACIÓN es la reacción química mediante la cual una molécula de monóxido de carbono se inserta en un sustrato orgánico, como ocurre al producir ácido acético a partir de metanol. La UBIQUITINACIÓN es un

proceso mediado por la ubiquitina que es una pequeña proteína reguladora, encontrada en la mayoría de los tejidos de eucariotas. La ubiquitina se puede asociar a proteínas marcándolas para su destrucción, ya que las dirige al proteosoma, que es un gran complejo de proteínas que encontramos en la célula encargado de degradar y reciclar proteínas innecesarias. La TRUNCACIÓN es un tipo de mutación puntual en una secuencia de ADN que provoca la aparición de un codón de terminación prematuro, donde el ARNm transcrito genera una proteína truncada por lo general no funcional, con tendencia a acumularse. La truncación puede ser no dependiente, de los codones de terminación, ya que en la proteína puede ocurrir cuando es cortada por una enzima. La FOSFORILACIÓN es el proceso mediante el cual se agrega un grupo fosfato a otra molécula como las proteínas. En el metabolismo, la fosforilación es el mecanismo básico de transporte de energía desde los lugares donde se produce hasta los lugares donde se necesita, y son reguladas mediante enzimas como las proteínas cinasas encargadas de fosforilar proteínas. La GLICOSILACIÓN, es el proceso mediante el cual se adhieren carbohidratos a una proteína; una vez que se ha añadido una cadena de polisacáridos a la proteína, es secretada, forma parte de la membrana extracelular, aunque actualmente se sabe que algunas proteínas citosólicas, nucleares o mitocondriales también pueden ser glicosiladas.

#### **4.1.- MODIFICACIONES POSTRANSCRIPCIONALES EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

Las modificaciones postranscripcionales de la proteína tau y sus efectos durante el desarrollo normal, ocurren 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).

La truncación es la modificación que produce el corte de una proteína en regiones específicas promoviendo así alteraciones en su función. La truncación del carboxilo terminal de la proteína tau se ha propuesto como un evento temprano de la formación de inclusiones intracelulares en la EA (Guillozet-Bongaarts et al., 2005). Tau truncada en la Glu 931 se describe en las marañas neurofibrilares, y en las neuritas anormales de cerebros de pacientes con EA (Guillozet-Bongaarts et al., 2005).

La nitración de proteínas ocurre cuando se agregan nitritos a las cadenas proteicas. 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, mientras 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 es propuesta como un evento relacionado con la EA (Guillozet et al., 2003).

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 de la proteína tau (Liu et al., 2002)

La glicosilación se define como la reacción mediante la cual los oligosacáridos son unidos 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 unido con la cadena proteica por el grupo amida de las

asparaginas, mientras que la O-glicosilación es la unión de una O-N-acetilglucosamina, (O-GlcNAc), que interactúa con el grupo hidroxilo de una serina o treonina en proximidad a un residuo de prolina (Gong et al., 2006; Liu et al., 2002).

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., 2002).

### **5.- GLICOSILACION**

La glicosilación es la unión entre un carbohidrato y el hidroxilo de otra molécula. Esta modificación es transduccional y post-transduccional. Los carbohidratos predominantemente encontrados en los glicoconjugados humanos incluyen: galactosa (Gal), manosa (Man), fucosa (Fuc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc) y la forma humana del ácido N-Acetilneuraminico (NeuNAc). (Voet et al., 2007)

Las glicoproteínas según el tipo de glicosilación se dividen en tres clases principales; C-, N- y O. La C- glicosilación ocurre en citoplasma sobre el residuo triptófano (Trp), en consenso (Trp-X-X-Trp). La N-glicosilación, son polisacáridos, procesados en RER y Golgi, la O-Glicosilación ocurre en Golgi, y existe una variante de esta en la cual un solo monosacárido de O-N-acetil glucosamina actúa sobre residuos de serina (Ser) y treonina (Thr). En este trabajo en particular abordaré la O-GlcNacilacion nucleocitoplasmática. (Varky et al., 2009).

La glicosilación es una modificación postraducciona frecuente en las proteínas. Los tipos más estudiados de glicosilación son: la O- y la N-glicosilación así como la C Manosilación. (Figura 1).

### **5.1.- C-GLICOSILACIÓN.**

La C-Glicosilación o C-manosilación, es otro tipo de glicosilación que se da cuando el C-1 de una manosa es añadida a C-2 del residuo de triptófano en la secuencia de glicosilación crítica en RNAasa 2 es Trp-X-X-Trp, con la primera Trp siendo modificada y siendo X cualquier aminoácido. Existen más de 300 proteínas de mamíferos con esta modificación. La C-manosilación es inusual porque el azúcar está unido a un carbono en lugar de un átomo de reactivo tal como nitrógeno u oxígeno. Recientemente, la primera estructura cristalina de una proteína que contiene este tipo de glicosilación se ha determinado que es componente del sistema de complemento humano (Hudson H. Essentials of Glycobiology.)

### **5.2.- N-GLICOSILACIÓN**

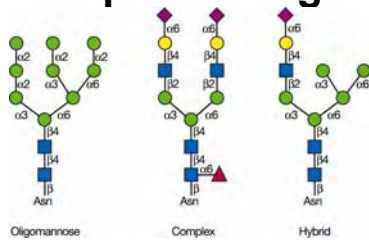
La N-Glicosilación y el procesamiento de N-oligosacáridos son modificaciones que adicionan o eliminan oligosacáridos específicos de las N-Glicoproteínas en el retículo endoplásmico rugoso (RER). Estas proteínas se modifican en el Golgi quien en sus cisternas contiene glicosiltransferasas, que agregan azúcares o glicosidasas encargadas de la remoción de azúcares como la N-GlcNAc., NeuNac., Gluc., Gal., Fuc., etc. (Varky et al., 2009, Voet et al., 2007.) (figura 1)

En la N-glicosilación, que consiste en la unión de un oligosacárido a través de un enlace N-glicosídico al grupo amino del aminoácido asparagina, ésta se realiza en el retículo endoplásmico. Las glicoproteínas se encuentran asociadas a un centro o CORE que une a una cadena de carbohidratos a la estructura proteica. Un aspecto importante de ambos procesos es que se realiza fundamentalmente en proteínas que se encuentran en las regiones luminales y/o extracelulares, lo que permite al organismo contar con estructuras altamente especializadas que le permiten reconocer estructuras proteicas propias de extrañas. (Dickamer and Taylor 2006).

Tabla.1. Características de la N-Glicosilación.

Tipo de glicosilación	Características	Síntesis	Azúcares	Sitio de unión proteica	Ejemplo de Función
N-Glicosilación	agregan o retiran moléculas de glicanos específicos de N-Glicoproteínas	Reticulo endoplásmico rugoso y Golgi	N-acetilglucosamina, ácido siálico, glucosa, galactosa, fructosa, etc.	Los N-oligosacáridos que se unen al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparagina (Asn-X-Ser/Thr)	Da a la proteína, conformación, solubilidad, antigenicidad y favorece el reconocimiento de proteínas por su unión a glicano.

## Tipos de N-glicanos



Tomado de Essentials in Glycobiology 2ª Ed.

### Representación simbólica de los monosacáridos y asociaciones comunes

● Galactosa (Gal)	★ Xylose (Xyl)
■ N-Acetylgalactosamina (GalNAc)	◆ N-Acetylneuraminic acid (Neu5Ac)
▤ Galactosamina (GalN)	◇ N-Glycolylneuraminic acid (Neu5Gc)
● Glucosa (Glc)	◆ 2-Keto-3-deoxynononic acid (Kdn)
■ N-Acetylglucosamina (GlcNAc)	▲ Fucosa (Fuc)
▤ Glucosamina (GlcN)	◆ Glucuronic acid (GlcA)
● Manosa (Man)	◆ Iduronic acid (IdoA)
■ N-Acetylmannosamina (ManNAc)	◆ Galacturonic acid (GalA)
▤ Mannosamina (ManN)	◆ Mannuronic acid (ManA)

## 5.3.- O-GLICOSILACIÓN

La O-glicosilación de proteínas comienza en aparato de Golgi con la unión de N-acetilgalactosamina (GalNAc) o manosa (Man) a residuos de Serina (Ser) o Treonina (Thr) de la proteína. Los residuos de N-actilglucosamina, galactosa, fucosa o ácido siálico son añadidos unos a uno de manera secuencial con diferentes tipos de enlaces, resultando por ello en diferente

O-oligosacáridos (O-glicanos) con estructura ramificada, compuesto por pocos residuos de monosacáridos. Un ejemplo característico de O-oligosacáridos con cadenas laterales que pueden inducir una respuesta inmunológica son los grupos sanguíneos (antígenos) A, B, y O que son O-oligosacáridos que unidos a glicoproteínas o glicolípidos se presentan en la superficie de eritrocitos (glóbulos rojos) y otros tipos de células. (Varky 2009, Voet 2007).

Una de las funciones de esta modificación consiste en la secreción de materiales para formar la matriz extracelular, adhiriendo una célula a otra mediante interacciones de los complejos glicanos de los proteoglicanos.

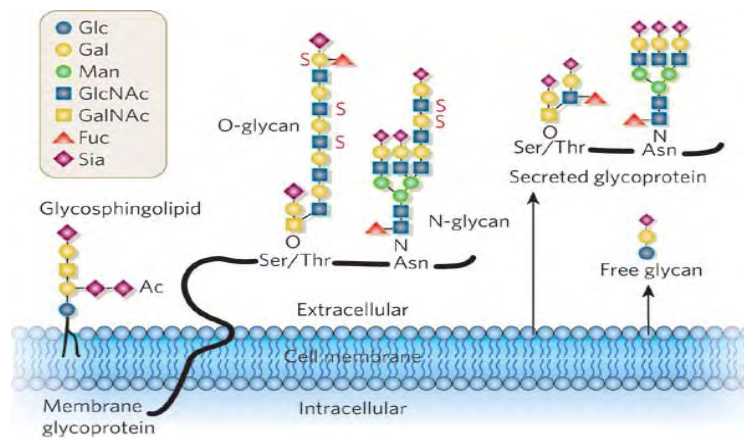
Otra función es la de actuar como un componente de las secreciones de aspecto mucoso donde la alta concentración de carbohidratos favorece la consistencia. Diversos glicanos se agregan a las cadenas por ejemplo la O-fucosa se añade entre el segundo y tercer residuo conservado de cisteína, que puede enlongarse por la adición secuencial de N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico.

La O-Glucosa se añade entre el segundo y tercer residuo de cisteína, y parece tener utilidad en el correcto plegamiento de proteínas. La O-N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) ocurre en la mayor parte de serinas y treoninas compartiendo los sitios con las cinasas que pueden fosforilarlos si no se encuentran glicosilados. Lo O-mannosa es cuando un residuo de manosa se transfiere de manosa-p-doicol a un residuo de serina-treonina en proteínas de vías secretorias.

Tabla.2. Características de la O-Glicosilación.

Tipo de glicosilación	Características	Síntesis	Azúcares	Sitio de unión proteica	Ejemplo de Función
O-Glicosilación	adición de O-oligosacáridos	Golgi	N-GalNAc, N-GlcNAc, Fuc., Xil, y NacNeu.	GlcNAc-N-Asn, GalNAc-O-Ser/Thr y XYL-O-Ser presentes en glicoproteínas y proteoglicanos.	O-glicanos son frecuentes en células secretoras y tejidos. Están presentes en la zona pelúcida que rodea los ovocitos y en recepción de espermatozoides. Los O-glicanos son importantes en la hematopoyesis, inflamación y formación de antígenos sanguíneos ABO.

Figura 2. O-glicanos



#### 5.4.- O-GLCNACILACIÓN

La O-GlcNAcilación se describió en 1984 cuando el Dr. Hanover muestra una modificación postraducciona generada por un único monosacárido, proceso que observo a nivel del poro nuclear. Más tarde, se mostró que era la N-acetilglucosamina (GlcNAc) el monosacárido incorporado al hidroxilo de la Ser o Thr, mediante un enlace O-glicosídico. Estudios posteriores encontraron que la O-GlcNAcilación, se efectúa sobre proteínas nucleares, citoplasmáticas y en proteínas mitocondriales, y que además se produce y afecta procesos como la señalización intracelular, a proteínas del citoesqueleto, así como a enzimas asociadas con el metabolismo celular (Love *et. al.*, 2003, Hanover *et al.*, 2005).

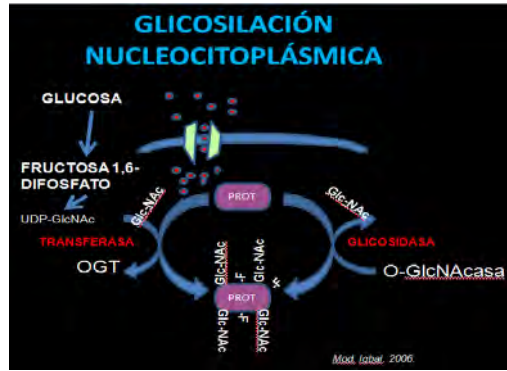


Fig. 3 Modificación por O-N-acetilglucosamina.

La O-GlcNAcilación se realiza por la O-Glicosiltransferasa (OGT) quien agrega a la O-GlcNAc a la proteína, y en donde la cantidad de O-GlcNAc que se mantiene unida a la proteína es regulada por la hidrolasa N-acetilglucosaminidasa (OGA) quien es la única enzima encargada de remover al monosacárido. (Zachara and Hart 2006 Kim et. al., 2006, 2007). Actualmente sabemos que las proteínas pueden ser glicosiladas y pueden también ser fosforiladas por diversas proteincinasas. Este es un proceso que sucede en sitios comunes de la Ser y la Thr, por lo que se ha sugerido que la glicosilación puede tener un papel en la regulación de los procesos de fosforilación (Hanover 2012).



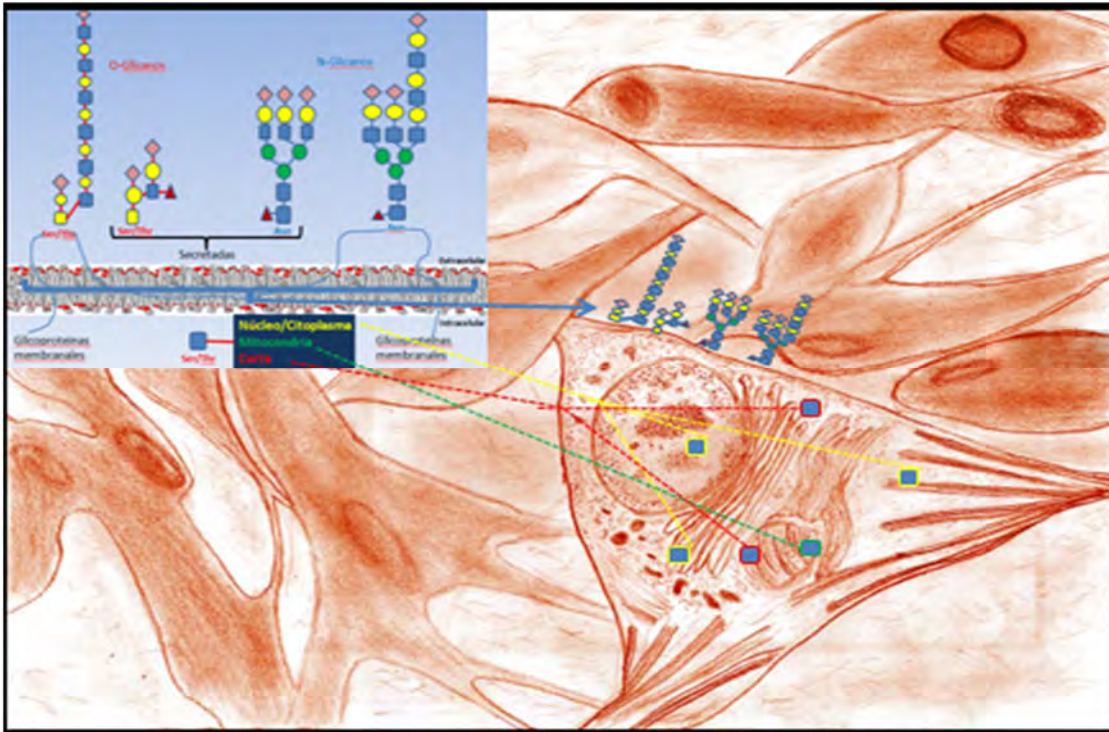


Fig. 4 Tipos de Glicosilación.

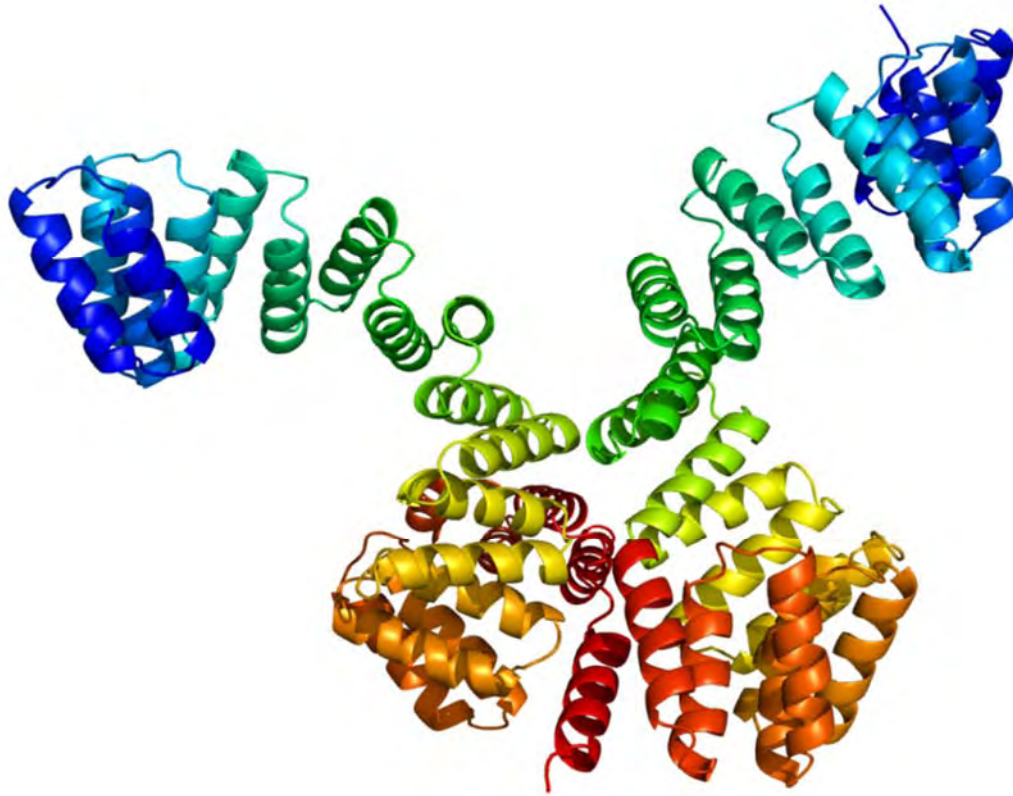
## 6.- ENZIMAS IMPLICADAS EN LA O-GLCNACILACION.

### 6.1.- LA O-N-ACETILGLUCOSAMINIL TRANSFERASA (OGT) EN LA GLICOSILACION.

La GlcNAc, es un producto de la vía biosintética de las hexosaminas (HPB), en donde la O-N-acetilglucosaminil transferasa (OGT) es quien cataliza la transferencia del grupo GlcNAc de la molécula donadora (UDPGlcNAc) a una proteína aceptora (Love *et. al.*, 2003, Hanover et al., 2005).(figura 5).

En los mamíferos, el gen de la OGT está localizado en el segmento Xq13 del cromosoma X, y puede presentarse en 3 isoformas que se generan por empalme alternativo, lo que depende del número de tetratricopeptidos de repetición.





(By Emw - Own work)

Figura 5. Estructura de OGT.

La isoforma más larga de la OGT es la nucleocitoplásmica (OGTnc), en donde el gen tiene 23 exones y la proteína un peso de 116 kDa, la isoforma intermedia que se encuentra en la mitocondria (OGTm) presenta 15 exones y un peso de 103 kDa, y la última es la isoforma corta (OGTs) con 10 exones y un producto de 78 kDa de peso (Zachara and Hart 2006, Hanover et al., 2012) (Figura 6). La localización de la OGTs es similar a la de la OGTnc, ambas se han encontrado en tejidos humanos adultos, como lo es el cerebro, en la corteza prefrontal e hipotálamo, aunque también se ha descrito su presencia en el páncreas y el útero. En el caso de la OGTm, al parecer tiene una expresión en los tejidos más limitada, y hasta el momento sólo se ha encontrado en el pulmón fetal y cerebro fetal, así como en células de la sangre (Hanover et al., 2011).

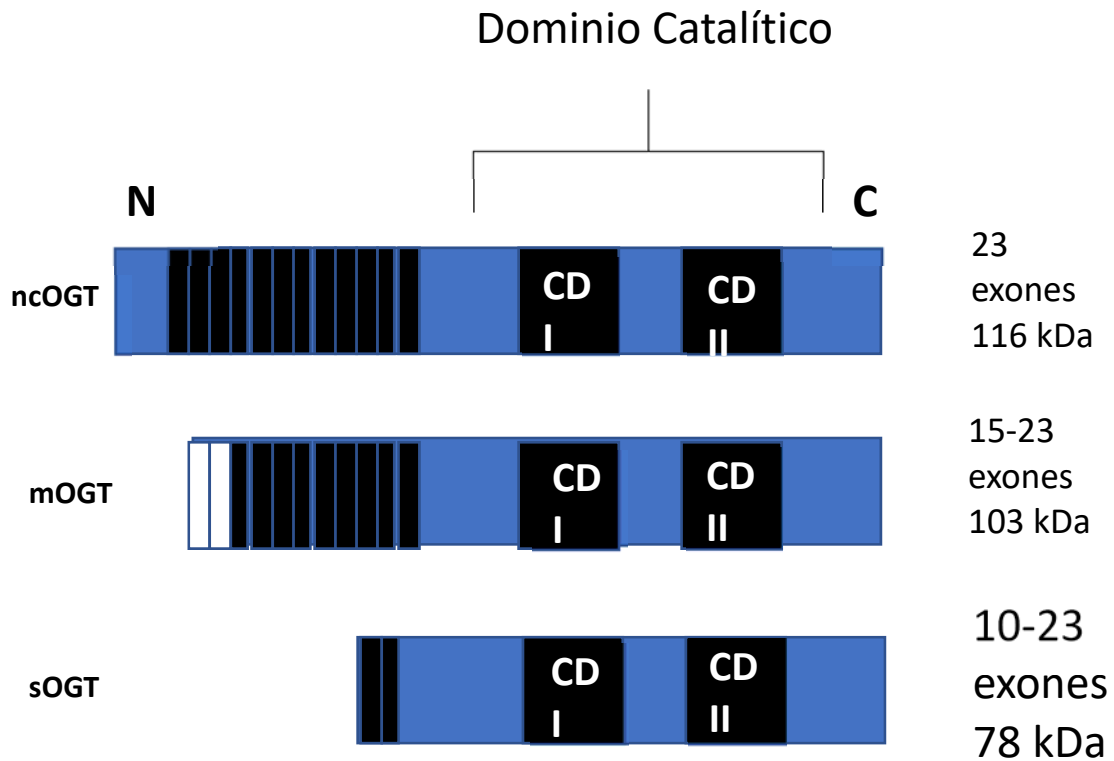


Figura 6. Isoformas de la OGT

## 6.2.-LA O-N-ACETILGLUCOSAMINIDASA (OGA) EN LA O-GLCNACILACIÓN

La O-N-acetilglucosaminidasa (OGA) es la enzima encargada de catalizar la eliminación del GlcNAc de las proteínas, y la cual se ha encontrado tanto en el núcleo como en el citoplasma celular. La OGA es una glicosil-hidrolasa o glucosidasa, y sus sustratos son las glicoproteínas modificadas por el O-GlcNAc. Este tipo de modificación postraduccional, que es común en las células de mamíferos, se encuentra ampliamente distribuida en las proteínas asociadas a procesos celulares vitales para el funcionamiento celular, como lo son: la degradación proteosomal y la señalización celular (Macauley *et.al.*, 2005, Yuzwa *et. al.* 2012)(Figura 7)

El gen para la OGA se encuentra en el cromosoma 10 (10q24), y el cual codifica para dos isoformas generadas mediante el empalme alternativo. La isoforma larga de OGA (hIOGA), formada por 16 exones, y la isoforma corta (HsOGA), la que se genera por un empalme alternativo y en donde encontramos la presencia de 10 exones. La actividad de estas dos isoformas de la OGA, se asocia a la falta del extremo carboxilo terminal de la isoforma corta (Kim et. al., 2006, 2007). Además del papel que la OGA tiene en la remoción de la GlcNAc, se le ha relacionado con la etiología de enfermedades como la DM, la EA y el cáncer. En años recientes se ha logrado clonar al gen, así como se ha caracterizado parcialmente a la enzima, sin embargo, se sabe aún poco sobre el mecanismo catalítico de ésta.



Schimpl et.al.

Figura 7. Estructura de OGA.

## **7.- LA OGT COMO SENSOR DE NUTRIENTES.**

El metabolito uridin difosfo-N-acetylglucosamina (UDP-GlcNAc) es quien funciona como el donador de la GlcNAc, para las enzimas encargadas de añadir a este a los sustratos. El origen de la GlcNAc es a través de la vía de las hexosaminas, ésta es una ruta metabólica que en condiciones fisiológicas consume del 2 al 5% del total de glucosa celular, y en donde el paso limitante para su actividad, es la presencia de la glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT), la cual convierte a la fructosa-6-fosfato a glucosamina-6-fosfato, metabolito que es el precursor del donador UDPGlcNAc (Buse 2006). Investigaciones previas han sugerido una asociación entre la vía de las hexosaminas y patologías como la DM, al favorecer la generación de la glucosamina-6-fosfato, lo cual a su vez aumenta la disponibilidad del UDP-GlcNAc y por ende la O-GlcNAcilación, desequilibrando así el balance entre los procesos de glicosilación y fosforilación (Buse 2006). La adición de GlcNAc a las proteínas es un proceso dinámico asociado con la respuesta al estrés celular, ya que se ha encontrado que los niveles de O-GlcNAc se elevan como medida de protección tanto en células como en tejidos, (Zachara et al., 2004). Un efecto similar, se ve en condiciones de hiperglucemia constante de tejidos periféricos, en donde se muestra un incremento de la O-GlcNAcilación (Buse et al., 2006, Slawson et al., 2006). La actividad de la GFAT es modulada por los niveles de UDP-GlcNAc, el cual depende de las concentraciones de nutrientes circundantes para la generación de la O-GlcNAcilación. La vía de las hexosaminas integra el metabolismo de los hidratos de carbono, del aminoácido glutamina (Gln), de intermediarios de la síntesis de ácidos grasos (acetil-CoA) y de los nucleótidos (uridina-difosfato) para la síntesis del UDP-GlcNAc, razones por las cuales se ha sugerido que la HBP funciona como un sensor de nutrientes y que alteraciones en su actividad puede tener importancia para el desarrollo de diversas patologías (Buse et al., 2006, Slawson et al., 2006). Algunas evidencias sugieren que la O-GlcNAcilación tiene un papel importante para

la regulación de las vías de señalización de la insulina. El incremento de la O-GlcNAcilación en músculo y adipocitos, afecta la activación de la fostatidilinositol 3 cinasa (PI3K) derivada del receptor de insulina. Asimismo, se ha encontrado que la hiperglicemia facilita la O-GlcNAcilación de proteínas asociadas con la glucotoxicidad y con la resistencia a la insulina, considerándose por esto como un punto clave para la evolución de patologías como lo es DM (Monte 2012).

### **8.- LA O-GLICOSILTRANSFERASA NUCLEOCITOPLASMÁTICA (OGTnc) EN LAS PROTEÍNAS CELULARES.**

La O-GlcNAcilación se presenta en una amplia gama de proteínas, hasta el momento se han identificado más de 600 proteínas que se encuentran O-GlcNAciladas en la célula. Sin embargo, se considera que este gran número sólo representa a una parte de las proteínas que se están modificando continuamente dentro de la célula. Diversos estudios, han descrito proteínas O-GlcNAciladas en prácticamente todos los compartimentos celulares en donde existan sitios con Ser o Thr, los cuales son susceptibles de ser O-GlcNAcilados. Entre las proteínas que pueden sufrir esta modificación, se incluyen a proteínas del poro nuclear, a factores de transcripción, proteínas de regulación epigenética, a proteínas del citoesqueleto, las chaperonas, proteínas virales, cinasas, fosfatasas, proteínas adaptadoras y enzimas asociadas con el metabolismo celular, entre otras (Hanover 2012). Como ejemplos específicos, podemos mencionar la presencia de la O-GlcNAcilación en las proteínas de poro nuclear p62 y Nup54 (importantes para el transporte de moléculas solubles y factores de transcripción a través de la envoltura nuclear) (Lubas and Hanover 2000).

En el trabajo de Han et. al., (2000), se mostró que el aumento en la concentración de glucosa estuvo asociado con un incremento en los niveles de O-GlcNAcilación de la proteína p62, lo que interviene con el transporte

activo del ARNm o de proteínas importantes para el reconocimiento de la señal de localización nuclear (Finlay and Forbes 1990).

Otros autores han evidenciado que factores de transcripción como: Sp1, p53, receptores de estrógenos,  $\beta$ -catenina, NF- $\kappa$ B y RNA polimerasa II entre otras, y que intervienen en la regulación de la transcripción del ADN, y como mediadores en la unión de otros factores transcripcionales, son modificados por la O-GlcNAc (Jokela et.al. 2011). Por ejemplo, Lim (2010), sugiere que la O-GlcNAcilación del factor de transcripción Sp1 actúa facilitando el reconocimiento de las secuencias a transcribir, y que el aumento de la O-GlcNAcilación debilita la unión al ADN de Sp1 y sus complementos de unión estable, inhibiendo la interacción de Sp1 sobre cadenas de ADN afectando la transcripción (Lim and Chang, 2010).

Investigaciones realizadas en proteínas involucradas con la regulación de la expresión génica, como por ejemplo con la ARN polimerasa II, histonas, complejos de la desacetilasa de histonas, que son importantes en la regulación genética son moduladas por la O-GlcNAción (Hanover et.al., 2012) En el caso de la ARN Pol II, esta proteína requiere de ser O-GlcNAcilada para poder efectuar su trabajo pero cuando se disminuyen sus niveles de O-GlcNAcilación no se observa la formación del complejo de pre-iniciación transcripcional (Ranuncolo et.al. 2012).

La tirosina y fosfatasa, como, por ejemplo: la Glucogeno sintasa cinasa 3 (GSK3), p85 y subunidades de la fosfoinositol 3 cinasa (PI3-K) entre otras, y quienes intervienen en la remoción o adhesión de fosfatos, ven regulada su actividad por los cambios en la O-GlcNAcilacion (Carrillo et.al. 2011). Proteínas del citoesqueleto como las citoqueratinas, neurofilamentos H, M y L, miosina, E-caderina, proteína *tau* asociada a microtúbulos, dineína,  $\alpha$ -túbulina, proteína precursora del  $\beta$ -amiloide,  $\beta$ -sinucleína, entre otras pueden también sufrir O-GlcNAcilación. (Lubas and Hanover 2000). Todas las proteínas mencionadas son relevantes por el papel que tienen para formar el entramado tridimensional implicado en el soporte interno de las células, lo cual interviene además en los fenómenos de transporte, tráfico y

división celular. Hablando en especial de la proteína *tau*, se ha encontrado que ésta es ampliamente O-GlcNAcilada lo cual regula negativamente su fosforilación; y en contraste, una disminución en su O-glicosilación favorece su hiperfosforilación, tal y como se descrito en la EA (Hart 2007, Liu et.al., 2004).

Otras proteínas que ven modificada su expresión en condiciones de estrés debido a la O-GlcNAcilación son las proteínas de choque térmico (HSP) como son las: HSP 27,  $\alpha$ -cristalina, HSP70, o la HSP90 entre otras. El trabajo de Kasemi sugiere que GlcNAcilación inducida por el estrés aumenta la expresión de HSP al inhibir la actividad de GSK-3 $\beta$ . (Kazemi et.al., 2010).

Las modificaciones encontradas en proteínas virales como por ejemplo la proteína de adenovirus, POTYVIRUS PLUM POX o la fosfoproteína básica del citomegalovirus, han mostrado una dependencia de la glicosilación para el ensamble y estructura viral (Pérez et al., 2013). En presencia de grandes concentraciones de glucosa se estimula la formación de la glucosamina, lo que incrementa a su vez los niveles de síntesis de la GlcNAc y como producto final los niveles de O-GlcNAcilación.

Recientemente, se ha descrito que la modulación de enzimas involucradas en actividades metabólicas como son la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS), la deshidrogenasa del gliceraldehído-3-fosfato, la piruvato quinasa, la UDP-glucosa pirofosforilasa y glucógeno sintasa por dar algunos ejemplos, ven disminuida su actividad por la O-glicosilación (Beleznai and Bagi Z. 2012).

Dado el gran número de sustratos modificados por la O-GlcNAc, esta última puede regular muchas funciones celulares (Hanover 2001; Butkinaree et al 2010; Hanover et al. 2010; Lazarus et al. 2009; Love y Hannover 2005; Hart et al. 2007).

## **9.-IMPORTANCIA DE LA MITOCONDRIA EN EL METABOLISMO ENERGETICO.**

Las mitocondrias son organelos de las células eucariotas que suministran la energía necesaria para el funcionamiento celular. Tienen un metabolismo que requiere de la presencia de oxígeno, así como mecanismos de obtención de energía (ATP), ciclo de Krebs, beta-oxidación y oxidación de ácidos grasos, mediante enzimas redox que realizan el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, a través la cadena respiratoria; además éste organelo interviene en la transcripción de información genética a partir del ARN mitocondrial (ARNm). (Hroudová J. et al., 2014.).

Mediante el uso de microscopía electrónica se ha descrito que su estructura está compuesta por una membrana externa, una membrana interna que forma crestas y la matriz mitocondrial, que es quien contiene el DNA y RNA, así como ribosomas que participan en la síntesis de compuestos mitocondriales. La membrana externa mitocondrial contiene porinas que permiten el paso de moléculas pequeñas y de iones de hasta 10 KDa. (Lim et al., 2016.) La membrana interna está compuesta por una alta concentración de proteínas (75% de peso) y es impermeable a la mayoría de moléculas pequeñas e iones, incluso  $H^+$  pero permeable a  $O_2$ ,  $CO_2$ , y  $H_2O$ . Contiene a la cadena de transporte de electrones, ADP-ATP, translocasa, ATP-sintasa, etc. La matriz mitocondrial es una solución con menos del 50% de agua, con una mezcla de diferentes las enzimas como son las del ciclo de Krebs, enzimas de la  $\beta$ -oxidación, enzimas de la oxidación de aminoácidos, ADN, ribosomas, sustratos, ADP, ATP, e iones inorgánicos  $P_i$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ , y otros intermediarios metabólicos solubles. (Hroudová J. et al., 2014.).

La mitocondria es un organelo dinámico, que es controlada mediante la fusión (unión de mitocondrias para formar una más grande), o fisión (formación de dos mitocondrias a partir de una), ya que las mitocondrias no pueden ser generadas de novo, proliferan por el crecimiento y división de



los organelos preexistentes. Algunas proteínas importantes en la dinámica mitocondrial son 4GTPasas: Miofusina 1 a 2, GPA1 y DPr1. Todas ellas dependientes de hidrólisis de GTP. (Hill s. et al., 2014.)

El número de mitocondrias varía según el tipo de organismo o tejido, y las mitocondrias varían de tamaño y forma dependiendo de su origen y estado metabólico, con una longitud aproximada de 2 $\mu$ m, y un diámetro entre 0.5 $\mu$ m y 1 $\mu$ m, una célula eucariota típica posee alrededor de 2000 mitocondrias. (Cheng et al., 2010).

Las mitocondrias se desplazan mediante microtúbulos y se localizan en las regiones próximas con mayor consumo de ATP. Las mitocondrias cambian su forma y distribución dependiendo de las necesidades celulares. Por ejemplo, en las neuronas, las mitocondrias son responsables del mantenimiento bioenergético por su alta demanda de ATP y su adecuada distribución, ya que se concentran en las regiones neurales pre y pos sinápticas, mediante un adecuado transporte activo, para reclutarlas (Cheng et al., 2010).

La presencia de DM, se considera en la actualidad un factor de riesgo en la EA y hay evidencias que muestran que la DM exaserva los cambios característicos de la EA, mediante mecanismos aún no bien conocidos. En la actualidad existen modelos de la EA que emplean el uso de estreptozotocina (STZ) que es una sustancia química de origen natural que se sintetiza en el interior de ciertas células pancreáticas encargadas de producir insulina: los islotes de Langerhans. (Baptista et al, 2013). Es un agente diabetógeno, es decir, que es capaz de provocar o de agravar una diabetes lo que explica que sea utilizada con frecuencia en modelos experimentales, provocando DM artificialmente en animales de laboratorio, ya que las células  $\beta$  del páncreas captan la STZ a través del transportador GLUT2. La STZ, ocasiona cambios intracelulares en las células beta, fragmentación y alcalinización de DNA, hasta producir muerte. (Elsner et al., 2000).

Se ha establecido que en situaciones de hiperglicemia y envejecimiento se incrementan los niveles de glicación de las mitocondrias, la mitocondria es el principal orgánulo intracelular encargado de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), el exceso de ERO bajo estrés oxidativo, puede causar deterioro, funcional y/o estructural de las mitocondrias, lo que resulta en una reducción del ATP mitocondrial, induciendo formación de Citocromo C que induce muerte celular (Shen, et al., 2012; Aleardi et al., 2005).

En ratones transgénicos con sobreexpresión de A $\beta$ , se ha demostrado una disminución del complejo mitocondrial 1 NADH deshidrogenasa y IV Citocromo oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial lo que se asocia con daño oxidativo mitocondrial. (Tan et al., 2014; Eckret et al., 2011).

### ***10.-DIABETES Y EL DAÑO A LA MITOCONDRIA.***

En DM, e hiperglucemia se inducen numerosos efectos secundarios derivados de la activación de la proteína quinasa C (PKC), como lo es la generación de productos finales de la glicación avanzada (AGE), la actividad de la vía de los polioles, la síntesis mitocondrial de ERO (Shen, 2012) y una mayor actividad de la vía de hexosamina (Springhorn et al., 2012). La mitocondria se ve particularmente afectada por altas concentraciones de glucosa, ya que se altera la forma mitocondrial, del metabolismo de glucosa, la generación de energía, así como la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> (Baptista et al, 2013; Boudina et al, 2007). En las neuronas, una alta concentración de glucosa induce la despolarización de la membrana mitocondrial (Liu et al, 2006; Russell et al, 2002), favoreciendo una actividad mitocondrial anormal, así como problemas del estado bioenergético (Ferryhough et al, 2010; Reddy, 2009). En su conjunto, las evidencias antes mencionadas muestran la relevancia de las mitocondrias para la evolución de los trastornos neurodegenerativos y el envejecimiento. (Cao et al, 2012;. Cardoso et al, 2013;. Moreira et al., 2007).

## **11.- EL PÉPTIDO A $\beta$ Y EL DAÑO A LA MITOCONDRIA.**

De manera similar a la descrita para DM, las mitocondrias de las células neuronales son los orgánulos particularmente afectadas en la EA. La característica más notable de la EA es la presencia de A $\beta$ , que se ha vinculado a la evolución de la enfermedad debido a su capacidad de inducir la síntesis de ERO (Mattson, 1997), y cuyo origen mitocondrial se ha establecido en las células neuronales incubadas con A $\beta$  (Bobba et al, 2013;. Jiao et al, 2012). Estos datos apoyan la existencia de un círculo vicioso, donde la disfunción mitocondrial favorece la síntesis de A $\beta$  y, la presencia de A $\beta$  sintetizado, aumenta la síntesis de ERO (Leuner et al., 2012a, 2012b). En un informe de Rosales- Corral et al. (2012) se mostró que la inyección de A $\beta$  fibrilar en el hipocampo causa daño axonal severo y alteraciones de la membrana mitocondrial interna. Además, Aleardi et al. (2005) encontraron que la acumulación de A $\beta$  en el cerebro de rata se asoció con un aumento de la viscosidad mitocondrial, la liberación del citocromo C, y la inhibición de los complejos de la cadena respiratoria concurrentes con la síntesis de ERO. Estos cambios explican en parte el deterioro de la fosforilación oxidativa y el aumento de la síntesis de ERO encontrado en cerebros post-mortem de los pacientes con EA, así como en modelos animales de la EA en presencia de A $\beta$  (Spuch et al., 2012).

Otros efectos secundarios observados fueron el daño de la membrana mitocondrial, la disminución de la actividad del Ca<sup>2+</sup> -ATPasa, y el aumento de mitocondrial por la acumulación de A $\beta$  (Ren et al., 2011).

Si bien estas evidencias colocan las mitocondrias como un punto común de daños tanto en DM y AD, el efecto preciso de la glucosa en las neuronas del hipocampo es aún desconocido. Los efectos de la alta concentración de glucosa en las vías metabólicas, que están asociados a los efectos secundarios de la glucosa en el cerebro de los pacientes diabéticos, son aún poco conocidos.

Aunque, se requiere más información para mejorar nuestra comprensión de la asociación de DM y AD (Aleardi et al, 2005; Cao et al, 2012; Neumann et al., 2008; Reddy, 2009; Russell et al., 2002; Shen, 2012), consideramos que la hiperglucemia crónica en pacientes con DM es un factor de riesgo importante en el desarrollo de la EA.

### **12.-NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR GLUCOSA.**

Las neuronas tienen una alta y constante demanda de glucosa. Sin embargo, la captación de glucosa no es ni depende de la influencia de la insulina. En condiciones de altos niveles de glucosa o de hiperglucemia, como en DM, las neuronas están expuestas a cuatro veces la concentración habitual de glucosa; si este aumento es persistente, el exceso de glucosa conduce a daño neuronal (Tomlinson y Gardiner, 2008). Normalmente, la insulina regula las altas concentraciones de glucosa postprandial, induciendo su absorción por el músculo, el hígado y el tejido adiposo. El cerebro, que utiliza la glucosa como fuente principal de energía, tiene transportadores de glucosa (GLUT1, GLUT3, y GLUT8) que no dependen de la insulina para la captación de glucosa (Espinoza-Rojo et al., 2010). Aunque GLUT4 (dependiente de la insulina que se expresa) se ha descrito en el cerebro, gran parte de captación de glucosa es mediada por transportadores de glucosa GLUT 1 y 3, que no dependen de insulina (Espinoza-Rojo et al., 2010). La presencia de glucosa en el mantenimiento de la funcionalidad del cerebro es indispensable (Pasquier et al., 2006). Sin embargo, las variaciones drásticas en los niveles fisiológicos de glucosa se han asociado con la disfunción cognitiva pacientes con diabetes tipo 1 o 2 (Kawamura et al., 2012). La evidencia actual sugiere que este efecto negativo surge de la disfunción mitocondrial (Rehni et al., 2014). Varios estudios han demostrado que la diabetes se asocia con el deterioro cognitivo y la demencia (Biessels et al., 2006). Aunque se han sugerido algunos factores, tales como los defectos en la vasculatura cerebral, deterioro de la señalización de la insulina, resistencia a la insulina, el estrés

oxidativo, los productos finales de glicación avanzada, los episodios de hiperglucemia o hipoglucemia, y la toxicidad de la glucosa (Bornstein et al., 2014), los principales mecanismos involucrados en el daño cerebral son aún confusos y poco claros. Un número de hallazgos sostienen que el daño observado en DM surge fundamentalmente de la hiperglucemia crónica. Giaccari, (2009) estudió a las vías metabólicas activadas por glucosa, se analizaron diferentes evidencias y se reconoció que el estrés oxidativo, la activación de la proteína quinasa C, y de la vía de hexosamina, en la que la O-glicosiltransferasa es un elemento muy importante, son los mecanismos clave involucrados en la toxicidad ejercida por la glucosa.

### **13.-MODIFICACIONES POR LA O-GLICOSIL-TRANSFERASA MITOCONDRIAL (OGTm).**

En enfermedades crónicas en donde se han encontrado alteraciones en el metabolismo de la glucosa (como en la DM, el envejecimiento, el cáncer, o la EA), se ha sugerido que esto deriva de alteraciones en el proceso de transferencia de la GlcNAc. En relación a lo anterior, se ha descrito que la O-GlcNAcilación por la OGTm (la cual se localiza en la membrana mitocondrial interna), juega un papel muy importante. Las mitocondrias intervienen en la regulación del potencial de membrana, en la síntesis de esteroides, en el almacén transitorio de calcio, en la regulación del metabolismo celular y en la apoptosis, (Hart *et. al.* 2011). En especial sabemos que la apoptosis es el mecanismo de muerte más común en las enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso (Lee *et. al.* 2012, Boehmelt *et al*, 2000, Hannover *et al*, 1999; Liu *et al*, 2009). En 1997, el grupo del Dr. Lubas demostró que la sobreexpresión de la OGTm era altamente tóxica para cultivos de células del sistema nervioso central (Lubas *et. al.*, 1997), mientras que la sobreexpresión de la OGTnc no es citotóxica in vivo o in vitro, (Hanover 2003). Experimentos posteriores sobreexpresando a la OGTm usando un vector en *E. coli*, mostró que las proteínas expuestas a la presencia de la OGTm pueden ser O-GlcNAcizadas, de manera similar a lo descrito en tirosincinasas como la Src

o en la O-GlcNacasa. (Hannover *et al*, 1999, Lubas *et. al.*, 1997). Mediante el uso de un vector de expresión para la OGTm se encontró una asociación entre la sobreexpresión de la OGTm con un aumento en la activación de las vías apoptóticas celulares (Hanover *et al.*, 2011).

Estudios en cardiomiocitos de ratones hiperglicémicos mostraron que el incremento en la concentración de la O-GlcNac, tuvo una actividad protectora en modelos de estrés térmico, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico (ER), estrés por hipoxia, por isquemia, y estrés por reperfusión por trauma y hemorragia. En conjunto estos datos sugieren que la O-GlcNacilación es un mecanismo de protección celular al estrés (Hanovet *et.al.*, 1999, Issad and Kuo 2008, Groves *et. al.*, 2013).

La presencia de hiperglicemia tiene como efecto una disminución del potencial de membrana mitocondrial, al modificar la actividad de los complejos I, III, y IV de la mitocondria, cambios que se encontró facilitan la fragmentación mitocondrial en miocitos cardiacos. Este efecto negativo en las proteínas mitocondriales en condiciones de hiperglicemia, puede explicarse por la presencia de un desbalance entre los procesos de glicosilación y de fosforilación, lo cual influye sobre los canales de calcio dependientes de voltaje, afectando el funcionamiento normal de las mitocondrias, disminuyendo la disponibilidad de ATP por la disfunción mitocondrial, y favoreciendo además el inicio de la resistencia a la insulina (Ngho *et al.*, 2011, Shin *et al.*, 2011, Gu *et al.*, 2011, Lazarus *et al.* 2011, Darley-Usmar *et al.*, 2012, Johnsen *et al.*,2013).

#### **14.- OGT EN DM Y NEURODEGENERACIÓN.**

Las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento no sólo son un gran reto científico, sino médico, económico y social de enormes dimensiones. Esta familia de enfermedades incluye a la enfermedad de Parkinson, a la enfermedad de Huntington y a la enfermedad de Alzheimer (EA) como las más comunes e importantes. La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas asociadas con el envejecimiento son

multifactoriales en donde intervienen múltiples vías de señalización cerebral (Skovronsky et. al., 2006, Gong et.al., 2012). En este tipo de tejidos, la O-GlcNAcilación actúa como un modulador de homeostasis, de la actividad de proteínas encargadas de la señalización, así como de proteínas ligadas con las vías de transducción de señales, y las que intervienen modificando el proceso neurodegenerativo (Zachara and Hart 2006). El origen y desarrollo de algunas de estas enfermedades ha sido estudiado en modelos de roedores, como en el caso de la enfermedad de Huntington, en modelos de parálisis supranuclear progresiva, en modelos de toxicidad por el péptido, beta amiloide (A $\beta$  1-42) así como en daño celular en taupatías (Gong et al., 2012).

En el caso específico de la EA, se ha encontrado que el nivel de O-GlcNAcilación cerebral total, así como el nivel de O-GlcNAcilación específico de la proteína *Tau*, están disminuidos en el cerebro del paciente con EA. Estos resultados se han ligado con la disminución en la generación de energía derivada de la glucosa. Razón por la cual, se considera que los niveles de O-GlcNAcilación son indicadores de los niveles de nutrientes intracelulares y de glucosa en el cerebro (Gong et al., 2012).

Una de las patologías más estudiadas por la alteración en el metabolismo de la glucosa, es la DM, en donde se ha observado disfunción mitocondrial, incremento del estrés oxidativo, neuroinflamación, así como la presencia de agregados y mal plegamiento de proteínas capaces de generar neurotoxicidad. (Groves *et al.* 2013 en el 2, Issad.& Kuo 2008). Al ser la concentración de glucosa un modulador de la actividad de la vía de las hexosaminas, se le ha considerado como un sensor de la concentración de glucosa, insulina y con el proceso de O-GlcNAcilación en el paciente con diabetes (Issad et al., 2010). Por lo anterior, se dice que la O-GlcNAc interviene como un mediador de la resistencia a la insulina en respuesta a la hiperglicemia, ya que al incrementar la O-GlcNAc de las proteínas, reduce la fosforilación de la Proteína cinasa B (AKT) , modulando diversas vías como PI3-K y GSK-3B (Monte, 2012). Se ha encontrado que la presencia

de resistencia a la insulina en la diabetes, se asocia con pérdida de conexión sináptica, hiperfosforilación de la proteína *tau*, con agregación de la proteína amiloide  $\beta$ , con disfunción mitocondrial y con apoptosis, por lo que su adecuado estudio es de gran relevancia para mejorar nuestra comprensión de enfermedades neurodegenerativas, como en el caso de la EA. (Groves *et. al.* 2013, Issad & Kuo 2008). Introduce comas al azar. Revisa el texto para eliminar las comas innecesarias.



## **15.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La O-GlcNAcilación es un proceso dinámico, que es relevante en la señalización celular al regular cambios en diversos niveles. Es un sistema complejo que interviene en procesos tan diversos como la señalización celular, la transcripción y en las vías metabólicas celulares, indispensables para la supervivencia. En particular, las alteraciones metabólicas que generan cambios en las vías de O-GlcNAcilación en padecimientos como la DM y la EA, a través de una mayor actividad de la vía de hexosaminas, da como resultado la generación de estrés oxidante y apoptosis, razones por las cuales, consideramos de suma importancia continuar profundizando sobre el papel de la O-GlcNAcilación y la actividad de las OGTnc y de la OGTm, ya cobra importancia en el desarrollo y evolución de estas patologías crónico-degenerativas.

## **16.- HIPÓTESIS**

El A $\beta$  25-35 en estado de hiperglicemia, generará una reducción en la OGTnc y aumento en la expresión de la OGT mitocondrial.

## **17.- OBJETIVOS**

### OBJETIVO GENERAL

Demostrar cambios en la expresión de la OGTnc y OGTm en presencia de A $\beta$ , hiperinsulinemia e hiperglicemia.

### OBJETIVOS PARTICULARES

Demostrar la expresión de la OGT nuclear y mitocondrial, de la O-GlcNAc y de la tau hiperfosforilada (Ser396).

Evaluar los cambios de la OGTnc y OGTm en las distintas fracciones celulares.

Determinar los factores que intervienen en la regulación de OGTm.

## **18.- METODOLOGÍA.**

### **18.1.- ANIMALES DE LABORATORIO**

Se emplearon ratas Wistar machos, de entre 180 y 250g. Esta perfectamente caracterizada desde el punto de vista anatómico, fisiológico y genético, se reproduce sin complicaciones, son animales muy adaptables, fáciles de cuidar y manejar con una N de 20 animales por grupo, que cuentan con 12 hrs de luz, por 12 de obscuridad que se mantienen con agua y comida a libre demanda. Se mantienen en un ambiente libre de gérmenes y de enfermedades con empleo de cama estéril para investigación con animales. Son de hábitos nocturnos, los sentidos del olfato y audición están muy desarrollados, la rata puede oír altas frecuencias. Presenta una visión normal. Posee receptores táctiles desarrollados sobre la cabeza, alrededor del hocico, en las patas y sobre la cola. La cola es utilizada para la orientación sobre el terreno y equilibrio durante el salto; sirve como principal órgano de regulación de temperatura. La circulación sanguínea de la cola aumenta cuando el animal necesita eliminar calor de su cuerpo. El promedio del peso de un macho adulto es de 250 a 520 g y tienen una vida de 2.5 a 3.5 años; en el grupo de machos raramente se observa agresividad (Bioterio para neurociencias 2010).

### **18.2.- CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA**

Se realizó cirugía estereotáxica en ratas con un peso de 180 a 250g. 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  $-4.0$ ; lateral  $\pm 3.0$  respecto a bregma y profundidad de  $-2.0$  respecto a la duramadre (Paxinos). Luego se procedió a realización de trepano mediante un mototool en el punto determinado por

las coordenadas hasta antes de las meninges; se realizó la medición y se dio la profundidad adecuada, para cada hemisferio.

### **18.3.- PREPARACIÓN DEL PÉPTIDO AB 25-35.**

Veinticuatro horas previas a la administración intha hipocampal, se disolvió el péptido en una disolución 1:10 a una concentración de 100 $\mu$ M, En Agua bidestilada MilliQ, essterilizada con filtros de 0.22  $\mu$ m y se incubó a 37°C, se deposita intra-hipocampal 1 $\mu$ l [100  $\mu$ M] deA $\beta$  25-35, que se administró en cinco minutos lentamente, se mide con Jeringa Hamilton previamente colocada al aparato estereotaxico y se realiza la medición para el lado contralateral y se repite el procedimiento.

### **18.4.- ADMINISTRACIÓN DE ESTREPTOZOTOCINA.**

Después de 7 días se administró estreptozotocina a las ratas, se administró dosis única en muslo derecho del animal, de Estreptozotocina (40mg/kg) diluida en Buffer de citratos a pH de 4.45 Se les considerará hiperglicémicas, con una glucosa superior a 200mg/dl, a la semana de la aplicación.

### **18.5.- MONITOREO DE GLUCOSA Y PESO.**

El monitoreo de glucosa se realizó con medidor de Glucosa capilar Accucheck Active de Roche, la obtención de sangre fué 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 la cuantificación del peso de los animales.

### **18.6.-OBTENCIÓN DE CEREBROS.**

Los cerebros se obtuvieron mediante dislocación cervical, las cabezas se ponen sobre hielo, y se extrae el cerebro, la mitad derecha se congeló en nitrógeno líquido a -70°C y la mitad izquierda se fija con paraformaldehido al 4%.

### **18.7.- OBTENCIÓN DE SANGRE.**

Se obtuvo mediante punción cardiaca, se realizó glucometría al momento y para las otras muestras, se separó plasma de glóbulos rojos.

## **18.8.- REACTIVOS**

Se empleo el péptido Amiloide-beta 25-35 (-GSNGAIIGLM-), N-(dimetiltiocarbamoilo) - $\alpha$ -D-glucosamina (estreptozotocina, STZ), albúmina de suero bovino (BSA), y 4% de paraformaldehído se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). Inhibidores de la proteasa compleat de Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Alemania). La proteína se cuantificó usando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA <sup>TM</sup> (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.). Lectina WGA de Aglutinina de germen de trigo, se conjugo con FITC (WGA) se obtuvo de Vector Lab (Burlingame, CA, EE.UU.), y se utilizó en una dilución 1: 1000. Los anticuerpos policlonales IgG de conejo anti- P-Tau-Ser-396 y P-Thr-231 fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, (Dallas, TX, EE.UU.), y se empleó en una dilución 1: 100 para inmunohistoquímica y al 1: 1000 para Western blot. Los anticuerpos frente a GSK3 y O-glicosiltransferasa (OGT) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, y se utilizaron en una dilución 1: 100 para inmunohistoquímica y al 1: 1000 para la inmunotransferencia de tipo Western. Los anticuerpos frente a O-GlcNAc y GAPDH se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology, y se utilizaron en una dilución 1: 1000 para la inmunotransferencia de tipo Western. VectaShield más DAPI se adquirió de Vector Lab. Secondary-anticuerpos acoplados a FITC IgG (anti-conejo y anti-ratón) o rodamina IgG (anti-conejo y anti-ratón) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology. La hemoglobina glicosilada (HbA1c) se evaluó utilizando columnas de intercambio iónico catiónicas de Helena Laboratories (Beaumont, TX, EE.UU.). La concentración de glucosa en el plasma se evaluó mediante el método de la glucosa oxidasa (Yellow Springs Instruments, OH, EE.UU.). Los niveles de insulina se determinaron utilizando insulina de rata kit ELISA obtenido de Crystal Chem Inc. (Chicago, IL, EE.UU.).

## **18. 9.-DETERMINACIÓN DE INSULINA**

Para la determinación de la insulina se utilizó el método ELISA (Crystal Chem Inc). El cálculo de RI se realizó mediante el índice HOMA

(Homeostasis Model Assessment): insulina basal (mUI/L) x glicemia basal (mmol)/22,5. Se consideró como valor diagnóstico de resistencia a la insulina un HOMA mayor de 4ng/dl. (Mattews et al., 1985)

#### **18.10.- DETERMINACION DE PESO.**

Los animales se pesaron en una balanza granataria de triple brazo.

#### **18.11.- TÉCNICA DE HEMATOXILINA Y EOSINA PARA MICROSCOPIA DE LUZ EN CAMPO CLARO.**

Se realizó este procedimiento, para poder visualizar las estructuras cerebrales y visualizar el área de administración del péptido, así como sus características histológicas básicas Anexo B.III.

#### **18.12.- TÉCNICA DE NISSL PARA MICROSCOPIA DE LUZ EN CAMPO CLARO.**

Este método se utiliza 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 B IV.

#### **18.13.- INMUNOHISTOQUÍMICA HRP PARA MICROSCOPIA DE LUZ EN CAMPO CLARO.**

Este método permite ver la expresión de un anticuerpo específico en nuestro tejido, como se ve en el Anexo B.VI.

#### **18.14.- INMUNOHISTOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.**

Con esta técnica se visualiza la expresión de uno o más anticuerpos en una misma lamina, para obtener una localización y distribución más específica de su distribución e intensidad de reacción, y percibir si ambas marcas tienen o no colocalización, como se explica en el Anexo B.VII.

#### **18.15.- TÉCNICAS DE FRACCIONAMIENTO Y SEPARACIÓN CELULAR.**

Los concentrados celulares fueron lavados con buffer de fosfatos salina (fosfato 20mM, NaCl 150mM y pH de 7.5), se resuspenden en PBS con

inhibidor de proteasas (PMSF 1mM, leupeptina 5µg y pepstatina 5µg/ml) y 500µg de Digitonina, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente descrito por Kearns y Hart.

Ver anexo B.IX.

#### **18.16.- WESTERN BLOT.**

Una parte del hipocampo se diseccionó a partir del tejido hemisferio derecho congelado. Cada porción del hipocampo se lisó en 500 µl de tampón de lisis enfriado con hielo (CLB; PBS de pH = 7,4, 1% inhibidores de Triton X-100, y la proteasa). Después de centrifugar el lisado a 12.000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se mezcló con tampón de Laemmli y se hirvió durante 10 min. La proteína se cuantificó con el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™ y 15 µg de proteínas se sometió a electroforesis en un gel de sodio dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%. Al final, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0,45 m, GE Healthcare). La eficiencia de la transferencia se verificó mediante tinción con rojo Ponceau. Las membranas se saturaron primero durante 45 min con leche desnatada 5% en tampón Tris-solución salina-Tween (TBST; 15 mM Tris-HCl, NaCl 140 mM, y 0,05% de Tween 20, que contiene la leche al 5% no grasa), y se sondaron durante la noche a 4 ° C con anti-O-GlcNAc (RL2), anti-OGT (H300), anti-P-tau-Ser-396, anti-GSK3 y anti-GAPDH. Entonces, se lavaron tres veces con TBST durante 10 min, y se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano picante a una dilución de 1: 10000 para 1 h. Finalmente, tres lavados de 10 min se realizaron con TBST, y la detección de quimioluminiscencia se llevó a cabo. El análisis densitométrico de las membranas de Western blot se realizó con LI-COR oeste de análisis dentro de la celda de Image Studio.

#### **18.17.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Las determinaciones de glucosa, el porcentaje de hemoglobina glucosilada, y el peso se presentan como media ± desviación estándar (SD). El análisis ANOVA y prueba de Tukey se utilizaron para comparar entre los

grupos, la concentración de insulina se muestra como media  $\pm$  desviación estándar. Se utilizó la prueba t de Student para la comparación entre los grupos. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete de software SPSS v.15.

## **19.- RESULTADOS.**

### **19.1 CAMBIOS METABÓLICOS**

#### **Determinación de los niveles de glucosa**

La hiperglucemia se define por sí un importante factor de riesgo para el desarrollo de la EA (Valente et. Al., 2010). Nuestros resultados mostraron niveles de  $93 \pm 12$  mg / dl de glucosa en el grupo control; el grupo A $\beta$  tuvo un promedio de  $101,6 \pm 14$  mg / dl; el grupo STZ + A $\beta$  tuvo un promedio de  $522,6 \pm 38$  mg / dl; y el grupo STZ tuvo un promedio de  $495,4 \pm 145$  mg / dl de glucosa en plasma (Figura 1). La comparación de los niveles de glucosa entre el grupo control y el grupo de A $\beta$  no mostró diferencias estadísticas ( $P > 0,05$ ). Del mismo modo, el análisis estadístico no reveló diferencias entre los grupos que emplearon STZ, tanto el grupo de STZ + A $\beta$  o solo STZ ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, la comparación de los grupos con STZ y controles si mostraron diferencia estadísticamente significativa entre ellos ( $* P < 0,001$ ) (Figura 8).



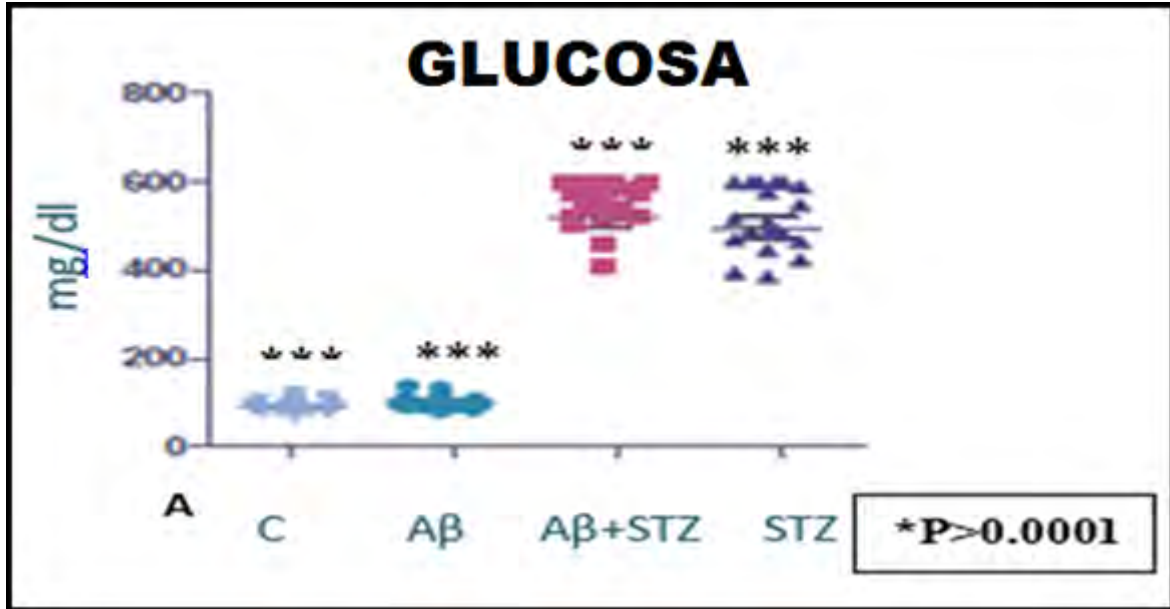


Figura 8. Determinación de glucosa, en sangre capilar de la cola de la rata, después de cuatro semanas de estudio. En los grupos Control (C), Amiloide Beta intrahipocampal (Aβ), Amiloide Beta con Estreptozotocina (Aβ+STZ) y Estreptozotocina (STZ). El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la concentración de glucosa en los grupos con o sin STZ (\* P <0,0001).

### Determinación de peso

Estreptozotocina (STZ) se utiliza comúnmente para inducir daño pancreático y reproducir un estado similar al de la diabetes mellitus (Alvarado-Vázquez et al., 2003). Una característica de la diabetes es la pérdida de peso. Nuestros resultados mostraron que el grupo de control pesó en promedio  $397,9 \pm 42$  g; el grupo de Aβ tuvo un promedio de  $379,6 \pm 27$  g; el grupo STZ + Aβ tuvo un promedio de  $281,9 \pm 37$  g; y el grupo STZ tiene un promedio de  $288,1 \pm 33$  g Figura 2. El análisis estadístico reveló diferencias significativas en el peso de los grupos con STZ y controles que

tienen diferencia estadísticamente significativa entre ellos (\* P <0,05) (Figura 9).

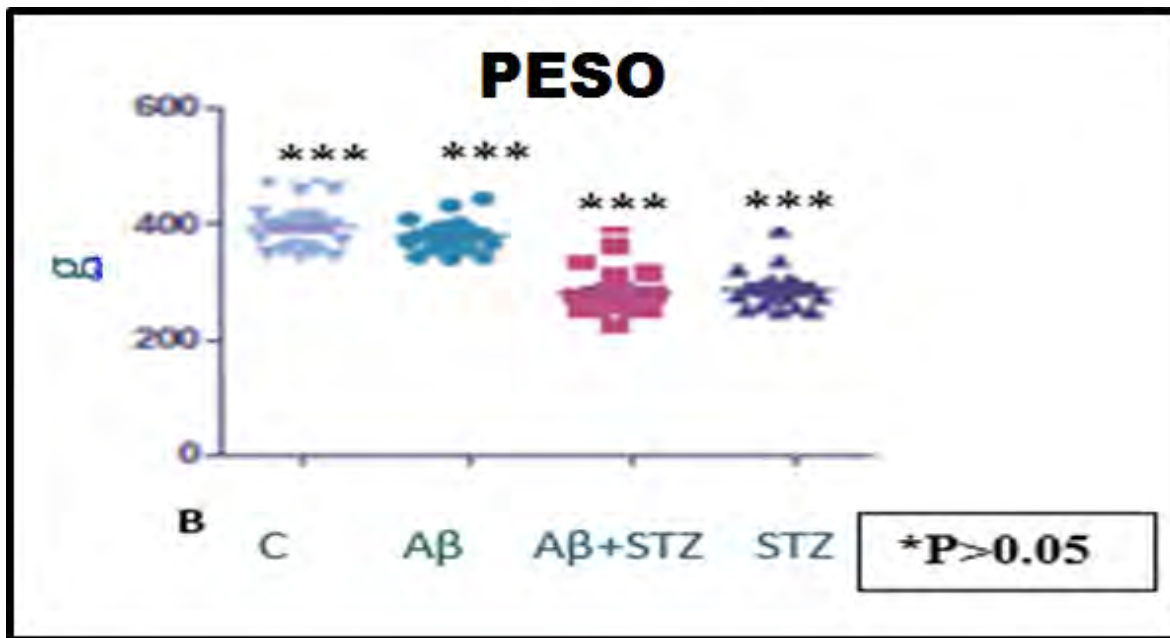


Figura 9. Determinación del peso. En los grupos Control (C), Amiloide Beta intrahipocampal (Aβ), Amiloide Beta con Estreptozotocina (Aβ+STZ) y Estreptozotocina (STZ). Con diferencia estadísticamente significativa al comparar los grupos que están con tratamiento de STZ o sin ella, el peso en los cuatro grupos (\* P <0,05).

### Porcentaje de hemoglobina glucosilada

El porcentaje de hemoglobina glucosilada se considera un indicador de los niveles de glucosa en pacientes con diabetes mellitus (Springhorn et. Al., 2012). Nuestros resultados mostraron que el porcentaje de HbA1c fue de  $4,6 \pm 3\%$  en el grupo control, en comparación el porcentaje en el grupo de Aβ fue de  $4,1 \pm 1,8\%$ , mientras que el grupo de Aβ + STZ tenía un porcentaje de  $8,3 \pm 3,9\%$ , y el grupo STZ tuvo una media de  $10,3 \pm 2,5\%$  (Figura 3). Después de comparar el porcentaje de hemoglobina glucosilada en los diferentes grupos, los análisis estadísticos encontraron diferencias

significativas entre los grupos control y A $\beta$  frente a grupos A $\beta$  + STZ y STZ (\* P <0,05), (Figura 10).

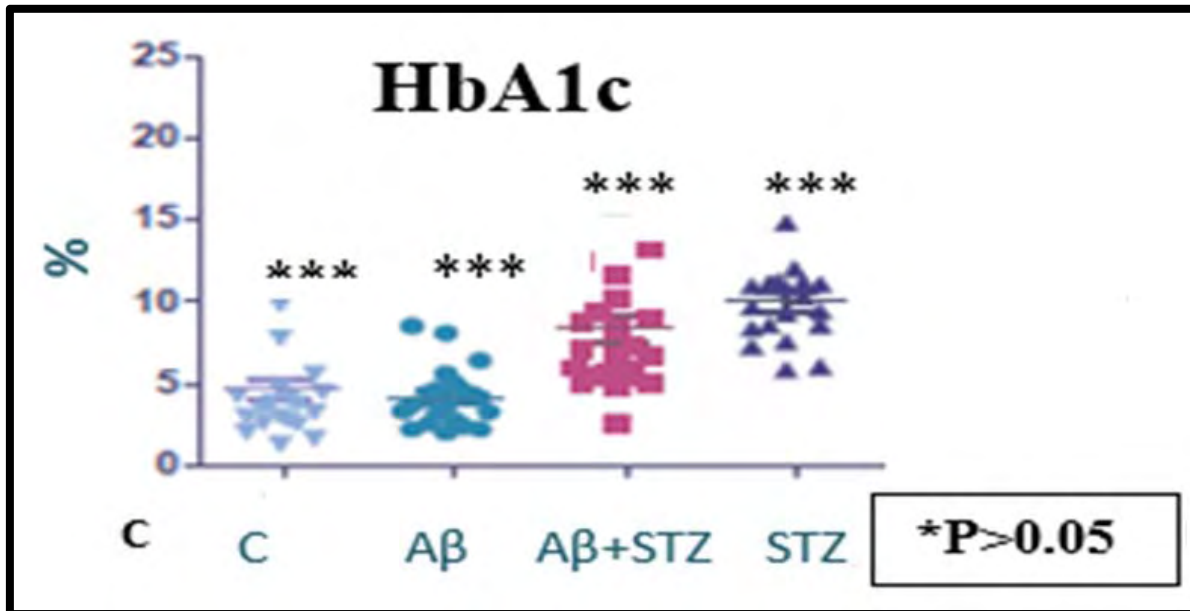


Figura 10. Determinación de la hemoglobina glucosilada (HbA1c en%) en suero de rata después de cuatro semanas de estudio. En los grupos Control (C), Amiloide Beta intrahipocampal (A $\beta$ ), Amiloide Beta con Estreptozotocina (A $\beta$ +STZ) y Estreptozotocina (STZ). El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el porcentaje de HbA1c entre los grupos (\* P <0,05).

### Concentración de insulina en plasma

Evidencias recientes sugieren que las variaciones en la concentración de insulina o resistencia a la insulina son factores de riesgo para la evolución de la EA (Zhao et. al., 2009). En este trabajo, los niveles de insulina en los diferentes grupos experimentales fueron: para el grupo de control de  $6 \pm 3,2$  ng / ml; el grupo A $\beta$  con  $6,2 \pm 3,1$  ng / ml; el grupo A $\beta$  + STZ con  $9,2 \pm 5,1$  ng / ml; y el grupo tratado con STZ con una media de  $15,2 \pm 6,2$  ng / ml Figura 4. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre el control y el único grupo STZ (\* P <0,05) (Figura11).

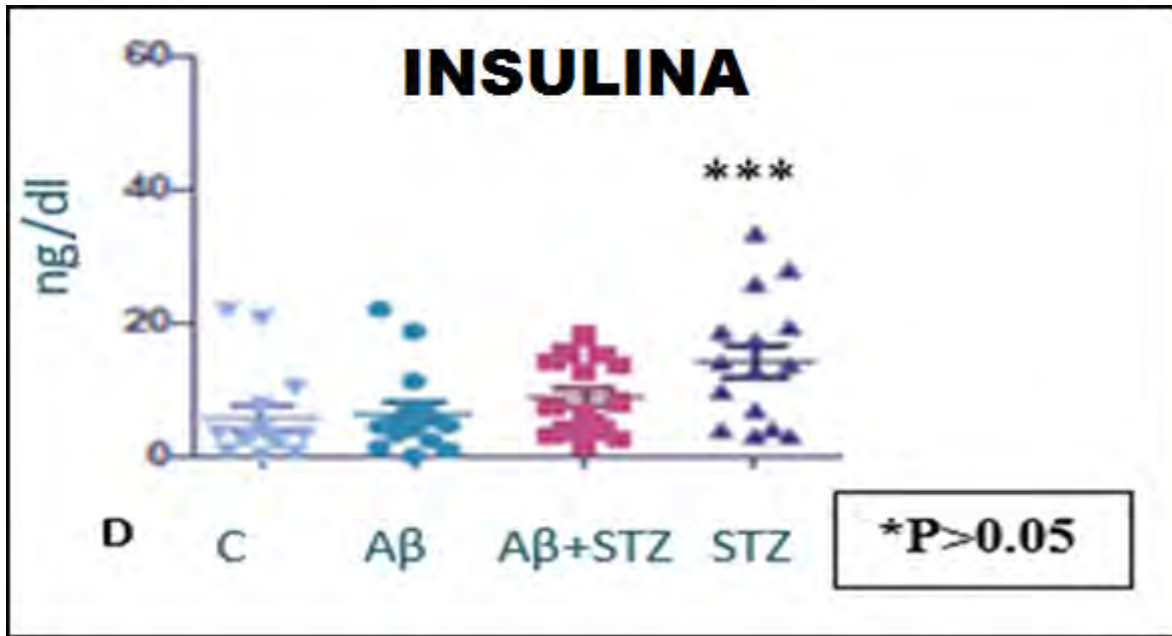


Figura 11. Determinación de insulina. En los grupos Control (C), Amiloide Beta intrahipocampal (Aβ), Amiloide Beta con Estreptozotocina (Aβ+STZ) y Estreptozotocina (STZ). El análisis estadístico mostró diferencias significativas en los niveles de insulina entre los grupos (\* P <0,05).

## 19.2.-RESULTADOS HISTOLÓGICOS.

Posterior a la obtención de los cerebros y procesamiento explicado en los anexos obtuvimos las siguientes imágenes por histoquímica y microscopía de campo claro.

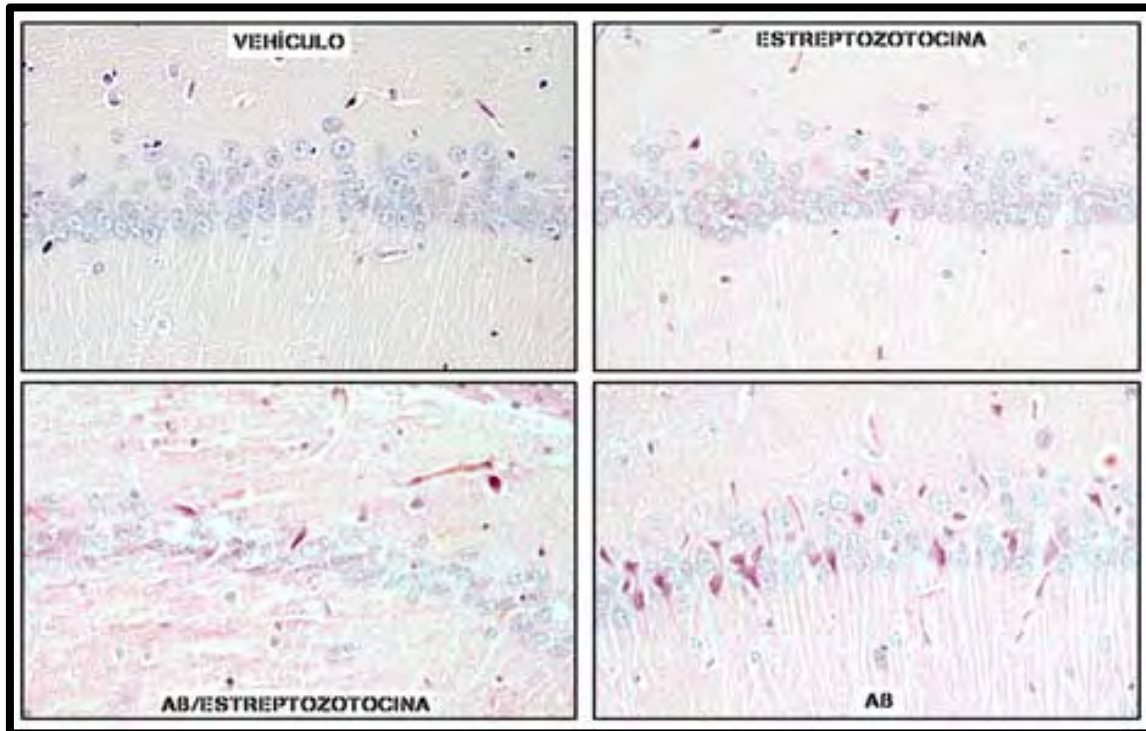


Figura 12. Microfotografía de Hematoxilina eosina 40X del área CA1 del hipocampo donde se observan los cambios estructurales en los diferentes grupos. En los grupos Control (C), Amiloide Beta intrahipocampal ( $A\beta$ ), Estreptozotocina (STZ) y Amiloide Beta con Estreptozotocina ( $A\beta$ +STZ).

En la Figura 12. se aprecia el área del hipocampo CA1 con un aumento de 40X y tinción de hematoxilina y eosina para poder determinar las estructuras y los cambios morfológicos que tienen.

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  $A\beta$  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 aprecia una desorganización y engrosamiento de 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 con menos orden de los procesos dendríticos, secundario al manejo con STZ.

En el grupo de A $\beta$ +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 perdida del orden de los procesos dendríticos, de los estratos lacunosum y radiatum.

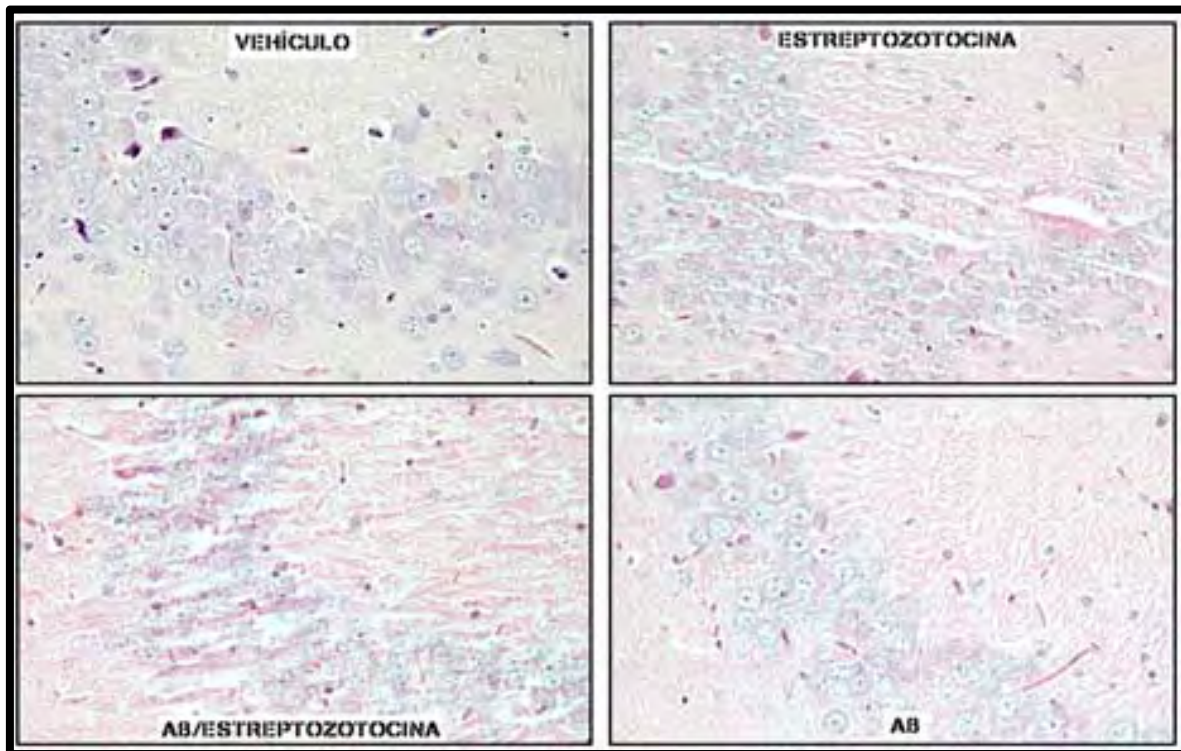


Figura 13.

En el área del hipocampo CA3 con un aumento de 40X y tinción de hematoxilina y eosina como se aprecia en la Figura 13, para poder determinar las estructuras y los cambios morfológicos que tienen.

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 perdida 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 perdida de núcleo con amplia desorganización y ruptura de procesos dendríticos de los estratos lacunosum y radiatum y se ve una marcada perdida 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.

En la Figura 14 se aprecia con H y E 40X, el giro dentado. 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 de A $\beta$  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.

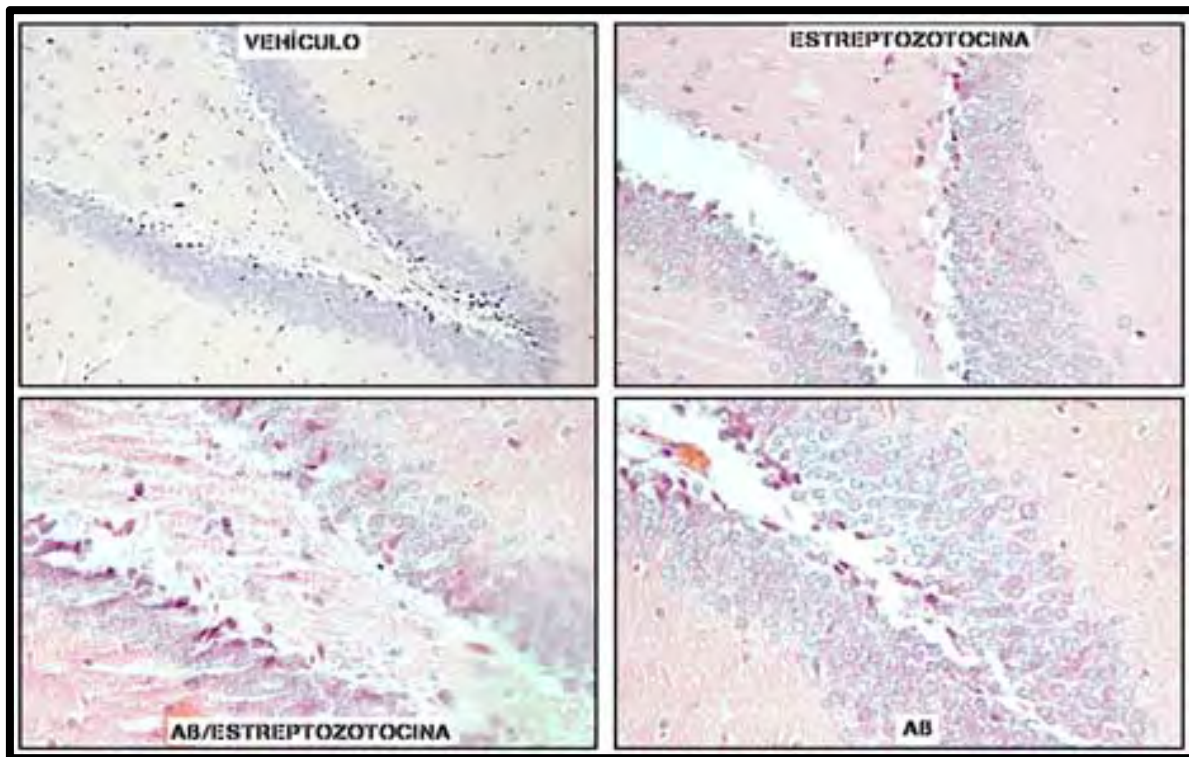


Figura 14.

En la Figura 14. se aprecia el área del giro dentado con un aumento de 40X y tinción de hematoxilina y eosina para poder determinar las estructuras y los cambios morfológicos que tienen.

En el grupo tratado con STZ se ve pérdida 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 $\beta$ +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 pérdida 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.



### 19.3.- TINCIÓN ARGÉNTICA.

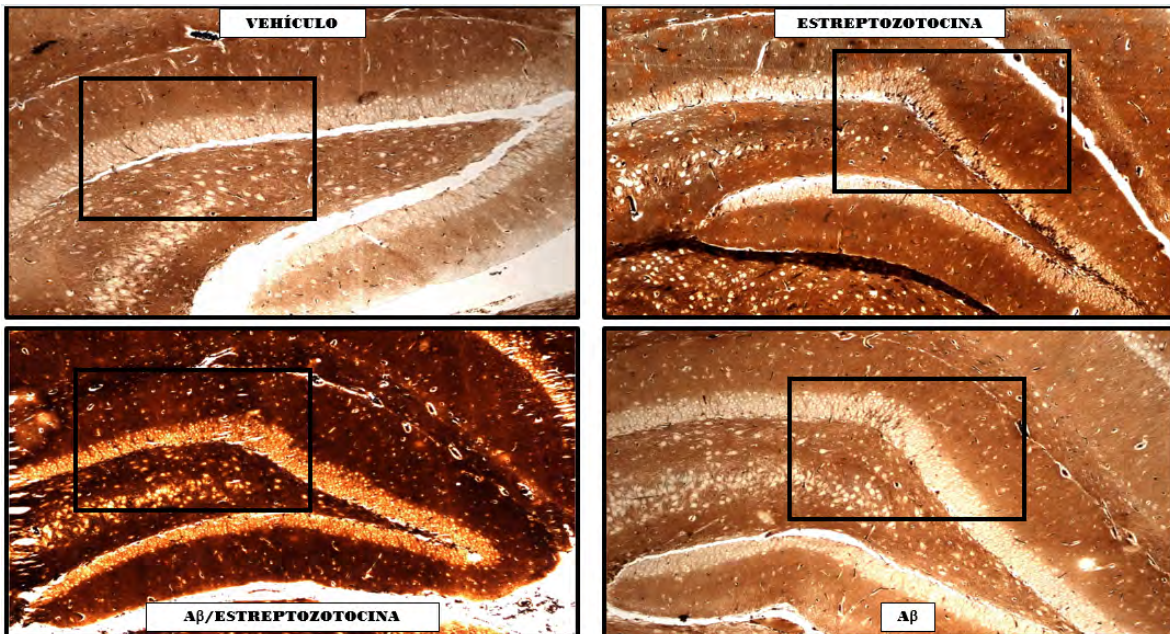


Figura 15A.

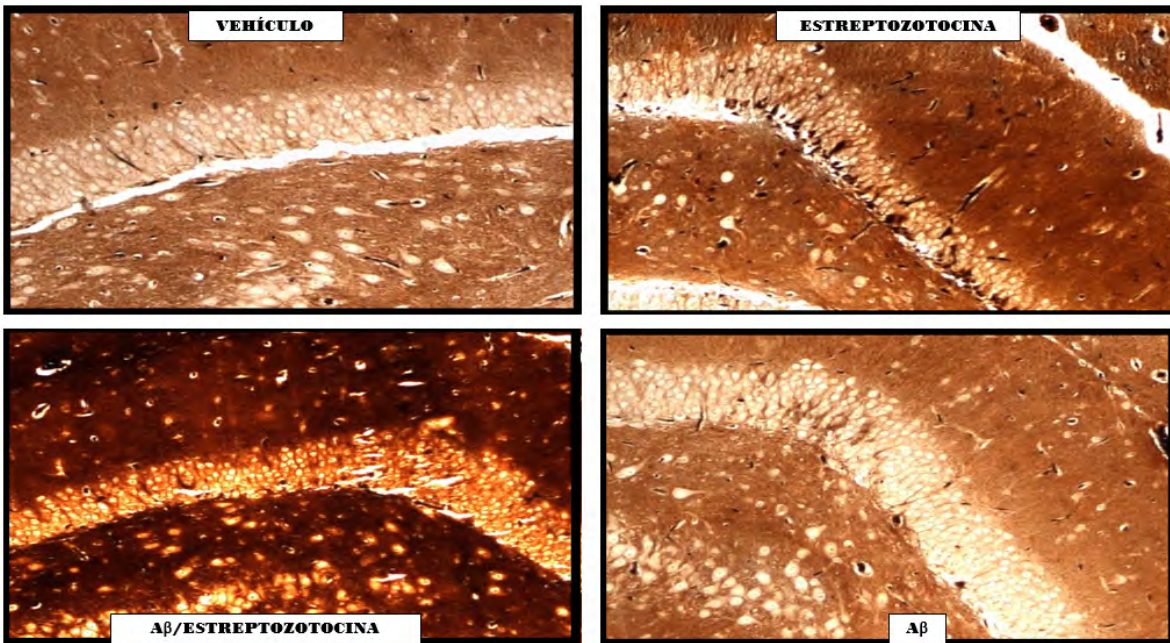


Figura 15B.

En la Figura 15A. se aprecia el área del giro dentado con un aumento de 40X y tinción de plata para poder determinar las estructuras y los cambios morfológicos que tienen. Figura 15B. se aprecia el área del giro dentado con un aumento de 160X y tinción de plata para poder determinar estructuras más pequeñas.

En el grupo control se aprecian una mayor cantidad y estructura en las agrupaciones celulares del giro dentado y fibras musgosas al interior y axonales hacia la periferia, que se aprecian con su estructura conservada. En el grupo A $\beta$  Se muestran las neuronas conservadas, con presencia de cúmulos del pigmento en algunos espacios del área de las neuronas piramidales, con pérdida de la organización en las fibras hacia la periferia. En el grupo de STZ se ven en la región de los núcleos de las células musgosas, una ausencia de los núcleos y pérdida de fibras periféricas y en la región de las neuronas piramidales, se aprecia una condensación de los cuerpos celulares una mayor penetración del colorante, que en las regiones inter piramidales y se aprecian algunas acumulaciones de pigmentos al interior de algunos cuerpos celulares. Mientras que en el grupo de A $\beta$ +STZ, se ve una gran cantidad de pigmento en las fibras musgosas, con pérdida de cuerpos celulares y una importante condensación de los cuerpos celulares, con una amplia penetración del colorante de regiones interpiramidales, se aprecia fragmentación de las fibras que salen de las células piramidales.

## 19.4.- RESULTADOS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

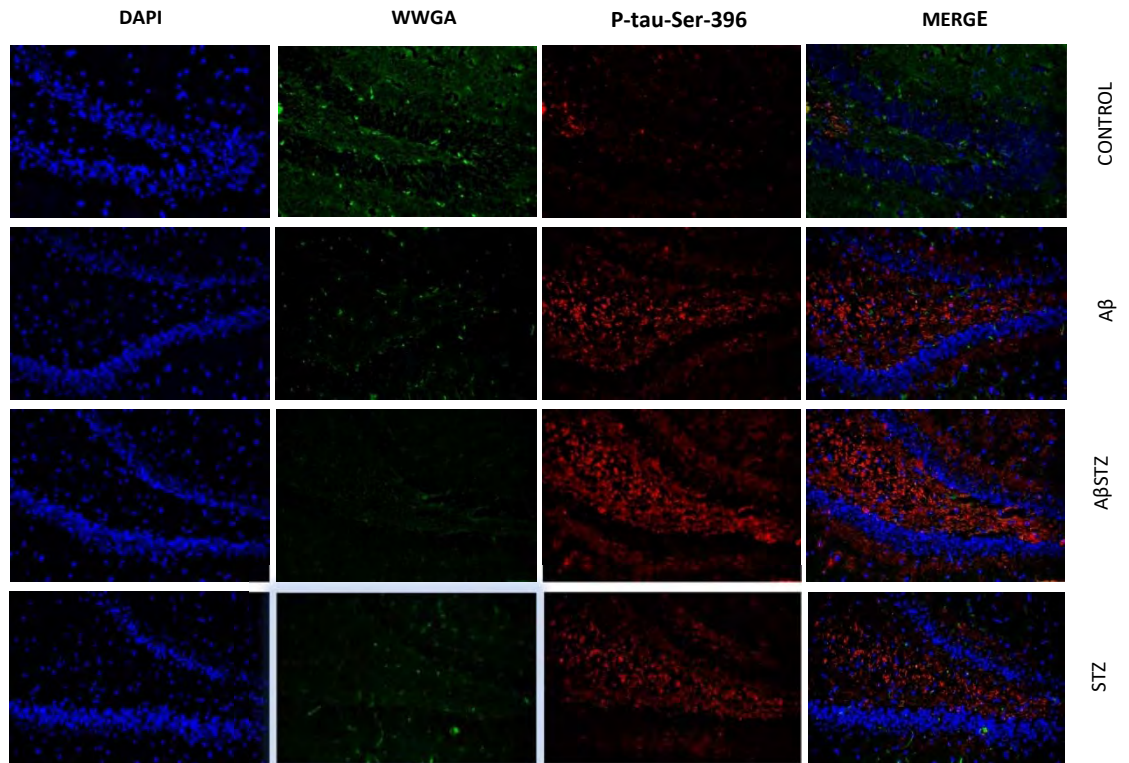


Figura 9A.

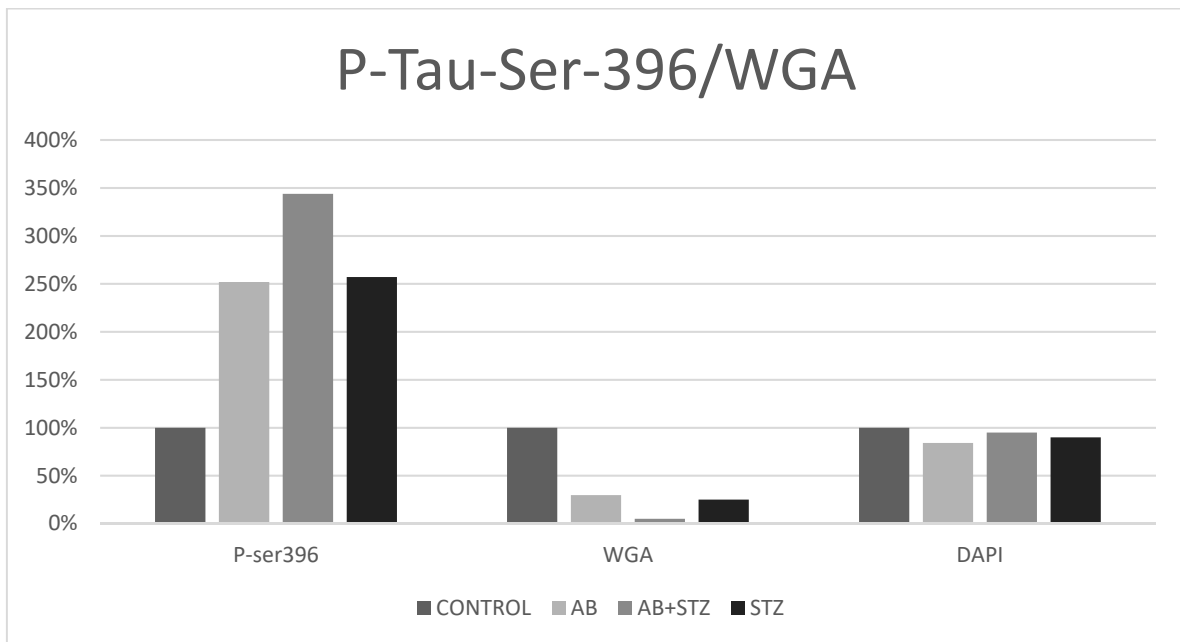


Figura 16B.

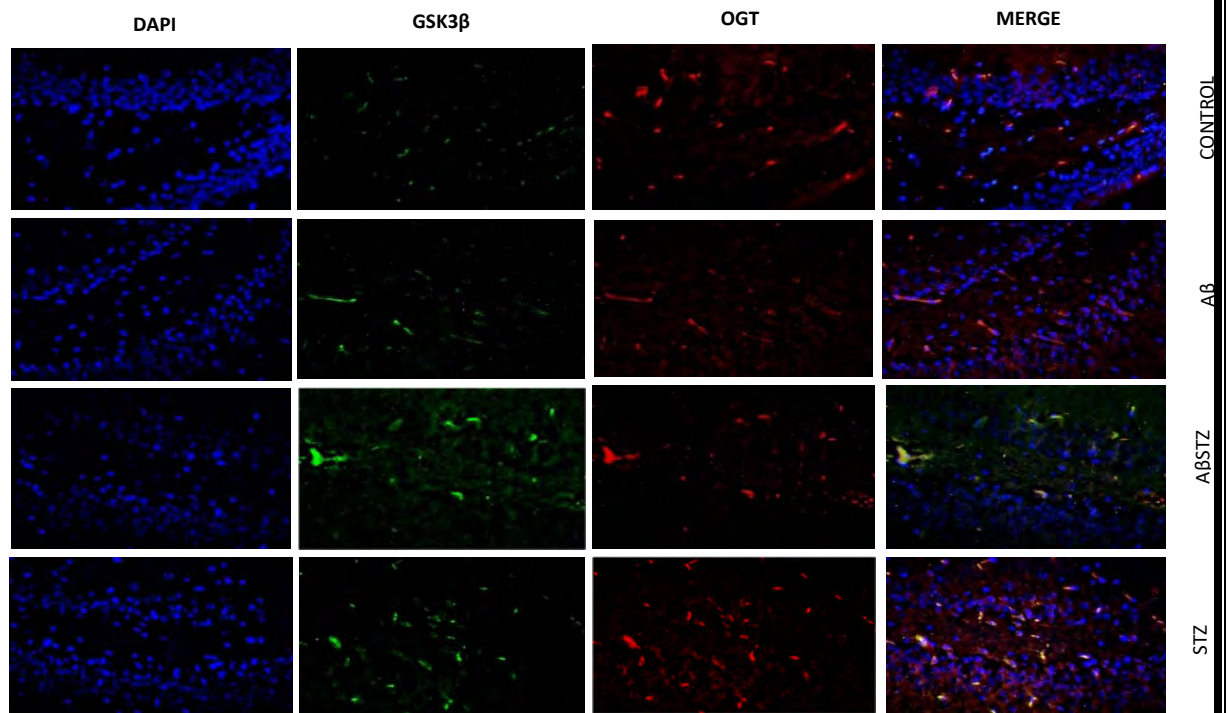
Figura 16. La presencia de O-GlcNAc en el tejido del hipocampo determinada por inmunofluorescencia. O-GlcNAc se identificó utilizando WGA-FITC (color verde); P-tau-Ser-396 se determinó utilizando un anticuerpo específico conjugado con rodamina (color rojo), y el núcleo celular se evaluó con la tinción DAPI (color azul). En la última fila en tonalidad naranja se ven las zonas de empalme. (16.A). El gráfico muestra los porcentajes de fluorescencia como se determina con el software de fluorescencia (16.B).

### **Cambios de O-GlcNAc y P-Tau-Ser-396 en tejidos hipocampales.**

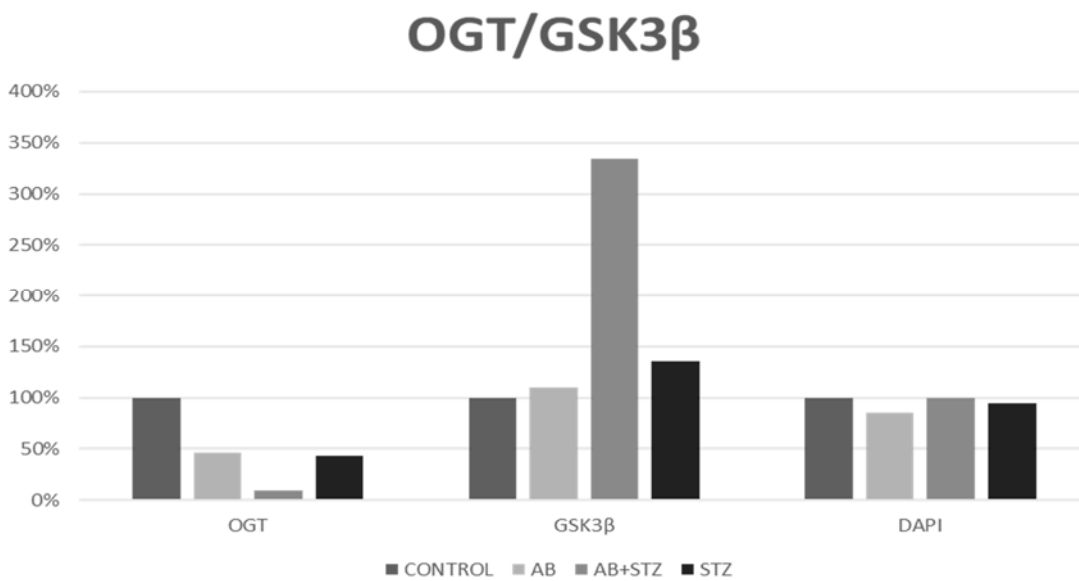
Se muestran los núcleos celulares en las neuronas piramidales y células granulares de la circunvolución dentada con DAPI (azul) y la presencia de O-GlcNAc en el tejido del hipocampo se evaluó con WGA-FITC (color verde). Como se muestra en la Figura 16, el grupo control mostró WGA en el citoplasma perinuclear de las neuronas piramidales, las células granulares y el área de fibras musgosas (sección triangular interna del giro dentado). El grupo tratado con A $\beta$ , mostró una disminución de las áreas de tinción WGA-FITC que fueron identificados principalmente en el citoplasma, de las neuronas piramidales y células granulares como en el área de fibras Musgosas. El grupo STZ también mostró disminución de reconocimiento WGA-FITC, y la tinción se identifica principalmente en el citoplasma; mientras que en el grupo tratado con STZ + A $\beta$ , las regiones WGA-tinción fue prácticamente abolidos. La presencia de P-tau-Ser-396 se evaluó mediante el empleo de anticuerpo específico, que fue reconocido más tarde usando un anticuerpo secundario conjugado con rodamina (color rojo), el control mostró mínima expresión de P-tau-Ser-396 en la región del hipocampo. El A $\beta$  y los grupos tratados con STZ mostraron un incremento en la expresión de anticuerpos anti-P-tau-Ser-396, que se observa principalmente en el citoplasma de las neuronas piramidales y células granulares y principalmente en el área de fibras musgosas. El grupo STZ + A $\beta$ , mostró un aumento estadísticamente signiicativo en la expresión de anticuerpo anti-P-tau-Ser-396 en estas áreas.

El empalme de los marcadores (rojo para anti-P-tau-Ser-396, verde para WGA-FITC) da una tonalidad naranja que en el grupo tratado con A $\beta$ , presenta un predominio de la fosforilación en la periferia de algunas células y toma un tono naranja que muestran colocalización de la lectina WGA y el anticuerpo a P-tau-Ser-396 en algunos de estos sitios. En el caso de grupos de STZ y A $\beta$ , presente P-tau-Ser-396 en la zona de las fibras musgosas y finalmente grupo A $\beta$  + STZ muestra una presencia predominio de P-tau-Ser-396 en todas las áreas, con una reducción significativa de la expresión de la lectina WGA, que se ve sólo discretamente en la periferia de algunos núcleos tiene colocalización en sólo algunas fibras.

Como se muestra en la Figura 16B, la fluorescencia del grupo de control fue considerado como el 100%, la fluorescencia muestra una reducción del 70% para el grupo de A $\beta$ , mientras que la disminución fue de 95% en A $\beta$  + STZ y 75% en el grupo STZ, respectivamente. Todos estos cambios fueron estadísticamente significativos en comparación con el grupo de control ( $P < 0,001$ ). Los aumentos de 152% en A $\beta$ 25-35, 244% en A $\beta$  + STZ, y 156,9% en STZ de P-tau-Ser-396 se observaron en los grupos, en comparación con los valores de la Figura 16B grupo de control. ( $P < 0,001$ ). fluorescencia núcleo de la célula mostró algunas variaciones; sin embargo, estos valores no fueron significativas ( $P > 0,05$ ).



**Figura10A.**



**Figura 17B.**

Figura 17. Las expresiones de OGT y GSK3 se evaluaron en los tejidos del hipocampo utilizando un anticuerpo específico acoplado a FITC (color verde), y con

un anticuerpo específico acoplado a rodamina (color rojo), respectivamente. El núcleo de la célula se evaluó con DAPI mancha (color azul) (17.A). En la última fila en tonalidad naranja se ven las zonas de empalme. El gráfico muestra los porcentajes de fluorescencia observados después de usar un software específico (software desarrollado por CKrLugowski- Rivero) (17.B).

### **Los cambios de OGT y GSK3 en tejido hipocampal.**

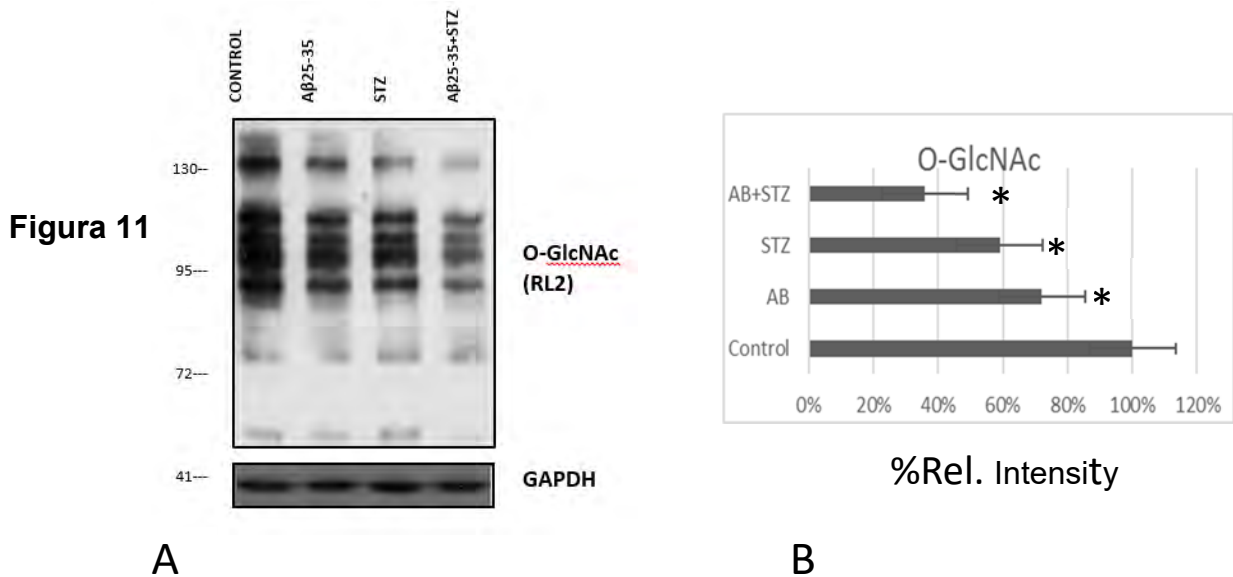
Presencia de núcleo de la célula se encuentra mediante el uso de DAPI mancha (color azul), en las neuronas piramidales y algunas células granulares de la circunvolución dentada, en grupos de A $\beta$ , STZ y A $\beta$  + STZ, tienen núcleos más pequeños, con apariencia fragmentada que predominan en el grupo A $\beta$  + STZ. (Figura 17A). Por otra determinación lado de GSK3 en el tejido del hipocampo fueron evaluados utilizando FITC (color verde). El grupo de control, muestran la presencia mínima en las neuronas piramidales. A $\beta$  y el grupo STZ proporcionan una pequeña presencia en el citoplasma perinuclear de las neuronas piramidales y el área de fibras Mussy, mientras que el grupo de A $\beta$  + STZ, se expresó principalmente en las fibras musgosas, las células granulares y en el citoplasma de las neuronas piramidales. La presencia de OGT se evaluó utilizando un anticuerpo específico, que fue reconocido más tarde usando un anticuerpo secundario conjugado con rodamina (color rojo), Para el grupo de control tiene expresión en perinuclear citoplasma de las células granulares, y el área de las dendritas de neuronas piramidales. Además de los grupos de A $\beta$  y STZ proporcionan una pequeña presencia en perinuclear citoplasma de neuronas piramidales y el área de fibras Mussy, así como en el grupo A $\beta$  + STZ, una presencia reducida en áreas citoplásmicas y fibras musgosas. En combinación que muestra para el control, STZ y A $\beta$ , la prevalencia de la actividad OGT en rojo, y la pequeña presencia citoplasmática de GSK3 en las áreas de las fibras musgosas cómo está prácticamente ausente en el grupo de control, mientras que en el grupo de A $\beta$  + STZ, la GSK3 se

sobreexpresa, con una discreta presencia de OGT como mínimo puntuado en las áreas del citoplasma.

Como se indica en la figura 17.B, nuestros resultados mostraron una disminución en la expresión de OGT por grupo de A $\beta$  54%, grupo STZ + A $\beta$  90% y por el grupo STZ 57%, respectivamente ( $p < 0,001$ ). Aunque, no se observaron cambios significativos en la expresión de GSK3 también. En el grupo de A $\beta$  tiene un 10% en el grupo STZ se observó 36% de incremento. Mientras que en el grupo STZ + A $\beta$ , tienen un incremento del 234% ( $P < 0,01$ , frente a los grupos de control de A $\beta$  y STZ; y  $P < 0,001$ , grupo de control frente A $\beta$  + STZ). Los valores de fluorescencia del núcleo celular no mostraron cambios significativos.



## 19.5.- RESULTADOS POR WESTERN BLOT



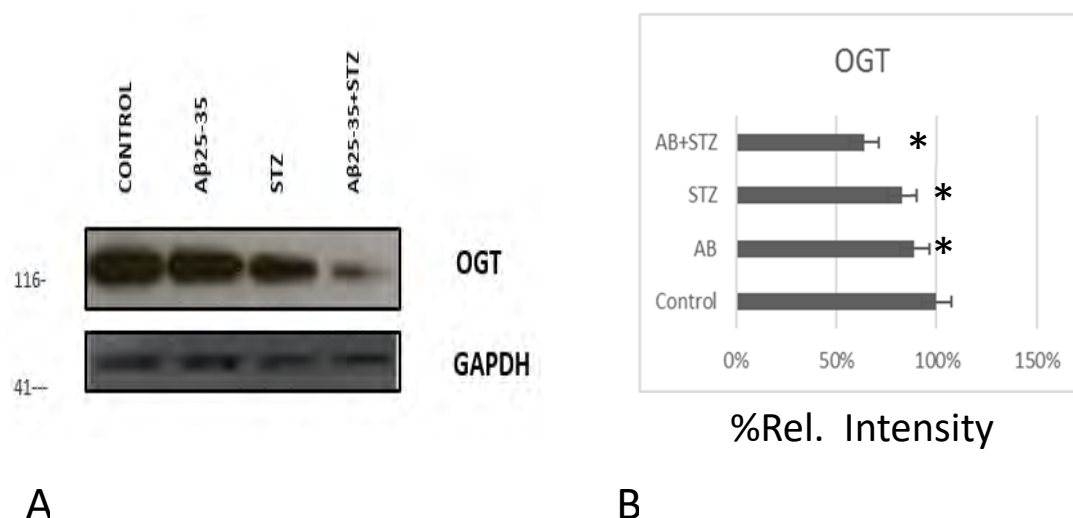
**Figura 18.**

Figura 18. Western blot de las proteínas cerebrales totales utilizados para determinar la presencia de O-GlcNAcylation (O-GlcNAc). (A) La membrana se incubó con anti-O-GlcNAc y el anticuerpo específico anti-GAPDH. El gráfico muestra los resultados del análisis densitométrico de proteína después de la normalización con niveles de GAPDH (B). Las diferencias observadas entre los cuatro grupos fueron estadísticamente significativas (\*  $P < 0,01$ , control vs. grupos A $\beta$  y STZ; \*\*  $P < 0,001$ , grupo de control frente A $\beta$  + STZ).

Western blot de O-GlcNAcylation (O-GlcNAc) presentes en las proteínas totales del cerebro

Las variaciones en la expresión de O-GlcNAc habían sido previamente asociados con el daño tanto en los pacientes con EA y DM2. Nuestros resultados mostraron una disminución en el nivel de proteínas O-GlcNAcylation asociados con los grupos experimentales Figura 18A. Para el análisis densitométrico, los valores obtenidos del grupo de control representan 100%. Después de comparar con el grupo control, el grupo A $\beta$  mostró una disminución de 20%, mientras que el grupo STZ mostró una disminución de 30%, y finalmente el grupo A $\beta$  + STZ mostró una

disminución de 70% en el nivel de proteínas del cerebro O-GlcNAcylated la Figura 18B. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (\*  $p < 0,01$ , o uso de grupos de control de A $\beta$  y STZ; \*\*  $p < 0,001$ , grupo de control frente A $\beta$  + STZ).



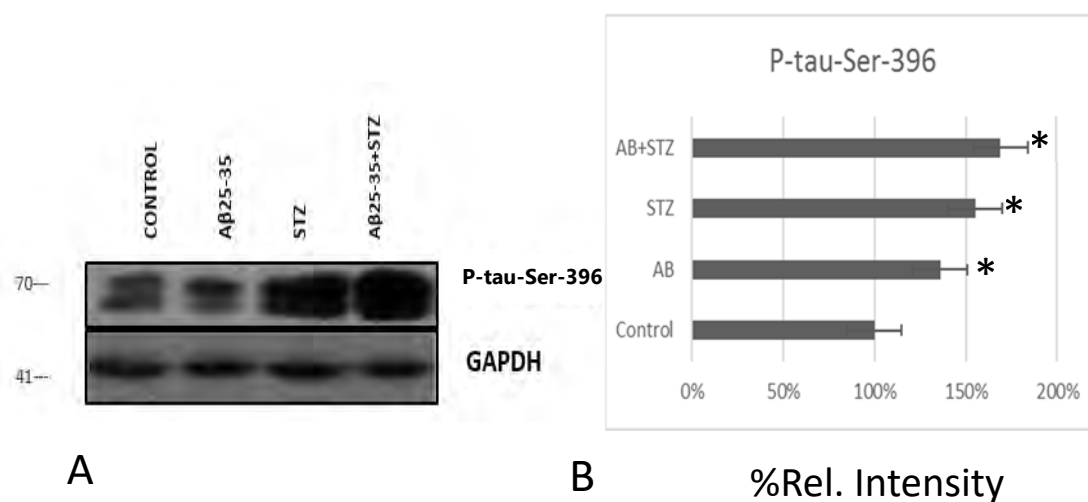
**Figura 19.**

Figura 19. Western blot para evaluar la expresión de O-GlcNAc-transferasa (OGT). El análisis se realizó en un extracto de proteína total, en los cuatro grupos. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-anticuerpo OGT y anti-GAPDH (A). Los resultados obtenidos del análisis de densitometría se muestran en B; normalización se realizó con niveles de GAPDH. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (\*  $p < 0,01$ , o uso de grupos de control de A $\beta$  y STZ; \*\*  $p < 0.001$ , de control vs. A $\beta$  + STZ).

Western blot de O-GlcNAc transferasa (OGT) en las proteínas totales del cerebro

La presencia de OGT involucrado en O-GlcNAcylation de proteínas en el cerebro se evaluó por transferencia Western. Una vez más, los resultados mostraron que la expresión de esta enzima se asoció con el grupo experimental la Figura 19A. Se observó una disminución de 10%, 20% y

40% en la expresión de OGT en el A $\beta$ , STZ, y grupos A $\beta$  + STZ, respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas Figura 19B, (\* P <0,01, frente a los grupos de control de A $\beta$  y STZ; \*\* P <0,001, frente al control de A $\beta$  + STZ).



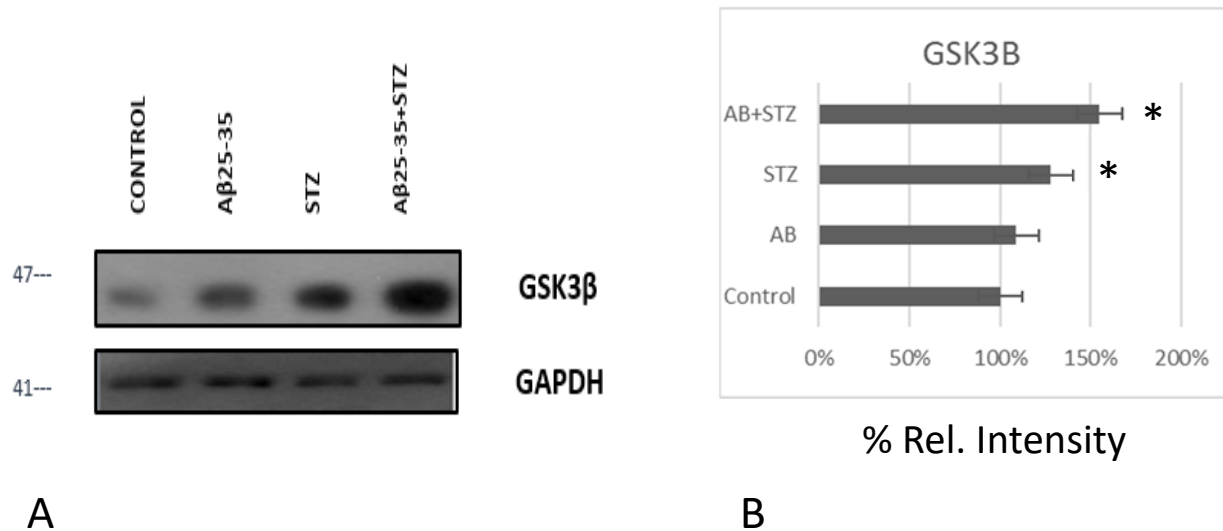
**Figura 20.**

Figura 20. Evaluación de P-tau-Ser-396 en el extracto de proteína total del cerebro en los grupos experimentales. La membrana se incubó con anticuerpos anti-GAPDH anti-P-tau-Ser-396 y (20A). El gráfico muestra los resultados después de la normalización de los resultados obtenidos a partir de la concentración de GAPDH (20B). El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los grupos de control vs A $\beta$ 25-25, STZ y STZ + A $\beta$ 25-25 (\* P <0,05).

Western blot para determinar P-tau-Ser-396 en el total de proteínas cerebrales

En contraste con la disminución en ambos O-GlcNAcylation niveles y OGT, nuestros resultados mostraron un incremento en la presencia de P-Ser-396, uno de los sitios críticos para la fosforilación de proteínas Tau. La Figura 20A muestra los cambios en la presencia de P-Ser-396 en relación con los grupos experimentales. En la Figura 20B, los datos obtenidos del análisis densitométrico señalan un aumento de 10%, 30% y 45% en el A $\beta$ , STZ, y

grupos A $\beta$  + STZ, respectivamente. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas después de comparar el control frente a grupos STZ y STZ + A $\beta$  (\* P <0,05).



**Figura 21.**

Figura 21. La presencia de glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3) en el extracto de cerebro total de proteína se evaluó mediante Western blot. La membrana se incubó con anticuerpos anti-GAPDH anti-GSK3 y (21A). Los resultados obtenidos para las proteínas reconocidas con anti-GSK3 se normalizaron con los obtenidos para GAPDH (21B). El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los grupos de control y STZ y STZ + A $\beta$ 25-25 (\* P <0,05).

Western blot de la glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 $\beta$ ) en las proteínas totales del cerebro.

GSK3 es una enzima clave ligada a la fosforilación de la proteína Tau, análisis de transferencia Western mostró un claro aumento de su expresión en todos los grupos experimentales, en comparación con el grupo de control la Figura 21A. Los resultados del análisis densitométrico se visualizan en la Figura 21B. Aunque los grupos de A $\beta$  mostraron un incremento del 5% en los niveles de GSK3 se no fue significativa. En comparación, la STZ mostró un aumento de 25%, mientras que el grupo de A $\beta$  + STZ mostró un incremento del 55% en la expresión de esta enzima. El análisis estadístico

mostró que estas diferencias fueron significativas (\*  $P < 0.05$ , control frente a grupos STZ y STZ +  $A\beta$ ).

## 22.6.- WESTERN BLOT FRACCION MITOCONDRIAL.

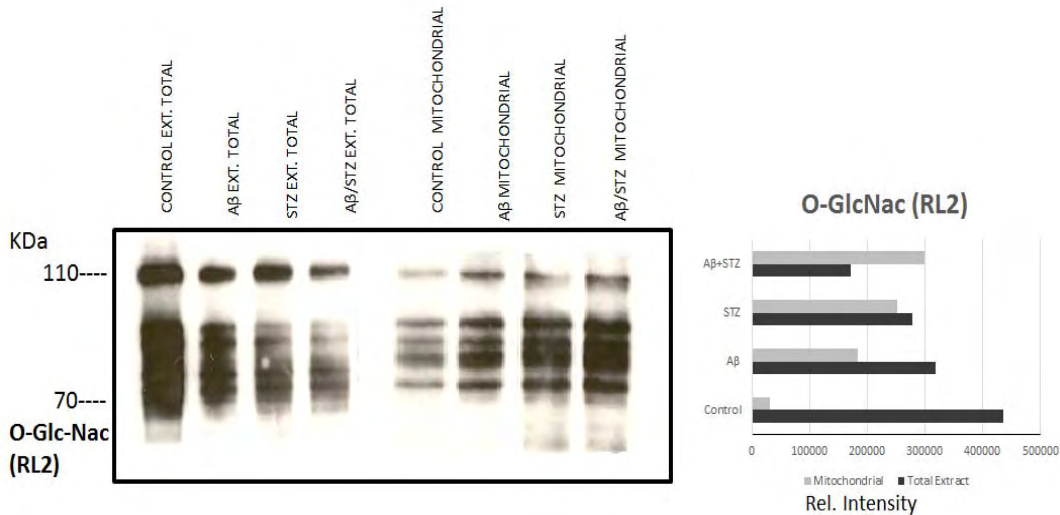


Figura 22.

Figura 22. Western blot de proteínas cerebrales totales y concentrados mitocondriales de estos mismos tejidos, utilizados para determinar la presencia de O-GlcNAcylation (O-GlcNac). (22A) La membrana se incubó con anti-O-GlcNac y el anticuerpo específico anti-GAPDH. El gráfico muestra los resultados del análisis densitométrico de proteína después de la normalización con niveles de GAPDH (22B). Las diferencias observadas entre los cuatro grupos fueron graficadas.

Western blot de O-GlcNAcylation (O-GlcNac) presentes en las proteínas totales y extractos mitocondriales de cerebros de rata.

Nuestros resultados mostraron con respecto a las proteínas totales una disminución en el nivel de proteínas O-GlcNAciladas asociados con los grupos experimentales, mientras que en las fracciones mitocondriales se ve un incremento en los niveles de O-GlcNAcilación Figura 22A. Para el análisis densitométrico, los valores obtenidos del grupo de control representan 100%. Después de comparar con el grupo control, el grupo Aβ mostró una disminución de 27% 20%, mientras que el grupo STZ mostró una disminución de 36% 30%, y finalmente el grupo Aβ + STZ mostró una disminución de 61% 70% en el nivel de proteínas del cerebro O-GlcNAciladas. Mientras a nivel mitocondrial se aprecia lo opuesto, después

de comparar con el grupo control, el grupo A $\beta$  mostró un incremento de la expresión del 487%, mientras que el grupo STZ mostró una disminución de 706%, y finalmente el grupo A $\beta$  + STZ mostró una disminución del 862% como se aprecia en la Figura 22B.



Figura 23.

Figura 23. Western blot para evaluar la expresión de O-GlcNAc-transferasa (OGT). El análisis se realizó en un extracto de proteína total, y concentrados mitocondriales de estos mismos tejidos, en los cuatro grupos. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-anticuerpo OGT y anti-GAPDH (23A). Los resultados obtenidos del análisis de densitometría se muestran en B; normalización se realizó con niveles de GAPDH. Las diferencias observadas entre los cuatro grupos y dos extractos fueron graficadas.

Nuestros resultados muestran con respecto a las proteínas totales una disminución en la expresión de la transferasa OGT al asociar el grupo control, con los grupos experimentales, mientras que en las fracciones mitocondriales se ve en incremento en los niveles de OGT Figura 23A. Para el análisis densitométrico, los valores obtenidos del grupo de control representan 100%. Después de comparar con el grupo control, el grupo A $\beta$  mostró una disminución de 14% 10%, mientras que el grupo STZ mostró una disminución de 30%20%, y finalmente el grupo A $\beta$  + STZ mostró una

disminución de 72% 40% en la expresión de OGTnc en proteínas totales del cerebro, mientras a nivel mitocondrial se aprecia lo opuesto, después de comparar con el grupo control, el grupo A $\beta$  mostró un incremento de la expresión del 224%, mientras que el grupo STZ mostró una disminución de 341%, y finalmente el grupo A $\beta$  + STZ mostró una disminución del 531% como se aprecia en la Figura 23B.

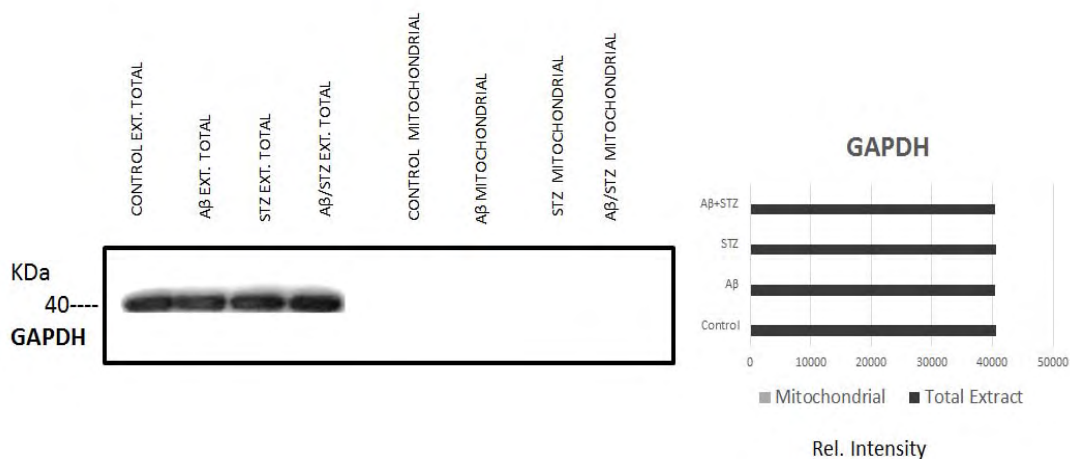


Figura 24.

Figura 24. Western blot para evaluar la expresión de la Glicerilaldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). El análisis se realizó en un extracto de proteína total, y concentrados mitocondriales de estos mismos tejidos, en los cuatro grupos. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-GAPDH (24A). Los resultados obtenidos del análisis de densitometría se muestran en (24B); No se apreció reacción en los extractos mitocondriales. Las diferencias observadas entre los cuatro grupos y dos extractos fueron graficadas.

Nuestros resultados muestran valores constantes, con respecto a las proteínas totales, en los cuatro grupos mientras en el caso de las proteínas mitocondriales no se observó reacción.





Figura 25.

Figura 25. Western blot para evaluar la expresión de Citocromo C. El análisis se realizó en un extracto de proteína total, y concentrados mitocondriales de estos mismos tejidos, en los cuatro grupos. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-Citocromo C (25A). Los resultados obtenidos del análisis de densitometría se muestran en (25B); Las diferencias observadas entre los cuatro grupos y dos extractos fueron graficadas.

Los resultados muestran con respecto a las proteínas totales una disminución en la expresión de la transferasa OGT al asociar el grupo control, con los grupos experimentales, mientras que en las fracciones mitocondriales se ve en incremento en los niveles de OGT Figura 25A. Para el análisis densitométrico, los valores obtenidos del grupo de control representan 100%. Después de comparar con el grupo control, el grupo Aβ mostró una disminución de 14% 10%, mientras que el grupo STZ mostró una disminución de 30%20%, y finalmente el grupo Aβ + STZ mostró una disminución de 72% 40% en la expresión de OGTnc en proteínas totales del cerebro, mientras a nivel mitocondrial se aprecia lo opuesto, después de comparar con el grupo control, el grupo Aβ mostró un incremento de la expresión del 224%, mientras que el grupo STZ mostró una disminución de

341%, y finalmente el grupo A $\beta$  + STZ mostró una disminución del 531% como se aprecia en la Figura 25B.

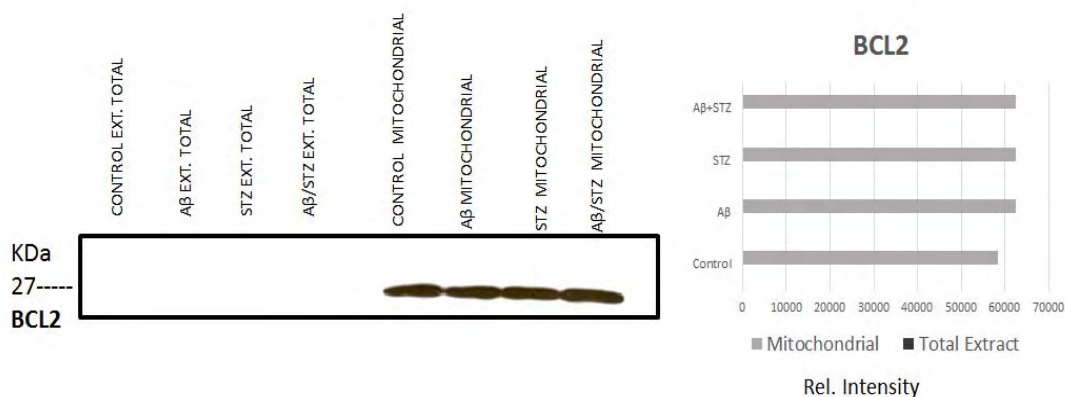


Figura 26

Figura 26. Western blot para evaluar la expresión de (B-cell lymphoma 2) (BCL2). El análisis se realizó en un extracto de proteína total, y concentrados mitocondriales de estos mismos tejidos, en los cuatro grupos. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-BCL2 (26A). Los resultados obtenidos del análisis de densitometría se muestran en B; No se apreció reacción en los extractos totales. Las diferencias observadas entre los cuatro grupos y dos extractos fueron graficadas.

Se muestran valores constantes, con respecto a las proteínas mitocondriales, en los cuatro grupos mientras en el caso de las proteínas totales no se observó reacción.

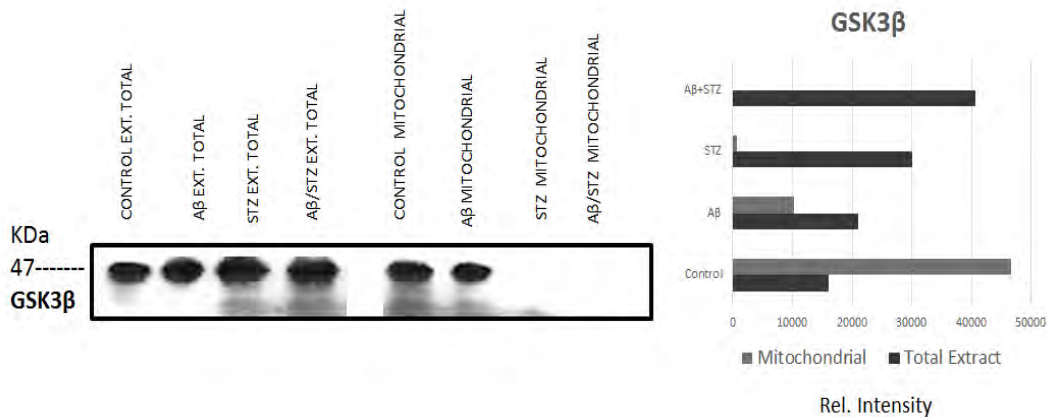


Figura 27.

Figura 27. La presencia de glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3) en el extracto de proteína de cerebro total y concentrados mitocondriales de estos mismos tejidos, en los cuatro grupos se evaluó mediante Western blot. La membrana se incubó con anticuerpos anti-GSK3β y anti-GAPDH (27A). Los resultados obtenidos para las proteínas reconocidas con anti-GSK3 se normalizaron con los obtenidos para GAPDH (27B). Las diferencias observadas entre los cuatro grupos y dos extractos fueron graficadas.

Western blot de glucógeno sintasa cinasa 3 beta (GSK3β) en las proteínas totales y fracción mitocondrial del cerebro.

GSK3 es una enzima clave ligada a la fosforilación de la proteína Tau, análisis de transferencia Western mostró un claro aumento de su expresión en todos los grupos experimentales, en comparación con el grupo de control la Figura 27A. Los resultados del análisis densitométrico se visualizan en la Figura 14B. Aunque los grupos de Aβ mostraron una presencia con incremento del 41% 5% en los niveles de GSK3 se no fue significativa. En comparación, al grupo control, el grupo de STZ mostró un aumento de 10,796%25%, mientras que el grupo de Aβ + STZ mostró un incremento del 14,497% en la expresión de esta enzima. En la fracción mitocondrial, los grupos de Aβ mostraron un incremento del 33% en los niveles de GSK3 se no fue significativa. En comparación, la STZ mostró un aumento de 1%,

mientras que el grupo de A $\beta$  + STZ mostró un incremento del 0% en la expresión de esta cinasa.

## **20.-DISCUSIÓN.**

En este estudio se investigó el efecto del péptido A $\beta$ 25-35 sobre la fosforilación y O-GlcNAcilación, en tejido hipocampal de rata, en estado de hiperglucemia e hiperinsulinemia. Aunque estudios previos han declarado la hiperglucemia y la presencia del péptido A $\beta$ 25-35 como factores de riesgo para desarrollar AD (Josep, 2001; Casoli, 2002; Valente et al, 2010; Bosco, 2011; Cai, 2015), su asociación con variaciones en los niveles de insulina aún es poco conocido. En este trabajo, el péptido A $\beta$ 25-35 se administró directamente en el tejido del hipocampo (Cuevas, 2009); y la hiperglucemia e hiperinsulinemia se indujo con la administración intramuscular de STZ (Alvarado-Vásquez, 2003, 2006). Después de cuatro semanas, nuestros resultados mostraron una disminución significativa en los niveles de O-GlcNAc y OGT, que se asoció con un aumento en los niveles de insulina, P-Tau-Ser-396, y GSK3. Estos cambios eran más evidentes en el grupo tratado con A $\beta$ 25-35 más STZ. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la importancia de la glucosa, A $\beta$ 25-35, la insulina o el metabolismo celular en el inicio de neurotoxicidad en hipocampo (Montiel, 2006). Por ejemplo, en la EA los cambios en el metabolismo de la glucosa, implican una reducción de los niveles energéticos cerebrales como resultado de la disminución de la captación de glucosa (Dias y Hart, 2007; Liu et al, 2009; Valente et al., 2010). Los resultados de Liu et al. (2009) demostraron que un aumento en los niveles de glucosa se asoció con variaciones en la fosforilación y patrones de O-glicosilación en cerebro de rata (Liu, 2009). Además, la DM, el mal control glucémico, y la disminución de la actividad mitocondrial se han considerado los factores asociados con el desarrollo de EA (Montiel et al, 2006; Roberts et al, 2014., Ashraf et al, 2015). Nuestros resultados presentan hiperglucemia en los dos grupos tratados con STZ. Los altos niveles de glucosa circulante fueron confirmados por la determinación del porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA1c), que se considera un indicador del promedio de los niveles de glucosa presentes en los pacientes con DM así como en modelos

experimentales de diabetes (Springhorn et al., 2012). El porcentaje de HbA1c fue particularmente mayor en los grupos que recibieron STZ (\*  $P < 0,05$ ). Las neuronas, que normalmente tienen un alto requisito de la glucosa, en condiciones de hiperglucemia están expuestas a niveles cuatro veces mayores de glucosa. Si este aumento es crónico, favorece la disfunción cognitiva (Kawamura et al., 2012). Aunque algunos otros factores han sido propuestos, (la afección de la vasculatura cerebral, señalización alterada por la insulina, resistencia a la insulina, y episodios de hipoglucemia), la hiperglucemia crónica podría ser estimada como un factor de riesgo para desarrollar AD (Bornstein et al., 2014).

Algunos trabajos muestran un papel crítico de la resistencia a la insulina (IR) en EA, favoreciendo la producción, acumulación de A $\beta$  y la formación de las marañas neurofibrilares (Matsuzaki et al., 2010), la insuficiencia de la transmisión sináptica, y la degeneración neuronal (Cai et al., 2015). En este trabajo, los niveles de insulina mostraron un aumento en los grupos que recibieron STZ. El STZ ha sido previamente vinculado con los modelos de la diabetes tipo 1 (dependiente de insulina), debido a su efecto sobre la biosíntesis y secreción de la insulina (Nukatsuka et al., 1990; Bedoya et al., 1996). En etapas posteriores, STZ induce alteraciones en la funcionalidad de las células beta, así como sobre la expresión génica y la producción de proteínas, lo que lleva a una deficiencia en el transporte y metabolismo de la glucosa (Wang y Gleichmann, 1998). Las administraciones continuas de STZ inhiben la síntesis rápida de insulina, lo que afecta los niveles de insulina circulante; este efecto está influenciado por la concentración utilizada de STZ (Wu y Huan, 2008; Akbarzadeh et al., 2007), En modelos donde se aplicó por vía intravenosa 60 mg kg de STZ (en comparación con los que se utilizó 40 mg / kg por vía intramuscular), los niveles / insulina eran detectables durante 80 días. Mientras que el grupo tratado con STZ mostró una disminución en los niveles de insulina, en comparación con el grupo control, la concentración fue similar entre ambos grupos (Akbarzadeh et al.2007). En un modelo de síndrome metabólico inducido con STZ (25 mg /

kg, administrada en dos ocasiones), se informó de la presencia de hiperinsulinemia durante 28 meses (Li et al., 2015). Estos datos apoyan el uso de STZ para inducir la hiperinsulinemia, de manera similar a la observada en los pacientes con DM2. Nuestros resultados mostraron un aumento en los niveles de insulina en plasma en animales tratados con STZ; esto puede intensificar los efectos negativos derivados de la hiperglucemia en presencia de A $\beta$ 25-35, como se muestra por Cai et al. (2015) o Craft (2007), quien informó que el aumento de la insulina plasmática está vinculada a un aumento en los niveles de A $\beta$  y agentes inflamatorios en el cerebro (Craft 2007). El cerebro metaboliza la glucosa a través de diferentes vías, una de ellas es la ruta de biosíntesis de hexosamina (HBP) (Li M et al., 2013). Normalmente, 2 a 5% de la glucosa se metaboliza por la HBP, que produce UDPN-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) (McClain y Crook, 1996) que, a su vez, es utilizado por la N-acetilglucosamina transferasa O-ligado (OGT) durante el O-GlcNAcilación de proteínas citoplasmáticas y mitocondrial (Brownlee, 2001; Marsh et al, 2013;. McClain, 2002; McClain y Crook, 1996). La importancia de esta vía reside en su papel ambivalente, ya que se asocia tanto con la protección, como con la muerte celular en EA. Por ejemplo, si los sitios susceptibles de O-GlcNAcilación se cubren con O-GlcNAc inhibe la posibilidad de hiperfosforilar esos sitios de la proteína Tau, (Zhu et al., 2014). Sin embargo, en condiciones de estrés, como en la DM, un aumento del O-GlcNAcilación puede ocurrir debido a un aumento global en el nivel de la glucosa, lo que induce el desarrollo de la resistencia a la insulina (McClain y Crook, 1996; Brownlee, 2001; McClain, 2002; Marsh et al, 2013.), inhibiendo el efecto protector de la insulina y favorecer el inicio de la apoptosis (Nakamura et al, 2001). Sin embargo, una menor utilización de la glucosa asociado con una menor O-GlcNAcilación de las proteínas ha sido reportado en EA (Zhu et al., 2014). En nuestro trabajo, la presencia de A $\beta$ 25-35 se asoció con un descenso en O-glicosiltransferasa (OGT) y los niveles de O-GlcNAcilación, especialmente en el grupo tratado con STZ. Además, estos resultados fueron confirmados por Western blot se utiliza

para detectar las proteínas O-GlcNAcizadas, así como el OGT involucrados en este proceso. Por otro lado, nuestros resultados mostraron que la caída en los niveles de O-GlcNAcización estaba vinculada a un aumento en los niveles de P-Tau-Ser-396, que puede inducir hiperfosforilación de la proteína Tau característico de la EA (Wanga y Liu 2008). Recientemente, se informó de que la fosforilación de P-Tau-Ser-396 (detectado en secciones de cerebro humanos embebidos en parafina) es un evento temprano, antes de la aparición de la estructura fibrilar clásica (Mondragón-Rodríguez et al., 2014).

En nuestro modelo se encontró un incremento de 151,9%, 244% y 156,9% en los niveles de P-Tau-Ser-396 en el grupo de A $\beta$ , A $\beta$ -STZ, y grupos de STZ, respectivamente. Una vez más, estos resultados fueron confirmados por Western blot, donde se observó un claro aumento en la expresión de P-Tau-Ser-396 en presencia de A $\beta$ 25-35, especialmente en el grupo STZ + A $\beta$ . Estos resultados muestran que A $\beta$  y glucosa pueden inducir una alta fosforilación de la proteína Tau, pero curiosamente, la presencia de ambos potencia este efecto negativo. Diferentes quinasas se han involucrado en la fosforilación de la proteína Tau. La glucógeno sintasa quinasa-3 beta (GSK3) reconoce 27 de los aproximadamente 45 sitios de fosforilación identificados en la proteína Tau (Hanger y Noble 2011), y entre estos sitios se encuentra la Ser396, considerada un sitio crítico para la agregación y estabilización de los microtúbulos, en asociación a la proteína Tau (Wang et al., 2008). La evaluación de GSK3 por inmunohistoquímica mostró altos niveles de esta quinasa en los grupos de A $\beta$  y STZ; especialmente el grupo de A $\beta$  + STZ mostraron una presencia clara y fuerte de GSK3 (234%). Es importante destacar que este aumento en la fosforilación de Tau se ha relacionado previamente con una mayor expresión de GSK3 (Qu et al., 2011). Una vez más, la presencia de esta quinasa se confirmó por Western blot. Nuestros resultados coinciden con los de Qu et al. (2011), quien informó que la hiperglucemia inducida por STZ puede causar alteraciones de la vía / GSK-3 / PP-2A Akt en el cerebro de ratas y la fosforilación



anormal de tejido del hipocampo. Como se mencionó antes, la DM2 aumenta al doble el riesgo de demencia (Verdile et al, 2015; Ninomiya, 2014). Sabemos también que la EA es el subtipo más común de demencia y se asocia con el envejecimiento (Maccioni et. Al., 2001, Kelley y Petersen 2007). Sin embargo, hay resultados que sugieren que el papel de la insulina o resistencia a la insulina como la posible conexión entre las dos enfermedades (Cai et al., 2015). Nuestros resultados muestran que el aumento de los niveles de glucosa favoreció una mayor actividad de GSK3, lo que aumenta los niveles de P-Tau-Ser-396. Esto, a su vez, se ve favorecido por la menor expresión de OGT y O-GlcNAcilación, que normalmente inhibe la fosforilación de la proteína Tau. También se incrementaron los niveles de insulina (Zhao et. Al., 2009, Cai et al., 2015), este aumento puede favorecer la acumulación de A $\beta$ , la formación de NFT, y la degeneración neuronal. Todos estos hechos juntos potencian el daño en el tejido del hipocampo.

O-GlcNAcilación es un proceso dinámico y reversible que está emergiendo como un importante regulador de numerosos mecanismos celulares (Butkinaree et al., 2010), y de participar en una amplia gama de enfermedades humanas (Hart et al., 2011). Hanover et al. (2010) demostraron la importancia de la O-GlcNAcilación en enfermedades del sistema inmunológico, cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la DM y las enfermedades neurodegenerativas. Curiosamente, en condiciones patológicas o perjudiciales (por ejemplo, isquemia y trauma) la HTA y la consiguiente O-GlcNAcilación representan la primera línea de defensa del organismo (Chatham et al., 2008).

Ante cambios en los niveles de glicosilación y fosforilación, la presencia de hiperglicemia continua era útil conocer que las modificaciones en la OGTm, en nuestro modelo no existen trabajos sobre la isoforma OGTm. Hart (2009) la describe y menciona cuáles son sus isoformas características. El trabajo de Love (2011) describe la presencia de una isoforma mediante splicing

alternativo, plantean un modelo celular con hiperexpresión de la isoforma mitocondrial, y la comparan contra la hiperexpresión de OGTnc y ellos describen que el aumento de OGTnc tiene un efecto protector mientras el aumento en la expresión de la isoforma OGTm induce muerte celular. Más recientemente el trabajo de Trapannone (2016), quienes trabajando sobre líneas celulares HEK 293 y HeLa así como hígados de ratones mediante el uso de Northern Blott buscaron el RNAt para OGTnc y OGTm, donde ellos asocian el aumento de OGTm en asociación con el aumento de los niveles de O-GlcNAc y que los valores de OGTm con respecto a la OGTnc son los mismos, sin embargo en nuestro modelo, en el grupo control se concuerda con lo mencionado en este trabajo, es decir que al presentar niveles adecuados de O-GlcNAc, la OGTnc se mantiene constante y la OGTm se mantiene sin cambios; sin embargo al reducir la presencia de O-GlcNAc en los grupos tratados con A $\beta$ , STZ y A $\beta$ +STZ la OGTnc se ve disminuida, mientras que en el caso de la fracción mitocondrial para estos mismos grupos se ve un aumento de la presencia de OGTm.

En este trabajo de tesis nos dimos a la tarea de aislar las mitocondrias de estos mismos cuatro grupos experimentales ya que consideramos que el estrés generado por la hiperglicemia, la toxicidad del amiloide y ambos estresores, provocan cambios mitocondriales, por lo tanto, nos pareció interesante conocer su comportamiento en nuestro modelo, para lo cual obtuvimos la fracción mitocondrial del extracto de cerebro. Los resultados mostraron que a mayor concentración de O-GlcNAc en extractos totales se encuentra una menor concentración de O-GlcNAc a nivel mitocondrial, concordando con lo mostrado por el trabajo de Trapannone et al., 2016. Sin embargo, ocurre en condiciones fisiológicas, pero cuando se reduce la concentración de O-GlcNAc en extractos totales aumenta la concentración de O-GlcNAc en la fracción mitocondrial.

A mayor concentración de O-GlcNAc, existe una mayor expresión de OGTnc (en extractos totales de cerebros control), se ve mínima presencia

de OGTm (en extractos mitocondriales) y en contraste, cuando se reduce la concentración de O-GlcNAc hay menor expresión de OGTnc en extractos totales, pero aumenta la concentración de OGTm en la fracción mitocondrial.

En cuanto a la expresión de GSK3 $\beta$  encontramos que hay poca expresión de GSK3 $\beta$  en el grupo de STZ y la expresión de la marca es mayor para el grupo de A $\beta$ +STZ en los extractos totales, mientras que su presencia a nivel mitocondrial es mayor en el grupo control reduce para el grupo de A $\beta$ , en el caso del grupo de STZ es menor y en el de A $\beta$ +STZ, no se encontró.

En el trabajo de Love (2011) se encontró que la presencia de OGTnc tiene un efecto citoprotector, mientras que la sobre expresión de OGTm la encontraron que se asociaba con citotoxicidad para la célula. Se conoce que en EA hay un aumento de citocromo C en las neuronas susceptibles a morir en asociación con aumento de estrés oxidativo forma parte de los primeros eventos en el desarrollo de la EA según Aleardi et al. (2005) encontraron que la acumulación de A $\beta$  en el cerebro de rata se asoció con un aumento de la viscosidad mitocondrial, la liberación del citocromo C, y la inhibición de los complejos de la cadena respiratoria concurrentes con la síntesis de ERO.

En condiciones adecuadas de O-GlcNAc nucleocitoplasmática en el grupo control, así como en el de A $\beta$ , no se encuentra expresión de citocromo C en extractos totales mientras que en el grupo de STZ y A $\beta$ +STZ, se encuentra en los extractos totales, mientras que para los grupos de grupo control, así como en el de A $\beta$ , se encuentra expresión en las fracciones mitocondriales mientras para los grupos de STZ y A $\beta$ +STZ, no se encuentra expresión de citocromo C en las fracciones mitocondriales pero se encontró la presencia de citocromo C a nivel nucleocitoplasmático, sin embargo los controles para fracción mitocondrial se basó en la presencia de BCL2 que se encontraron presentes y en el caso de las fracciones nucleares se empleó GAPDH como control de carga.

En los trabajos de Baptista 2013 y Boudina 2007, se describe como, la mitocondria se ve particularmente afectada por altas concentraciones de glucosa, ya que se altera la forma mitocondrial, del metabolismo de la glucosa, la generación de energía, así como la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (Baptista et al, 2013; Boudina et al, 2007), lo que apoya en parte los resultados obtenidos de nuestro trabajo, mientras que según Liu 2012 y Russell 2002, en las neuronas, la alta concentración de glucosa induce la despolarización de la mitocondria membrana mitocondrial, mientras Fernyhough, 2010 y Reddy, 2009 mostraron como se favorece una actividad mitocondrial anormal, esta induce problemas del estado bioenergético (Fernyhough et al, 2010; Reddy, 2009). Esto cambios explican en parte el deterioro de la fosforilación oxidativa y el aumento de la síntesis de ERO observaron los cerebros post-morte de los pacientes con EA, así como en modelos animales de la EA en presencia de  $\text{A}\beta$  (Spuch et al., 2012).

Por lo que consideramos de importancia considerar los posibles cambios en la expresión de OGTm, como un inductor de daño mitocondrial.

## **21.- Conclusión**

La hiperglucemia e hiperinsulinemia se asocian con el inicio de la lesión del hipocampo, y más tarde con el desarrollo de neurotoxicidad. La presencia de hiperglucemia e hiperinsulinemia se encuentran asociados con la activación de numerosos mecanismos perjudiciales (actividad alta GSK3, la inhibición de OGT, y O-GlcNAcilación en el tejido del hipocampo) en los extractos totales de cerebro. Pero cuando se revisa el efecto de estos cambios, sobre la fracción mitocondrial, se observa un efecto opuesto, aumento de OGTmitocondrial y aumento de la O-GlcNAcilacion a nivel mitocondrial. Esto ayuda a explicar las dificultades en la determinación del mecanismo central por el cual la presencia de diabetes favorece el comienzo de la EA. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la elevación de los niveles de glucosa e insulina fueron dos primeros eventos clave, que podrían favorecer el daño neurotóxico, al inducir la activación de

estos mecanismos y exacerbar el daño en presencia de A $\beta$ , se incrementa la expresión de OGTm mientras la OGTnc se reduce, favoreciendo la salida de citocromo C al citoplasma. Este trabajo da apoyo para continuar la evaluación de estos mecanismos en otros modelos, y mejora nuestra comprensión sobre la asociación entre la hiperglicemia, insulina-resistencia y EA. Finalmente, si esta asociación podría ayudar a explicar el origen de otras demencias asociadas con altos niveles de glucosa y el impacto mitocondrial de estos cambios.

## 22.- LITERATURA CITADA.

- (ADA) American Diabetes Association. 2014 Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 37 Suppl 1:S81-90.
- Aleari AM, Benard G, Augereau O, et al. 2005. Gradual alteration of mitochondrial structure and function by beta-amyloids: importance of membrane viscosity changes, energy deprivation, reactive oxygen species production, and cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr* 37:207-25.
- Alvarado-Vásquez N., Lascurain R., Cerón E., Vanda B., Carvajal-Sandoval G., Tapia A., Guevara J., Montaña LF., Zenteno E. 2006. Oral glycine administration attenuates diabetic complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*.79; 3: 225-32.
- Alvarado-Vásquez N., Zamudio P., Cerón E., Vanda B., Zenteno E., Carvajal-Sandoval G. 2003.Effect of glycine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 134; 4: 521-7.
- Ashraf A, Fan Z, Brooks DJ, Edison P. 2015. Cortical hypermetabolism in MCI subjects: a compensatory mechanism? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 42; 3: 447-58.
- Avila J., Lucas J.J., Perez M., Hernandez F., 2004. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev*. 54: 361–84.
- Avila J, Pérez M, Lucas JJ, Gómez-Ramos A, Santa María I, Moreno F, Smith M, Perry G, Hernández F. 2004. Assembly in vitro of tau protein and its implications in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*.1;2:97-101.
- Baptista FI, Pinto MJ, Elvas F, Almeida RD, Ambrósio AF. 2013. Diabetes alters KIF1A and KIF5B motor proteins in the hippocampus. *PLoS One*. 12;8(6):e65515.
- Ba-Tin L, Strike P, Tabet N. 2011. Diabetic peripheral microvascular complications: relationship to cognitive function. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2011:723434.
- Bedoya FJ., Solano F., Lucas M., 1996. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia*. 15; 52: 344-7.
- Beleznai T, Bagi Z. 2012. Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation. *Vascul Pharmacol*. 56(3-4):115-21.

- Biessels G.J., Strachan M.W., Visseren F.L., Kappelle L.J., Whitmer R.A., 2014. Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: towards targeted interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2; 3: 246-55.
- Bioterio para neurociencias 2010. (Recuperado) <http://neurocienciaut.jimdo.com/bioterio/> (consultado 13-06-2010).
- Bloemer J, Bhattacharya S, Amin R, Suppiramaniam V. 2014. Impaired insulin signaling and mechanisms of memory loss. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 121:413-49.
- Bobba A, Amadoro G, Valenti D, Corsetti V, Lassandro R, Atlante A. 2013. Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by  $\beta$ -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion* 13:298-311.
- Boehmelt G, Wakeham A, Elia A, Sasaki T, Plyte S, Potter J, Yang Y, Tsang E, Ruland J, Iscove NN, Dennis JW, Mak TW. 2000. Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells. *EMBO J.* 2;19(19):5092-104.
- Bond MR, Hanover JA. 2013. O-GlcNAc Cycling: A Link Between Metabolism and Chronic Disease. *Annu Rev Nutr.* In Press.
- Bosco D., Fava A., Plastino M., Montalcini T., Pujia A., 2011. Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis *J. Cell. Mol. Med.* 15; 9:1807-21.
- Botero LE, Toro AE, Patiño AJ, Salazar G, Rodríguez JC, Suárez-Escudero JC, Alarcón GA, Corcimarú A, Osorio C, Jeong JS, Alzate O. 2012. Diabetes mellitus in patients with Alzheimer's disease: clinical description and correlation with the APOE genotype in a sample population from the province of Antioquia, Colombia. *Biomedica.* 32(2):239-51.
- Boudina S, Sena S, Theobald H, et al. 2007. Mitochondrial energetics in the heart in obesity related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes* 56:2457-66.
- Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 13; 414:813-20.
- Buse M. G. (2006) Hexosamines, insulin resistance and the complications of diabetes: current status. *Am. J Phys. Endoc. Met.* 290, E1-E8.
- Butkinaree C, Park K, Hart GW. 2010. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and

transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta* 1800:96-106.

- By Emw - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8820696>
- Cai Z., Xiao M., Chang L., Yan L.J., 2015. Role of insulin resistance in Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis.* 30; 4:839-51.
- Cao M, Jiang J, Du Y, Yan P. 2012. Mitochondria-targeted antioxidant attenuates high glucose-induced P38 MAPK pathway activation in human neuroblastoma cells. *Mol Med Rep* 5:929-34.
- Cardoso S, Correia SC, Santos RX, et al. 2013. Hyperglycemia, hypoglycemia and dementia: role of mitochondria and uncoupling proteins. *Curr Mol Med* 13:586-601.
- Carrillo LD, Froemming JA, Mahal LK. 2011. Targeted in vivo O-GlcNAc sensors reveal discrete compartment-specific dynamics during signal transduction. *J Biol Chem.* 25;286(8):6650-8.
- Chatham JC, Marchase RB. 2010 Protein O-GlcNAcylation: A critical regulator of the cellular response to stress. *Curr Signal Transduct Ther.*5;1:49-59.
- Cheng A1, Hou Y, Mattson MP. 2010. Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro.* 4;2:5-45.
- Craft S. 2007. Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis. Potential mechanisms and implications for treatment. *Curr Alzheimer Res.* 4; 2:147-52.
- Cuevas E, Limón D, Pérez-Severiano F, Díaz A, Ortega L, Zenteno E, Guevara J. 2009. Antioxidant effects of epicatechin on the hippocampal toxicity caused by amyloid-beta 25-35 in rats. *Eur J Pharmacol.* 15;616:122-7.
- Dandona P., Mohamed I., Ghanim H., Sia C.L, Dhindsa S., Dandona S., Makdissi A., Chaudhuri A., 2011. Insulin suppresses the expression of amyloid precursor protein, presenilins, and glycogen synthase kinase-3beta in peripheral blood mononuclear cells. *J ClinEndocrinolMetab.* 96; 6:1783-8.
- Darley-USmar VM, Ball LE, Chatham JC. 2012. Protein O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine: a novel effector of cardiomyocyte metabolism and function. *J Mol Cell Cardiol.*52(3):538-49.
- Dehennaut V., Hanouille X., Bodart J-F., Vilain J.P., Michalski J-C., Landrieu I., Lippens G. and Lefebvre T. (2008). Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates *Biochem Biophys Res Commun.* 2;369(2):539-46.



- Delobette, S., Privat, A., Maurice, T., 1997. In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 319:1–4.
- Dias W., Hart G. 2007. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol Biosyst.* 3; 11:766-72.
- Dias WB, Cheung WD, Hart GW. 2012. O-GlcNAcylation of kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1;422(2):224-8.
- Dickamer K, Taylor ME 2006. *Introduction to Glycobiology* (2nd ed.). Oxford University Press, USA.
- Eckert A, Schmitt K, Götz J. 2011. Mitochondrial dysfunction - the beginning of the end in Alzheimer's disease? Separate and synergistic modes of tau and amyloid- $\beta$  toxicity. *Alzheimer's Res. & Ther.* 3:3-15.
- Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. 2000. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia.* 43:1528-1533.
- Espinoza-Rojo M., Iturralde-Rodríguez K., Chánes-Cárdenaz M., Ruiz- Tachiquin M., Aguilera P. 2010. Glucoswe transporters regulation on ischemic brain posible role as therapeutic target. *Cent Nerv Syst Agents Med Cem* 4:317-25.
- Essentials of Glycobiology. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. 2nd edition.
- Federation (IDF) Diabetes Atlas 2013 <http://www.idf.org/diabetesatlas/es>.
- Fernyhough P, Roy Chowdhury SK, Schmidt RE. 2010. Mitochondrial stress and the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 5:39-49.
- Finlay, D. R. and Forbes, D. J. (1990) Reconstitution of biochemically altered nuclear pores: transport can be eliminated and restored. *Cell.* 60, 17-29.
- Gangy S. 2001. The role of cerebral amyloid  $\beta$  accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 115: 1121-29.
- Gawlowski T, Suarez J, Scott B, Torres-Gonzalez M, Wang H, Schwappacher R, Han X, Yates JR 3rd, Hoshijima M, Dillmann W. 2012. Modulation of dynamin-related protein 1 (DRP1) function by increased O-linked- $\beta$ -N-acetylglucosamine modification (O-GlcNAc) in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 287:30024-34.
- Gong C.X., Liu F., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., 2006. Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation *J. Alzheimers Dis.* 9:1-12.

- Gong CX, Liu F, Iqbal K. 2012. O-GlcNAc cycling modulates neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.*109(43):17319-20.
- Groves JA, Lee A, Yildirim G, Zachara NE. 2013. Dynamic O-GlcNAcylation and its roles in the cellular stress response and homeostasis. *Cell Stress Chaperones.*
- Gu Y, Ande SR, Mishra S. 2011. Altered O-GlcNAc modification and phosphorylation of mitochondrial proteins in myoblast cells exposed to high glucose. *Arch Biochem Biophys.* 505:98-104.
- Gu Y, Ande SR, Mishra S. 2011. Altered O-GlcNAc modification and phosphorylation of mitochondrial proteins in myoblast cells exposed to high glucose. *Arch Biochem Biophys.* 1;505(1):98-104.
- Guillozet AL, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM. 2003. Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 60;5:729-36.
- Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Reynolds MR, Horowitz PM, Fu Y, Wang T, Cahill ME, Bigio EH, Berry RW, Binder LI. 2005. Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 26;7:1015-22.
- Han I, Oh ES, Kudlow JE 2000. Responsiveness of the state of O-linked N-acetylglucosamine modification of nuclear pore protein p62 to the extracellular glucose concentration. *Biochem J.* 15;350 Pt 1:109-14.
- Hanger D. P., Noble W., 2011. Functional Implications of Glycogen Synthase Kinase-3-Mediated tau Phosphorylation. *Int J Alzheimers Dis.* 352805; 1-11.
- Hanover J. A., Cohen K. C., Willingham M.C., and Park M. K.(1987). O-Linked N-Acetylglucosamine Is Attached to Proteins of the Nuclear Pore: Evidence For Cytoplasmic and Nucleoplasmic Glycoproteins. *The J Biol. Chem.* 262, 9887-9894.
- Hanover JA, Krause MW, Love DC 2012 Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 23;13(5):312-21.
- Hanover JA, Krause MW, Love DC. 2010. The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta.*;1800(2):80-95.
- Hanover JA, Lai Z, Lee G, Lubas WA, Sato SM. 1999. Elevated O-linked N-acetylglucosamine metabolism in pancreatic beta-cells. *Arch Biochem Biophys.*362(1):38-45.

- Hanover JA, Forsythe ME, Hennessey PT, Brodigan TM, Love DC, Ashwell G, Krause M. 2005. A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9;102:11266-71.
- Hanover JA, Krause MW, Love DC. 2012. Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 23;13:312-21.
- Hardy J, Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 19;297:353-6.
- Hart G.W., Slawson C., Ramirez-Correa G. and Lagerlof O. (2011). Cross Talk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease. *Ann. Rev. Biochem.* 80, 825–58.
- Hart GW, Housley MP, Slawson C. 2007. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 26:1017-22.
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. 2011. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: Roles in signaling, transcription, and chronic Disease. *Ann Rev Biochem* 80:825–58.
- Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. 2003. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* 60:1119-22.
- Henriksen E.J., 2010. Dysregulation of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 6; 5:285-93.
- Hill S, Van Remmen H. 2014. Mitochondrial stress signaling in longevity: a new role for mitochondrial function in aging. *Redox Biol.* 27;2:936-44.
- Hroudová J, Singh N, Fišar Z. 2014. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's disease. *Biomed Res Int.* 175062:10.1155/2014.
- International Diabetes Federation (IDF) Diabetes Atlas 2013 [http://www.idf.org/sites/default/files/EN\\_6E\\_Ch2\\_the\\_Global\\_Burden.pdf](http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Ch2_the_Global_Burden.pdf).
- Issad T and Kuo M. (2008). O-GlcNAc modification of transcription factors, glucose sensing and glucotoxicity. *Trends Endocrin Met.* 19, 380-390.
- Issad T, Masson E, Pagesy P. 2010 O-GlcNAc modification, insulin signaling and diabetic complications. *Diabetes Metab.* 36(6 Pt 1):423-35.

- Jiao Y, Zhang Y, Wei Y, Liu Z, An W, Guo M. 2012. Direct observation of internalization and ROS generation of amyloid  $\beta$ -peptide in neuronal cells at subcellular resolution. *Chembiochem* 13:2335-8.
- Johnsen VL, Belke DD, Hughey CC, Hittel DS, Hepple RT, Koch LG, Britton SL, Shearer J. 2013. Enhanced cardiac protein glycosylation (O-GlcNAc) of selected mitochondrial proteins in rats artificially selected for low running capacity. *Physiol Genomics*. 7;45(1):17-25.
- Johnson B, Opimba M, Bernier J. 2014. Implications of the O-GlcNAc modification in the regulation of nuclear apoptosis in T cells. *Biochim Biophys Acta*. 1840:191-8.
- Jokela TA, Makkonen KM, Oikari S, Kärnä R, Koli E, Hart GW, Tammi RH, Carlberg C, Tammi MI. 2011. Cellular content of UDP-N-acetylhexosamines controls hyaluronan synthase 2 expression and correlates with O-linked N-acetylglucosamine modification of transcription factors YY1 and SP1. *J Biol Chem*. 3;286(38):33632-40.
- Jones DS, Greene JA. 2016. Is dementia in decline?: historical trends and future trajectories. *N Engl J Med* 374:507-9
- Kawamura, T., Umemura, T., Hotta, N., 2012. Cognitive impairment in diabetic patients: can diabetic control prevent cognitive decline? *J. Diabetes Investig.* 3, 413–23.
- Kazemi Z, Chang H, Haserodt S, McKen C, Zachara NE. 2010. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3 $\beta$ -dependent manner. *J Biol Chem*. 285(50):39096-107.
- Kebede M, Ferdaoussi M, Mancini A, Alquier T, Kulkarni RN, Walker MD, Poitout V. 2012. Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14;109(7):2376-81.
- Kelley B.J., Petersen R.C., 2007. Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *NeurolClin*. 25; 3:577-609.
- Kerner W, Brückel J. 2014 Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 122;7:384-6.
- Kim B, Backus C, Oh S, Feldman EL. 2013. Hyperglycemia-induced tau cleavage in vitro and in vivo: a possible link between diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 34:727-39.

- Kim C, Nam DW, Park SY, Song H, Hong HS, Boo JH, Jung ES, Kim Y, Baek JY, Kim KS, Cho JW, Mook-Jung I. 2013. O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase inhibitor attenuates  $\beta$ -amyloid plaque and rescues memory impairment. *Neurobiol Aging*. 34:275-85.
- Kim EJ, Amorelli B, Abdo M, Thomas CJ, Love DC, Knapp S, Hanover JA. 2007. Distinctive inhibition of O-GlcNAcase isoforms by an alpha-GlcNAc thioisulfonate. *J Am Chem Soc*. 5;129(48):14854-5.
- Kim EJ, Kang DO, Love DC, Hanover JA. 2006. Enzymatic characterization of O-GlcNAcase isoforms using a fluorogenic GlcNAc substrate. *Carbohydr Res*. 12;341(8):971-82.
- Lazarus MB, Nam Y, Jiang J, Sliz P, Walker S. 2011. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature*. 27;469(7331):564-7.
- Lee CW, Shih YH, Wu SY, Yang T, Lin C, Kuo YM. 2013. Hypoglycemia induces tau hyperphosphorylation. *Curr Alzheimer Res*. 10:298-308.
- Lee J., Kim K-Y., Lee J. and Paik Y-K. (2009). Regulation of Dauer Formation by O-GlcNAcylation in *Caenorhabditis elegans*. *The J Biol. Chem.*. 285, 2930-2939.
- Lee J-H., Cheon Y-H., Woo R-S., Song D-Y., Moon C. and Baik T.K. (2012) Evidence of early involvement of apoptosis inducing factor-induced neuronal death in Alzheimer brain. *Ana. Cel. Biol*. 45, 26-37.
- Lefebvre T, Cieniewski C, Lemoine J, Guerardel Y, Leroy Y, Zanetta JP, Michalski JC. 2001. Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem J*. 360:179-88.
- Lefebvre T, Dehennaut V., Guinez C., Olivier S., Drougat L., A Mir A-M., Mortuaire M., Vercoutter-Edouart AM., and Jean-Claude Michalski. 2010. Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1800:67–79.
- Leuner K, Müller WE, Reichert AS. 2012. From mitochondrial dysfunction to amyloid beta formation: novel insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 46:186-93.

- Leuner K, Schütt T, Kurz C, et al. 2012. Mitochondrion-derived reactive oxygen species lead to enhanced amyloid beta formation. *Antioxid Redox Signal* 16:1421-33.
- Li L, Liao G, Yang G, Lu Y, Du X, Liu J, Li L, Wang C, Li L, Ren Y, Zhong Z, Cheng J, Chen Y. 2015. High-fat diet combined with low-dose streptozotocin injections induces metabolic syndrome in *Macacamulatta*. *Endocrine*. 49; 3:659-68.
- Li T., Paudel H.K., 2006. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Biochemistry*. 45:3125–33.
- Lim K, Chang HI. 2010. Elevated O-linked N-acetylglucosamine correlated with reduced Sp1 cooperative DNA binding with its collaborating factors in vivo. *Biosci Biotechnol Biochem*. 74(8):1668-72.
- Lim S, Smith KR, Lim ST, Tian R, Lu J, Tan M. 2016. Regulation of mitochondrial functions by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Biosci*. 14;6:25.
- Lima VV, Spitler K, Choi H, Webb RC, Tostes RC. 2012. O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signaling in the cardiovascular system becoming sweeter? *Clin Sci (London)* 123:473-86.
- Liu D, Chan SL, de Souza-Pinto NC, et al. 2006. Mitochondrial UCP4 mediates an adaptive shift in energy metabolism and increases the resistance of neurons to metabolic and oxidative stress. *Neuromolecular Med* 8:389-414.
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX. 2004. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10804–10809.
- Liu F, Shi J, Tanimukai H, et al. 2009. Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease, *Brain* 132:1820-32.
- Liu F., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Hart G.W., and Gong C-X. 2007 O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of *tau*: A mechanism involved in Alzheimer's disease *PNAS* 10804–10809.
- Liu F., Shi J., Tanimukai H., Gu J., Gu J., Grundke-Iqbal I, Iqbal K., and Gong C-X. 2009. Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and *tau* pathology in Alzheimer's disease. *Brain*. 132,1820–1832.
- Liu F., Shi J., Tanimukai H., Gu J., Gu J., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Gong C. 2009. Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain*.132:1820-32.

- Liu J, Marchase RB, Chatham JC. 2007. Increased O-GlcNAc levels during reperfusion lead to improved functional recovery and reduced calpain proteolysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293:H1391-9.
- Liu Y, Li X, Yu Y, Shi J, Liang Z, Run X, Li Y, Dai CL, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Liu F, Gong CX. 2012. Developmental regulation of protein O-GlcNAcylation, O-GlcNAc transferase, and O-GlcNAcase in mammalian brain. *PLoS One.*7(8):e43724.
- Love DC, Kochran J, Cathey Shin S-H, Hanover JA. 2003. Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J Cell Sci.* 116:647-654.
- Lozano L, Alvarado-Vásquez N, Zomosa V, Limón D, Lefebvre T, Zenteno E, Guevara J. Effect of  $\beta$ -amyloid 25-35 peptide on the O-GlcNAcylation and phosphorylation tau protein in hyperglycemic rats. 24th Joint Glycobiology Meeting, Wittenberg, Germany, 24th-26th November 2013.
- Lozano L., Lara-Lemus R., Zenteno E., Alvarado-Vásquez N., 2014. The mitochondrial O-linked N-acetylglucosamine transferase (mOGT) in the diabetic patient could be the initial trigger to develop Alzheimer disease. *ExpGerontol.* 58:198-202.
- Lubas WA, Hanover JA. 2000. Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J Biol Chem.* 14;275(15):10983-8.
- Ma J, Hart GW. 2013. Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert Rev Proteomics.* 10:365-80.
- Macauley M.S., Whitworth G.E., Debowski A.W., Chin D., and Vocadlo DJ. 2005 O-GlcNAcase Uses Substrate-assisted Catalysis. *J Biol. Chem.* 280; 27, 25313–25322.
- Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L. 2001. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res.* 5:367-81.
- Madsen-Bouterse S.A., Xu Y., Petty H.R. and Romero R.(2008). Quantification of O-GlcNAc Protein Modification in Neutrophils by Flow Cytometry . *Cytometry Part A* 73A, 667\_672.
- Marsh SA, Dell'Italia LJ, Chatham JC. 2011. Activation of the hexosamine biosynthesis pathway and protein O-GlcNAcylation modulate hypertrophic and cell signaling pathways in cardiomyocytes from diabetic mice. *Amino Acids.* 40:819-28.

- Marsh SA, Powell PC, Dell'italia LJ, Chatham JC. 2013. Cardiac O-GlcNAcylation blunts autophagic signaling in the diabetic heart. *Life Sci* 92:648-56.
- Marsh, S. A. and Chatham, J. C. 2011. The paradoxical world of protein O-GlcNAcylation: a novel effector of cardiovascular dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 89:487–488.
- Matsuzaki T., Sasaki K., Tanizaki Y., Hata J., Fujimi K., Matsui Y., Sekita A., Suzuki S.O., Kanba S., Kiyohara Y., Iwaki T., 2010. Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: the Hisayama study. *Neurology* 75; 9: 764-70.
- Matthews D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Teacher D, Turner R. 1985. Homeostasis model assessment insulin resistance and cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia.* 28:412-9.
- Mattson MP. 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77:1081-132.
- Maurice, T., Lockhart, B.P., Privat, A., 1996. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain.* 706: 181–93.
- McClain D., Lubas W., Cooksey R., Hazel M, Parker G., Love D., Hanover J. 2002. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc Natl AcadSci U S A.* 6; 99:10695-9.
- McClain D., Crook E. 1996. Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes* 45; 8:1003-9.
- McClain DA. 2002. Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *J Diabetes Complications* 16:72-80.
- Mondragón-Rodríguez S., Perry G., Luna-Muñoz J., Acevedo-Aquino M., Williams S. 2014. Phosphorylation of tau protein at sites Ser (396-404) is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *NeuropatholAppNeurobiol.* 40; 2:121-35.
- Monte S. M. 2012. Therapeutic targets of brain insulin resistance in sporadic Alzheimer's disease. *Frontiers in Bioscience* E4, 1582-1605.
- Montiel T., Ricardo Quiroz-Baez R., Massieu L, Arias C., 2006. Role of oxidative stress on  $\beta$ -amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: Protection by antioxidants. *Exp Neurol.* 200: 496–508.
- Moreira PI, Santos MS, Seifça R, Oliveira CR. 2007. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. *J Neurol Sci.* 257:206-14.



- Nagy T., Champattanachai V., Marchase R.B. and Chatham J. (2005) Glucosamine inhibits angiotensin II-induced cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> elevation in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-linked N-acetylglucosamine. *American Journal of Physiological Cell Physiology*. 290, C57-C65.
- Neumann KF, Rojo L, Navarrete LP, Farías G, Reyes P, Maccioni RB. 2008. Insulin resistance and Alzheimer's disease: molecular links & clinical implications. *Curr Alzheimer Res*. 5:438-47.
- Ngoh GA, Watson LJ, Facundo HT, Jones SP. 2011. Augmented O-GlcNAc signalling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. *Amino Acids* 40:895-911.
- Ninomiya T., 2014. Diabetes mellitus and dementia. *CurrDiab Rep*. 14; 5:487-94.
- Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. 1990. Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J Pharmacobiodyn*. 13; 4:259-62.
- O-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting BMAL1/CLOCK ubiquitination. *Cell Metab*. 5; 17:303-10.
- Olivier-Van Stichelen S., Guinez C., Mir A-M., Perez-Cervera Y., Liu C., Michalski J-C., and Lefebvre T. (2012) The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of  $\beta$ -catenin and cell proliferation *Am. J. Physiol. Endo. Met.* 302, E417–E424.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. Hippocampal fissure. In: Paxinos, G., Watson, C. (Eds.), *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 30–46.
- Pérez JD, Udeshi ND, Shabanowitz J, Ciordia S, Juárez S, Scott CL, Olszewski NE, Hunt DF, García JA. 2013. O-GlcNAc modification of the coat protein of the potyvirus Plum pox virus enhances viral infection. *Virology*. S0042-6822(13)00193-1.
- Piaceri I, Nacmias B, Sorbi S. 2013. Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)*. 5:167-77.
- Pike, C.J., Walencewicz-Wasserman, A.J., Kosmoski, J., Cribbs, D.H., Glabe, C.G., Cotman, C.W., 1995. Structure–activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem*. 64:253–65.
- Prapong T., Buss J., Hsu W.H., Heine P., West G. H., Uemura E. 2002. Amyloid beta-peptide decreases neuronal glucose uptake despite causing increase in

GLUT3 mRNA transcription and GLUT3 translocation to the plasma membrane. *Exp Neurol.* 174; 2:253-8.

- Qu Z., Jiao Z., Sun X., Zhao Y., Ren J., Xu G. 2011. Effects of streptozotocin-induced diabetes on tau phosphorylation in the rat brain. *Brain Res.* 6; 1383:300-6.
- Querfurth HW, LaFerla FM. 2010. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 28:329-44.
- Ranuncolo SM, Ghosh S, Hanover JA, Hart GW, Lewis BA. 2012. Evidence of the involvement of O-GlcNAc-modified human RNA polymerase II CTD in transcription in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 6;287(28):23549-61.
- Reddy PH. 2009. Role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *CNS Spectr* 14(8 Suppl 7):8-13.
- Ren R, Zhang Y, Li B, Wu Y, Li B. 2011. Effect of  $\beta$ -amyloid (25-35) on mitochondrial function and expression of mitochondrial permeability transition pore proteins in rat hippocampal neurons. *J Cell Biochem.* 112:1450-7.
- Roberts R., Knopman D., Cha R., Mielke M., Pankratz V., Boeve B., Kantarci K., Geda Y., Jack C., Petersen R., Lowe V. 2014. Diabetes and elevated hemoglobin A1c levels are associated with brain hypometabolism but not amyloid accumulation. *J Nucl Med.* 55; 5:759-64.
- Robles-Flores M, Meléndez L, García W, Mendoza-Hernández G, Lam TT, Castañeda-Patlán C, González-Aguilar H. 2008. Posttranslational modifications on protein kinase c isozymes. Effects of epinephrine and phorbol esters. *Biochim Biophys Acta.* 1783(5):695-712.
- Rosales-Corral S, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, et al. 2012. Accumulation of exogenous amyloid-beta peptide in hippocampal mitochondria causes their dysfunction: a protective role for melatonin. *Oxid Med Cell Longev* 2012:843649.
- Ruan HB, Singh JP, Li MD, Wu J, Yang X. 2013. Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 24:301-9.
- Russell JW, Golovoy D, Vincent AM, et al. 2002. High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB J* 16:1738-48.
- Schimpl, M., Borodkin, V.S., Gray, L.J., Van Aalten, D.M.F. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structured=2YDQ>
- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 87: 4-14.

- Shen GX. 2012. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 12:106-12.
- Shin SH, Love DC, Hanover JA. 2011. Elevated O-GlcNAc-dependent signaling through inducible mOGT expression selectively triggers apoptosis. *Amino Acids* 40:885-93.
- Singh A, Donnino R, Weintraub H, Schwartzbard A. 2013. Effect of strict glycemic control in patients with diabetes mellitus on frequency of macrovascular events. *Am J Cardiol* 112:1033-8.
- Skovronsky DM, Lee VM, Trojanowski JQ. 2006. Neurodegenerative diseases: New concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol* 1:151–170.
- Slawson C, Housley MP, Hart GW. 2006. O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks. *J Cell Biochem.* 1;97(1):71-83.
- Springhorn C, Matsha TE, Erasmus RT, Essop MF. 2012. Exploring leukocyte OGlcNAcylation as a novel diagnostic tool for the earlier detection of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 97:4640-9.
- Spuch C, Ortolano S, Navarro C. 2012. New insights in the amyloid-Beta interaction with mitochondria. *J Aging Res* 2012:324968.
- Strachan MW, Deary IJ, Ewing FM, Frier BM. 1997. Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. *Diabetes Care.* 20:438-45.
- Suárez-Calvet M, Belbin O, Pera M, Badiola N, Magrané J, Guardia-Laguarta C, Muñoz L, Colom-Cadena M, Clarimón J, Lleó A. 2014. Autosomal-dominant Alzheimer's disease mutations at the same codon of amyloid precursor protein differentially alter A $\beta$  production. *J Neurochem.* 128:330-9.
- Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Yu H, Moriguchi A, Rakugi H, Morishita R. 2012. Oral glucose loading modulates plasma  $\beta$ -amyloid level in alzheimer's disease patients: potential diagnostic method for Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 34:25-30.
- Tan, E.P., Villar MT, E.L., Lu, J., Selfridge, J.E., Artigues, A., Swerdlow, R.H., Slawson, C., 2014. Altering O-linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine cycling disrupts mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* 289, 14719–14730.

- Tomlinson, D.R., Gardiner, N.J., 2008. Glucose neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 9; 1:36–45.
- Trapannone R, Mariappa D, Ferenbach AT, van Aalten DM. 2016. Nucleocytoplasmic human O-GlcNAc transferase is sufficient for O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins. *Biochem J.* 15;473(12):1693-702.
- Valente T., Gella A., Fernández-Busquets X., Unzeta M., Durany N. 2010. Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neurobiol Dis.* 37; 1: 67-76.
- Verdile G., Fuller S.J., Martins R.N., 2015. The role of type 2 diabetes in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 15:S961-69.
- Verdile G, Gandy SE, Martins RN. 2007. The role of presenilin and its interacting proteins in the biogenesis of Alzheimer's beta amyloid. *Neurochem Res.* 32;4-5:609-23.
- Viola KL, Velasco PT, Klein WL. 2008. Why Alzheimer's is a disease of memory: the attack on synapses by A beta oligomers (ADDLs). *J Nutr Health Aging* 12:51S-7S.
- Wagner B. Dias and Gerald W. Hart. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol. BioSyst.*, 3, 766–772.
- Wahlster L, Arimon M, Nasser-Ghods N, Post KL, Serrano-Pozo A, Uemura K, Berezovska O. 2013. Presenilin-1 adopts pathogenic conformation in normal aging and in sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 125:187-99.
- Wang JZ, Liu F. 2008. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol.* 85;2:148-75
- Wang X, Song X, Takata T, Miichi Y, Yokono K, Sakurai T. 2010. Amyloid- $\beta$  neurotoxicity restricts glucose window for neuronal survival in rat hippocampal slice cultures. *Exp Gerontol.* 45:904-8.
- Wang Z. Gleichmann H. 1998. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes.* 47; 1: 50-6.
- Wang J.Z., Liu F., 2008. Microtubule-Associated Protein tau In Development, Degeneration And Protection Of Neurons. *Prog. Neurobiol.* 85:148–75.
- Wirz KT, Keitel S, Swaab DF, Verhaagen J, Bossers K. 2014. Early molecular changes in Alzheimer disease: can we catch the disease in its presymptomatic phase? *J Alzheimers Dis.* 38:719-40.

- World Health Organization, 2013.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en> International Diabetes.
- Xing G., Dong M., Li X., Zou Y., Fan L., Wang X., Cai D., Li C., Zhou L., Liu J., Niu Y., 2011. Neuroprotective effects of puerarin against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells via a PI3K-dependent signaling pathway. *Brain Res Bull* 85; 3-4:212-8.
- Yang YR, Suh PG. 2013. O-GlcNAcylation in cellular functions and human diseases. *Adv Biol Regul.* S2212-4926:13;00071-7.
- Yuzwa SA, Shan X, Macauley MS, Clark T, Skorobogatko Y, Vosseller K, Vocadlo DJ. 2012. Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes *tau* against aggregation. *Nat Chem Biol.* 2012 Feb 26;8(4):393-9.
- Zachara NE, Hart GW. 2006. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim Biophys Acta* 1761(5-6):599-617.
- Zhao W-Q., Townsend M., 2009. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *BiochimBiophysActa.* 1792:482–96.
- Zhu Y., Shan X., Yuzwa S., Vocadlo D. 2014. The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 12; 289:34472-81.

## **A**nexo A Publicaciones

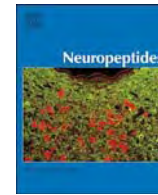
### ***A.I.- ARTICULO REQUISITO.***

Effect of Amyloid  $\beta$ -(25-35) in hyperglycemic and hyperinsulinemic rats, on phosphorylation and O-GlcNAcylation of tau protein.









## Effect of amyloid-B (25–35) in hyperglycemic and hyperinsulinemic rats, effects on phosphorylation and O-GlcNAcylation of tau protein

Liliana Lozano<sup>a,d</sup>, Jorge Guevara<sup>a</sup>, Tony Lefebvre<sup>b</sup>, Ivan Ramos-Martinez<sup>a</sup>, Daniel Limón<sup>c</sup>, Alfonso Díaz<sup>f</sup>, Eduarda Cerón<sup>c</sup>, Edgar Zenteno<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04510 Coyoacán, CDMX, Mexico

<sup>b</sup> Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F 59000 Lille, France

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, "Ismael Cosío Villegas", Department of Biochemistry, Calz. de Tlalpan 4502, C.P. 14080 CDMX, Mexico

<sup>d</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04510 Coyoacán, CDMX, Mexico

<sup>e</sup> Laboratorio de Neurofarmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

<sup>f</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Amyloid-Beta  
O-GlcNAcylation  
Tau protein  
GSK3beta  
Hyperglycemia  
Hyperinsulinemia

### ABSTRACT

Aggregation of the amyloid beta ( $A\beta$ ) peptide and hyperphosphorylation of tau protein, which are markers of Alzheimer's disease (AD), have been reported also in diabetes mellitus (DM). One regulator of tau phosphorylation is O-GlcNAcylation, whereas for hyperphosphorylation it could be GSK3beta, which is activated in hyperglycemic conditions. With this in mind, both O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau protein were evaluated in the brain of rats with streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemia and hyperinsulinemia and treated with the A $\beta$ 25–35 peptide in the hippocampal region CA1. Weight, glycated hemoglobin, glucose, and insulin were determined. Male Wistar rats were divided in groups (N = 20): a) control, b) treated only with the A $\beta$ 25–35 peptide, c) treated with A $\beta$ 25–35 and STZ, and d) treated only with STZ. Results showed statistically significant differences in the mean weight, glucose levels, insulin concentration, and HbA1c percentage, between C- and D-treated groups and not STZ-treated A and B (P < 0.05). Interestingly, our results showed diminution of O-GlcNAcylation and increase in P-tau-Ser-396 in the hippocampal area of the A $\beta$ 25–35- and STZ-treated groups; moreover, enhanced expression of GSK3beta was observed in this last group. Our results suggest that hyperinsulinemia-A $\beta$ 25–35-hyperglycemia is relevant for the down regulation of O-GlcNAcylation and up-regulation of the glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3beta), favoring A $\beta$ 25–35-induced neurotoxicity in the brain of rats.

### 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is an important public health problem. According to the World Health Organization (WHO), 346 million people exist worldwide with DM (ADA, 2014; WHO, 2013). DM is divided into type 1 (DM1), characterized by a complete lack of insulin, and type 2 (DM2), which includes both a decreased insulin secretion and insulin resistance (ADA, 2014; Kerner and Brückel, 2014). DM2 is a relevant risk factor for the development of dementia or neurodegenerative processes (Ninomiya, 2014; Verdile et al., 2015). It is considered that DM2 increases two-fold the risk of dementia, and that one in 10 cases of dementia is associated with DM2 worldwide (Biessels et al., 2014). Hyperglycemia is considered per se an important risk factor for cognitive dysfunction, dementia, and development of Alzheimer's disease (Tomlinson and Gardiner, 2008; Valente et al., 2010).

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder and a frequent cause of dementia in the elderly (Maccioni et al., 2001; Kelley and Petersen, 2007). Recent findings support the association between DM2 and the origin of AD. However, how diabetes favors the development of AD is still unclear. Some studies have focused on the role of insulin and insulin resistance as possible links between diabetes and AD (Cai et al., 2015).

Alzheimer's disease has two important markers: intracellular neurofibrillary tangles, formed by hyperphosphorylated tau protein (Wang and Liu, 2008), and accumulation of extracellular amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) plaques (Avila et al., 2004). Although the pathophysiology of AD is only partially known, one of the established hypotheses implicates the amyloid pathway (Hardy and Selkoe, 2002). The amyloid protein precursor is synthesized principally in neurons and is processed into A $\beta$ (1–40) and A $\beta$ (1–42) (Hardy and Selkoe, 2002). The A $\beta$ 25–35

\* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Coyoacán 04510, CDMX, Mexico.  
E-mail address: [ezenteno@unam.mx](mailto:ezenteno@unam.mx) (E. Zenteno).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2017.04.001>



peptide has been associated with damage to nerve cells in the hippocampal field CA1 (Cuevas et al., 2009; Xing et al., 2011) and seems to impair glucose uptake by hippocampal neurons (Prapong et al., 2002; Montiel et al., 2006).

A $\beta$  is produced by an alternative splice of the amyloid precursor protein by  $\beta$ -secretase and  $\gamma$ -secretase. A $\beta$ 1–42 shows greater hydrophobicity and tends to oligomerize and accumulate outside the neurons (Walsh et al., 2000). A $\beta$  induces lipid peroxidation; two reactive products of lipid peroxidation are the alkenales, 4-hydroxynonenal (HNE) and 2-propenal (acrolein), which cause stress and neurodegeneration (Butterfield and Kanski, 2002).

Glycosylation and phosphorylation of proteins are important to aggregation, as are pathologic genetic mutations. The cell structures most closely associated with aggregate components are the cytoskeleton, cytoplasm, axons, and dendrites, with involvement of microtubules, neurofilaments, and actin-binding proteins (Ayyadevara et al., 2016).

O-GlcNAcylation is the addition of O-GlcNAc to Ser/Thr residues; this has been identified using the GlcNAc-specific lectin, wheat germ agglutinin (WGA, Lefebvre et al., 2001), and using specific antibodies against O-GlcNAc-Ser/Thr residues or against O-GlcNAc-transferase (OGT). O-GlcNAcylation seems to regulate phosphorylation of the tau protein, maintaining structure and cellular functionality (Li et al., 2015; Gong et al., 2006). O-GlcNAcylation has been associated with insulin resistance and glucose toxicity (Lozano et al., 2014). Streptozotocin (STZ) is used commonly to induce pancreatic damage and reproduce a state like that of diabetes mellitus.

Recent evidences suggest that variations in insulin concentration or insulin resistance are risk factors for the evolution to AD (Zhao and Townsend, 2009). Phosphorylation of tau protein, could be accomplished by glycogen synthase kinase-3-beta (GSK3beta), which recognizes 27 of the approximately 45 identified phosphorylation sites in the tau protein (Hanger and Noble, 2011). The tau, Thr231, Ser396, and Ser422 phosphorylation sites are considered critical for tau's ability to bind and stabilize microtubules (Li and Paudel, 2006; Wang and Liu, 2008).

GSK3beta regulates the action of insulin in obese and DM2 patients (Henriksen, 2010); deregulation in the activity of GSK3beta has been implicated in the development of both AD and DM2, although the specific mechanisms that participate in AD pathophysiology have not been elucidated (Dandona et al., 2011). This work is aimed at identifying the potential role of GSK3beta in hippocampal brain areas of hyperglycemic and hyperinsulinemic rats that received the A $\beta$ 25–35 peptide, to understand better the mechanisms of diabetes that favor AD development.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

The institutional Ethics Committee for the Use of Animals for Experimentation from the Universidad Nacional Autónoma de México approved all experiments, based on the “Norma Mexicana 062”, according to “the Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research” from the Society for Neuroscience. Male Wistar rats (200–250 g) were provided by the animal facilities of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias and used throughout the study. Groups of five rats were housed in acrylic boxes, and maintained at standard conditions (23  $\pm$  2 °C, relative humidity at 55  $\pm$  5%, and 12-h light–dark cycles). Food and water were available ad libitum. Fig. 1.

### 2.2. Reagents

Amyloid-beta 25–35 (-GSNKGAIIGLM-) peptide, N-(methylnitroso-

carbamoyl)- $\alpha$ -D-glucosamine (streptozotocin, STZ), bovine serum albu-

min (BSA), and paraformaldehyde were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Complete protease inhibitors were from Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Germany). The protein was quantified using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Wheat germ agglutinin (WGA) FITC-conjugated was obtained from Vector Lab (Burlingame, CA, USA), and used at a 1:1000 dilution. The IgG rabbit polyclonal antibodies to P-tau-Ser-396 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), and used at a 1:100 dilution for immunohistochemistry and at 1:1000 for western blot. Antibodies against GSK3beta and O-glycosyltransferase (OGT) were obtained from Santa Cruz Biotechnology, and used at a 1:100 dilution for immunohistochemistry and at 1:1000 for western blot. The antibodies against O-GlcNAc (RL2) and GAPDH were from Santa Cruz Biotechnology, and used at a 1:1000 dilution for western blot. VectaShield plus DAPI was purchased from Vector Lab. Secondary-antibodies coupled to FITC IgG (anti-rabbit and anti-mouse) or Rhodamine IgG (anti-rabbit and anti-mouse) were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Glycated hemoglobin (HbA1c) was evaluated using cationic ion exchange columns from Helena Laboratories (Beaumont, TX, USA). Glucose concentration in plasma was evaluated using the glucose oxidase method (Yellow Springs Instruments, OH, USA). Insulin levels were determined using rat insulin ELISA kit obtained from Crystal Chem Inc. (Chicago, IL, USA).

### 2.3. Injection of amyloid-beta 25–35 peptide (Aβ25–35)

The Aβ25–35 peptide (100 μM) was dissolved in sterile water (Pike et al., 1995), and incubated at 37 °C for 24 h to favor its aggregation, before injecting into animals (Maurice et al., 1996; Delobette et al., 1997). Peptide aggregation was confirmed by light-scatter tests using Malvern Z-sizer, Grovewood Road on the peptide, which indicate 10,000,000 Da for aggregated βA peptide based on the size calculated by the equipment Fig. 2. Rats were anesthetized with pentobarbital

(60 mg/kg) and placed into a stereotaxic frame (Stoelting Co. Wood Dale, IL, USA). The stereotaxic coordinates for a bilateral injection in CA1 were: –4 mm posterior to bregma, ± 3 mm lateral to bregma, and –2 mm ventral to the dura mater, these coordinates were standardized according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (1997). Injections of Aβ25–35 or 1 μL distilled water were infused for 5 min with a Hamilton syringe. After surgery, the animals were returned to their cages and monitored constantly during recovery.

### 2.4. Injection of streptozotocin (STZ)

One week after surgical procedure, 25 μL of STZ (40 mg/kg), single dose, dissolved previously in citrate buffer (0.05 M sodium citrate, pH = 4.5), was injected intramuscularly. The levels of glucose were evaluated after three days. The effect of STZ was confirmed when a level ≥ 200 mg/dL of glucose was determined (Alvarado-Vásquez et al., 2003).

### 2.5. Experimental groups

Four experimental groups (n = 20) were designed for this study: 1) Control, treated only with the vehicle (water), 2) Aβ25–35 alone, 3) Aβ25–35 + STZ, and 4) STZ alone.

### 2.6. Percentage of glycated hemoglobin, and insulin and glucose levels in plasma

Weight, percentage of glycated hemoglobin (HbA1c), glucose concentration, and plasma insulin levels were determined before applying STZ to animals, four weeks after STZ administration, and before animals were euthanized, by cervical dislocation. Blood samples of each animal were obtained by cardiac puncture, and collected in Vacutainer® EDTA tubes.

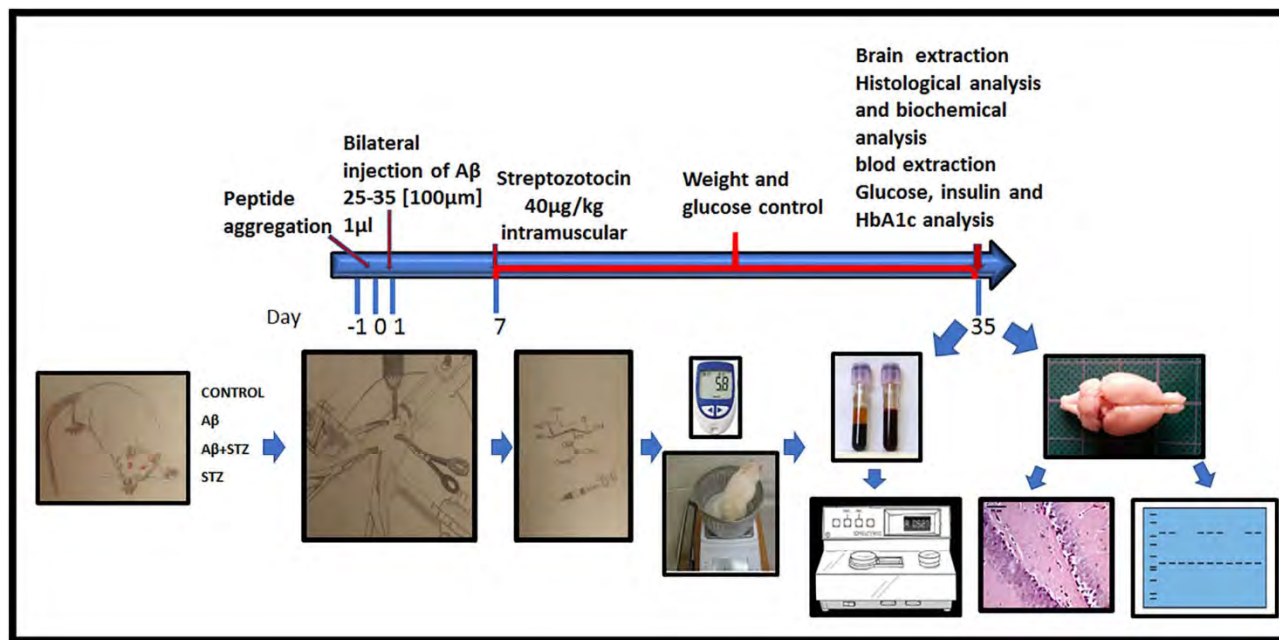


Fig. 1. Methodology, experimental design, stereotaxic surgery, streptozotocin administration, weight and glucose recordings, collection of tissues, processing of tissues.

## 2.7. Immunofluorescence staining

The brain's right hemisphere was frozen rapidly in liquid nitrogen and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The left hemisphere was fixed in a 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin; later,  $7\text{-}\mu\text{m}$  sections were made with a microtome and placed on slides. Paraffin was removed and sections were rehydrated using conventional histological techniques. Then, they were rinsed with PBS (pH 7.4), and blocked by incubating in 2% IgG-free bovine serum albumin (BSA) in PBS (BSA-PBS) for 30 min. Then, slides were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with antibody to P-tau-Ser-396, antibody OGT (F12), antibody GSK3beta, or with the lectin WGA-FITC. After three washes with BSA-PBS, anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies, conjugated to FITC or rhodamine, were incubated with the samples. Slides were counterstained with VectaShield and DAPI for nuclei visualization. Image acquisition and processing were made with a Leica (Leica Microsystems Wetzlar, Germany) microscope fitted with a Leica DC

300F digital-imaging system, using Leica Image Manager 1000 acquisition software. A semi-quantitative analysis of the immunofluorescence was made using software that identifies the changes in the fluorescence of the area analyzed, and identifies and discriminates between the different colors (red, green, and blue) (™ C. Kristopher Lugowski Rivero, Mexico).

## 2.8. Hematoxylin-eosin staining

After cervical dislocation, the brains were immersed overnight in 4% paraformaldehyde, and then embedded in paraffin. Paraffin blocks were obtained from the lesion center and serially cut into  $5\text{-}\mu\text{m}$  thick slices. The brains were processed for routine paraffin embedding. Serial coronal sections ( $5\ \mu\text{L}$ ) of the hippocampal CA and dentate gyrus region and forebrain were cut and mounted on silane-coated slides, deparaffinized with xylene, rehydrated through graded ethanol, and stained with hematoxylin-eosin. Finally, brain cell morphology was observed

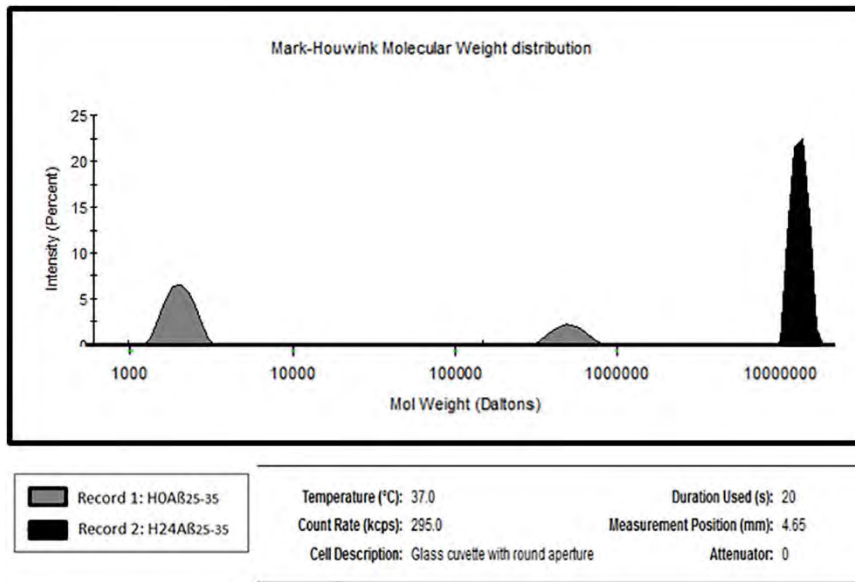


Fig. 2. Image of Aβ 25–35 modifications at 24 h after incubation, assessed by dynamic light scattering.

under light microscopy. Image acquisition and processing were made with a Leica (Leica Microsystems Wetzlar, Germany) microscope fitted with a Leica DC 300F digital-imaging system, using Leica Image Manager 1000 acquisition software.

### 2.9. Western blot analysis

A portion of the hippocampus was dissected from the frozen right hemisphere tissue. Each hippocampal portion was lysed in 500  $\mu$ L of ice-cold lysis buffer containing PBS, pH = 7.4, 1% Triton X-100, and protease inhibitors. After centrifuging the lysate at 12,000 rpm for 10 min, the protein was determined with the Pierce™ BCA Protein Assay Kit, and 15  $\mu$ g of proteins was electrophoresed in a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Then, electrophoresed proteins were transferred to a blotting nitrocellulose membrane (0.45  $\mu$ m, GE Healthcare). Efficiency of the transfer was verified using Ponceau red staining. Membranes were first saturated for 45 min with 5% skim milk in Tris-buffered saline-Tween (TBST), 15 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, and 0.05% Tween 20, containing 5% non-fatty acid milk, and probed overnight at 4 °C with anti-O-GlcNAc (RL2), anti-OGT (H300), anti-P-tau-Ser-396, anti-GSK3beta, and anti-GAPDH. Then, they were washed three times with TBST for 10 min, and incubated with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase-labeled at a dilution of 1:10,000 for 1 h. Finally, three 10-min washes were performed with TBST, and detection by chemiluminescence was carried out. Densitometric analysis of western blot membranes was made with In-Cell Western™ analysis using LI-COR Image Studio software.

### 2.10. Statistical analysis

Determinations of glucose, percentage of glycated hemoglobin, and weight are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). ANOVA analysis and Tukey test were used to compare among groups. Insulin concentration is shown as mean  $\pm$  SD. Student's t-test was used to compare among groups. The statistical analysis was performed using software package SPSS v.15.

## 3. Results

### 3.1. Determination of glucose

Our results showed levels of  $93 \pm 12$  mg/dL of glucose in plasma for the control group; the A $\beta$  group had an average of  $101.6 \pm 14$  mg/dL; the A $\beta$  + STZ group had  $522.6 \pm 38$  mg/dL; and the STZ group had  $495.4 \pm 145$  mg/dL of glucose in plasma, (Fig. 3A). The comparison of glucose levels between the control group and the A $\beta$  group did not show statistical differences ( $P > 0.05$ ). The statistical analysis did not reveal differences between the STZ group and the A $\beta$  + STZ group ( $P > 0.05$ ); however, the comparison of control and A $\beta$  groups vs. A $\beta$  + STZ and STZ groups was statistically significant (\* $P < 0.001$ ).

### 3.2. Determination of weight

The control group weighed in average  $397.9 \pm 42$  g; the A $\beta$  group weighed an average of  $379.6 \pm 27$  g; for the A $\beta$  + STZ and the STZ treated groups a significant diminution of weight to  $281.9 \pm 37$  g and  $288.1 \pm 33$  g, respectively, was identified (Fig. 3B). The statistical analysis revealed significant differences in the weight of control and A $\beta$  groups vs. A $\beta$  + STZ and STZ groups (\* $P < 0.05$ ).

### 3.3. Percentage of glycated hemoglobin

The percentage of HbA1c is considered an indicator of glucose levels in patients with diabetes mellitus (Springhorn et al., 2012). Our results showed that the percentage of HbA1c was of  $4.6 \pm 3\%$  and

$4.1 \pm 1.8\%$  for the control and the A $\beta$  group, respectively; whereas,

the A $\beta$  + STZ group showed increased percentage of  $8.3 \pm 3.9\%$  and of  $10.3 \pm 2.5\%$  for the STZ treated group (Fig. 3, Graph C). After comparing the percentage of glycosylated hemoglobin in the different groups, the statistical analyses found significant differences in control and A $\beta$  groups vs. A $\beta$  + STZ and STZ groups (\*P < 0.05).

#### 3.4. Plasma insulin concentration

As indicated in Fig. 3D, the insulin levels in the different experimental groups were: for the control group,  $6 \pm 3.2$  ng/ $\mu$ L and  $6.2 \pm 3.1$  ng/ $\mu$ L for the A $\beta$ -treated group; the A $\beta$  + STZ group showed increased concentration of insulin up to  $9.2 \pm 5.1$  ng/ $\mu$ L, as well as in the STZ-treated group with  $15.2 \pm 6.2$  ng/ $\mu$ L. The statistical analysis showed significant differences between the control and the STZ-treated groups (\*P < 0.05).

#### 3.5. Changes in O-GlcNAc and P-tau-Ser-396 in hippocampal tissue

The cell nucleus was identified in pyramidal neurons and granular cells of the dentate gyrus with DAPI (blue), and O-GlcNAc in the hippocampal tissue was evaluated with WGA-FITC (green color). As shown in Fig. 4A, the control group showed WGA-labeling in the perinuclear cytoplasm of pyramidal neurons, granular cells, and in the mossy fibers area (internal triangular section of the dentate gyrus). The A $\beta$  group showed a diminution of WGA-FITC stained areas, which were mainly identified in the cytoplasm of pyramidal neurons and granular cells, as well as in mossy fibers area. The STZ group also showed diminished WGA-FITC recognition, and staining was mainly identified in the cytoplasm of pyramidal neurons and granular cells; whereas in the A $\beta$  + STZ-treated group, WGA-staining was practically abolished. The presence of P-tau-Ser-396 was evaluated using a specific antibody, which was recognized later using a secondary antibody conjugated to rhodamine (red color). The control showed minimal expression of P-

tau-Ser-396 in the hippocampal region. A $\beta$  and STZ-treated groups showed increased labeling of anti-P-tau-Ser-396, which was mainly observed in the cytoplasm of pyramidal neurons and granular cells, as well as in mossy fibers area. The A $\beta$  + STZ group showed significantly increased labeling of anti-P-tau-Ser-396 in these areas. The merged colors of the control group indicate an extended presence of WGA in the cytoplasmic area. Group A $\beta$  presents a predominance of phosphorylation on the periphery of some cells and takes an orange tone, indicating colocalization of WGA and the antibody to P-tau-Ser-396 in some of these sites. STZ and A $\beta$  groups present P-tau-Ser-396 in mossy fibers and, finally, group A $\beta$  + STZ shows a predominance of P-tau-Ser-396 in all areas, with a significant reduction in the labeling of WGA, which is only discretely seen in the periphery of some nuclei and indicating colocalization only in some fibers.

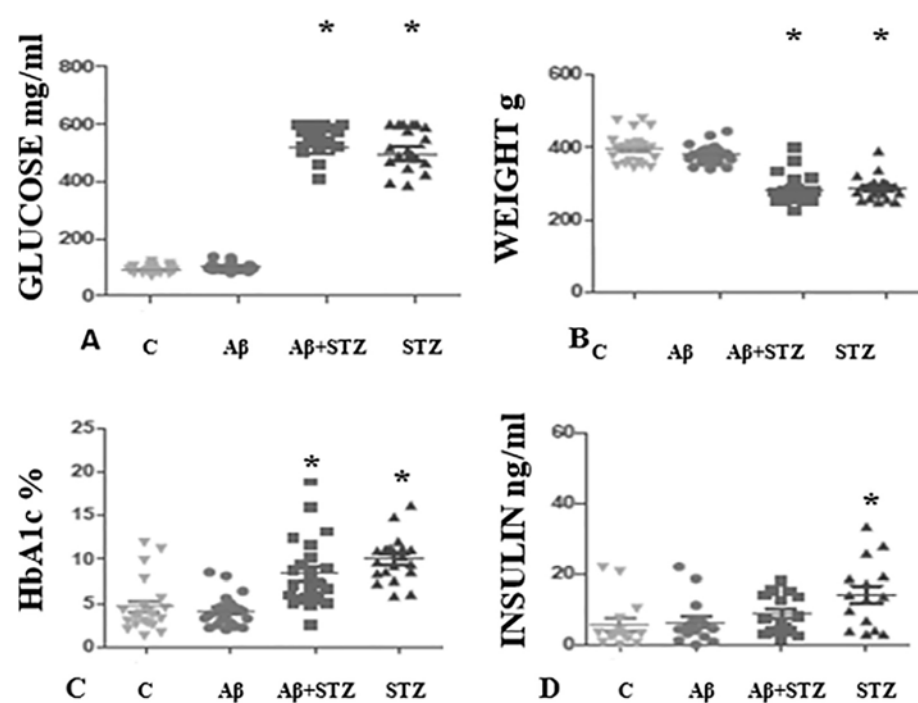
As shown in Fig. 4B, fluorescence of the control group was 100%.

Fluorescence showed a 70% reduction for group A $\beta$ , whereas the diminution was of 95% and 75% in A $\beta$  + STZ and STZ group, respectively. All these changes were statistically significant as compared to the control group (P < 0.001). Increases in P-tau-Ser-396 of 152% in A $\beta$ 25–35, 244% in A $\beta$  + STZ, and 156.9% in STZ were observed, as compared to the values of the control group, Fig. 4B (P < 0.001). Cell nucleus fluorescence showed some variations; however, these values were not significant (P > 0.05).

#### 3.6. Changes in OGT and GSK3beta expressions in hippocampal tissue

Presence of the cell nucleus was determined with DAPI stain (blue color) in pyramidal neurons and some granular cells of the dentate gyrus; A $\beta$ -, STZ-, and A $\beta$  + STZ-treated groups showed smaller nuclei, with fragmented appearance, predominantly in the group of A $\beta$  + STZ-treated rats. (Fig. 5A). GSK3beta in the hippocampal tissue was evaluated using FITC (green color). The control group showed minimal presence in pyramidal neurons. A $\beta$  and STZ groups revealed a small





**\*P.005.**

Fig. 3. Determination of glucose, weight, insulin concentration, and glycated hemoglobin (HbA1c in %) in rat serum after four weeks of study. The statistical analysis showed significant differences (A) in the concentration of glucose (\* $P < 0.0001$ ). (B) The weight in the four groups (\* $P < 0.05$ ). (C) Percentage of HbA1c among groups (\* $P < 0.05$ ). (D) Levels of insulin among groups (\* $P < 0.05$ ).

presence in the perinuclear cytoplasm of pyramidal neurons and mossy fibers area, whereas in the  $A\beta + STZ$  group, GSK3beta was expressed mainly in mossy fibers, granular cells, and the cytoplasm of pyramidal neurons. The presence of OGT was evaluated using a specific antibody, which was recognized later using a secondary antibody conjugated to rhodamine (red color). In the control group, OGT was expressed in the perinuclear cytoplasm of granular cells, and dendrites area of pyramidal neurons. Besides,  $A\beta$ - and STZ-treated groups showed a diminished expression in the perinuclear cytoplasm of pyramidal neurons and in the mossy fibers area, the same occurred in the  $A\beta + STZ$  group with a reduced presence in cytoplasmic areas and mossy fibers. In control, STZ, and  $A\beta$  groups, prevalence of OGT activity is given in red; small cytoplasmic presence of GSK3beta was found in mossy fiber areas but it is practically absent in the control group, whereas in the group of rats treated with  $A\beta + STZ$ , the GSK3beta is overexpressed, with a discreet presence of OGT, as minimum stippling, in areas of the cytoplasm. As indicated in Fig. 5B, our results showed diminished OGT expression in the  $A\beta$  group with 54%,  $A\beta + STZ$  group with 90%, and STZ group with 57% ( $P < 0.001$ ). Significant changes were observed also in GSK3beta expression; in group  $A\beta$ , a 10% increase, and in STZ group a 36% increase were observed. Whereas in group  $A\beta + STZ$ , the increase was of 234% ( $P < 0.01$ , control vs.  $A\beta$  and STZ groups; and  $P < 0.001$ , control vs.  $A\beta + STZ$  group). The fluorescence values of the cell nucleus did not show significant changes.

### 3.7. Hippocampal structures with hematoxylin and eosin staining

Hematoxylin and eosin staining identified the dentate gyrus under a  $40\times$  magnification and allowed determining the changes in structure and morphology undergone by the dentate gyrus (Fig. 6). In the STZ-treated group, pyramidal neurons were lost, neuronal size decreased, with nuclei being displaced towards the edges; likewise, alterations of the architecture of the dentate gyrus can be seen. In the  $A\beta + STZ$  group, we found a significant loss of neuronal structure, as well as

diminution of its size with significant loss of neuronal bodies, pinocy-

toxicity, spongiform areas, nuclei at the periphery, and a marked loss of architecture of the hippocampus and dentate gyrus, with marked rupture of the axonal fibers with loss of the organization and condensation of the neuronal bodies. The presence of the different groups of eosinophil cells suggests cell death.

### 3.8. Western blot of O-GlcNAc in total brain proteins

To confirm the results obtained by immunofluorescence, analysis of total brain proteins using western blot was made. The O-GlcNAc expression was determined with the RL2-antibody. Our results showed diminution of O-GlcNAcylated proteins in the experimental groups (Fig. 7A). In the densitometric analysis (Fig. 7B), the values obtained from the control group represent 100%. After comparing with the control group, A $\beta$ -alone and STZ-alone groups showed diminutions of 28% and 41% of O-GlcNAc density bands, respectively; whereas, the A $\beta$  + STZ group showed a 64% diminution in the density recognition of O-GlcNAc. The statistical analysis showed significant differences

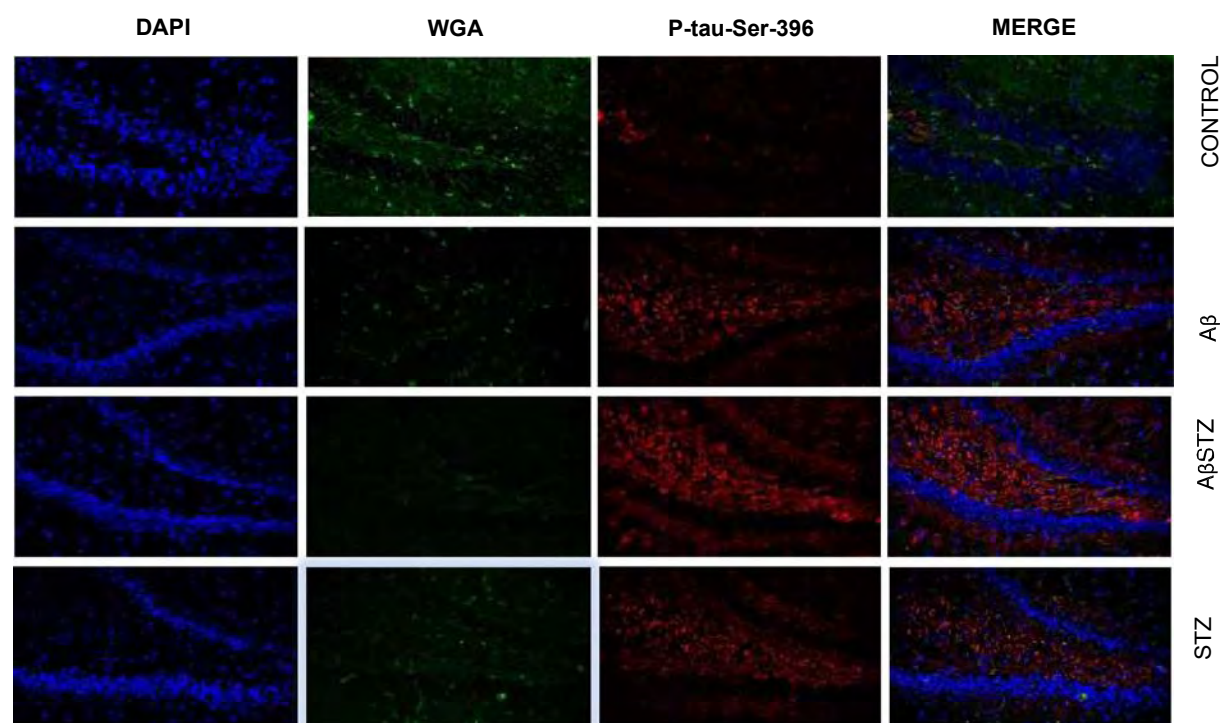
among groups; \*P < 0.01, control vs. A $\beta$  and STZ groups; \*\*P < 0.001, control vs. A $\beta$  + STZ group.

### 3.9. Western blot of O-GlcNAc transferase (OGT) in total brain proteins

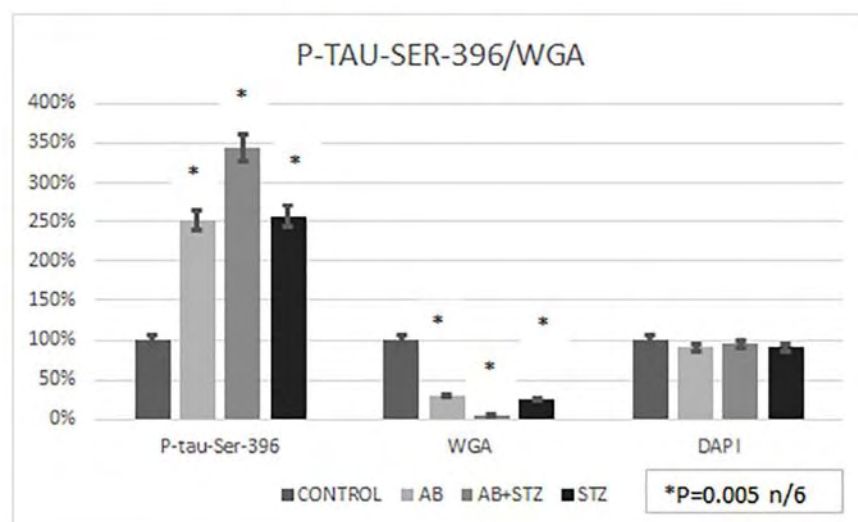
The of proteins involved in O-GlcNAcylation in the brain was evaluate by western blot. Diminished expression of the 116 kDa OGT was identified (Fig. 7A); diminutions were of 11% in the A $\beta$ , 15% in STZ, and 36% in A $\beta$  + STZ groups was observed (Fig. 7C). These differences were statistically significant (\*P < 0.01, control vs. A $\beta$  and STZ groups; \*\*P < 0.001, control vs. A $\beta$  + STZ).

### 3.10. Western blot to determine P-tau-Ser-396 in total brain proteins

The expression of anti-P-tau-Ser-396 of 70 kDa (Fig. 7A). Increase expression of 36% in A $\beta$ -treated rats, 55% in STZ, and 69% in A $\beta$  + STZ-treated groups of rats. The differences observed were



A.



B.

Fig. 4. The presence of O-GlcNAc in the hippocampal tissue determined by immunofluorescence (A) and western blot (B). O-GlcNAc was identified using WGA-FITC (green color); P-tau-Ser-396 was determined using a specific antibody conjugated to rhodamine (red color), and the cell nucleus was evaluated with the DAPI stain (blue color) (2.A). The graph shows the percentages of fluorescence as determined with the fluorescence software (2.B).

statistically significant after comparing the control vs. STZ and Aβ + STZ groups (\*P < 0.05) (Fig. 7D).

7E. The Aβ group showed an increase of 9% in the levels of GSK3beta that was not significant. In comparison, the STZ group showed a 28% increase, the Aβ + STZ group increased 55% the

### 3.11. Western blot of GSK3beta in total brain proteins

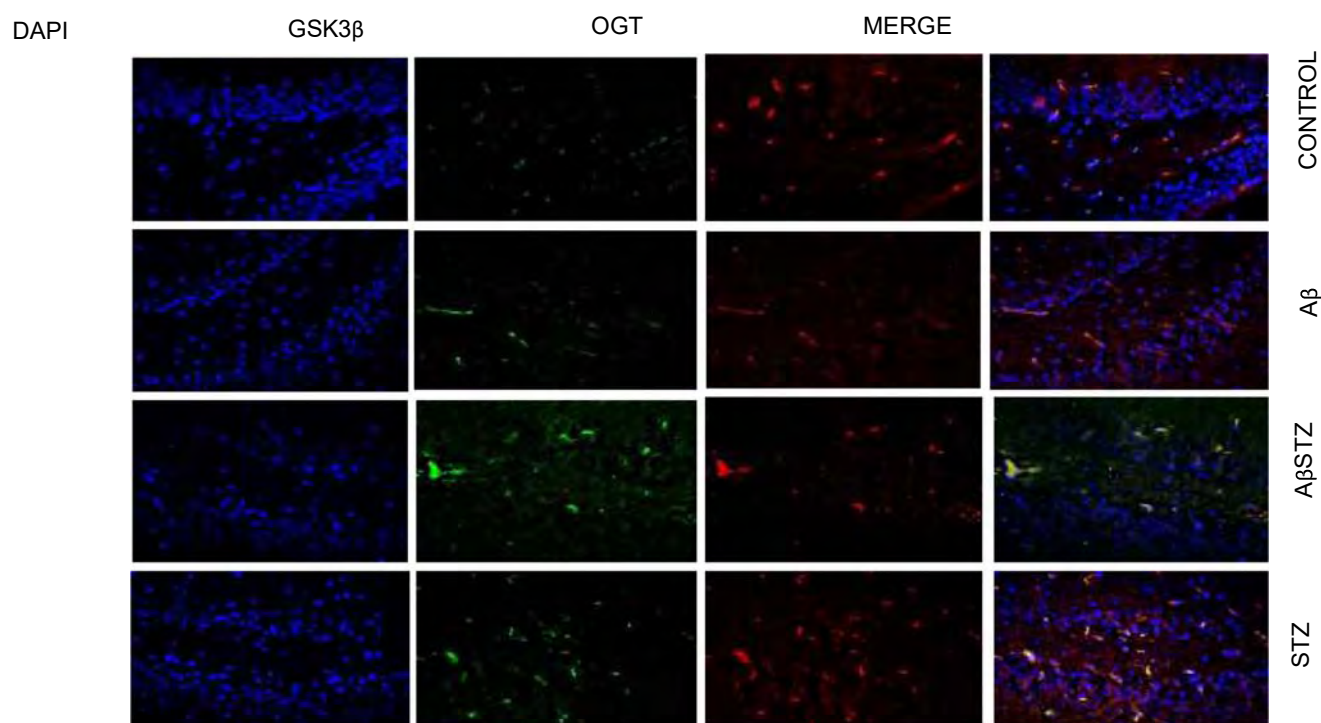
GSK3beta is a key enzyme linked to the phosphorylation of the tau protein. Western blot analysis showed a band of 47 kDa, which increases its expression in all the experimental groups, as compared to the control group (Fig. 7A). The densitometry analysis is visualized in Fig.

expression of this enzyme. These differences were significant when comparing control vs. STZ and A $\beta$  + STZ groups (\*P < 0.05).

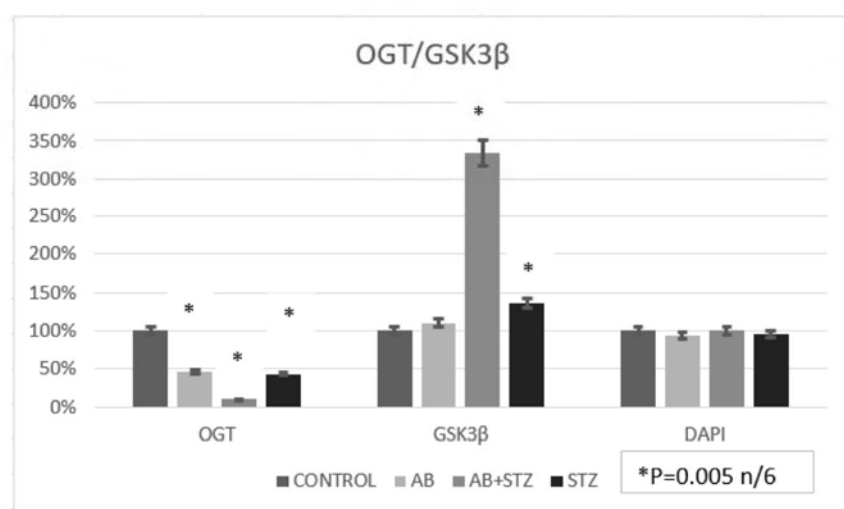
#### 4. Discussion

In this study, we investigated the effect of the A $\beta$ 25–35 peptide on

phosphorylation and O-GlcNAcylation patterns in the hippocampal tissue from hyperglycemic and hyperinsulinemic rats. Although previous studies have stated hyperglycemia and the presence of the A $\beta$ 25–35 peptide as risk factors to develop AD (Valente et al., 2010; Bosco et al., 2011; Cai et al., 2015), their association with hyperinsulinemia is still poorly understood. In this work, the A $\beta$ 25–35 peptide



A.



B.

Fig. 5. The expressions of OGT and GSK3beta were assessed in hippocampal tissues using a specific antibody coupled to FITC (green color), and with a specific antibody coupled to rhodamine (red color), respectively. The cell nucleus was evaluated with DAPI stain (blue color) (3.A). The graph shows the percentages of fluorescence observed after using a specific software (software developed by CKr Lugoowski-Rivero) (3.B).

was administered directly into the hippocampal tissue (Cuevas et al., 2009); and hyperglycemia and hyperinsulinemia were induced with the intramuscular administration of STZ (Alvarado-Vásquez et al., 2003, 2006).

During the period of the study, capillary glucose and weight of animals were monitored; hyperglycemia over 200 mg/dL and lower weight gain were found in STZ-treated groups. These results correlated with the presence of a high percentage of glycated hemoglobin in the two groups treated with STZ and the STZ + A $\beta$ , which was two-fold higher

than in the control group; however, insulin levels for groups

treated with STZ were higher than in control or A $\beta$  group alone. These higher insulin levels did not reduce glucose levels. Different mechanisms have been proposed to explain the importance of glucose, A $\beta$ 25–35, insulin, or cell metabolism in the onset of AD (Montiel et al., 2006). In Alzheimer's disease, the presence of

metabolic abnormalities involves impaired utilization of glucose and decreased energy production (Dias and Hart, 2007; Liu et al., 2009; Valente et al., 2010). Increased glucose levels have been associated with variations in the phosphorylation and O-glycosylation patterns in the rat brain (Liu et al., 2009). In addition, diabetes, poor glycemic

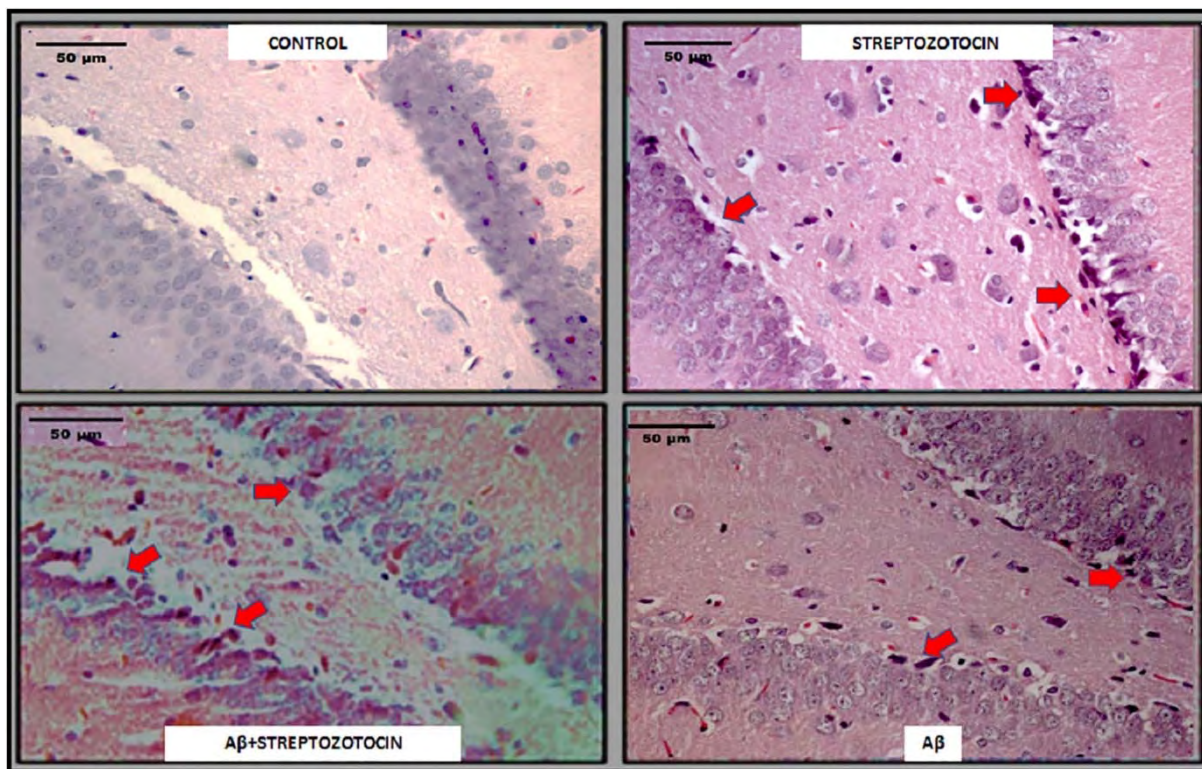


Fig. 6. Photomicrograph of rat hippocampus, staining with hematoxylin and eosin in the four experimental groups. Control group, A $\beta$  25–35, A $\beta$  25–35 + STZ and STZ. Arrows indicate cell bodies with eosinophilic impregnation.

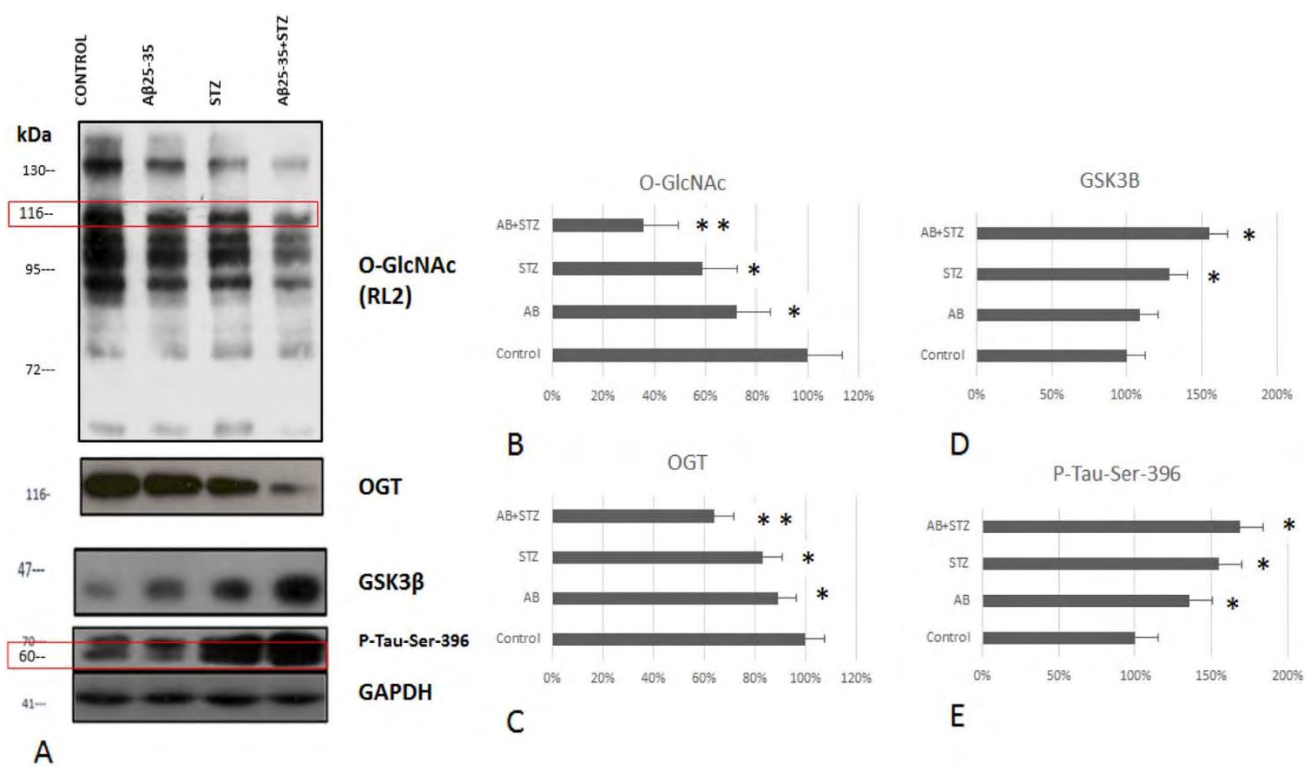


Fig. 7. Western blot of total brain proteins used to determine the presence of O-GlcNAcylation (O-GlcNAc), O-GlcNAc-transferase (OGT), P-tau-Ser-396, glycogen synthase kinase 3-beta (GSK3beta), and anti-GAPDH antibodies. (A) The membranes were incubated with different antibodies. The graph shows the results of protein densitometric analysis after normalizing with GAPDH levels O-GlcNAcylation (O-GlcNAc) (B), O-GlcNAc-transferase (OGT) (C), P-tau-Ser-396 (D), glycogen synthase kinase 3-beta (GSK3beta) (E). The differences observed among





control, and decreased mitochondrial activity have been considered factors associated with the development of AD (Montiel et al., 2006; Roberts et al., 2014; Ashraf et al., 2015). After four weeks of STZ-treatment, we found a significant decrease of O-GlcNAcylation with WGA in the immunofluorescence test or with anti-O-GlcNAc (RL2) in the western blot and expression of OGT, which was associated with increase in insulin levels, P-tau-Ser-396, and GSK3beta. These changes were more apparent in the group treated with A $\beta$ 25–35 + STZ. Our results confirm the presence of hyperglycemia in the groups treated with STZ. The percentage of HbA1c was particularly higher in the groups that received STZ (\*P < 0.05). Neurons, which normally have a high requirement of glucose, in hyperglycemic conditions, are exposed to four-fold higher levels of glucose; if this increase is chronic, it seems to favor cognitive dysfunction (Kawamura et al., 2012).

Insulin is the main regulator of blood glucose levels, stimulating the absorption of glucose by the liver, muscles, and adipose tissue. In contrast, the transport of glucose to the brain and the use of glucose by most cells within the brain are independent of insulin. In the previous studies, peripheral insulin administration did not prevent tau hyperphosphorylation or alteration of insulin signaling in the brain (Kamal et al., 2013). One possible explanation is that the peripherally administered insulin may not adequately permeate the blood brain barrier, an alternative would be the one raised in the work of Kim et al., who suggested a potential effect of intranasal insulin administration on brain insulin signaling pathways and tau hyperphosphorylation (Kim et al., 2013). Alteration of insulin signaling in the brain can inhibit phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt, and activate GSK3beta, which leads to phosphorylation of tau protein and formation of NFTs (Hurtado et al., 2012).

Although it is considered that STZ administration inhibits fast insulin synthesis and affects the levels of circulating insulin; these effects are influenced by the STZ concentration used (Akbarzadeh et al., 2007; Li et al., 2015; Wu and Huan, 2008). For example, in the work of Akbarzadeh et al. (2007), 60 mg/kg of STZ was applied intravenously (in comparison, we used 40 mg/kg intramuscularly), the insulin levels were detectable during 80 days and, although, the group treated with STZ showed a diminution in the levels of insulin in comparison to the control group, the concentration was similar between both groups. In models of metabolic syndrome induced with STZ (25 mg/kg, administered in two occasions), the presence of hyperinsulinemia was reported during 28 months (Li et al., 2015). These data support the use of STZ to induce hyperinsulinemia, similarly to that observed in DM2 patients. Our results showed increase in plasma insulin levels in STZ-treated animals; this can intensify the negative effects derived from hyperglycemia and A $\beta$ 25–35 (Cai et al., 2015; Craft, 2007).

The brain metabolizes glucose through different metabolic pathways; one of them is the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) (Li et al., 2013). Normally, 2 to 5% of glucose is metabolized by the HBP, which produces UDP N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) (McClain and Crook, 1996), this, in turn, is used by the O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) during O-GlcNAcylation of cytoplasmic and mitochondrial proteins (Marsh et al., 2013; McClain et al., 2002; Brownlee, 2001; McClain and Crook, 1996). The importance of this pathway resides in its ambivalent role, as it is associated with protection, but also with cell death in AD. For example, O-GlcNAcylation inhibits hyperphosphorylation of the tau protein, as well as amyloid- $\beta$  peptide's toxicity in AD (Zhu et al., 2014). In our work, the presence of A $\beta$ 25–35 was associated with a drop, in O-glycosyltransferase (OGT) expression and O-GlcNAcylation levels, especially in the STZ-treated group. Additionally, these results are confirming by positive recognition with the specific antibody anti-O-GlcNAc (RL2) by western blot, which has been used to detect O-GlcNAcylated proteins, as well as the OGT involved in this process.

Our results showed increased P-tau-Ser-396 phosphorylation, which has been suggested to induce the formation of intracellular neurofi-

brillary tangles characteristic of AD (Wang and Liu, 2008). Recently, it

was reported that phosphorylation of P-tau-Ser-396 is an early event, prior to the appearance of the classical fibrillary structure (Mondragón-Rodríguez et al., 2014). We found increased levels of P-tau-Ser-396 in the A $\beta$ , A $\beta$ -STZ, and STZ groups, and these results were confirmed by western blot assays, which showed increased expression of P-tau-Ser-396 in A $\beta$ 25–35 treated rats and, especially, in the A $\beta$  + STZ treated group.

Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3beta) recognizes 27 of the approximately 45 phosphorylation sites in the tau protein (Hanger and Noble, 2011), and Ser-396 is considered a critical site for tau's ability to bind and stabilize microtubules (Wang and Liu, 2008). Immunohistochemistry of brains revealed high levels of GSK3beta in the A $\beta$  and STZ-treated groups, but mainly in the A $\beta$  + STZ-treated group. It is relevant to highlight that this increase in tau phosphorylation has been linked previously with a higher expression of GSK3beta (Qu et al., 2011). Western blot confirmed the presence of this kinase. Our results agree with those of (Qu et al., 2011), who reported that STZ-induced hyperglycemia might cause alterations of the Akt/GSK-3/PP-2A pathway in the rat brain and further lead to abnormal phosphorylation of hippocampal tissue.

## 5. Conclusion

Hyperglycemia and hyperinsulinemia seem to be related with hippocampal damage and the development of AD. They activate GSK3beta activity and inhibit OGT and O-GlcNAcylation in the hippocampal tissue. This work gives support to continue evaluating these mechanisms in other conditions, and improves our understanding on the association of diabetes-insulin-AD.

## Acknowledgments

This article is part of the requirements to obtain the Ph.D. in Science

by Liliana Lozano Rodríguez in the Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, CONACYT (210572). This work was partially supported by grants from the Graduate Biological Sciences Division, School of Medicine, UNAM, PAEP 2013, PAPIIT (IN224011); CONACYT (0129932), and ECOS France-Mexico (M09S02)-CONACYT (189453), The University of Lille and the "Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)". The authors also thank FRABio FR 3688 and Dr. Noé Alvarado from the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias for his contributions to this work.

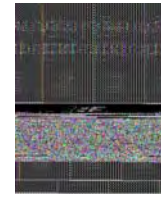
## References

- Alvarado-Vásquez, N., Zamudio, P., Cerón, E., Vanda, B., Zenteno, E., Carvajal-Sandoval, G., 2003. Effect of glycine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 134, 521–527.
- Alvarado-Vásquez, N., Lascuain, R., Cerón, E., Vanda, B., Carvajal-Sandoval, G., Tapia, A., Guevara, J., Montaña, L.F., Zenteno, E., 2006. Oral glycine administration attenuates diabetic complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 79 (3), 225–232.
- Akbarzadeh, A., Norouzi, D., Mehrabi, M.R., Jamshidi, S.H., Farhangi, A., Verdi, A.A., 2007. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J. Clin. Biochem.* 22, 60–64.
- American Diabetes Association, 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37, S81–S90.
- Ashraf, A., Fan, Z., Brooks, D.J., Edison, P., 2015. Cortical hypermetabolism in MCI subjects: a compensatory mechanism? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 42, 447–458.
- Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M., Hernandez, F., 2004. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.* 54, 361–384.
- Ayyadevara, S., Balasubramaniam, M., Pareon, P., Barger, S., Griffin, W., Alla, R., Tackett, A., 2016. Proteins that mediate protein aggregation and cytotoxicity distinguish Alzheimer's hippocampus from normal controls. *Aging Cell* 5, 924–939.
- Biessels, G.J., Strachan, M.W., Visseren, F.L., Kappelle, L.J., Whitmer, R.A., 2014. Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: towards targeted interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 3, 246–255.
- Bosco, D., Fava, A., Plastino, M., Montalcini, T., Pujia, A., 2011. Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 1807–1821.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820.

- Butterfield, D., Kanski, J., 2002. Methionine residue 35 is critical for the oxidative stress and neurotoxic properties of Alzheimer's amyloid beta-peptide 1-42. *Peptides* 23, 1299–1309.
- Cai, Z., Xiao, M., Chang, L., Yan, L.J., 2015. Role of insulin resistance in Alzheimer's disease. *Metab. Brain Dis.* 4, 839–851.
- Craft, S., 2007. Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis. Potential mechanisms and implications for treatment. *Curr. Alzheimer Res.* 2, 147–152.
- Cuevas, E., Limón, D., Pérez-Severiano, F., Díaz, A., Ortega, L., Zenteno, E., Guevara, J., 2009. Antioxidant effects of epicatechin on the hippocampal toxicity caused by amyloid-beta 25–35 in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 616, 122–127.
- Dandona, P., Mohamed, I., Ghanim, H., Sia, C.L., Dhindsa, S., Dandona, S., Maddisi, A., Chaudhuri, A., 2011. Insulin suppresses the expression of amyloid precursor protein, presenilins, and glycogen synthase kinase-3beta in peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 1783–1788.
- Delobette, S., Privat, A., Maurice, T., 1997. In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptide-(25–35)-induced amnesia in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 319, 1–4.
- Dias, W., Hart, G., 2007. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol. Biosyst.* 11, 766–772.
- Gong, C.X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2006. Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation. *J. Alzheimers Dis.* 9, 1–12.
- Hanger, D.P., Noble, W., 2011. Functional implications of glycogen synthase kinase-3-mediated tau phosphorylation. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2011, 352805.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
- Henriksen, E.J., 2010. Dysregulation of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* 6, 285–293.
- Hurtado, D., Molina-Porcel, L., Carroll, J., Macdonald, C., Aboagye, A., Trojanowski, J., Lee, V., 2012. Selectively silencing GSK-3 isoforms reduces plaques and tangles in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 32, 7392–7402.
- Kamal, A., Ramakers, G., Gispen, W., Biessels, G., 2013. Hyperinsulinemia in rats causes impairment of spatial memory and learning with defects in hippocampal synaptic plasticity by involvement of postsynaptic mechanisms. *Exp. Brain Res.* 226, 45–51.
- Kawamura, T., Umemura, T., Hotta, N., 2012. Cognitive impairment in diabetic patients: can diabetic control prevent cognitive decline? *J. Diabetes Investig.* 3, 413–423.
- Kelley, B.J., Petersen, R.C., 2007. Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurol. Clin.* 25, 577–609.
- Kerner, W., Brückel, J., 2014. Definition, classification, and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 122, 384–386.
- Kim, B., Backus, C., Oh, S., Feldman, E.L., 2013. Hyperglycemia-induced tau cleavage in vitro and in vivo: a possible link between diabetes and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 34, 727–739.
- Lefebvre, T., Cieniewski, C., Lemoine, J., Guerardel, Y., Leroy, Y., Zanetta, J.P., Micharliski, J.C., 2001. Identification of N-acetyl-D-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem. J.* 360, 179–188.
- Li, T., Paudel, H.K., 2006. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Biochemistry* 45, 3125–3133.
- Li, M., Ruan, H., Hughes, M., Lee, J., Singh, J., Jones, S., Nitabach, M., Yang, X., 2013. O-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting BMAL1/CLOCK ubiquitination. *Cell Metab.* 17, 303–310.
- Li, L., Liao, G., Yang, G., Lu, Y., Du, X., Liu, J., Li, L., Wang, C., Li, L., Ren, Y., Zhong, Z., Cheng, J., Chen, Y., 2015. High-fat diet combined with low-dose streptozotocin injections induces metabolic syndrome in *Macaca mulatta*. *Endocrine* 49 (3), 659–668.
- Liu, F., Shi, J., Tanimukai, H., Gu, J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C., 2009. Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 132, 1820–1832.
- Lozano, L., Lara-Lemus, R., Zenteno, E., Alvarado-Vásquez, N., 2014. The mitochondrial O-linked N-acetylglucosamine transferase (mOGT) in the diabetic patient could be the initial trigger to develop Alzheimer disease. *Exp. Gerontol.* 58, 198–202.
- Maccioni, R.B., Muñoz, J.P., Barbeito, L., 2001. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch. Med. Res.* 32, 367–381.
- Marsh, S.A., Powell, P.C., Dell'Italia, L.J., Chatham, J.C., 2013. Cardiac O-GlcNAcylation blunts autophagic signaling in the diabetic heart. *Life Sci.* 92, 648–656.
- Maurice, T., Lockhart, B.P., Privat, A., 1996. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain* 706, 181–193.
- McClain, D., Crook, E., 1996. Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes* 45 (8), 1003–1009.
- McClain, D., Lubas, W., Cooksey, R., Hazel, M., Parker, G., Love, D., Hanover, J., 2002. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 6 (99), 10695–10699.
- Mondragón-Rodríguez, S., Perry, G., Luna-Muñoz, J., Acevedo-Aquino, M., Williams, S., 2014. Phosphorylation of tau protein at sites Ser (396–404) is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 40 (2), 121–135.
- Montiel, T., Ricardo, Quiroz-Baez R., Massieu, L., Arias, C., 2006. Role of oxidative stress on beta-amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: protection by antioxidants. *Exp. Neurol.* 200, 496–508.
- Ninomiyama, T., 2014. Diabetes mellitus and dementia. *Curr. Diab. Rep.* 14 (5), 487–494.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. Hippocampal fissure. In: Paxinos, G., Watson, C. (Eds.), *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, pp. 30–46.
- Pike, C.J., Walencewicz-Wasserman, A.J., Kosmoski, J., Cribbs, D.H., Glabe, C.G., Cotman, C.W., 1995. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25–35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem.* 64, 253–265.
- Prapong, T., Buss, J., Hsu, W.H., Heine, P., West, G.H., Uemura, E., 2002. Amyloid beta-peptide decreases neuronal glucose uptake despite causing increase in GLUT3 mRNA transcription and GLUT3 translocation to the plasma membrane. *Exp. Neurol.* 174, 253–258.
- Qu, Z., Jiao, Z., Sun, X., Zhao, Y., Ren, J., Xu, G., 2011. Effects of streptozotocin-induced diabetes on tau phosphorylation in the rat brain. *Brain Res.* 1383, 300–306.
- Roberts, R., Knopman, D., Cha, R., Mielke, M., Pankratz, V., Boeve, B., Kantarci, K., Geda, Y., Jack, C., Petersen, R., Lowe, V., 2014. Diabetes and elevated hemoglobin A1c levels are associated with brain hypometabolism but not amyloid accumulation. *J. Nucl. Med.* 55 (5), 759–764.
- Springhorn, C., Matsha, T., Erasmus, R., Essop, M., 2012. Exploring leukocyte O-GlcNAcylation as a novel diagnostic tool for the earlier detection of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (12), 4640–4649.
- Tomlinson, D.R., Gardiner, N.J., 2008. Glucose neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 36–45.
- Valente, T., Gella, A., Fernandez-Busquets, X., Unzeta, M., Durany, N., 2010. Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neurobiol. Dis.* 37 (1), 67–76.
- Verdile, G., Fuller, S.J., Martins, R.N., 2015. The role of type 2 diabetes in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 15, S961–S969.
- Walsh, D., Tseng, B., Rydel, R., 2000. The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39, 10831–10839.
- Wang, J.Z., Liu, F., 2008. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog. Neurobiol.* 85, 148–175.
- World Health Organization, 2013. *International Diabetes Federation (IDF) Diabetes Atlas 2013*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en>. <http://www.idf.org/diabetesatlas/es>.
- Wu, K.K., Huan, Y., 2008. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. Chapter 5 *Curr. Protoc. Pharmacol Unit* 5.47.
- Xing, G., Dong, M., Li, X., Zou, Y., Fan, L., Wang, X., Cai, D., Li, C., Zhou, L., Liu, J., Niu, Y., 2011. Neuroprotective effects of puerarin against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells via a PI3K-dependent signaling pathway. *Brain Res. Bull.* 85, 212–218.
- Zhao, W.-Q., Townsend, M., 2009. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 482–496.
- Zhu, Y., Shan, X., Yuzwa, S., Vocadlo, D., 2014. The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 289, 34472–34481.

***A.II.- ARTÍCULO DE REVISIÓN.***

The mitochondrial O-linked N-acetylglucosamine transferase (mOGT) in the diabetic patient could be the initial trigger to develop Alzheimer disease.



## The mitochondrial O-linked N-acetylglucosamine transferase (mOGT) in the diabetic patient could be the initial trigger to develop Alzheimer disease



Liliana Lozano <sup>a</sup>, Roberto Lara-Lemus <sup>b</sup>, Edgar Zenteno <sup>a</sup>, Noé Alvarado-Vásquez <sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> National Autonomous University of Mexico, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Mexico

<sup>b</sup> National Institute of Respiratory Diseases, "Ismael Cosío Villegas", Mexico

### article info

#### Article history:

Received 7 March 2014

Received in revised form 14 August 2014

Accepted 18 August 2014

Available online 19 August 2014

Section Editor: Holly M Brown-Borg

#### Keywords:

O-GlcNAcylation

O-glycosyl transferase

Diabetes mellitus

Alzheimer disease

Mitochondria

### abstract

Diabetes mellitus (DM) is considered a risk factor for the development of Alzheimer disease (AD); however, how DM favors evolution of AD is still insufficiently understood. Hyperglycemia in DM is associated to an increase in mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation, as well as damage of hippocampal cells, reflected by changes in morphological and mitochondrial functionality. Similar mitochondrial damage has been observed when amyloid beta ( $A\beta$ ) accumulates in the brain of AD patients. In DM, the excess of glucose in the brain induces higher activity of the hexosamine biosynthesis pathway (HBP), it synthesizes UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), which is used by O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) to catalyze O-GlcNAcylation of numerous proteins. Although O-GlcNAcylation plays an important role in maintaining structure and cellular functionality, chronic activity of this pathway has been associated with insulin resistance and hyperglycemia-induced glucose toxicity. Three different forms of OGT are known: nucleocytoplasmic (ncOGT), short (sOGT), and mitochondrial (mOGT). Previous reports showed that overexpression of ncOGT is not toxic to the cell; in contrast, overexpression of mOGT is associated with cellular apoptosis. In this work, we suggest that hyperglycemia in the diabetic patient could induce greater expression and activity of mOGT, modifying the structure and functionality of mitochondria in hippocampal cells, accelerating neuronal damage, and favoring the start of AD. In consequence, mOGT activity could be a key point for AD development in patients with DM.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Clinical Significance of Diabetes Mellitus (DM) and Alzheimer Disease (AD)

#### 1.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) comprises a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia, which is a consequence of an alteration in insulin secretion. Diabetes per se is considered a risk factor to develop cognitive impairment (Ba-Tin et al., 2011; Singh et al., 2013; Strachan et al., 1997); however, a similar cognitive injury has been observed in individuals without DM diagnosis but with insulin resistance (Bloemer et al., 2014). According to a World Health Organization report, 347 million people exist worldwide with diabetes mellitus (DM) (World Health Organization, 2013), this number will increase up to 439 million in 2030 (Shaw et al., 2010). Two types of DM have been recognized: type 1, which is characterized by an absolute lack of insulin as a consequence of pancreas beta cell destruction; and type 2, which combines a decrease

of insulin secretion with insulin resistance (ADA, 2014). Recent evidences show an increase in the number of DM cases in the population between 40 and 59 years of age and 175 million of people are unaware of their disease (IDF, 2013).

#### 1.2. Alzheimer Disease (AD)

Alzheimer disease is a neurodegenerative disorder present in more than 35 million of people worldwide (Querfurth and LaFerla, 2010), and it affects approximately 5.1 million of North Americans aged 65 years or older (Hebert et al., 2003). AD is also one of the main causes of dementia in aging individuals and, similar to type-2 diabetes, is associated with aging. Pathologically, the disease is characterized by loss of synapses, presence of amyloid beta-peptide ( $A\beta$ ) plaques, and intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) formed by the hyperphosphorylated tau protein (Alcardi et al., 2005). The  $A\beta$ , which is generated by the proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein (APP), depicts two important forms in AD, the  $A\beta$ 40 and  $A\beta$ 42 (Gangy, 2001); soluble  $A\beta$  oligomers are the most toxic to the cell (Viola et al., 2008). AD shows two types: familial AD, which can be caused by mutations in the gene of the amyloid  $\beta$  precursor protein (APP), or in the presenilin 1 (PS1) and 2 (PS2) genes (Suárez-Calvet et al., 2014; Wahlster et al., 2013);

\* Corresponding author at: Department of Biochemistry, National Institute of Respiratory Diseases, "Ismael Cosío Villegas", Calz. de Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, 14080 Mexico, D.F., Mexico.  
E-mail address: [mnooe@gmail.com](mailto:mnooe@gmail.com) (N. Alvarado-Vásquez).



and sporadic AD, where various risk factors have been identified, although diabetes stands as the most important risk factor for the development of AD (Botero et al., 2012; Piaceri et al., 2013).

glycemic conditions, as in DM, neurons are exposed to four-fold higher levels of glucose; if this increase is persistent, then the excess of glucose

## 2. Similitude of Mitochondrial Changes Observed in DM and AD

### 2.1. Diabetes and Damage to Mitochondria

In DM, hyperglycemia induces numerous side effects derived from the activation of protein kinase C (PKC), advanced glycation end-products generation (AGE), activity of the polyol pathway, mitochondrial synthesis of reactive oxygen species (ROS) (Shen, 2012), and higher activity of the hexosamine pathway (Springhorn et al., 2012). The mitochondrion is particularly affected by high glucose concentrations, which alter mitochondrial shape, glucose metabolism, generation of energy, as well as  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (Baptista et al., 2013; Boudina et al., 2007). In neurons, high glucose concentration induces depolarization of the mitochondrial membrane (Liu et al., 2006; Russell et al., 2002), an abnormal mitochondrial activity, as well as impaired bioenergetics status (Fernyhough et al., 2010; Reddy, 2009). As a whole, the aforementioned evidences show the relevance of mitochondria for the evolution of neurodegenerative disorders and aging (Cardoso et al., 2013), however, these events can be inhibited using antioxidants specific for mitochondria (Cao et al., 2012; Moreira et al., 2007).

### 2.2. A $\beta$ Peptide and Damage to Mitochondria

Similarly as described for DM, mitochondria of neuronal cells are the organelles particularly affected during AD. The most remarkable characteristic of AD is the presence of A $\beta$ , which has been linked to the evolution of the disease due to its capability of inducing ROS synthesis (Mattson, 1997), and whose mitochondrial origin has been recently established in neuronal cells incubated with A $\beta$  (Bobba et al., 2013; Jiao et al., 2012). These data support the existence of a vicious cycle, where mitochondrial dysfunction favors A $\beta$  synthesis and, conversely, the synthesized A $\beta$  maintains mitochondrial dysfunction and increased ROS synthesis (Leuner et al., 2012a, 2012b). A recent report by Rosales-Corral et al. (2012) showed that the injection of fibrillar A $\beta$  into the hippocampus causes severe axonal damage and alterations of the inner mitochondrial membrane. In addition, Aleardi et al. (2005) found that accumulation of A $\beta$  in the rat brain was associated with an increase in mitochondrial viscosity, cytochrome C release, and inhibition of respiratory chain complexes concurrent with the synthesis of ROS. This would explain the impaired oxidative phosphorylation and the increase in the synthesis of ROS observed post-mortem in brains of AD patients, as well as in animal models of AD in the presence of A $\beta$  (Spuch et al., 2012). Other side effects observed were damage of mitochondrial membrane, decrease in the activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, and increase in mitochondrial  $[\text{Ca}^{2+}]$  by A $\beta$  accumulation (Ren et al., 2011).

While these evidences place mitochondria as a common spot of damage in both DM and AD, the precise effect of glucose on hippocampal neurons is still unknown. The effects of high glucose concentration on the metabolic pathways, which are associated to the side effects of glucose in the brain of diabetic patients, are still poorly understood. Although, more work is necessary to improve our understanding of the DM and AD association (Aleardi et al., 2005; Cao et al., 2012; Neumann et al., 2008; Reddy, 2009; Russell et al., 2002; Shen, 2012), we consider that chronic hyperglycemia in DM patients is one of the most important risk factors for AD development.

## 3. Glucose Neurotoxicity on the Brain and Neurons

Neurons have a high and constant demand of glucose. However, glucose uptake is neither dependent on nor influenced by insulin. In hyper-

leads to neuronal damage (Tomlinson and Gardiner, 2008). Normally, insulin regulates the high postprandial glucose concentrations, inducing its uptake by the muscle, liver, and fat tissue. The brain, which uses glucose as its principal energy source, has glucose transporters (GLUT1, GLUT3, and GLUT8) that do not depend on insulin for glucose uptake (Espinoza-Rojo et al., 2010). Although GLUT4 (dependent on insulin to be expressed) has been described in the brain, an insulin-regulated glucose uptake has not been shown yet in the brain (Espinoza-Rojo et al., 2010). The relevance of glucose in maintaining the functionality of the brain (Pasquier et al., 2006), as well as a memory-enhancer (Messier, 2004), has been confirmed previously. However, drastic variations in the physiological levels of glucose have been associated with cognitive dysfunction in type 1 or 2 diabetic patients (Kawamura et al., 2012). Current evidence suggests that this negative effect arises from mitochondrial dysfunction (Rehni et al., 2014). Several studies have shown that diabetes is associated with cognitive impairment and dementia (Biessels et al., 2006). Although some factors have been suggested, such as a defective brain vasculature, impaired signaling by insulin, insulin resistance, oxidative stress, advanced glycation end products, hyperglycemic or hypoglycemic episodes, and glucose toxicity (Bornstein et al., 2014), the main mechanisms involved in brain damage are still confusing and unclear. Interestingly, a number of findings sustain that the damage observed in DM arises fundamentally from chronic hyperglycemia. Recently, Giaccari et al. (2009) revised the whole metabolic pathways activated by glucose, they analyzed different evidences and defined that oxidative stress, activation of protein kinase C, and the hexosamine pathway (in which O-glycosyl transferase is a very important element) are the key mechanisms involved in the toxicity exerted by glucose.

#### 4. The O-Glycosyl Transferase and O-GlcNAcylation as Probable Association Point Between DM and AD

The principal consumer of glucose is the brain, which metabolizes it by different metabolic pathways; one of the latter is the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) (Ruan et al., 2013). Under physiological conditions, 2 to 5% of glucose entering the cells are utilized by the HBP. It begins with the conversion of fructose 6-phosphate to glucosamine 6-phosphate by the rate-limiting enzyme glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFA), and the end product is the UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) (McClain and Crook, 1996). Currently, we know that synthesized UDP-GlcNAc is used in one special post-translational modification identified as O-GlcNAcylation, which occurs in nucleocytoplasmic and mitochondrial proteins (Brownlee, 2001; Marsh et al., 2013; McClain, 2002; McClain and Crook, 1996). O-GlcNAcylation is performed by the O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT), which uses the UDP-GlcNAc substrate to transfer the monosaccharide to the hydroxyl group of a specific serine or threonine in the target protein (Hart et al., 2011; Love et al., 2003). O-GlcNAcylation could occur reciprocally or sequentially with serine or threonine phosphorylation, and evidences suggest that it operates as a switch in different cellular pathways. So far, three different isoforms of the OGT enzyme have been identified, these are: the nucleocytoplasmic OGT (110 kDa, ncOGT), the short OGT (78 kDa, sOGT), and the mitochondrial OGT (103 kDa, mOGT) (Love et al., 2003). The two isoforms considered as the most important are ncOGT and mOGT, which also play a role in glucose sensing and diabetes mellitus (Butkinaree et al., 2010; Love et al., 2003; McClain and Crook, 1996). However, Shin et al. (2011) found that overexpression of ncOGT was not toxic to the cell, whereas mOGT overexpression was associated to cellular apoptosis. It is important to point out that O-GlcNAcylation and O-GlcNAc cycling enzymes are present in the brain (Liu et al., 2012).

Currently, it is known that hundreds of proteins can be O-GlcNAcylated, and these include proteins like the insulin receptor and

its substrates, MAP kinases, cell cycle regulators, several proteins of the cytoskeleton, and the tau protein (Brownlee, 2001; F. Liu et al.,



2004; K Liu et al., 2004; McClain and Crook, 1996; Yang and Suh, 2014). O-GlcNAcylation is a dynamic and reversible process that is emerging as an important regulator of numerous cellular mechanisms (Butkinaree et al., 2010), and as participating in a wide range of human diseases (Hart et al., 2011). Hanover et al. (2010) summarized and demonstrated the importance of O-GlcNAcylation in immune system diseases, cancer, cardiovascular diseases, diabetes, and neurodegenerative diseases. Intriguingly, under pathological or damaging conditions (e.g., ischemia and trauma) the HBP and the resulting O-GlcNAcylation represent the first line of defense of an organism (Chatham et al., 2008).

In stress conditions, such as in DM, an increased O-GlcNAc may occur due to a global increase in glucose level, linked to some of its toxic effects, as well as to insulin resistance (Brownlee, 2001; Marsh et al., 2013; McClain, 2002; McClain and Crook, 1996). It is relevant to mention that an increase in O-GlcNAcylation has been associated to hippocampal cell apoptosis, suggesting that the O-GlcNAc system may participate in neurodegeneration, predominantly of the hippocampus (F. Liu et al., 2004; K. Liu et al., 2004). In addition, excessive hexosamines inhibit the protective effect of insulin and provoke apoptosis of retinal neurons (Nakamura et al., 2001).

##### 5. Perspective

The diversity of factors previously proposed (A $\beta$ , glucose, insulin, etc.) as the origin of AD makes it difficult to find the central mechanisms that cause the disease (Baptista et al., 2013; Boudina et al., 2007; Liu et al., 2006; Russell et al., 2002). However, an increasing number of works support the role of hyperglycemia as a risk factor for the development of neuronal damage (Tomlinson and Gardiner, 2008) and starting point of Alzheimer disease (Tang et al., 2013). Nevertheless, it is still an issue of strong debate how a high glucose concentration could favor brain damage in the presence or absence of A $\beta$  in individuals at risk of developing AD. Evidences show that A $\beta$  (Leuner et al., 2012a, 2012b) or high glucose concentrations (Liu et al., 2006; Russell et al., 2002) promote mitochondrial damage. This allows us to suggest mitochondria as the sharing element for both diseases. It is interesting to note that recent reports support the role of glucose levels to exacerbate the neuronal damage in the presence of A $\beta$ . Recently, Wang et al. (2010) reported that A $\beta$ 's neurotoxicity is intensified at glucose concentrations between  $\leq 3$  mM and  $\geq 20$  mM. On the other hand, Takeda et al. (2012) reported that a single oral glucose load induces an increase in the A $\beta$  levels in the plasma of patients with non-AD dementia. Interestingly, this increase in the A $\beta$  levels was most important in patients with previous diagnoses of AD. These data underline the relevance of glucose as an inducer of changes in the synthesis of A $\beta$  or as an enhancer of damage derived from it. In addition, these evidences may help to explain another controversial issue in the study of DM and AD. Previously, some authors had suggested hypoglycemia as a critical factor to develop AD (Lee et al., 2013). However, hyperglycemia as the central point to develop AD has been proposed too (B. Kim et al., 2013; C. Kim et al., 2013). Although all this information still needs to be confirmed, it underlines the importance of the adequate regulation of glucose concentrations to attenuate or inhibit A $\beta$  toxicity. While hypoglycemia is considered by some authors as the principal risk factor to develop AD in the diabetic patient, we differ from this opinion and consider a high glucose concentration as the main factor. Epidemiological evidences show hyperglycemia as a characteristic of type 2 diabetes patients (Knopman et al., 2011). On the other hand, two recent studies showed that chronically high blood glucose levels pose a risk factor for cognitive damage or dementia in individuals without DM (Crane et al., 2013). This is probably a consequence of structural changes in important areas of the hippocampus (Kerti et al., 2013). Mitochondrial dysfunction and generation of ROS have been observed in the presence of high glucose with or without accumulation of A $\beta$ . Both events were associated with the onset of cellular apoptosis (Ma

and Hart, 2013). At this point, the cell activates the hexosamine pathway and carries out O-GlcNAcylation of several

proteins (Liu et al., 2007) to protect itself and avoid the onset of apoptosis (Johnson et al., 2014; Ngoh et al., 2011). But unfortunately, the chronically stimulated HBP performs O-GlcNAcylation of numerous proteins, including mitochondrial proteins (Lima et al., 2012). Exposure of cardiac myocytes to high glucose increases mitochondrial protein O-GlcNAcylation, contributing to impaired mitochondrial function (Hu et al., 2009). This fact, paradoxically, is related to dysfunction and mitochondrial fragmentation, as well as to insulin resistance (Gawłowski et al., 2012; Gu et al., 2011).

These last observations could be explained by recently reported evidences. In these works, the authors by using proteomics screen showed that over-expression of OGT or OGA, in a neuronal cell line, induced alterations in proteins associated with the respiratory chain or in proteins linked with the tricarboxylic acid cycle. Drastic changes in morphology, cellular respiration, and glycolysis were observed also (Tan et al., 2014). On the other hand, Pekkumaz et al. (2014) showed that glucose induced the O-GlcNAcylation of the Milton adaptor protein in hippocampal neurons, HEK293T and COS7 cells, which in complex with the Miro GTPase, kinesin, and dynein/dynactin, are involved in mitochondrial motility. In a recent publication (Zhao et al., 2014) in which O-GlcNAcylation was evaluated, O-GlcNAc cycling and its association with retinal mitochondrial regulation were demonstrated. The authors reported that disrupted mitochondrial homeostasis was associated with oxidative stress. However, O-GlcNAcylation might protect against oxidative stress and promote mitochondrial respiration in the aged retina. In a recent and interesting report, Cao et al. (2013) confirmed the significance of O-GlcNAcylation in mitochondrial functionality. The authors demonstrated that mitochondrial proteins in the rat liver are O-GlcNAcylated, and that most of these enzymes are involved in the urea cycle, tricarboxylic acid cycle, and lipid metabolism. Experimental data indicate that O-GlcNAcylation participates in homeostasis, aging, and pathological states. However, chronic O-GlcNAcylation could be associated with the exacerbation of cellular damage (e.g., diabetes, hypertension, or AD) (Lefebvre et al., 2010). It is relevant to point out that B. Kim et al. (2013) and C. Kim et al. (2013) revealed recently one mechanism by which O-GlcNAcylation intervenes in the regulation of A $\beta$  synthesis. These authors found that a specific inhibitor of O-GlcNAcase (enzyme related to O-GlcNAc detached from proteins) reduces A $\beta$  production by lowering  $\gamma$ -secretase activity (B. Kim et al., 2013; C. Kim et al., 2013).

We consider that hyperglycemia acting alone, and later in conjunction with the A $\beta$ , induces firstly mitochondrial dysfunction and, eventually, an increase in ROS generation. The cell uses the excess of glucose to increase the activity of HBP and O-GlcNAcylation of proteins, attempting to protect both structure and functionality. In this regard, Yuzwa et al. (2012) showed that increases of O-GlcNAc slow down the motor neuron loss in the JNPL3 tau mouse model. The results demonstrated also that the protective effect of O-GlcNAc is not dependent on tau phosphorylation, but derives from reduced tau oligomerization. Regrettably, one of the enzymes activated by chronic hyperglycemia could be the mOGT, its chronic activation and overexpression facilitate cell damage, inducing cellular apoptosis through a direct effect on mitochondria (Shin et al., 2011). Additional support to this suggestion can be obtained from recent data, which indicate an impaired O-GlcNAcylation and phosphorylation of mitochondrial proteins in myoblasts incubated with high glucose concentrations (Gu et al., 2011). In addition, high glucose concentration induces changes in O-GlcNAcylation of the DRP1 protein in cardiac muscle cells, inducing mitochondrial fragmentation, as well as a drop of mitochondrial membrane potential (Gawłowski et al., 2012). In addition, abnormal O-GlcNAcylation has been associated with an impaired mitochondrial activity and with hypertrophy of cardiomyocytes in an experimental diabetes model (Marsh et al., 2011). Although our current knowledge about the relevance of O-GlcNAcylation and mOGT is still in its early stages in a similar way as noted for the cardiovascular system (Marsh and Chatham, 2011), some evidences found by Lozano et al. (2013) provide a new in-

sight about this point (Lozano et al., 2013), underlining the relevance of the diabetes-A $\beta$  axis.

Although the identity of the OGT associated with the neuronal damage in the diabetic patient is still unresolved, the mOGT characteristics permit to associate it with the origin of brain damage and the start of AD in the diabetic patient. We consider that if the accountability of mOGT in the brain damage, observed in patients with diabetes or at risk of developing AD, is established, several relevant points could be clarified. For example: 1) it would improve our comprehension of the diabetes-AD association; 2) it would help to understand the differences in the results found by various research groups (Butkinaree et al., 2010; Hart et al., 2011; Liu et al., 2009; Shin et al., 2011); 3) it would help to explain the origin of the neuropathological features associated with AD, but observed also in the brain of patients with dementia or diabetes alone; and 4) it could help to evaluate diabetic patients in a pre-symptomatic phase or those with insulin resistance but at risk of developing Alzheimer disease (Wirz et al., 2014). All this aimed at providing an adequate and early treatment to prevent the eventual development of AD.

#### Acknowledgments

This study is part of the doctoral thesis of one of the authors in Biological Sciences at UNAM. L.L.R. was a recipient of a CONACYT-scholarship (No. 210572). This work was partially supported by grants from the Graduate Biological Sciences Division, School of Medicine, UNAM, PAEP 2013, PAPIIT (IN224011); CONACYT (0129932), and ECOS France-Mexico (M09S02)-CONACYT (189453).

#### References

- Aleardi, A.M., Benard, G., Augereau, O., Malgat, M., Talbot, J.C., Mazat, J.P., Letellier, T., Dachary-Prigent, J., Solaini, G.C., Rossignol, R., 2005. Gradual alteration of mitochondrial structure and function by beta-amyloids: importance of membrane viscosity changes, energy deprivation, reactive oxygen species production, and cytochrome c release. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 207–225.
- American Diabetes Association, 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 (Suppl. 1), S81–S90.
- Baptista, F.L., Pinto, M.J., Elvas, F., Almeida, R.D., Ambrósio, A.F., 2013. Diabetes alters KIF1A and KIF5B motor proteins in the hippocampus. *PLoS One* 8, e65515.
- Ba-Tin, L., Strike, P., Tabet, N., 2011. Diabetic peripheral microvascular complications: relationship to cognitive function. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 2011, 723434.
- Biessels, G.J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., Scheltens, P., 2006. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol.* 5, 64–74.
- Bloemer, J., Bhattacharya, S., Amin, R., Suppiramaniam, V., 2014. Impaired insulin signaling and mechanisms of memory loss. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 121, 413–449.
- Bobba, A., Amadoro, G., Valenti, D., Corsetti, V., Lassandro, R., Atlante, A., 2013. Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by  $\beta$ -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion* 13, 298–311.
- Bornstein, N.M., Brainin, M., Guekht, A., Skoog, I., Korezyn, A.D., 2014. Diabetes and the brain: issues and unmet needs. *Neurol. Sci.* 35, 995–1001.
- Botero, L.E., Toro, A.E., Patiño, A.J., Salazar, G., Rodríguez, J.C., Suárez-Escudero, J.C., Alarcón, G.A., Corcimar, A., Osorio, C., Jeong, J.S., Alzate, O., 2012. Diabetes mellitus in patients with Alzheimer's disease: clinical description and correlation with the APOE genotype in a sample population from the province of Antioquia, Colombia. *Biomedica* 32, 239–251.
- Boudina, S., Sena, S., Theobald, H., Sheng, X., Wright, J.J., Hu, X.X., Aziz, S., Johnson, J.L., Bugger, H., Zaha, V.G., Abel, E.D., 2007. Mitochondrial energetics in the heart in obesity related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes* 56, 2457–2466.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820.
- Butkinaree, C., Park, K., Hart, G.W., 2010. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 96–106.
- Cao, M., Jiang, J., Du, Y., Yan, P., 2012. Mitochondria-targeted antioxidant attenuates high glucose-induced P38 MAPK pathway activation in human neuroblastoma cells. *Mol. Med. Rep.* 5, 929–934.
- Cao, W., Cao, J., Huang, J., Yao, J., Yan, G., Xu, H., Yang, P., 2013. Discovery and confirmation of O-GlcNAcylated proteins in rat liver mitochondria by combination of mass spectrometry and immunological methods. *PLoS One* 8, e76399.
- Cardoso, S., Correia, S.C., Santos, R.X., Carvalho, C., Candeias, E., Duarte, A.I., Plácido, A.I., Santos, M.S., Moreira, P.I., 2013. Hyperglycemia, hypoglycemia and dementia: role of mitochondria and uncoupling proteins. *Curr. Mol. Med.* 13, 586–601.
- Chatham, J.C., Nöt, L.G., Fülöp, N., Marchase, R.B., 2008. Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma. *Shock* 29,

- Crane, P.K., Walker, R., Hubbard, R.A., Li, G., Nathan, D.M., Zheng, H., Haneuse, S., Craft, S., Montine, T.J., Kahn, S.E., McCormick, W., McCurry, S.M., Bowen, J.D., Larson, E.B., 2013. Glucose levels and risk of dementia. *N. Engl. J. Med.* 369, 540–548.
- Espinoza-Rojo, M., Iturralde-Rodríguez, K.I., Cháñez-Cárdenas, M.E., Ruiz-Tachiain, M.E., Aguilera, P., 2010. Glucose transporters regulation on ischemic brain: possible role as therapeutic target. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 10, 317–325.
- Fernyhough, P., Roy Chowdhury, S.K., Schmidt, R.E., 2010. Mitochondrial stress and the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 5, 39–49.
- Gangy, S., 2001. The role of cerebral amyloid  $\beta$  accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 115, 1121–1129.
- Gawłowski, T., Suarez, J., Scott, B., Torres-Gonzalez, M., Wang, H., Schwappacher, R., Han, X., Yates III, J.R., Hoshijima, M., Dillmann, W., 2012. Modulation of dynamin-related protein 1 (DRP1) function by increased O-linked- $\beta$ -N-acetylglucosamine modification (O-GlcNAc) in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 287, 30024–30034.
- Giaccari, A., Sorice, G., Muscogiuri, G., 2009. Glucose toxicity: the leading actor in the pathogenesis and clinical history of type 2 diabetes mechanisms and potentials for treatment. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 19, 365–377.
- Gu, Y., Ande, S.R., Mishra, S., 2011. Altered O-GlcNAc modification and phosphorylation of mitochondrial proteins in myoblast cells exposed to high glucose. *Arch. Biochem. Biophys.* 505, 98–104.
- Hanover, J.A., Krause, M.W., Love, D.C., 2010. The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 80–95.
- Hart, G.W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G., Lagerlof, O., 2011. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 825–858.
- Hebert, L.E., Scherr, P.A., Bienias, J.L., Bennett, D.A., Evans, D.A., 2003. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch. Neurol.* 60, 1119–1122.
- Hu, Y., Suarez, J., Fricovsky, E., Wang, H., Scott, B.T., Trauger, S.A., Han, W., Hu, Y., Oyeleye, M.O., Dillmann, W.H., 2009. Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *J. Biol. Chem.* 284, 547–555.
- International Diabetes Federation (IDF) Diabetes Atlas, 2013. [http://www.idf.org/sites/default/files/EN\\_6E\\_Ch2\\_the\\_Global\\_Burden.pdf](http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Ch2_the_Global_Burden.pdf).
- Jiao, Y., Zhang, Y., Wei, Y., Liu, Z., An, W., Guo, M., 2012. Direct observation of internalization and ROS generation of amyloid  $\beta$ -peptide in neuronal cells at subcellular resolution. *ChemBiochem* 13, 2335–2338.
- Johnson, B., Opimba, M., Bernier, J., 2014. Implications of the O-GlcNAc modification in the regulation of nuclear apoptosis in T cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 191–198.
- Kawamura, T., Umemura, T., Hotta, N., 2012. Cognitive impairment in diabetic patients: can diabetic control prevent cognitive decline? *J. Diabetes Investig.* 3, 413–423.
- Kerti, L., Witte, A.V., Winkler, A., Grüttner, U., Rujescu, D., Flöel, A., 2013. Higher glucose levels associated with lower memory and reduced hippocampal microstructure. *Neurology* 81, 1746–1752.
- Kim, B., Backus, C., Oh, S., Feldman, E.L., 2013a. Hyperglycemia-induced tau cleavage in vitro and in vivo: a possible link between diabetes and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 34, 727–739.
- Kim, C., Nam, D.W., Park, S.Y., Song, H., Hong, H.S., Boo, J.H., Jung, E.S., Kim, Y., Baek, J.Y., Kim, K.S., Cho, J.W., Mook-Jung, I., 2013b. O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase inhibitor attenuates  $\beta$ -amyloid plaque and rescues memory impairment. *Neurobiol. Aging* 34, 275–285.
- Knopman, D.S., Penman, A.D., Catellier, D.J., Coker, L.H., Shibata, D.K., Sharrett, A.R., Mosley Jr., T.H., 2011. Vascular risk factors and longitudinal changes on brain MRI: the ARIC study. *Neurology* 76, 1879–1885.
- Lee, C.W., Shih, Y.H., Wu, S.Y., Yang, T., Lin, C., Kuo, Y.M., 2013. Hypoglycemia induces tau hyperphosphorylation. *Curr. Alzheimer Res.* 10, 298–308.
- Lefebvre, T., Dehennaut, V., Guinez, C., Olivier, S., Drougat, L., Mir, A.-M., Mortuaire, M., Vercoutter-Edouart, A.M., Michalski, J.C., 2010. Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 67–79 (A).
- Leuner, K., Müller, W.E., Reichert, A.S., 2012a. From mitochondrial dysfunction to amyloid beta formation: novel insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 46, 186–193.
- Leuner, K., Schütt, T., Kurz, C., Eckert, S.H., Schiller, C., Occhipinti, A., Mai, S., Jendrach, M., Eckert, G.P., Kruse, S.E., Palmiter, R.D., Brandt, U., Dröse, S., Wittig, I., Willem, M., Haass, C., Reichert, A.S., Müller, W.E., 2012b. Mitochondrion-derived reactive oxygen species lead to enhanced amyloid beta formation. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1421–1433.
- Lima, V.V., Spittler, K., Choi, H., Webb, R.C., Tostes, R.C., 2012. O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signaling in the cardiovascular system becoming sweeter? *Clin. Sci. (London)* 123, 473–486.
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Hart, G.W., Gong, C.X., 2004a. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10804–10809.
- Liu, K., Paterson, A.J., Zhang, F., McAndrew, J., Fukuchi, K., Wyss, J.M., Peng, L., Hu, Y., Kudlow, J.E., 2004b. Accumulation of protein O-GlcNAc modification inhibits proteasomes in the brain and coincides with neuronal apoptosis in brain areas with high O-GlcNAc metabolism. *J. Neurochem.* 89, 1044–1055.
- Liu, D., Chan, S.L., de Souza-Pinto, N.C., Slevin, J.R., Wersto, R.P., Zhan, M., Mustafa, K., de Cabo, R., Mattson, M.P., 2006. Mitochondrial UCP4 mediates an adaptive shift in energy metabolism and increases the resistance of neurons to metabolic and oxidative stress. *Neuromolecular Med.* 8, 389–414.
- Liu, J., Marchase, R.B., Chatham, J.C., 2007. Increased O-GlcNAc levels during reperfusion lead to improved functional recovery and reduced calpain proteolysis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H1391–H1399.
- L. Lozano et al. / *Experimental Gerontology* 58 (2014) 198–202
- Liu, F., Shi, J., Tanimukai, H., Gu, J., Gu, J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C.X., 2009. Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 132, 1820–1832.
- Liu, Y., Li, X., Yu, Y., Shi, J., Liang, Z., Run, X., Li, Y., Dai, C.L., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.X., 2012. Developmental regulation of protein O-GlcNAcylation. O-GlcNAc transferase, and O-GlcNAcase in mammalian brain. *PLoS One* 7, e43724.
- Love, D.C., Koehran, J., Cathey Shin, S.-H., Hanover, J.A., 2003. Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J. Cell Sci.* 116, 647–654.
- Lozano, L., Alvarado-Vásquez, N., Zomosa, V., Limón, D., Lefebvre, T., Zenteno, E., Guevara, J., 2013. Effect of  $\beta$ -amyloid 25–35 peptide on the O-GlcNAcylation and phosphorylation tau protein in hyperglycemic rats. 24th Joint Glycobiology Meeting, Wittenberg, Germany, 24th–26th November.
- Ma, J., Hart, G.W., 2013. Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert Rev. Proteomics* 10, 365–380.
- Marsh, S.A., Chatham, J.C., 2011. The paradoxical world of protein O-GlcNAcylation: a novel effector of cardiovascular dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 89, 487–488.
- Marsh, S.A., Dell'Italia, L.J., Chatham, J.C., 2011. Activation of the hexosamine biosynthesis pathway and protein O-GlcNAcylation modulate hypertrophic and cell signaling pathways in cardiomyocytes from diabetic mice. *Amino Acids* 40, 819–828.
- Marsh, S.A., Powell, P.C., Dell'Italia, L.J., Chatham, J.C., 2013. Cardiac O-GlcNAcylation blunts autophagic signaling in the diabetic heart. *Life Sci.* 92, 648–656.
- Mattson, M.P., 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol. Rev.* 77, 1081–1132.
- McClain, D.A., 2002. Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *J. Diabetes Complications* 16, 72–80.
- McClain, D.A., Crook, E.D., 1996. Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes* 45, 1003–1009.
- Messier, C., 2004. Glucose improvement of memory: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 33–57.
- Moreira, P.I., Santos, M.S., Seiga, R., Oliveira, C.R., 2007. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. *J. Neurol. Sci.* 257, 206–214.
- Nakamura, M., Barber, A.J., Antonetti, D.A., LaNoue, K.F., Robinson, K.A., Buse, M.G., Gardner, T.W., 2001. Excessive hexosamines block the neuroprotective effect of insulin and induce apoptosis in retinal neurons. *J. Biol. Chem.* 276, 43748–43755.
- Neumann, K.F., Rojo, L., Navarrete, L.P., Farias, G., Reyes, P., Maccioni, R.B., 2008. Insulin resistance and Alzheimer's disease: molecular links & clinical implications. *Curr. Alzheimer Res.* 5, 438–447.
- Ngo, G.A., Watson, L.J., Facundo, H.T., Jones, S.P., 2011. Augmented O-GlcNAc signalling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. *Amino Acids* 40, 895–911.
- Pasquier, F., Boulogne, A., Leys, D., Fontaine, P., 2006. Diabetes mellitus and dementia. *Diabetes Metab. Syndr (5 Pt 1)*, 403–414.
- Pekkmurz, G., Trinidad, J.C., Wang, X., Kong, D., Schwarz, T.L., 2014. Glucose regulates mitochondrial motility via Milton modification by O-GlcNAc transferase. *Cell* 158, 54–68.
- Piaceri, I., Nacmias, B., Sorbi, S., 2013. Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 5, 167–177.
- Querfurth, H.W., LaFerla, F.M., 2010. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 28, 329–344.
- Reddy, P.H., 2009. Role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *CNS Spectr.* 14 (8 Suppl. 7), 8–13.
- Rehni, A.K., Nautiyal, N., Perez-Pinzon, M.A., Dave, K.R., 2014. Hyperglycemia/hypoglycemia-induced mitochondrial dysfunction and cerebral ischemic damage in diabetics. *Metab. Brain Dis.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11011-014-9538-z> (Apr 16).
- Ren, R., Zhang, Y., Li, B., Wu, Y., Li, B., 2011. Effect of  $\beta$ -amyloid (25–35) on mitochondrial function and expression of mitochondrial permeability transition pore proteins in rat hippocampal neurons. *J. Cell. Biochem.* 112, 1450–1457.
- Rosales-Corral, S., Acuna-Castroviejo, D., Tan, D.X., López-Armas, G., Cruz-Ramos, J., Munoz, R., Melnikov, V.G., Manchester, L.C., Reiter, R.J., 2012. Accumulation of exogenous amyloid-beta peptide in hippocampal mitochondria causes their dysfunction: a protective role for melatonin. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 843649.
- Ruan, H.B., Singh, J.P., Li, M.D., Wu, J., Yang, X., 2013. Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 301–309.
- Russell, J.W., Golovoy, D., Vincent, A.M., Mahendru, P., Olzmann, J.A., Mentzer, A., Feldman, E.L., 2002. High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB J.* 16, 1738–1748.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z., 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87, 4–14.
- Shen, G.X., 2012. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* 12, 106–112.
- Shin, S.H., Love, D.C., Hanover, J.A., 2011. Elevated O-GlcNAc-dependent signaling through inducible mOGT expression selectively triggers apoptosis. *Amino Acids* 40, 885–893.
- Singh, A., Donnino, R., Weintraub, H., Schwartzbard, A., 2013. Effect of strict glycemic con-

- trol in patients with diabetes mellitus on frequency of macrovascular events. *Am. J. Cardiol.* 112, 1033-1038.
- Springhorn, C., Matsha, T.E., Erasmus, R.T., Essop, M.F., 2012. Exploring leukocyte OGlcNAcylation as a novel diagnostic tool for the earlier detection of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 4640-4649.
- Spuch, C., Ortolano, S., Navarro, C., 2012. New insights in the amyloid-beta interaction with mitochondria. *J. Aging Res.* 2012, 324968.
- Strachan, M.W., Deary, I.J., Ewing, F.M., Frier, B.M., 1997. Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. *Diabetes Care* 20, 438-445.
- Suárez-Calvet, M., Belbin, O., Pera, M., Badiola, N., Magrané, J., Guardia-Laguarda, C., Muñoz, L., Colom-Cadena, M., Clarimón, J., Lleó, A., 2014. Autosomal-dominant Alzheimer's disease mutations at the same codon of amyloid precursor protein differentially alter A $\beta$  production. *J. Neurochem.* 128, 330-339.
- Takeda, S., Sato, N., Uchio-Yamada, K., Yu, H., Moriguchi, A., Rakugi, H., Morishita, R., 2012. Oral glucose loading modulates plasma  $\beta$ -amyloid level in Alzheimer's disease patients: potential diagnostic method for Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 34, 25-30.
- Tan, E.P., Villar MT, E.L., Lu, J., Selfridge, J.E., Artigues, A., Swerdlow, R.H., Slawson, C., 2014. Altering O-linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine cycling disrupts mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* 289, 14719-14730.
- Tang, J., Pei, Y., Zhou, G., 2013. When aging-onset diabetes is coming across with Alzheimer disease: comparable pathogenesis and therapy. *Exp. Gerontol.* 48, 744-750.
- Tomlinson, D.R., Gardiner, N.J., 2008. Glucose neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 36-45.
- Viola, K.L., Velasco, P.T., Klein, W.L., 2008. Why Alzheimer's is a disease of memory: the attack on synapses by A beta oligomers (ADDLs). *J. Nutr. Health Aging* 12, S51-S57.
- Wahlster, L., Arimon, M., Nasser-Ghods, N., Post, K.L., Serrano-Pozo, A., Uemura, K., Berezovska, O., 2013. Presenilin-1 adopts pathogenic conformation in normal aging and in sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 125, 187-199.
- Wang, X., Song, X., Takata, T., Miichi, Y., Yokono, K., Sakurai, T., 2010. Amyloid- $\beta$  neurotoxicity restricts glucose window for neuronal survival in rat hippocampal slice cultures. *Exp. Gerontol.* 45, 904-908.
- Wirz, K.T., Keitel, S., Swaab, D.F., Verhaagen, J., Bossers, K., 2014. Early molecular changes in Alzheimer disease: can we catch the disease in its presymptomatic phase? *J. Alzheimers Dis.* 38, 719-740.
- World Health Organization, 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en>. Yang, Y.R., Suh, P.G., 2014. O-GlcNAcylation in cellular functions and human diseases. *Adv. Biol. Regul.* 54, 68-73.
- Yuzwa, S.A., Shan, X., Macauley, M.S., Clark, T., Skorobogatko, Y., Vosseller, K., Vocadlo, D.J., 2012. Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat. Chem. Biol.* 8, 393-399.
- Zhao, L., Feng, Z., Zou, X., Cao, K., Xu, J., Liu, J., 2014. Aging leads to elevation of O-GlcNAcylation and disruption of mitochondrial homeostasis in retina. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 425705.

## 24.-ANEXO B.

### I.- Determinación de hemoglobina glicosilada

Después de preparar un hemolizado, donde se elimina la fracción lábil, las hemoglobinas son retenidas por una resina de intercambio catiónico, eluyéndose de forma específica la hemoglobina A1c (HbA1c) previa eliminación por lavado de la Hemoglobina A1a+b (HbA1a+b) 1. La estimación del porcentaje de la Hb A1c se realiza por lectura de la absorbancia a 415 nm.

COMPOSICIÓN 1. Reactivo. Ftalato de potasio 50 mmol/L, detergente 5 g/L, azida de sodio 0,95 g/L, pH 5,0. 2. Reactivo. Tampón fosfatos 30 mmol/L, pH 6,5, azida de sodio 0,95 g/L. 3. Reactivo. Tampón fosfatos 72 mmol/L, pH 6,5, azida de sodio 0,95 g/L. 4. Microcolumnas. Contienen resina de intercambio catiónico equilibrada con tampón fosfatos 72 mmol/L, pH 6,5, azida de sodio 0,95 g/L. Utilizar únicamente Microcolumnas (4) y reactivos 2 y 3 del mismo número de lote. CONSERVACIÓN Conservar a 15-30°C. Reactivos estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso. Indicaciones de deterioro: Reactivos: Presencia de partículas, turbidez. Microcolumnas (4): Ausencia de tampón sobre el lecho de la resina. EQUIPO ADICIONAL Fotómetro para lecturas a 415 nm (405-425) MUESTRAS Sangre total recogida mediante procedimientos estándar. La Hemoglobina A1C es estable 7 días a 2-8°C. Puede utilizarse heparina o EDTA como anticoagulante. PROCEDIMIENTO Preparación del hemolizado y eliminación de la fracción lábil 1. Dejar atemperar reactivos y columnas durante unos minutos, hasta que alcancen la temperatura ambiente (21-26°C)

2. Pipetear en un tubo de ensayo: Sangre 50 L Reactivo (1) 200 L 3. Agitar y dejar a temperatura ambiente durante 10-15 min. Este hemolizado se utilizará en los pasos 6 y 11. Preparación de la columna (Notas 2 y 3) 4. Destapar la parte superior de la columna y romper a continuación la lengüeta inferior. 5. Con la ayuda del extremo plano de una pipeta, bajar el

disco superior hasta el nivel de la resina, evitando comprimirla. Dejar gotear hasta que el líquido alcance el nivel del disco, desechando el eluido. Separación y lectura de la HbA1c 6. Aplicar cuidadosamente sobre el disco superior: Hemolizado 50 L Desechar el eluido 7. Cuando haya penetrado todo el hemolizado añadir, procurando arrastrar los posibles restos del mismo: Reactivo (2) 200 L Desechar el eluido 8. Pipetear: Reactivo (2) 2,0 mL Desechar el eluido 9. Colocar la columna sobre un tubo de ensayo y añadir: Reactivo (3) 4,0 mL Recoger el eluido (Fracción HbA1c) 10. Agitar bien y leer la absorbancia de la fracción HbA1c a 415 nm frente a agua destilada (AHbA1c). La absorbancia es estable durante al menos una hora. Lectura de la HbTOTAL 11. Pipetear en un tubo de ensayo: Reactivo (3) 12,0 mL Hemolizado 50 L 12. Agitar bien y leer la absorbancia de la HbTOTAL a 415 nm frente a agua destilada (AHb TOTAL). La absorbancia es estable durante al menos una hora. CÁLCULOS El tanto por ciento de HbA1c en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:  $100 \times \frac{A_{HbA1c}}{A_{HbTOTAL}} \times \frac{V_{HbTOTAL}}{V_{HbA1c}}$  El volumen de HbA1c (VHbA1c) es 4 mL, el volumen de Hb total (VHbTOTAL) es 12 mL. Se deduce la fórmula siguiente para el cálculo de la concentración:  $\%HbA1c = \frac{A_{HbA1c}}{A_{HbTOTAL}} \times 300$  % Los resultados obtenidos con el presente método, pueden convertirse en equivalentes a los de un método certificado según el US National.

Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP), o en equivalentes a los del método estandarizado por la International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), mediante las siguientes fórmulas:  $\%HbA1c-NGSP = 0,86 \times \%HbA1c-BioSystems + 0,24$   $\%HbA1c-IFCC = 0,94 \times \%HbA1c-BioSystems - 2,09$  VALORES DE REFERENCIA Los siguientes valores discriminantes han sido establecidos por el Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT) y han sido aceptados en varios países para la población no diabética y para la evaluación del grado de control de la glucosa en sangre en pacientes diabéticos<sup>2,3</sup>. DCCT / NGSP IFCC BioSystems Grado de control 4,0 - 6,0 2,0 - 4,2 4,4 - 6,7 No diabético

6,0 - 6,5 4,2 - 4,8 6,7 - 7,3 Objetivo 6,5 - 8,0 4,8 - 6,4 7,3 - 9,1 Buen control > 8,0 > 6,4 > 9,1 Precisa actuación CONTROL DE CALIDAD Se recomienda el uso de los Controles de Hemoglobina A1C, Normal (cod. 18001) y Elevado (cod. 18002), para verificar la funcionalidad del procedimiento de medida. Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables. CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS Límite de detección: Menor que 4,3 %. Límite de linealidad: Mayor que 17,0 %. Repetibilidad (intraserie): Concentración media CV n 7,2 % 5,4 % 25 9,9 % 6,3 % 25 Reproducibilidad (interserie): Concentración media CV n 7,2 % 7,3 % 25 9,9 % 5,9 % 25 Veracidad: Al comparar los resultados obtenidos con este método con los de un método certificado por NGSP, se obtiene la siguiente ecuación: (%HbA1C-BS) = 1,17 x (% HbA1C-Certified) – 0,28.

## II. Fijado y congelación de los tejidos para cortes con criostato.

Se sumergió el cerebro en paraformaldehído al 4% disuelto en PBS a pH 7.4 relación 4 a 1.

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 boques 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.

III.- 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

## IV.- HEMATOXILINA DE HARRIS

Se pone a hervir 1000ml de agua destilada y ya que hierve 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 ácido acético concentrado y se filtra, una vez preparado se guarda en una botella ámbar y se pone en un lugar oscuro.

## 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

V.- 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 intenzó
- 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 de violeta de Cresilo.

Sol. Matriz de violeta de cresilo – 1ml

Sol. Estabilizadora 100ml.

VI.- 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 Ca<sup>2</sup> 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 Ca<sup>2</sup> 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-Ca<sup>2</sup>+ 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-Ca<sup>2</sup>+ 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.- Contra-tinción 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.

VII.- 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 50 ml 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 sumergido 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 Ca<sup>2</sup> 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 Ca<sup>2</sup> 1mM+ PARA LECTINAS).

10.- Lavar con PBS por 5 minutos (PBS Ca<sup>2</sup> 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 Ca<sup>2</sup> 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.

#### VIII.- TINCION POR PLATA

##### SOLUCION FIJADORA (1L)

Metanol 40% 400 ml

Formaldehído 5% 50 ml

##### SOLUCION DE PLATA (1L)

AgNO<sub>3</sub> 0.1% 1 g

##### SOLUCION PRETRATAMIENTO (1L)

Tiosulfito de sodio 0.02 % 0.2 g

##### SOLUCION REVELADORA (1L)

Carbonato de sodio 3 % 30 g

\*formaldehído 0.05 % 1 ml

\*Solución pretratamiento 200  $\mu$ l

Las soluciones marcadas con \* se agregan en el momento.

## PROCEDIMIENTO

1. Agregar solución fijadora (10 min)
2. Lavar dos veces con agua destilada (5 min)
3. Añadir solución de pretratamiento (1 min)
4. Enjuagar dos veces con agua destilada
5. Bañar con solución de plata (5 min)
6. Enjuagar con agua destilada
7. Enjuagar con solución de pretratamiento
8. Agregar solución reveladora (dejar en esta solución hasta que se observen las bandas con la intensidad que se desee)
9. Detener la reacción con ácido cítrico 2.3 M
10. Lavar con agua destilada
11. Secar en solución de etanol 10 % + glicerol 4%.
12. Todo con agitación constante.

IX.- Técnicas de fraccionamiento y separación celular.

Los concentrados celulares fueron lavados con buffer de fosfatos salina (fosfato 20mM, NaCl 150mM y pH de 7.5), se resuspenden en PBS con inhibidor de proteasas (PMSF 1mM, leupeptina 5 $\mu$ g y pepstatina 5 $\mu$ g/ml) y 500 $\mu$ g de Digitonina, se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente descrito por Kearns y Hart.

Después de centrifugar a 200Xg por 10 min a 4°C, el sobrenadante corresponde al material citosólico mientras el precipitado, corresponde a contenido nuclear membranas y fracciones, el precipitado es lavado con

PBS y las membranas se solubilizan en buffer de Hepes 50mM, NaCl 500mM, Triton 2% 100X con inhibidor de proteasas.

1.- Solución de PBS a 7.4-7.2

- Tritón X-100 al 1%

- Inhibidor de proteasas (pastilla de Roche) Minicomplit 1/4 tab. por 10ml

Se obtiene el tejido, se pesa

Se homogeniza con el buffer 500µl, con este volumen se inicia y de ser necesario se va agregando 50µl adicionales hasta un volumen máximo de 2000µl para 500mg de tejido.

Se homogeniza sin hacer burbujas por proteína (hay pero solo del tritón (suavemente)).

Se recupera la muestra con pipeta Pasteur para recuperar lo más posible de tejido.

Se transfiere a tubos tipo eppendorf

Se centrifuga a 4°C 3000rpm por 15 min.

El sobrenadante lo recupero

Congelar el pellet o precipitado a -70°C

El sobrenadante se pasa a un tubo y se somete a 12000 o 14000 (probar) X30min a 4°C.

Se obtienen las mitocondrias, se separan y se conserva la fracción soluble el sobrenadante y se buscan las mitocondrias.

El sobrenadante se centrifuga a 18000(o 16000) RPM X45 min 2 veces.

Descartar el sobrenadante y en el botón están las mitocondrias.

Se determina proteína por Lowry.

Se prepara gel de poliacrilamida al 10% y se revisa las fracciones condiciones.

Se mete así en el gel.

Se agrega DOC al 2% 1/1 relación al 0.09% ya con 50% de proteína aislada a con DOC se mete directo al gel ya que si tiene DOC ya no se puede congelar.

Se hierve se agrega B-mercapto y se corre.

X.- Western Blott.

Se realiza determinación de proteína por kit BCA (Pierce) migración celular mediante gel de poliacrilamida al 10% agregando 10µg por carril de proteína.

La transferencia de proteínas se realizó en membrana de nitrocelulosa, la confirmación se realizó mediante rojo Ponceau, Los biots son saturados en TBS-Tween (Tris 15mM, NaCl 140 mM, Tween 20 0.5ml/l) contienen 30 g/l BSA por 45 min, Las proteínas fueron analizadas con anticuerpos policlonales IgG de conejo a P-Tau-Ser-396 y P-Thr-231 fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, (Dallas, TX, EE.UU.), y se utiliza en una dilución 1: 100 para inmunohistoquímica y al 1: 1000 para Western blot. Los anticuerpos frente a GSK3 y O-glicosiltransferasa (OGT) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, y se utilizaron en una dilución 1: 100 para inmunohistoquímica y al 1: 1000 para la inmunotransferencia de tipo Western. Los anticuerpos frente a O-GlcNAc y GAPDH se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology, y se utilizaron en una dilución 1: 1000 para la inmunotransferencia de tipo Western. VectaShield más DAPI se adquirió de Vector Lab. Secondary-anticuerpos acoplados a FITC IgG (anti-conejo y anti-ratón) o rodamina IgG (anti-conejo y anti-ratón) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology.