



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR  
UNIVERSIDAD DE OVIEDO

# **ALTERACIONES EN LA SÍNTESIS DEL HEPARÁN SULFATO EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TESIS DOCTORAL  
NATALIA PÉREZ LÓPEZ  
OVIEDO, 2021





Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR  
UNIVERSIDAD DE OVIEDO

# **ALTERACIONES EN LA SÍNTESIS DEL HEPARÁN SULFATO EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TESIS DOCTORAL  
NATALIA PÉREZ LÓPEZ  
OVIEDO, 2021



## **AGRADECIMIENTOS**

Aunque anteponiéndose a la redacción de la tesis doctoral, los agradecimientos suelen redactarse al final, puesto que a lo largo de este intenso camino te cruzas en tu andar con extraordinarias personas que contribuyen a que sea posible.

En primer lugar, es mi deseo agradecer a mis directores de tesis haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto. Gracias a su apoyo, dedicación, paciencia y magistral orientación, ha sido posible y ha visto la luz.

A mis compañeros de laboratorio, por su paciencia y desinteresada ayuda, que permitió conciliar mi actividad laboral con las contingencias de la investigación y su metodología.

Y por supuesto, a mi familia, que son mi ejemplo, mi inspiración y mi motor hacia la excelencia; que siempre me han apoyado e impulsado para que lograra mis metas, creyendo en mí y minimizando las cuestiones logísticas, y me recuerdan cada día que el límite está allí donde tú lo pongas.

A mi hijo Alejandro, al que he robado muchas horas de juegos y cariño, y sin embargo siempre me esperaba con la mayor de sus sonrisas y su incondicional amor, deseo que aprenda que esforzarse, siempre merece la pena. A él.



## ABREVIATURAS

<b>Aa:</b> Aminoácido	<b>Ig:</b> Inmunoglobulina
<b>ACT:</b> Actina	<b>KS:</b> Keratán sulfato
<b>ADNasa:</b> Desoxirribonucleasa	<b>LB:</b> Lámina basal
<b>AGRN:</b> Agrina	<b>LCR:</b> Líquido cefalorraquídeo
<b>AINE:</b> Antiinflamatorio no esteroideo	<b>LDL:</b> Lipoproteína de baja densidad
<b>APOE:</b> Apolipoproteína E	<b>MEC:</b> Matriz extracelular
<b>ARNasa:</b> Ribonucleasa	<b>MMSE:</b> Mini Examen del Estado Mental (del inglés Mini mental state examination)
<b>AT:</b> Antitrombina	<b>N-CAM:</b> Molécula de adhesión celular neural
<b>βa:</b> beta-amiloide	<b>NDST:</b> N-deacetilasa/N-sulfotransferasa
<b>BHE:</b> Barrera hematoencefálica	<b>OMS:</b> Organización Mundial de la Salud
<b>CAA:</b> angiopatía amiloidea congofílica o cerebral	<b>ONF:</b> Ovillo neurofibrilar
<b>CS:</b> Condroitín sulfato	<b>ONF-I:</b> Ovillo neurofibrilar intracelular
<b>dNTPs:</b> Desoxinucleótidos trifosfatos	<b>ONF-E:</b> Ovillo neurofibrilar extracelular
<b>Dominio NA:</b> Dominio muy acetilado del heparán sulfato	<b>PBS:</b> tampón fosfato salino
<b>Dominio NA/NS:</b> Dominio acetilado y sulfatado del heparán sulfato	<b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa
<b>Dominio NS:</b> Dominio muy sulfatado del heparán sulfato	<b>PG:</b> Proteoglicano
<b>EA:</b> Enfermedad de Alzheimer	<b>PPA:</b> Proteína precursora de amiloide
<b>EGF:</b> Factor de crecimiento epidérmico	<b>PRCAN:</b> Perlecano
<b>EXT-1 y 2:</b> Sintetasas del heparán sulfato	<b>PS:</b> Placa senil
<b>EXTL:</b> N-acetilglucosaminiltransferasa 1	<b>PSEN:</b> Presenilina
<b>FGF:</b> Factor de crecimiento de fibroblastos	<b>qRT-PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
<b>GAG:</b> Glicosaminoglicano	<b>RT polimerasa:</b> Polimerasa de transcripción inversa
<b>Gal:</b> Galactosa	<b>SDC:</b> Sindecano
<b>GAPDH:</b> Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	<b>SRGN:</b> Serglicina
<b>GlcA:</b> Ácido glucurónico	<b>SULF:</b> Heparán sulfato sulfatasa
<b>GLCE:</b> Glucuronil C-5 epimerasa	<b>TGFβ:</b> Factor de crecimiento transformante beta
<b>GlcN:</b> Glucosamina	<b>UDP-Gal:</b> Uridindifosfo-galactosa
<b>GlcNAc:</b> N-acetilglucosamina	<b>UDP-GlcA:</b> Uridindifosfo-ácido glucurónico
<b>GlcNS:</b> Glucosamina N-sulfato	<b>UDP-GlcNAc:</b> Uridindifosfo-N-acetilglucosamina
<b>GPC:</b> Glipicano	<b>UDP-Xyl:</b> Uridindifosfo-xilosa
<b>HPSE:</b> Heparanasa	<b>Xyl:</b> Xilosa
<b>HS:</b> Heparán sulfato	<b>LB:</b> Lámina basal
<b>HS2ST:</b> Heparán sulfato 2-O-sulfotransferasa	
<b>HS3ST:</b> Heparán sulfato 3-O-sulfotransferasa	
<b>HSPG:</b> Proteoglicano de heparán sulfato	
<b>IdoA:</b> Ácido idurónico	
<b>IHQ:</b> Inmunohistoquímica	





# ÍNDICE

<b>PREFACIO</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Las demencias</b> .....	<b>5</b>
1.1. Etimología .....	5
1.2. Breve contextualización histórica.....	5
1.3. Epidemiología.....	6
<b>2. Enfermedad de Alzheimer</b> .....	<b>7</b>
2.1. Clasificación .....	8
2.2. Manifestaciones clínicas.....	10
2.3. Histopatología.....	11
2.3.1. Amiloide en la enfermedad de Alzheimer .....	11
2.3.2. Proteína Tau.....	15
2.4. Progresión de las lesiones.....	16
2.5. Etiopatogenia.....	18
2.5.1. Hipótesis .....	19
2.5.2. Factores de riesgo .....	21
2.6. Diagnóstico.....	24
2.7. Tratamiento.....	26
<b>3. Proteoglicanos y glicosaminoglicanos</b> .....	<b>27</b>
3.1. Proteoglicanos de heparán sulfato .....	30
3.1.1 Proteoglicanos de heparán sulfato de superficie celular .....	32
3.1.2. Proteoglicanos de heparán sulfato de matriz extracelular.....	35
3.1.3. Proteoglicanos de heparán sulfato citoplasmáticos/otros proteoglicanos .....	38
3.2. Biosíntesis del heparán sulfato .....	39
3.2.1. Inicio de la síntesis de la cadena .....	39
3.2.2. Polimerización de la cadena .....	40
3.2.3. Modificación de la cadena .....	41
a.N-deacetilación/N-sulfatación .....	41
b.Epimerización .....	42
c.O-sulfataciones .....	42
3.2.4. Modificaciones del heparán sulfato posteriores a la síntesis .....	43
a.Sulfotransferasas (sulfatasas extracelulares .....	43
b.Heparanasa.....	44
3.3. Funciones del heparán sulfato .....	44
3.3.1. Papel fisiológico .....	45

3.3.2. Patología .....	46
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>51</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
<b>1. Selección de pacientes y muestras .....</b>	<b>53</b>
<b>2. Materiales.....</b>	<b>54</b>
<b>3. Aislamiento de ARN.....</b>	<b>55</b>
<b>4. Obtención del ADNc: reacción de transcripción reversa.....</b>	<b>55</b>
<b>5. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR).....</b>	<b>56</b>
<b>6. Inmunohistoquímica .....</b>	<b>58</b>
<b>7. Análisis de datos .....</b>	<b>58</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
<b>1. Alteraciones de la transcripción de los genes de biosíntesis del heparán sulfato en distintas zonas del cerebro .....</b>	<b>59</b>
1.1. Alteraciones en la región transentorrinal (amígdala).....	59
1.1.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena.....	59
1.1.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación .....	60
1.1.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico.....	61
1.1.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina .....	61
1.1.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares.....	63
1.2. Alteraciones en hipocampo anterior .....	63
1.2.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena.....	63
1.2.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación .....	64
1.2.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico.....	64
1.2.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina .....	64
1.2.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares.....	65
1.3. Alteraciones en hipocampo posterior .....	66
1.3.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena.....	66
1.3.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación .....	66
1.3.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico.....	67
1.3.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina .....	67
1.3.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares.....	68
1.4. Alteraciones en claustrum.....	68
1.4.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena.....	69
1.4.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación .....	69
1.4.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico.....	70
1.4.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina .....	70

1.4.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares.....	71
1.5. Alteraciones en cisura calcarina .....	71
1.5.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena.....	71
1.5.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación .....	72
1.5.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico .....	72
1.5.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina .....	73
1.5.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares.....	74
1.6. Alteraciones en globo pálido .....	74
1.6.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena.....	74
1.6.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación .....	75
1.6.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico .....	76
1.6.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina .....	76
1.6.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares.....	77
1.7. Alteraciones en cerebelo.....	77
1.7.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena.....	77
1.7.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación .....	78
1.7.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico .....	78
1.7.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina .....	79
1.7.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares.....	79
<b>2. Evaluación de las alteraciones observadas en la transcripción génica .....</b>	<b>81</b>
<b>3. Correlaciones en las alteraciones de la transcripción génica .....</b>	<b>87</b>
<b>4. Detección de alteraciones en la estructura de las cadenas de heparán sulfato en la enfermedad de Alzheimer mediante inmunohistoquímica .....</b>	<b>93</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>97</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>137</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> PROCESAMIENTO DE LA APP Y PRODUCTOS DE ESCISIÓN: VÍA NO AMILOIDOGÉNICA Y VÍA AMILOIDOGÉNICA .....	13
<b>FIGURA 2.</b> MECANISMO DE PRODUCCIÓN, DEGRADACIÓN Y DEPOSICIÓN DE BA EN LAS ARTERIAS DE LA CORTEZA.....	14
<b>FIGURA 3.</b> REPRESENTACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE PS Y DE ONFS INTRA Y EXTRACELULARES EN TEJIDO CEREBRAL.....	16
<b>FIGURA 4.</b> DEPÓSITO DE PROTEÍNA TAU Y PLACAS DE AMILOIDE .....	18
<b>FIGURA 5.</b> HIPÓTESIS INICIAL DE LA CASCADA AMILOIDEA.....	20
<b>FIGURA 6.</b> ALGORITMO DIAGNÓSTICO PARA LA EA.....	25
<b>FIGURA 7.</b> ESTRUCTURA DE UN PROTEOGLICANO. ....	27
<b>FIGURA 8.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA UNIDAD DISACARÍDICA .....	28
<b>FIGURA 9.</b> TIPOS DE PROTEOGLICANOS DE HEPARÁN SULFATO Y SUS DIFERENTES LOCALIZACIONES.....	32
<b>FIGURA 10.</b> PROTEOGLICANOS DE HEPARÁN SULFATO DE LA SUPERFICIE CELULAR ....	32
<b>FIGURA 11.</b> ESTRUCTURA DE LOS SDCS.....	33
<b>FIGURA 12.</b> ESQUEMA DE UN GLIPICANO .....	34
<b>FIGURA 13.</b> MOLÉCULA DE PERLECANO CON LOS 5 DOMINIOS .....	36
<b>FIGURA 14.</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS ENZIMAS DE LA BIOSÍNTESIS DEL HEPARÁN SULFATO.....	39
<b>FIGURA 15.</b> MACRÓFAGOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	48
<b>FIGURA 16.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE LA POLIMERIZACIÓN DE LA CADENA EN AMÍGDALA .....	60
<b>FIGURA 17.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE N-DEACETILACIÓN/N-SULFATACIÓN, GENES MODIFICADORES DEL RESIDUO DE ÁCIDO URÓNICO Y GENES RESPONSABLES DE C-6 SULFATACIÓN EN AMÍGDALA .....	61
<b>FIGURA 18.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE C-3 SULFATACIÓN Y GENES RESPONSABLES DE ENDOSULFATASAS EXTRACELULARES EN AMÍGDALA .....	62
<b>FIGURA 19.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE LA POLIMERIZACIÓN DE LA CADENA EN HIPOCAMPO ANTERIOR .....	63
<b>FIGURA 20.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE N-DEACETILACIÓN/N-SULFATACIÓN, GENES MODIFICADORES DEL RESIDUO DE ÁCIDO URÓNICO Y GENES RESPONSABLES DE C-6 SULFATACIÓN EN HIPOCAMPO ANTERIOR ....	64

<b>FIGURA 21.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE C-3 SULFATACIÓN Y GENES RESPONSABLES DE ENDOSULFATASAS EXTRACELULARES EN HIPOCAMPO ANTERIOR .....	65
<b>FIGURA 22.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE LA POLIMERIZACIÓN DE LA CADENA EN HIPOCAMPO POSTERIOR .....	66
<b>FIGURA 23.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE N- DEACETILACIÓN/N-SULFATACIÓN, GENES MODIFICADORES DEL RESIDUO DE ÁCIDO URÓNICO Y GENES RESPONSABLES DE C-6 SULFATACIÓN EN HIPOCAMPO POSTERIOR...	67
<b>FIGURA 24.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE C-3 SULFATACIÓN Y GENES RESPONSABLES DE ENDOSULFATASAS EXTRACELULARES EN HIPOCAMPO POSTERIOR .....	68
<b>FIGURA 25.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE LA POLIMERIZACIÓN DE LA CADENA EN CLAUSTRUM .....	69
<b>FIGURA 26.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE N- DEACETILACIÓN/N-SULFATACIÓN, GENES MODIFICADORES DEL RESIDUO DE ÁCIDO URÓNICO Y GENES RESPONSABLES DE C-6 SULFATACIÓN EN CLAUSTRUM .....	70
<b>FIGURA 27.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE C-3 SULFATACIÓN Y GENES RESPONSABLES DE ENDOSULFATASAS EXTRACELULARES EN CLAUSTRUM .....	71
<b>FIGURA 28.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE LA POLIMERIZACIÓN DE LA CADENA EN CISURA CALCARINA.....	72
<b>FIGURA 29.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE N- DEACETILACIÓN/N-SULFATACIÓN, GENES MODIFICADORES DEL RESIDUO DE ÁCIDO URÓNICO Y GENES RESPONSABLES DE C-6 SULFATACIÓN EN CISURA CALCARINA .....	73
<b>FIGURA 30.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE C-3 SULFATACIÓN Y GENES RESPONSABLES DE ENDOSULFATASAS EXTRACELULARES EN CISURA CALCARINA.....	74
<b>FIGURA 31.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE LA POLIMERIZACIÓN DE LA CADENA EN NÚCLEO PÁLIDO .....	75
<b>FIGURA 32.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE N- DEACETILACIÓN/N-SULFATACIÓN, GENES MODIFICADORES DEL RESIDUO DE ÁCIDO URÓNICO Y GENES RESPONSABLES DE C-6 SULFATACIÓN EN NÚCLEO PÁLIDO.....	75
<b>FIGURA 33.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE C-3 SULFATACIÓN Y GENES RESPONSABLES DE ENDOSULFATASAS EXTRACELULARES EN NÚCLEO PÁLIDO .....	76
<b>FIGURA 34.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE LA POLIMERIZACIÓN DE LA CADENA EN CEREBELO .....	77

<b>FIGURA 35.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE N-DEACETILACIÓN/N-SULFATACIÓN, GENES MODIFICADORES DEL RESIDUO DE ÁCIDO URÓNICO Y GENES RESPONSABLES DE C-6 SULFATACIÓN EN CEREBELO .....	78
<b>FIGURA 36.</b> TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE GENES RESPONSABLES DE C-3 SULFATACIÓN Y GENES RESPONSABLES DE ENDOSULFATASAS EXTRACELULARES EN CEREBELO .....	80
<b>FIGURA 37.</b> PORCENTAJE DE GENES CUYA TRANSCRIPCIÓN SE VE ALTERADA EN DIFERENTES GRADOS DE EA .....	83
<b>FIGURA 38.</b> PORCENTAJE DE GENES QUE EXPERIMENTAN SUB Y SOBRE EXPRESIÓN EN DIFERENTES GRADOS DE EA .....	84
<b>FIGURA 39.</b> PORCENTAJE DE GENES QUE EXPERIMENTAN ALTERACIONES EN SUS NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN EN DIFERENTES REGIONES CEREBRALES .....	85
<b>FIGURA 40.</b> DIAGRAMA DE VENN REPRESENTATIVO DE LAS CORRELACIONES POSITIVAS ENTRE DIFERENTES GENES DE LA SÍNTESIS DE LAS CADENAS DE HS .....	89
<b>FIGURA 41.</b> DIAGRAMA DE VENN REPRESENTATIVO DE LAS CORRELACIONES NEGATIVAS ENTRE DIFERENTES GENES DE LA SÍNTESIS DE LAS CADENAS DE HS .....	91
<b>FIGURA 42.</b> DETECCIÓN DEL EPITOPO 10E4 DEL HEPARÁN SULFATO, QUE INCLUYE RESIDUOS DE GLUCOSAMINA N-SULFATAD, EN SECCIONES CEREBRALES .....	94
<b>FIGURA 43.</b> DETECCIÓN DEL EPITOPO JM403 DEL HEPARÁN SULFATO, QUE INCLUYE RESIDUOS DE GLUCOSAMINA SIN SUSTITUCIÓN EN N, EN SECCIONES CEREBRALES .....	95

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1</b> GENES RELACIONADOS CON LOS ACÚMULOS DE PROTEÍNA TAU Y BA.....	23
<b>TABLA 2.</b> TIPOS DE PROTEOGLICANOS DE HS.....	31
<b>TABLA 3.</b> DATOS DE LAS MUESTRAS EMPLEADAS PARA LA REALIZACIÓN DEL TRABAJO .....	54
<b>TABLA 4.</b> ZONAS ANALIZADAS EN LAS MUESTRAS RECOGIDAS.....	54
<b>TABLA 5.</b> OLIGONUCLEÓTIDOS DIRECTOS Y REVERSOS UTILIZADOS Y CARACTERÍSTICAS DE LOS AMPLICONES OBTENIDOS .....	57
<b>TABLA 6.</b> GENES DE BIOSÍNTESIS DE HS CUYA TRANSCRIPCIÓN RESULTA ALTERADA EN LA EA, REPRESENTADOS EN FUNCIÓN DEL GRADO DE LA PATOLOGÍA Y LA REGIÓN CEREBRAL.....	81
<b>TABLA 7.</b> CORRELACIONES POSITIVAS ENTRE GENES RESPONSABLES DE LA SÍNTESIS DE LAS CADENAS DE HS .....	88
<b>TABLA 8</b> CORRELACIONES NEGATIVAS ENTRE GENES RESPONSABLES DE LA SÍNTESIS DE LAS CADENAS DE HS.. .....	90





## PREFACIO

*Julietta tiene los ojos azules y una sonrisa limpia, tranquila, de felicidad plena. Me mira con dulzura e inocencia, sin embargo, está muy lejos. Esos ojos azules ya no tienen fondo, ya se vaciaron de discurso y empezaron a perderse hace 18 años.*

*Al principio eran pequeños despistes, olvidos cotidianos que le costaron más de un disgusto: la plancha encendida, las llaves que nunca encontró, la desorientación en su barrio, los números de teléfono (Julietta nunca ha tenido móvil y nunca le ha hecho falta), los nombres de sus hijos, sus rostros.*

*Aquel día Lucía lo recordará hasta que la genética le permita: su madre la trató como una desconocida. Y se cristalizaron los temores angustiosos que venían persiguiéndole. Lo real como golpe sordo contra el suelo: “es Alzheimer, la enfermedad empeorará”, aunque pareciera imposible, aunque no imaginaran hasta cuánto.*

*Y así fue. Los despistes llegaron a ser verdaderas odiseas, el aseo, la comida, el descanso inexistente, el desasosiego, los desvelos, las pastillas para dormir, para la agitación y para el ánimo, porque al principio Julieta alternaba periodos de lucidez que no hacían sino angustiar sus horas: era consciente de lo que no recordaba. Después aparecieron las alucinaciones, las ideas delirantes de perjuicio, de ruina y desamparo, la celotipia, el miedo.*

*Ya solo recordaba cuando niña, en la casa de sus padres, de hecho, llamaba a su madre, una llamada presente y esquiza, angustiosa y vacía.*

*Julietta ya no viene a la consulta. Su hija, cuidadora principal de los 5 hermanos, pide cita cada 15-20 días. Casi siempre por motivos banales, que nos sirven de cómplices, a ambas, de su verdadera carga. Sólo cuando hago la pregunta “¿Cómo estás? ¿Cómo lo llevas?” se derrumba entre pudor y desamparo. Esta válvula de escape la aleja de la “temida baja laboral”, “creo que no voy a poder más”. Pero siempre puede, por sus hijos, por su marido, por su padre, por su madre, por ella.*

*Las familias con un miembro con demencia descienden por una espiral de desolación conforme avanza la enfermedad. Muchos saben que su ser querido ya no es quién era, pero eso no apacigua el dolor de los desastres cotidianos.*

*La enfermedad no sólo consume recursos económicos (reducciones de jornada, excedencias, contratación de cuidadores externos, residencias especializadas), sino recursos humanos y sociales; esa especie de escafandra en la que poco a poco se ven recluidos los pacientes, bajo la atenta e impotente mirada de sus seres queridos, esa soledad involuntaria, el estigma social, el miedo y la angustia, no son mesurables y, sin embargo, agotan, desgastan y dañan de por vida a los que se quedan, y hasta el final, a los que se van.*

*Desde la Atención Primaria de salud nos ocupamos de todas las Julietas, y, sobre todo, de sus familias. Dilatamos esos 6 escasos minutos para ofrecerles un lugar de escucha, de consuelo, un lugar donde volcar interrogantes, pues sus dudas, son las nuestras, sus preguntas, son las nuestras y el deseo es compartido: acompañarles y tener todas las respuestas, algún día.*

*“De vez en cuando, en los días de viento,  
bajaba hasta el lago, y pasaba horas mirándolo,  
puesto que, dibujado en el agua,  
le parecía ver el inexplicable espectáculo, leve,  
que había sido su vida”.*

Seda  
Alessandro Baricco



# **INTRODUCCIÓN**

## **1. LAS DEMENCIAS**

### **1.1. ETIMOLOGÍA**

El Diccionario etimológico de Medicina define demencia como: *pérdida de la razón; trastorno de la mente; locura; insensatez; extravagancia* || *estado mental de deterioro y pérdida general de las facultades intelectuales. Es causado por enfermedad mental o por envejecimiento. El demente va perdiendo progresivamente la memoria, el razonamiento y los instrumentos del pensamiento, entre ellos el lenguaje. Llega a ser incapaz de adaptarse a las nuevas situaciones y de adquirir conocimiento* || *d. senil, deterioro psíquico profundo, global y progresivo, que afecta a las funciones intelectuales básicas y trastorna la conducta social en algunos ancianos. La causa más frecuente es la enfermedad de Alzheimer, que cursa además con atrofia cerebral* (Segura Munguía, 2004).

### **1.2. BREVE CONTEXTUALIZACIÓN HISTÓRICA**

En un contexto histórico ya existen referencias escritas sobre la demencia en la sociedad humana desde hace miles años. A pesar de que la supervivencia en épocas antiguas apenas rondaba los 30 años, y, por tanto, es de suponer que las enfermedades por deterioro progresivo natural no fueran frecuentes, ya los egipcios dejaron testimonio del proceso fisiológico del envejecimiento en el papiro Ebers y en el de Berlín, donde la pérdida de las funciones superiores era inexorablemente una circunstancia esperable del final de la vida fruto de la “*debilidad física de la vejez*” (Boller y Forbes, 1998; García-Albea, 1999).

En la antigua Grecia había dos posturas opuestas respecto a la demencia. Para la mayoría, esta afectación de la conducta o del intelecto ligada al envejecimiento era considerada punible y carente de interés científico. Sin embargo, otros autores consideraban la demencia independiente de la edad; entre ellos, destaca Cicerón quien criticaba las consideraciones fatalistas sobre la vejez y propuso diversas prácticas con el fin de retrasar la aparición de la demencia: “*Del mismo modo que la petulancia y el libertinaje son más propios de los jóvenes que de los viejos, pero no de todos los jóvenes sino solo de*

*los no virtuosos, así también esta necedad senil que solemos llamar demencia es propia de los ancianos sin seso, no de todos” (Cicerón, De Senectute) (Eliasz y Da Mota, 2015).*

En los siglos posteriores, importantes pensadores como Galeno de Pérgamo, Areteo de Capadocia, Oribasio de Pérgamo, Pablo de Egina, interpretaban más sólidamente la demencia como una condición independiente al avance de la edad. Durante la Edad Media y el Renacimiento no hubo aportaciones relevantes, pero a partir de los siglos XVI-XVIII la historia de la demencia cobra de nuevo importancia al delimitarse su definición, diferenciando, por ejemplo, términos como delirium y manía. Además, se esbozó su carácter orgánico, al establecer su relación con diferentes patologías incluyendo la sífilis, la enfermedad arterioesclerótica y ciertos virus. El nombre de “demencia senil” fue utilizado por primera vez por el psiquiatra francés Jean Etienne Dominique Esquirol en 1838. Posteriormente, Kraepelin diferenciaría los conceptos de demencia precoz, actual concepto de esquizofrenia, y demencia senil (Berchtold y Cotman, 1998; Fukui, 2015; Papavramidou, 2018).

### **1.3. EPIDEMIOLOGÍA**

En la actualidad, la demencia constituye uno de los problemas más importantes de salud pública, dado que supone la cuarta causa de muerte global en países desarrollados y, desde 2012, es considerada como “La epidemia del siglo XXI” (Bondi et al., 2017). Durante el año 2015 se diagnosticaron 9,9 millones de casos de demencia a nivel mundial, lo que supone un nuevo caso cada 3,2 segundos. En 2018 hubo alrededor de 50 millones de personas afectadas por demencia, el 5,2 % de la población. De entre los diferentes tipos de demencias, en torno al 70 % corresponden a la enfermedad de Alzheimer (EA), cuya prevalencia e incidencia se incrementan cada año (Garre Olmo, 2018).

En España cerca de medio millón de personas padecen EA, afectando en torno al 5 % de los mayores de 60 años y situándose por encima del 30 % en mayores de 90 años (Fundación del cerebro, 2017). Aparecen unos 40.000 casos anuales y la mortalidad asciende al 50 % en mayores de 85 años, siendo la décima causa de muerte (Villarejo Galende, et al., 2017; INE, 2017).

Supone un enorme gasto económico para los gobiernos, los propios pacientes, los familiares y cuidadores. En 2015 el gasto superó los 800.000 millones de dólares, y se estima que podría alcanzar los dos billones de dólares en 2030 (OMS, 2017). El gran

impacto socio-sanitario ha impulsado a la Organización Mundial de la Salud a crear el “Proyecto de plan de acción mundial sobre la respuesta de salud pública en la demencia” para el periodo 2017-2025, con una potente implicación de la administración pública y también de diversas instituciones privadas para la sensibilización, la investigación y la información y apoyo a pacientes, familiares y cuidadores (OMS, 2016; Livingston et al., 2017).

## **2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

En 1906, en la 37ª Reunión de Psiquiatras del Suroeste de Alemania, Alois Alzheimer dio una conferencia titulada “*Sobre un proceso patológico peculiar grave del córtex cerebral*”. En dicha ponencia presentó el caso de la paciente Auguste Deter, de 51 años, ingresada en el Sanatorio Municipal de Dementes y Epilépticos de Frankfurt, a finales de noviembre del año 1901. Su marido refería que, tras una vida completamente normal, Auguste inició un cuadro combinado de alteración conductual, olvidos de hechos rutinarios, delirios celotípicos, desorientación, alucinaciones, depresión e incapacidad progresiva para actividades cotidianas. La paciente falleció cinco años después debido a una sepsis por neumonía (Pérez-Trullén, 2013). La ponencia de Alzheimer pasó desapercibida hasta que fue incluida en 1907 en la revista *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychischgerichtliche Medizin* cuando despertó el interés de la comunidad médica (Maurer y Maurer, 2006). Tras la muerte de la señora Deter, Alzheimer se centró en el estudio de las alteraciones neuropatológicas halladas en el cerebro en esta enfermedad.

Emile Kraepelin, en su “*Tratado de psiquiatría para médicos y estudiantes*” en 1910, utilizó por primera vez el término de EA en honor a su colaborador, hoy día también conocida como Demencia senil tipo Alzheimer o Mal de Alzheimer (Maurer et al., 2006; Pérez-Trullén, 2013). Desde entonces a nuestros días, las aportaciones en la investigación de EA han crecido exponencialmente. Sin embargo, aún no se ha logrado obtener un tratamiento efectivo que detenga su evolución y mucho menos su remisión.

La EA es un proceso primario neurodegenerativo, irreversible, progresivo y altamente incapacitante en su última fase. La afectación de ciertas zonas del cerebro está causada por el acúmulo de lesiones histopatológicas no patognomónicas que

macroscópicamente dan lugar a destrucción de estructuras neuronales. Esto se traduce en un ensanchamiento de los surcos por adelgazamiento de las circunvoluciones y atrofia cerebral bilateral, secundaria y secuencial, de las zonas implicadas (lóbulo temporal, neocórtex frontotemporal, parietal y cerebelo). El volumen cortical disminuye y secundariamente se agranda el sistema ventricular, fenómeno conocido como hidrocefalia *ex vacuo*. Fisiológicamente, en la EA tiene lugar una pérdida paulatina de las funciones superiores, incluyendo atención, memoria y razonamiento, alteraciones conductuales, del estado de ánimo y deterioro general. La muerte sobreviene bastante después del diagnóstico, en un intervalo de tiempo que oscila entre 10 y 25 años, generalmente por morbilidades relacionadas indirectamente con la patología, incluyendo sepsis, desnutrición o infecciones respiratorias (Reiman y Caselli, 1999).

## 2.1. CLASIFICACIÓN

Actualmente es controvertido establecer una clasificación de los tipos de EA, la tendencia general es organizar la enfermedad en función de la edad de aparición en EA presenil o senil, o en función de la agregación familiar en esporádica o familiar (Albert et al., 2011; Ballard et al., 2011; McKhann et al., 2011).

Según la edad de aparición se distingue:

- EA presenil o de inicio precoz: se da en menos del 10 % de los casos, aparece en individuos de entre 30 y 65 años. Su evolución es rápida y agresiva por mayor afectación del neocórtex. Presentan un deterioro más acusado de las funciones ejecutivas, afasia y apraxia en estadios iniciales, con manifestaciones psicóticas y parkinsonismos (Wallin y Blennow, 1996; Braak y Braak, 1996).
- EA senil o tardía: característica en mayores de 65 años, supone el 90 % de los diagnósticos, su evolución también es progresiva, pero más lenta.

Según la agregación familiar:

- EA esporádica: la mayoría de los casos coinciden con la forma senil y en ocasiones hay antecedente de enfermedad en algún familiar, sin que sea necesaria una asociación vertical.



- EA familiar: se da en pacientes con mutaciones en algunos genes que influyen en el procesamiento de las formas tóxicas de amiloide, características de la enfermedad. Casi siempre coinciden con la forma de presentación de inicio precoz.

Además, se describen formas atípicas de presentación de EA, con menor frecuencia y edad de aparición más temprana:

- Variante frontotemporal: afectación intensa y precoz de lóbulos frontales presentando hipometabolismo local y gran presencia de degeneraciones neurofibrilares. Esto da lugar a alteraciones repentinas en la personalidad y el comportamiento como signos de debut, incluyendo agresividad, irritabilidad, desinhibición, apatía, deterioro de funciones ejecutivas, déficits atencionales y de fluencia verbal. La memoria episódica permanece conservada en estadios iniciales (Johnson et al., 1999).
- Variante logopénica: representa aproximadamente el 1 % de las formas atípicas. En este caso existen disfunciones de las áreas del lenguaje, memoria de evocación y trabajo. La alteración del hipocampo, la corteza entorrinal y la alteración clínica cerebral posterior es más acusada. La secuencia típica de deterioro puede no ser tan evidente y suceder antes la pérdida de fluencia semántica, un defecto nominativo que progresa a anomia semántica, afasia transcortical con repetición conservada y finalmente afasia tipo Wernicke (Foster et al., 1983; Harasty et al., 2001).
- Variante posterior: Su curso es más prolongado y con cierto predominio en mujeres mayores de 55 años. Existen alteraciones en el área occipital y parietal, con atrofia prematura de la vía visual anterior que afecta a la capacidad para la lectura. La alteración de la memoria sucede en fases más tardías (Benson et al., 1988; Hof et al., 1997).
- Demencia tipo Alzheimer en el síndrome de Down: en estos pacientes la prevalencia oscila entre el 7 y el 50 % (Zigman y Lott, 2007). Es considerada por algunos autores una forma atípica porque predominan los síntomas frontales como alteraciones del comportamiento (Ball et al., 2006).
- Demencias mixtas: en las que la EA comparte lesiones anatomopatológicas con otras entidades clínicas, lo que dificulta su diagnóstico: demencia por cuerpos de Lewy difusos (Merdes et al., 2003; Crutch et al., 2012), Enfermedad de Parkinson (Emre, 2003), lesiones vasculares en las que los síntomas típicos de EA se presentarían con

menos intensidad (Jellinger y Mitter-Ferstl, 2003), degeneración corticobasal (Schneider et al., 1997), y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Tsuchiya et al., 2004).

## 2.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

En función de la afectación funcional, el déficit cognitivo global y otras características, en la clínica práctica la EA se podría dividir en 4 fases: pre-clínica, demencia leve, moderada y grave (Sclan y Reisberg, 1992; Lindeboom y Weinstein, 2004; Waldemar et al., 2007):

- Fase preclínica: puede comenzar hasta 30 años antes de las manifestaciones sintomáticas. En las últimas décadas esta fase ha ido cobrando gran importancia porque puede esconder la clave de los tratamientos preventivos (Dubois, 2018). Las lesiones histopatológicas se inician precozmente, pero no en todos los casos darán lugar a enfermedad. El paciente puede sufrir ciertos lapsus aislados que no interfieren con su actividad diaria por lo que no solicita la ayuda sanitaria.
- Fase de demencia leve: comienzan los cambios y déficits en las funciones superiores: memoria reciente, lenguaje gestual, pensamiento abstracto, concentración y aprendizaje de habilidades nuevas. Se hacen frecuentes los episodios de desorientación en lugares habituales. El paciente es consciente de este deterioro padeciendo crisis de ansiedad y alteraciones emocionales que van desde la apatía y estados depresivos a cierta hiperactividad. En esta fase el paciente o sus familiares consultan con el médico. Es necesario vigilancia estrecha.
- Fase de demencia moderada: Se incrementa la pérdida cognitiva con afasias, apraxias y agnosias frecuentes, lo que conlleva incapacidad en la comunicación. Es más evidente el deterioro de las funciones emocionales, la desorientación espacio-temporal y la afectación de la memoria autobiográfica. Además, pueden aparecer los primeros síntomas psicóticos con aumento de la agresividad, anhedonia y obsesiones y, en muchos casos, todo ello acompañado de anosognosia. El paciente descuida su higiene y es dependiente para las actividades básicas instrumentales de la vida diaria.
- Fase de demencia grave: las alteraciones del comportamiento y el déficit neurológico son muy severos. El paciente muestra reflejos primitivos y trastornos deglutorios. Los síntomas psicóticos se agudizan con ideas delirantes, alucinaciones, confusión y

desorientación sobre todo por la noche. Su actividad queda reducida a vida cama-sillón con mutismo, desconexión del medio y dependencia total para actividades básicas.

### **2.3. HISTOPATOLOGÍA**

El elemento patológico central en EA es la acumulación de la proteína Tau hiperfosforilada y del péptido citotóxico beta-amiloide ( $\beta$ a) (Glennner y Wong, 1984; Selkoe, 1994). Otras lesiones histopatológicas frecuentes en EA son la degeneración granovacuolar, las neuritas distróficas y los cuerpos de Hirano, que son agregados proteicos citoplasmáticos que predominan en el asta de Amón en el hipocampo (Munoz et al., 1993; Fechtner et al., 2002).

#### **2.3.1. Amiloide en la enfermedad de Alzheimer**

El amiloide engloba un grupo de proteínas fibrilares heterogéneas presentes en distintos tejidos. En condiciones patológicas estas proteínas pueden adquirir el plegamiento en hoja  $\beta$ , lo que les confiere una resistencia a la degradación y eliminación, organizándose estas estructuras en agregados insolubles que dan lugar a numerosas enfermedades amiloides sistémicas. En el cerebro estos agregados se encuentran asociados a procesos degenerativos incluyendo la EA, la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, y la demencia por cuerpos de Lewy (Terry et al., 1987; Walsh y Selkoe, 2004; Wechalekar et al., 2016).

El  $\beta$ a está formado por péptidos de entre 37 y 43 aminoácidos (aa), que encontramos formando monómeros u oligómeros solubles. Estos péptidos son altamente flexibles y propensos a la agregación, conformando fibrillas rectas no ramificadas de entre 6 y 10 nm de diámetro (Hardy y Allsop, 1991; Hardy y Higgins, 1992).

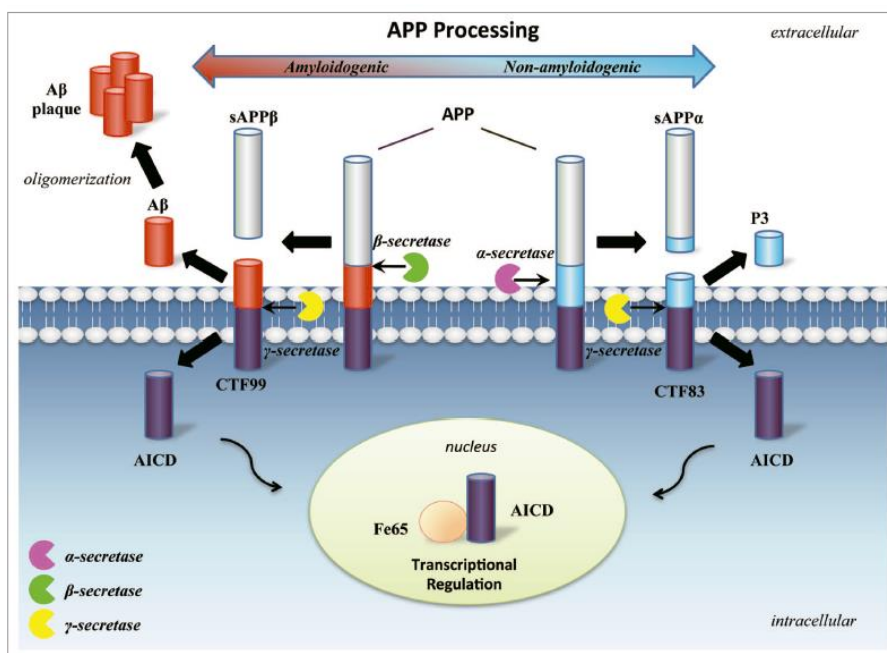
El papel que desempeña el  $\beta$ a en condiciones fisiológicas no está del todo aclarado, se sabe que interacciona con diferentes ligandos e interviene en el crecimiento celular, transporte de colesterol y ejerce cierta protección frente al estrés oxidativo y a la infección por algunos microbios (Yao y Papadopoulos, 2002; Baruch-Suchodolsky y Fischer, 2009; Soscia et al., 2010; Barrett et al., 2012).

El  $\beta$ a deriva de la proteína precursora de amiloide (PPA), una glicoproteína de 110 kDa que interviene en el crecimiento, reparación y supervivencia de las células (Glennner et

al., 1984; Kang et al., 1987). Es posible encontrarla en muchos tejidos y en los espacios sinápticos. Esta proteína está codificada por un gen situado en el cromosoma 21; mutaciones en dicho gen podrían incrementar la producción de  $\beta$ a (Turner et al., 2003; Priller et al., 2006).

La PPA se sintetiza en el retículo endoplasmático, migra a la membrana celular donde puede ser procesada por una familia de secretasas. Las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas, codificadas por los genes de las presenilinas (PSEN), se encargan de la lisis de proteínas transmembrana tipo 1, incluyendo la PPA, cuya escisión puede seguir dos caminos: una vía no amiloidogénica o una vía amiloidogénica (figura 1) (Selkoe, 2001; De Strooper et al., 2012; Haass et al., 2012).

- a. Vía no amiloidogénica: En esta ruta, la  $\alpha$ -secretasa es la primera que actúa sobre la PPA liberando un fragmento del extremo carboxi-terminal de 83 aa, conocido como p83. Es un péptido pequeño y soluble sobre el que actúa la  $\gamma$ -secretasa para dar lugar a un péptido aún menor, llamado p3, que será degradado sin acumularse ni interferir con la actividad celular fisiológica (Haass y Selkoe, 1993).
- b. Vía amiloidogénica: La PPA es escindida por la  $\beta$ -secretasa en el extremo carboxi-terminal, liberando un péptido de 99 aa que incluye una región hidrofóbica correspondiente al  $\beta$ a. Este péptido de 99 aa es fragmentado por la  $\gamma$ -secretasa en varios puntos, dando lugar a isoformas de entre 36 y 46 aa de  $\beta$ a. Las isoformas más conocidas son:
  - El residuo de 40 aa ( $\beta$ a40) es el más frecuente (LaFerla, 2007); tiene cierta solubilidad y se organiza en monómeros. Estos monómeros se agregan predominantemente en el endotelio de la microvasculatura cerebral dando lugar a la angiopatía amiloidea congoflica o cerebral (CAA), que se caracteriza por la aparición de microaneurismas, microinfartos corticales y hemorragias cerebrales más o menos extensas (Weller et al., 1998; Rensink et al., 2003). Los agregados vasculares se observan independientemente de si hay acúmulo de amiloide en el parénquima cerebral (Charidimou et al., 2012).



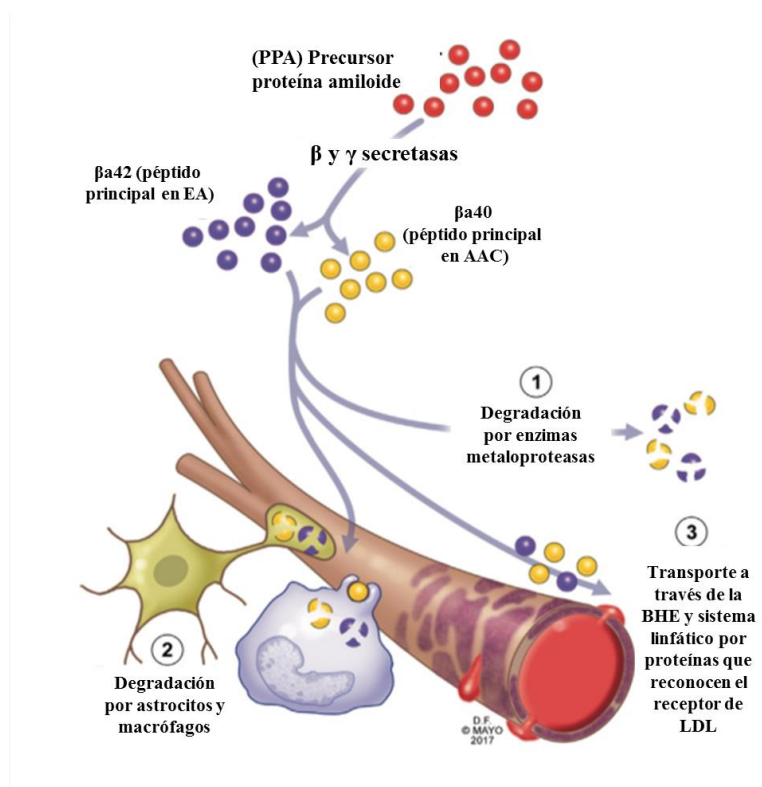
**Figura 1. Procesamiento de la APP y productos de escisión: vía no amiloideogénica y vía amiloideogénica.** (Modificado de Zhou et al. 2011)

- El residuo de 42/43 aa ( $\beta$ a42/43) es menos abundante, más hidrofóbico y con mayor capacidad fibrogénica que el anterior. Su asociación en oligómeros le proporciona una extraordinaria capacidad de agregación en forma de fibrillas. Estos agregados dañan las sinapsis, desencadenan vías tóxicas y dan lugar a cambios degenerativos y déficits cognitivos (Mucke y Selkoe, 2012). Los dos aa adicionales parecen ser los responsables de las propiedades biofísicas tóxicas porque favorecen la organización del amiloide en conglomerados anulares. Estos conglomerados interactúan con componentes de la membrana plasmática y alteran la homeostasis de los canales iónicos y ciertas moléculas de adhesión celular (neuroliginas y reurexinas de la hendidura sináptica) (Jarrett et al., 1993; Younkin, 1998; Mawuenyega et al., 2010; Saito et al., 2011; Zhao y Lukiw, 2015).

El  $\beta$ a forma placas seniles (PS) en el parénquima cerebral, y en ocasiones se han detectado acúmulos en pequeños vasos cerebrales (Glennner y Wong, 1984; Selkoe, 1994). Aunque ambas isoformas pueden formar parte de las PS, es  $\beta$ a42/43 el que compone el núcleo central de las mismas. El tamaño de las PS oscila entre 10 y 200  $\mu$ m y pueden ser clasificadas de menor a mayor grado de maduración en placas difusas, placas primitivas, placas densas o neuríticas, que predominan en la EA avanzada, y placas quemadas. La maduración de dichas placas consiste en la adición al conglomerado de diferentes

moléculas: oligómeros de  $\beta$ a42/43,  $\beta$ a40, fragmentos de PPA, moléculas de heparán sulfato (HS), APOE, marcadores de inflamación, fragmentos de neuritas distróficas, astrocitos y microglía reactiva, entre otras (Busière et al., 2004; Armstrong, 2009; Serrano Pozo et al., 2011).

El  $\beta$ a puede ser eliminado de varias maneras: por proteólisis, por degradación en lisosomas celulares del parénquima cerebral, por astrocitos y macrófagos y por aclaramiento mediante el sistema cerebrovascular, que incluye las vías de drenaje del fluido intersticial y de la barrera hematoencefálica (BHE) (Kanekiyo et al., 2014) (figura 2). Cuando la producción de amiloide está anormalmente aumentada o la eliminación es insuficiente y/o defectuosa, la cascada inflamatoria se exagera de forma anómala dando lugar a la formación de las PS (Almeida et al., 2006; Wang et al., 2016).



**Figura 2. Mecanismo de producción, degradación y deposición de  $\beta$ a en las arterias de la corteza.** La PPA se descompone por las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$  para formar  $\beta$ a42, péptido principal asociado con la EA y  $\beta$ a40, péptido principal asociado con la angiopatía amiloide cerebral. Estos péptidos se pueden degradar por metaloproteinasas, astrocitos o macrófagos, o se transportan a través de la barrera hematoencefálica a través de la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL), y se drenan a través del sistema linfático. (Modificado de DeSimone et al., 2017)

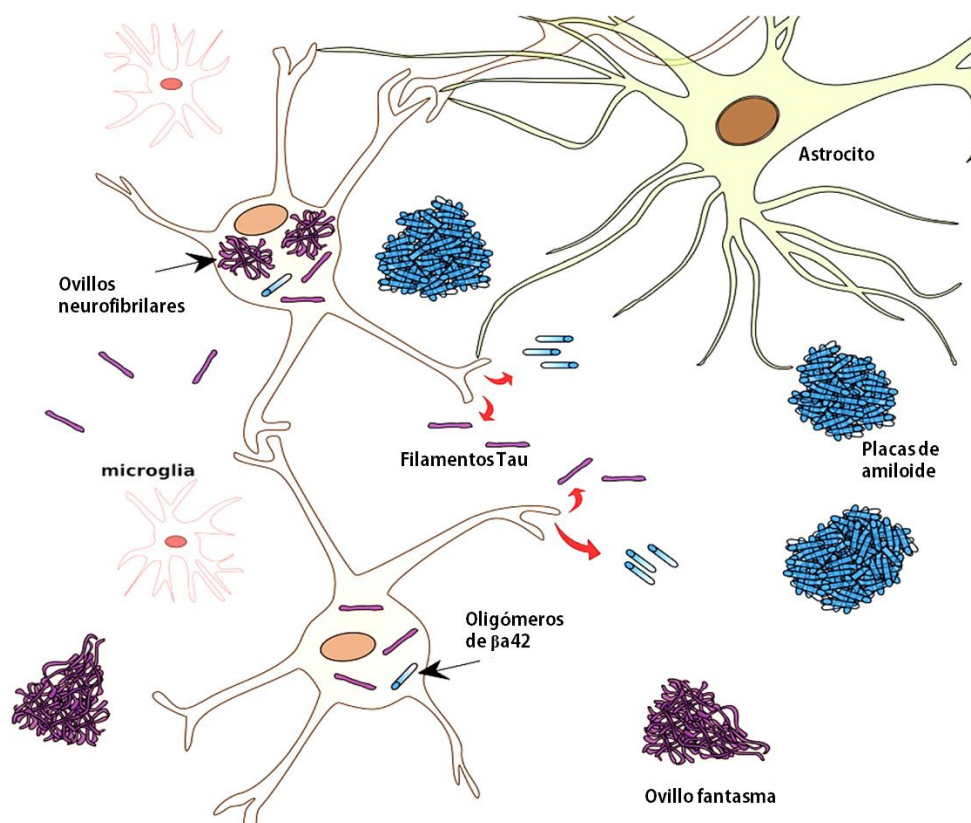
### 2.3.2. Proteína Tau

La proteína Tau está localizada fundamentalmente en el sistema nervioso. Se trata de una unidad tubular que se asocia al heterodímero tubulina para estabilizar los microtúbulos de la neurona, facilitando el transporte de señales y nutrientes en la célula. En los últimos años también se ha relacionado con el mantenimiento de la integridad del ADN y ARN y la plasticidad sináptica (Weingarten, 1975; Stamer et al., 2002; Fuster-Matanzo et al., 2018).

El gen que codifica la proteína Tau se sitúa en el cromosoma 17 y da lugar a 6 isoformas distintas que precisan ser fosforiladas para su correcto funcionamiento (Goedert et al., 1992).

En condiciones patológicas la proteína se encuentra anormalmente fosforilada, lo que impide que funcione correctamente y facilita su acúmulo de dos maneras: predominantemente en filamentos helicoidales aberrantes de doble cadena apareada, o en filamentos rectos (Goedert, 1993). Ambos tipos se pueden encontrar dispersos de manera soluble o enredados en ovillos neurofibrilares insolubles (ONFs) (Kidd, 1963). Los ONFs empiezan a formarse muchos años antes de que aparezcan los síntomas neurodegenerativos y están directamente relacionados con fenómenos de estrés oxidativo, alteraciones en las sinapsis y la destrucción y muerte neuronal (Alonso et al., 1997; Morsch et al., 1999; Pérez-Tur, 2000; Armstrong, 2009; Cárdenas et al., 2012).

Estos ovillos pueden tener ubicación intracelular o extracelular (ONF-I, ONF-E) (figura 3), y aunque no son exclusivos de la EA, sí son muy característicos. En la EA los ONF-I se localizan en el cuerpo neuronal, en dendritas apicales y distales a modo de hebras del neuropilo. Mientras que ONF-E, que son ovillos más compactos, se sitúan en dendritas o axones anormales de neuronas destruidas que están asociados a PS (Cras et al., 1995; Fukutani et al., 1995; Gómez-Ramos et al., 2006; Armstrong, 2009; Kim et al., 2010).



**Figura 3. Representación de la distribución de PS y de ONFs intra y extracelulares en tejido cerebral.** (Modificado de Saint-Aubert et al., 2017)

## 2.4. PROGRESIÓN DE LAS LESIONES

Los cambios morfológicos en EA siguen un patrón de diseminación secuencial en las zonas implicadas descrito en 1991 por Braak y Braak, que diferencian tres fases y seis estadios (Braak y Braak, 1996; Braak et al., 2006):

- a. Fase transentorrinal: (estadios I y II de Braak), las alteraciones ocurren en esta región sin que en principio se aprecian cambios o deterioro cognitivo, para después progresar a la amígdala y al hipocampo.
- b. Fase límbica: (estadios III y IV de Braak), se intensifica el daño en las regiones anteriores y se extiende a lóbulos temporal, frontal, parietal y parte del neocórtex. Correspondería clínicamente con la EA incipiente, con poca destrucción en córtex cerebral y sin atrofia detectable macroscópicamente. Los cambios severos sólo ocurren en algunas regiones y áreas cognitivas como las áreas de asociación frontotemporal, respetando áreas motoras, visuales y sensitivas primarias y con dilatación predominante en el ventrículo lateral. Se considera que al final de esta fase la transferencia de datos



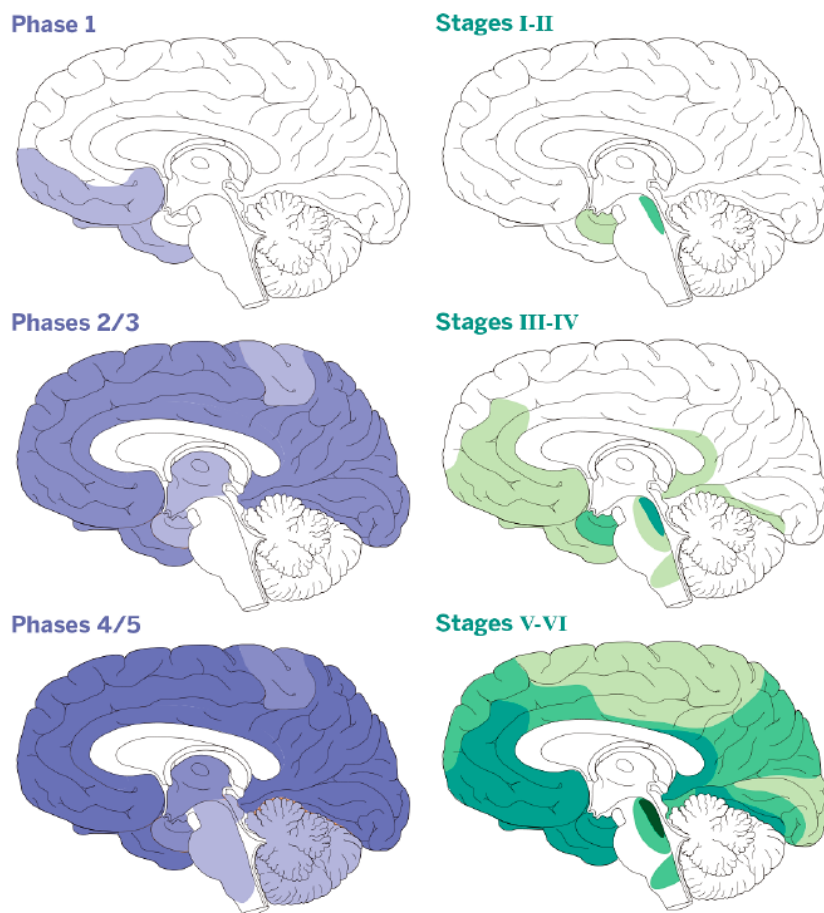
desde neocórtex al hipocampo y viceversa se interrumpe, por lo que comenzarían el deterioro cognitivo y los cambios sutiles en la personalidad.

- c. Fase isocortical: (estadios V y VI de Braak), destrucción masiva del neocórtex, de mayor gravedad en las áreas de asociación neocortical, áreas primarias sensitiva y motora, núcleo estriado y sustancia negra. Se confirma el diagnóstico de EA.

Descubrimientos realizados durante los últimos años han llevado a una revisión en la clasificación de estos estadios. Los acúmulos de la proteína Tau y del  $\beta$ a seguirían secuencias de depósito independientes (figura 4), identificándose también en otras zonas como núcleos subcorticales, tronco encéfalo (locus coeruleus), núcleo serotoninérgico dorsal del rafe y cerebelo.

Más concretamente, los acúmulos de Tau se localizarían en el locus coeruleus, en las regiones transentorrinal y entorrinal en los estadios I y II. Después se afectaría la formación del hipocampo y parte del neocórtex en los estadios III y IV, y finalmente el resto del neocórtex en estadios V y VI. Mientras que, el  $\beta$ a seguiría la distribución descrita por Thal y colaboradores (2002) en 5 fases. Inicialmente el  $\beta$ a se observa en neocórtex temporal basal y orbitofrontal (fase 1). Se diseminaría posteriormente a lo largo del neocórtex hacia la formación del hipocampo, la amígdala, el diencefalo y los ganglios basales (fases 2 y 3). En los casos graves de EA, las placas de  $\beta$ a también se encuentran en mesencefalo, tronco cerebral inferior (núcleos del puente y locus coeruleus) y la corteza del cerebelo (fases 4 y 5) (Thal et al., 2002).

Ambos tipos de acúmulos han sido observados incluso en etapas muy tempranas del desarrollo, poniendo en duda que la corteza entorrinal sea la primera afectada e, incluso, se han detectado acúmulos en individuos sanos. En cualquier caso, la afectación de estas regiones presenta correlación evidente con formas atípicas y típicas de EA (Grinberg et al., 2009; Simic et al., 2009; Duyckaerts et al., 2015; Theofilas et al., 2016; Kelly et al., 2017; Braak y Del Tredici, 2018; Jacobs et al., 2018).



**Figura 4. Depósito de proteína Tau y placas de amiloide.** Representación esquemática de la formación secuencial de placas de  $\beta$ -amiloide (azul) y proteína Tau (verde) en las diferentes zonas cerebrales, en cada estadio de la enfermedad de Alzheimer. (Modificado de Goedert, 2015)

## 2.5. ETIOPATOGENIA

Las causas exactas de la enfermedad aún están siendo investigadas. Se han propuesto varias hipótesis y factores de riesgo potencial.

### 2.5.1. Hipótesis

- Hipótesis colinérgica. En los años 80 se propuso la primera hipótesis sobre el posible origen de la EA. El sistema colinérgico está formado por la acetilcolina (Ach) y las moléculas encargadas de su metabolismo. La Ach es uno de los neurotransmisores más importantes del organismo. Se produce en las neuronas y tiene efectos fundamentales en el sistema nervioso central (SNC) y periférico al interactuar con receptores específicos. Entre sus principales funciones la Ach participa en el mantenimiento de la supervivencia neuronal y en los circuitos de aprendizaje y memoria en corteza cerebral e hipocampo. En pacientes con EA se ha visto un déficit de Ach en dichas regiones y la hipótesis colinérgica sostiene que este déficit es el causante del daño cognitivo (Coyle et al., 1983; Craig et al., 2011), impulsando el desarrollo de fármacos inhibidores de la enzima encargada de la eliminación de la Ach (anticolinesterásicos) para frenar la enfermedad. La falta de éxito con estos fármacos descarta esta hipótesis como causa de enfermedad aunque se siguen empleando en las estrategias paliativas. En contra de esta hipótesis también cabría señalar que se ha demostrado la implicación de otros neurotransmisores en la sintomatología de la EA y que la disminución de la Ach se debe a la destrucción de las regiones cerebrales donde se sintetiza, fundamentalmente el núcleo basal de Meynert, no ocurriendo en todos los casos con la misma magnitud (Whitehouse et al., 1982; Bartus, 2000; Terry y Buccafuso, 2003).
- Hipótesis de la cascada amiloidea. Esta teoría propuesta en 1992 por Hardy y Higgins sostiene que los depósitos de  $\beta$ a, sobre todo  $\beta$ a42, son el elemento inicial de la enfermedad. Las PS activan mecanismos inflamatorios, promueven disfunción sináptica y generan neuritas distróficas y estrés oxidativo. Con el tiempo afecta a la homeostasis de las neuronas. Se deteriora la función de determinadas enzimas (fosfatasa y quinasas) por lo que se hiperfosforila la proteína Tau, dañando el transporte axonal y formando ONFs. El resultado final del proceso es la alteración funcional de la neurona, la muerte celular y el declive cognitivo (figura 5) (Hardy y Higgins, 1992; LaFerla et al., 2007; Small, 2008).

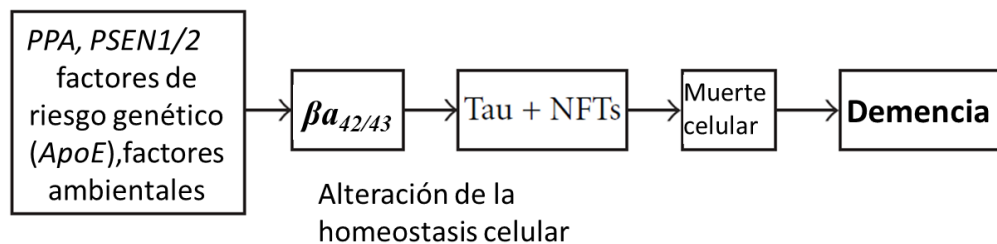
Esta hipótesis ha recibido muchas críticas y ha sido modificada en varias ocasiones porque:

- Se ha observado en prepúberes y adultos sanos la presencia de agregados cerebrales de Tau y  $\beta$ a sin repercusión clínica posterior (Hulette et al., 1998;

Giannakopoulos et al., 2003; Price, 2004; Bennett et al., 2006; Armstrong, 2011; Braak et al., 2011; Esparza et al., 2013);

- Se sabe que las alteraciones cognitivas están vinculadas de modo directo con la proteína Tau anómala y su acúmulo (Alonso et al., 1997; Cárdenas et al., 2012);
- La formación de las PS y ONFs, es independiente y aunque ambas están relacionadas en la evolución de la EA, es posible detectarlas de forma aislada en otras patologías (Terry et al., 1987);
- Los ONFs preceden a las placas amiloideas (Price y Morris, 2004);
- La inmunización activa contra el amiloide puede disminuir su acúmulo, pero no mejora la función cognitiva (Nicoll et al., 2006; Gilman et al., 2005, Green et al., 2009).

### Hipótesis de la cascada amiloide: formulación original



**Figura 5. Hipótesis inicial de la cascada amiloide.** βa: β-amiloide, ApoE: apolipoproteína E, PPA: precursor de la proteína amiloide, PSEN1/2: genes de las presenilinas 1 y 2, NFTs: ovillos neurofibrilares. (Traducido de Armstrong, 2011)

- Hipótesis inflamatoria. Algunas líneas de investigación defienden que la causa de la EA podría ser la respuesta inflamatoria crónica en el sistema nervioso central (SNC). Los depósitos de βa y Tau generarían una respuesta anómala del sistema inmunológico, sea por una disfunción o por su prolongación excesiva en el tiempo. Algunos autores se apoyan en la presencia de reactantes de fase aguda e infiltrados inflamatorios en las placas densas, y macrófagos con amiloide fagocitado alrededor de estas placas. La terapia con antiinflamatorios no ha ofrecido resultados significativos, de manera que no es posible concretar si la inflamación característica de la EA es causa o consecuencia (Hardy y Allsop, 1991; Kimura et al., 1994; Selkoe, 2001; Hardy et al., 2014).
- Hipótesis infecciosa: relacionada con la hipótesis anterior, cada vez hay más datos sobre el papel de los microorganismos en la respuesta inflamatoria e inmunológica cerebral.

Las infecciones están adquiriendo más importancia como posibles causas de procesos neurodegenerativos: infecciones por hongos (Prusiner, 2013; Alonso et al., 2014), virus (Lurain et al., 2013; Chiu et al., 2014), bacterias (Hammond et al., 2010; Miklossy, 2011; Asti y Gioglio, 2014), protozoos (Prandota, 2014). También se está estudiando la participación de la *microbiota*. Estos microorganismos, además del mantenimiento nutricional de los seres vivos, actúan como potentes activadores proinflamatorios, interviniendo en las cascadas inflamatoria e inmunológica del hospedador. Estos eventos aceleran la producción de radicales libres, aumentan la permeabilidad vascular e incluso la activación aberrante del sistema inmune innato, intensificando la agregación del  $\beta$ a (Hill et al., 2014; Welling et al., 2015; Zhao y Lukiw, 2015).

- Otras hipótesis. En los últimos años han surgido otras líneas de investigación de factores influyentes como la resistencia a insulina, el papel del estrés oxidativo, alteraciones en la microvasculatura cerebral o la hipótesis neuroenergética que propone la disminución del aporte de glucosa en el cerebro como evento que acelera la sintomatología de la EA (Drachman, 2014; Prasad et al., 2014; Winkler et al., 2015).

### 2.5.2. Factores de riesgo

A pesar de que la etiología concreta sigue siendo un enigma, la tendencia general considera un origen multicausal para la EA y, debido a la variabilidad de los factores de riesgo que intervienen en el desarrollo y la clínica, algunos autores proponen abordar la EA como un síndrome (Wallin y Blennow, 1996; Rolland et al., 2008). Los factores de riesgo se dividen en modificables y no modificables. De los modificables destacan:

- Factores de riesgo cardiovascular: según el National Institute of Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA) enfermedades como la diabetes mellitus, la hipertensión arterial y dislipemias como la hipercolesterolemia podrían activar la vía amiloidogénica precipitando la progresión de la enfermedad. Algunos estudios demuestran que es posible reducir hasta un 35 % el riesgo de demencia controlando estas patologías (Petitti et al., 2005; Barnes y Yaffe, 2011; Sperling-Reisa et al., 2011; Attems y Jellinger, 2014; Nelson et al., 2014; Livingston et al., 2017; Broce, 2018).
- Agentes tóxicos: el curso de la enfermedad podría verse acelerado por la exposición a metales pesados, como el plomo en etapas infantiles (Lidsky y Schneider, 2003;

Bihaqi et al., 2014) y el aluminio (Shin, 1994); el tabaco, los disolventes orgánicos, la silicona, etc. (Cacabelos, 1990).

- Otros, relacionados con menor evidencia como son: el déficit de vitamina D (Annweiler et al., 2012; Shen y Ji, 2015), el aislamiento social, el estilo de vida sedentario, el estrés (Vallejo-Johnson y Marcial-Velastegui, 2017); los traumatismos craneoencefálicos (Djordjevic et al., 2016).

Entre los factores no modificables destacan:

- Edad: es el factor no modificable más importante, ser mayor de 65 años incrementa exponencialmente la probabilidad de padecer demencia (Ballard et al., 2011).
- Sexo: se identifica cierta prevalencia en mujeres respecto a varones (Hebert et al., 2003; Irvine et al., 2012).
- Factores genéticos: se ha descrito la influencia de mutaciones de determinados genes en el aumento de los acúmulos de  $\beta$ a y proteína Tau (tabla 1). Dentro de todos los posibles genes implicados, cabe destacar cuatro de ellos por el patrón de herencia que presentan. Los genes *PSEN1*, *PSEN2* y el gen *APP* tienen una herencia autosómica dominante, siendo los responsables de las formas preseniles (Selkoe, 2001; Bertram y Tanzi, 2004; Harold et al., 2009; Lambert et al., 2009; Bekris et al., 2010). Mientras que el gen *APOE* se transmite con patrón de herencia mendeliana semi-dominante y penetrancia incompleta, y se relaciona con las formas seniles de EA.
  - El gen *PSEN1* se localiza en el cromosoma 14 y su alteración da lugar a las formas de EA más incapacitantes, agresivas y tempranas (predomina en menores de 30 años). Se han identificado cerca de 200 mutaciones en este gen, siendo el más implicado en variantes familiares de EA. Hoy sabemos que fue el responsable del caso de la paciente Auguste Deter (Martin et al., 1991; Crook et al., 1998; Janssen et al., 2003; Müller et al., 2013).
  - El gen *PSEN2*, localizado en el cromosoma 1, condiciona una clínica algo más tardía y con mayor similitud a las formas esporádicas. Ambos genes codifican la síntesis de las presenilinas (PSEN) (Rogaev et al., 1995; Bird et al., 1998).
  - El gen *APP*, en el cromosoma 21, codifica la formación de la PPA, es responsable de un fenotipo característico que aparece entre los 40 y 50 años y de algunos casos de demencia en el síndrome de Down (Doran et al., 2017).

**Tabla 1. Genes relacionados con los acúmulos de proteína Tau y  $\beta$ .** Los genes de la enfermedad de Alzheimer se encuentran en 4 cromosomas diferentes y se asocian con herencia autosómica dominante o esporádica. EA: enfermedad de Alzheimer. (Traducido de Bekris et al., 2010)

EA Loci	Símbolo genético	Nombre del gen	Cromosoma	Herencia
EA1	<i>APP</i>	Proteína precursora de amiloide	21q21	Autosómica Dominante
EA2	<i>APOE</i>	Apolipoproteína E	19q13.32	Esporádica
EA3	<i>PSEN1</i>	Presenilina 1	14q24.2	Autosómica Dominante
EA4	<i>PSEN2</i>	Presenilina 2	1q42.13	Autosómica Dominante

- El gen *APOE* codifica la Apolipoproteína E (ApoE), el transportador de lípidos más importante del SNC. Se trata de una proteína plasmática de 299 aa codificada por dicho gen situado en el cromosoma 19, (Fernández-Viadero, 2013). La mutación de este gen es el factor de riesgo más importante en los casos de EA esporádica y EA familiar tardía (Corder et al., 1993). Existen varios alelos, la mayoría de ellos están implicados en funciones protectoras del SNC como reparación de daños moleculares en membranas celulares y proteínas, eliminación del amiloide, modulación y metabolismo del PPA y procesos inflamatorios e inmunológicos (Ye et al., 2005; Hauser, 2011; Youmans et al., 2012). En la EA los alelos más implicados son  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ . Dos de ellos,  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 3$ , se consideran factores protectores porque son menos neurotóxicos, y más efectivos para eliminar el  $\beta$  y transportar colesterol (Chartier-Harlin, 1994; Bekris et al., 2010). Por el contrario, ser portador del alelo  $\epsilon 4$  incrementa el riesgo de EA porque favorece el acúmulo de  $\beta$  en PS y aumenta la fosforilación de proteína Tau. Además, se sabe que este alelo altera la plasticidad neuronal y la funcionalidad mitocondrial lo que origina fenómenos neurotóxicos y déficits sinápticos, también participa de forma aberrante en fenómenos neuroinflamatorios y altera la permeabilidad de la BHE, lo que se traduce, en definitiva, en atrofia tisular y déficit cognitivo (Strittmatter et al., 1993; Harris et al., 2003; Basak y Kim, 2010; Mahley y Huang, 2012; Dean et al., 2014; Mufson et al., 2016).

Por otro lado, aunque se necesitan más estudios, se cree que hay otras circunstancias que podrían tener efecto protector frente a la enfermedad. Una adecuada reserva cognitiva, obtenida mediante estimulación intelectual y el alto nivel educativo,

estimula la sinaptogénesis y la plasticidad neuronal amortiguando las lesiones por depósito. También tiene un efecto positivo el ejercicio físico moderado, la dieta equilibrada, una red social estimulante, el consumo regular de ciertos fármacos como antiinflamatorios no esteroideos y estatinas (Stern, et al., 1999; Fratiglioni et al., 2000; Ferris et al., 2007; Kirk-Sanchez y McGough, 2014; Law et al., 2018).

## 2.6. DIAGNÓSTICO

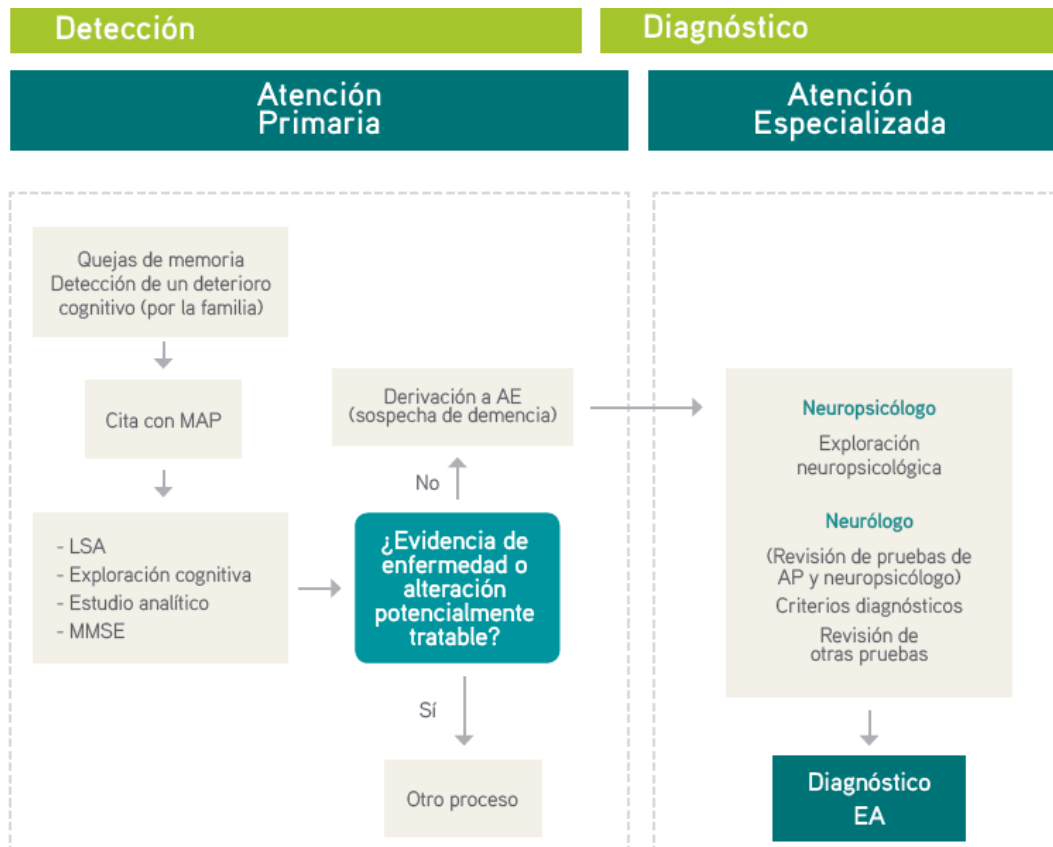
Actualmente el diagnóstico exacto de EA se establece visualizando en el tejido cerebral las lesiones descritas, es decir *post mortem*. El carácter incurable de la EA obliga a un diagnóstico precoz *in vivo*. Lo más adecuado es ofrecer al enfermo y a su entorno social la capacidad de anticiparse al deterioro progresivo de la calidad de vida y planificar su enfermedad. En este sentido varios autores defienden la idoneidad de identificar precozmente la fase preclínica, en individuos de riesgo, como los casos de EA senil esporádica con asociación familiar sin componente genético. (Weiner et al., 2010; Hampel et al., 2018; Jacobs et al., 2018; Stites et al., 2018).

Los criterios diagnósticos clásicos de la Clasificación Internacional de Enfermedades CIE-10 y el Manual Diagnóstico y Estadístico de Enfermedades Mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría DSM-IV resultan insuficientes para determinar la EA. Por ello, actualmente se utilizan los criterios NINCDS-ADRDA, elaborados en 1984 por el National Institute of Neurological and Communicative Disorders y la Alzheimer's Disease and Related Disorders Association y revisados posteriormente en 2011 (McKhann et al., 2011). También se emplean nuevos criterios más específicos de la EA desarrollados por Dubois y colaboradores (Dubois et al., 2007; Dubois, 2018).

En los últimos 20 años el avance en diferentes técnicas ha contribuido a precisar el diagnóstico. Cuando los pacientes acceden a los servicios de atención primaria, lo primero que se plantea es un diagnóstico diferencial con otras demencias cuya causa pueda ser tratada. El punto de partida consiste en descartar comorbilidades metabólicas, hormonales, medicamentosas o psiquiátricas como factor desencadenante de demencia. Para ello es necesario realizar una anamnesis exhaustiva con pruebas complementarias que incluyen analítica completa, radiografía, electrocardiograma y test neuropsicológicos para la valoración cognitiva. La punción lumbar se reserva para casos con sospecha de un proceso infeccioso subyacente (Bruun et al., 2018). Tras la valoración por el médico de familia, el



paciente es derivado al médico especializado en neurología, y el seguimiento se hará fundamentalmente por ambos, en conjunto con un equipo multidisciplinar (figura 6).



**Figura 6. Algoritmo diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer.** (PWC, 2013)

Por el momento, los estudios genéticos y las técnicas específicas de imagen se emplean en casos seleccionados, por su alto coste, y algunas están reservadas para la investigación. Herramientas como la resonancia magnética nuclear, la tomografía computarizada, la tomografía por emisión de positrones y la tomografía computarizada de emisión monofotónica permiten valorar la atrofia incipiente. Cuando incorporan biomarcadores y radiotrazadores es posible identificar los depósitos de  $\beta$  y Tau y zonas con hipoperfusión vascular e hipometabolismo (Storandt et al., 2009; De Meyer et al., 2010; Hall et al., 2017; Ossenkoppele et al., 2019).

La cuantificación del gradiente Tau/ $\beta$  en el líquido cefalorraquídeo (LCR), fluido que al estar en contacto directo con el espacio extracelular cerebral es un indicador fiable

del daño en el parénquima (Brier et al., 2016), ha mostrado niveles de  $\beta$ a en LCR elevados en estadios iniciales de enfermedad, mientras que los niveles de Tau, que traduce daño neuronal, permanecen disminuidos. Cuando la enfermedad progresa se invierte el gradiente, reflejo de la formación de PS y ONF y la destrucción masiva de tejido cerebral. Es interesante porque el aumento de Tau hiperfosforilada muestra cierta especificidad para la EA, no hallándose estos niveles elevados en otras enfermedades del SNC (Blennow, 2004; Ossenkoppele, 2012; Grønning, 2012; Bruggink, 2013).

## **2.7. TRATAMIENTO**

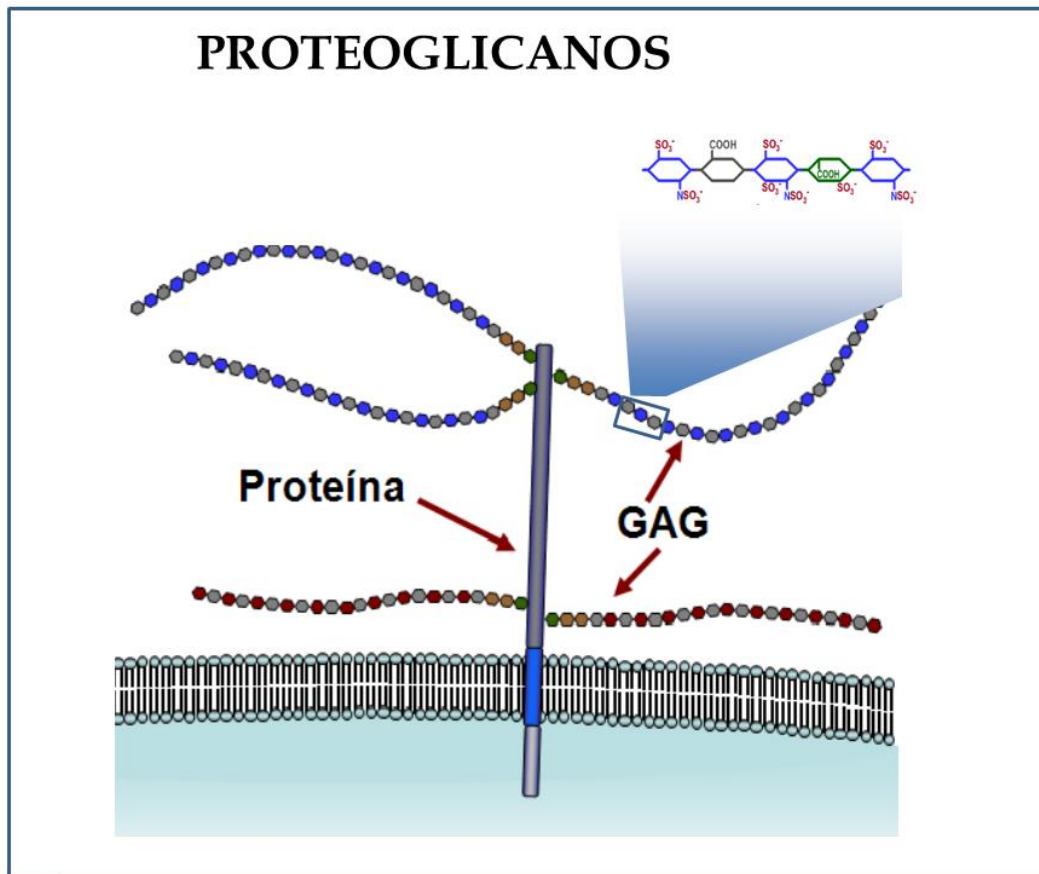
No existe un tratamiento definitivo para detener o erradicar la EA. De forma paliativa se utilizan algunos fármacos para el control de síntomas asociados, incluyendo inhibidores de la colinesterasa, antidepresivos y antipsicóticos.

Por otro lado, desde hace unas décadas es objeto de estudio una amplia serie de tratamientos experimentales, como fármacos moduladores de la inmunidad, del metabolismo del colesterol y la glucosa (estatinas, antidiabéticos) y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). También se están realizando ensayos con fármacos modificadores de ApoE4, contra el acúmulo de  $\beta$ a y Tau, e incluso, tratamientos con células madre y recambio plasmático (Santos et al., 2002; Golde et al., 2011; Karran, 2012; Yu et al., 2014; Funk et al., 2015; McCartney, 2015; Boada et al., 2017; McGeer et al., 2018; Young et al., 2018).

La valoración individual de cada uno de ellos no ha ofrecido resultados concluyentes por el momento. Es necesario conocer más en profundidad las bases moleculares de los fenómenos que tienen lugar durante la EA para un mejor abordaje terapéutico. Existen varios tipos de moléculas implicadas a lo largo de este proceso, incluyendo los proteoglicanos (PGs). Se ha descrito previamente la participación de los PGs en muchos procesos fisiológicos, como la inflamación, y patológicos, incluyendo algunas enfermedades neurodegenerativas como la EA. Diversos estudios detallan la interacción de los PGs con la PPA, el  $\beta$ a y la proteína Tau, y su presencia en los depósitos amiloideos y los NFTs (Shaffer et al., 1995).

### 3. PROTEOGLICANOS Y GLICOSAMINOGLICANOS

Los PGs son un grupo muy diverso de glicoconjugados constituido por cadenas de carbohidratos específicos de longitud variable, llamadas glicosaminoglicanos (GAGs), unidas covalentemente a diferentes proteínas núcleo (Fernández-Vega et al., 2013) (figura 7). Existen unos 50 genes que codifican las proteínas núcleo en el genoma humano, que determinan la ubicación de estas moléculas: en la superficie celular, en la matriz extracelular (MEC), e incluso, en el interior celular en algunos casos (Iozzo y Schaefer, 2015).



**Figura 7. Estructura de un proteoglicano.** Los proteoglicanos están formados por la unión de cadenas de glicosaminoglicanos a una proteína núcleo. Los glicosaminoglicanos son cadenas de disacáridos repetidos con residuos sulfatados en carbonos determinados.

Los GAGs se encuentran en todos los tipos celulares humanos y consisten en la repetición de unidades de disacáridos compuestas de una hexosamina N-acetilada o N-sulfatada y un ácido urónico (GlcA o IdoA) o galactosa. Los GAGs pueden clasificarse en

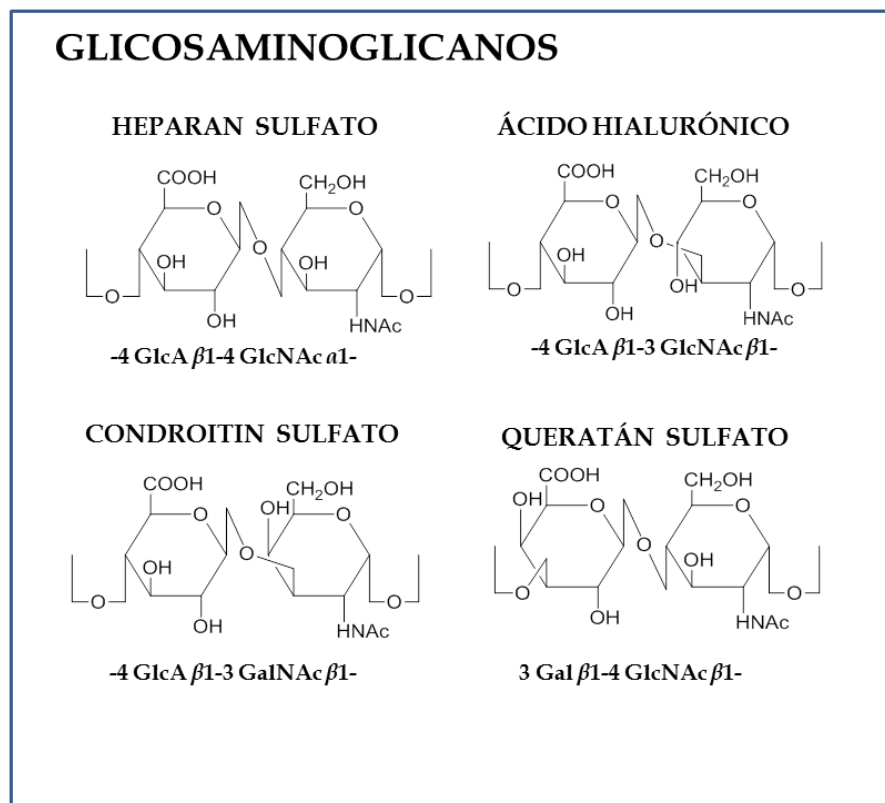
varios tipos según la estructura química de la unidad disacarídica que los compone: heparán sulfato (HS), condroitín sulfato (CS)/dermatán sulfato, ácido hialurónico y el keratán sulfato (KS) (Cui et al., 2013) (figura 8).

- Condroitín sulfato /Dermatán sulfato. El CS está formado por la repetición de unidades disacarídicas de ácido glucurónico (GlcA) y N-acetil galactosamina (GalNAc) unidas por enlace  $\beta$ 1-3. El dermatán sulfato contiene residuos de ácido idurónico (IdoA), resultado de la epimerización del GlcA, unidos a GalNAc (Malavaki et al., 2008).

- Queratán sulfato, formado por disacáridos de galactosa (Gal) y GlcNAc unidos por enlace  $\beta$ 1-3. Se diferencian tres tipos de KS en función de la localización: KS tipo I en córnea, KSII en cartílago, KSIII en cerebro, sin embargo, se sabe que su ubicuidad es aún mayor (Funderburgh, 2002).

- Ácido hialurónico, el disacárido de este GAG está formado por la asociación de residuos de GlcA unidos por enlace  $\beta$ 1-3 a residuos de GlcNAc (Tammi et al., 2002).

- Heparán sulfato (HS)/Heparina, formado por unidades de GlcA y GlcNAc ensambladas por enlaces  $\beta$ 1-4. Son las moléculas con mayor carga negativa y complejidad estructural conocidas hasta el momento (Habuchi et al., 2003).



**Figura 8. Estructura química de la unidad disacarídica.** Representación de los disacáridos que componen los 4 tipos de cadenas de glicosaminoglicanos.

Los PGs se relacionan con gran cantidad de moléculas a través de interacciones de carga con baja especificidad y afinidad, hasta uniones con una gran especificidad y una gran afinidad. Por ello, los PGs intervienen en el procesamiento y acumulación de los ligandos y ejercen funciones diferentes en los tejidos. Algunas de estas funciones vienen dadas por las proteínas núcleo, pero la mayoría dependen de las cadenas de GAGs que los componen. Gracias a las modificaciones químicas en dichas cadenas, es decir, determinados patrones de epimerización y sulfatación, adquieren la capacidad de codificar información biológica. (Snow et al., 1994a).

En este sentido, por ejemplo, el CS es muy importante para el desarrollo esquelético ya que interviene en la formación del cartílago y en la división celular en el periodo embrionario. El dermatán sulfato, fue identificado inicialmente en piel. Ambos GAGs pueden actuar como correceptores o moduladores de señalización celular para el crecimiento, la proliferación, la síntesis de neuritas, de células madre neuronales y progenitoras, ayudando en la regeneración de neuronas y de la MEC. Por otro lado, su alteración puede dar lugar a procesos patológicos como determinadas enfermedades raras debidas a la mutación en los genes que intervienen en su síntesis, pueden formar cicatrices gliales y favorecer algunos tipos de neuropatías periféricas. Se les ha relacionado con fenómenos de progresión de la arterioesclerosis, con un tipo de cáncer llamado condrosarcoma, e incluso pueden actuar como receptores de superficie celular para patógenos (Malavaki et al., 2008; Mikami y Kitagawa, 2013; Wang et al., 2016).

El KS facilita la hidratación de la MEC para mantener la transparencia corneal; en cartílago y tejido óseo tiene un papel estructural; y también se sabe que interviene en la regeneración y plasticidad neuronal. Puede dar lugar a procesos patológicos como las enfermedades denominadas mucopolisacaridosis, la distrofia macular corneal, ciertos carcinomas de tracto genital femenino, etc. (Funderburgh, 2002; Pomin, 2015; Uchimura, 2015).

La principal función del ácido hialurónico se relaciona con el mantenimiento de la hidratación y ciertas propiedades físicas de los tejidos (piel, cartílago, líquido sinovial, humor vítreo). Interviene en el desarrollo de la arquitectura y mecánica celulares y puede traducir señales para el funcionamiento biológico de los organismos. Carece de proteína núcleo por lo que se le identifica como un polisacárido libre en MEC (Tammi et al., 2002; Nusgens, 2010; Tsepilov and Beloded, 2015).

### 3.1. PROTEOGLICANOS DE HEPARÁN SULFATO (HSPGs)

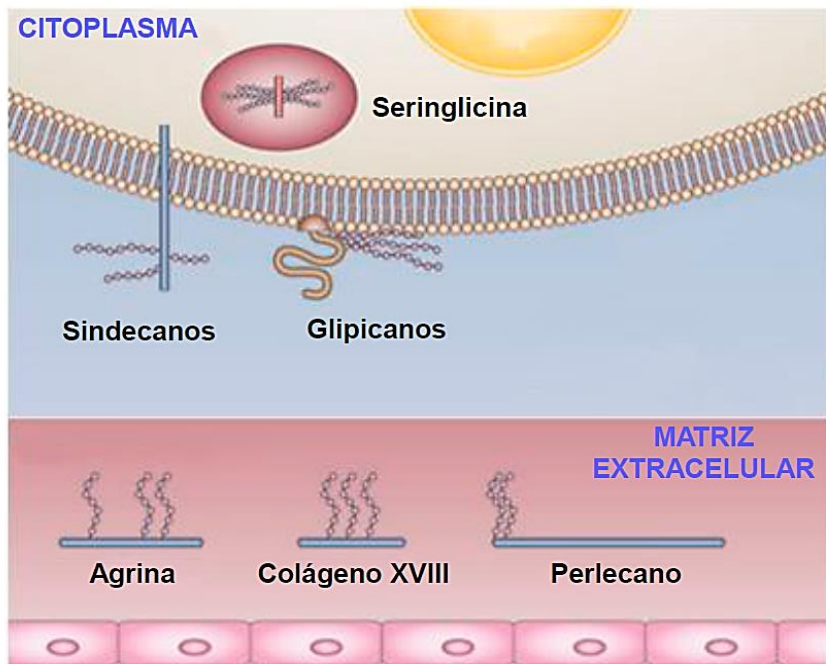
De los diferentes GAGs, sin duda, el HS es el más importante por su ubicuidad, puesto que se encuentra en la superficie de todas las células y también en la matriz extracelular que las rodea, y por su implicación en múltiples procesos fisiológicos. Esta capacidad de participar en numerosas funciones viene principalmente determinada por la información biológica incluida en las cadenas de HS generada a través de modificaciones enzimáticas, cuyo resultado es un código molecular de información conocido como “heparanoma” (Bernfield et al., 1992; Ori et al., 2008; Ricard-Blum y Lisacek, 2017).

Entre estas modificaciones destaca la adición de grupos sulfato en posiciones concretas de la unidad disacáridica del HS, otorgando características funcionales específicas de cada localización. Además de las reacciones de sulfatación, también ocurren epimerizaciones del GlcA que confieren flexibilidad a las cadenas. Las moléculas presentan longitudes comprendidas entre 40 y 300 residuos disacáridos, y se encuentran estructuradas en dominios capaces de codificar información detallada para su interacción con ligandos concretos (Sarrazin et al., 2011). Ejemplo de ello es la heparina, un tipo de HS altamente sulfatado con capacidad anticoagulante, producido por los mastocitos del tejido conectivo y células progenitoras gliales, con aproximadamente un 70 % de residuos de GlcA epimerizados en IdoA (Lindahl et al., 2017).

Los HSPGs están principalmente constituidos por cadenas de HS y algunos de ellos también pueden contener cadenas de CS, lo que incrementa su diversidad (figura 9). Las proteínas núcleo que constituyen los PGs se agrupan en una serie de subfamilias (tabla 2) que se pueden clasificar en función de su localización: en la superficie celular, sindecanos (SDC) y glipicanos (GPC), en el citoplasma formando parte de vesículas secretoras, serglicina, y en la membrana basal (MEC), agrina (AGRN), perlecano y colágeno XVIII (Sarrazin et al., 2011; Iozzo y Schaefer 2015) (figura 9).

Tabla 2. tipos de proteoglicanos de heparán sulfato: HS, heparán sulfato; CS, condroitín sulfato; DS, dermatán sulfato; MEC, matriz extracelular; TGF- $\beta$ , factor de crecimiento transformante - $\beta$ ; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; MB, membrana basal. (Traducido y modificado de Lindahl et al., 2017).

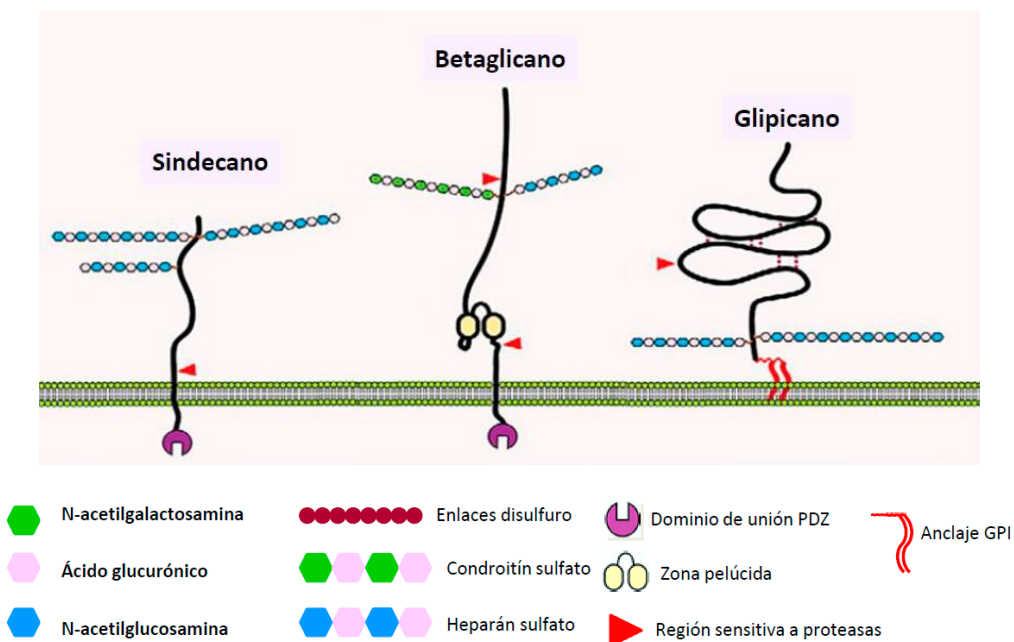
PROTEOGLICANO	PROTEINA	NÚCLEO (KDA)	NÚMERO/TIPO CADENA GAG	DISTRIBUCIÓN TISULAR	FUNCIONES PROPUESTAS	ENFERMEDADES HUMANAS RELACIONADAS
Proteoglicanos unidos a la membrana						
Sindecanos 1-4		31-45	1-3 HS, 0-2 CS	mayoría de células nucleadas	regula adhesión celular, migración y organización de actina en citoesqueleto, control de eliminación de ligandos de superficie celular	deregulación en varios cánceres (p.ej., melanoma, carcinoma mamario)
Betaglicano		110	0-1 HS, 0-1 CS	Fibroblastos	coreceptor que regula la unión del ligando (p.ej., inhibinas), señalización a través de receptores TGF- $\beta$	supresor de tumores, comúnmente perdido en el cáncer de ovario
Glicicanos 1-6		~60	1-3 HS	células epiteliales y mesenquimales, cerebro	coreceptores que regulan la señalización a través de receptores asociados (p.ej., tirosina quinasas)	Síndrome de crecimiento excesivo Simpson-Golabi-Behmel, progresión del carcinoma hepatocelular (GPC3)
Proteoglicanos secretados						
Perlecano		400	1-3 HS, 0-2 CS	MBs, MEC, cartilago	ensamblaje MEC, regula migración celular por interacción con integrinas, secuestro de factores de crecimiento (p.ej., FGF)	mutaciones raras causan malformaciones esqueléticas severas
Agrina		200	1-3 HS	MBs, cerebro y uniones neuromusculares	maduración de la unión neuromuscular, ligando para integrina y $\alpha$ -distroglicano	
Colágeno tipo XVIII		147	2-3 HS	MBs, isoforma más larga más extendida	estabilidad de MB, el dominio monocromérico C-terminal (endostatina) es antiangiogénico	Mutaciones: síndrome Knobloch, múltiples defectos de cierre del tubo neural y ocular
PGs de granulos intracelulares						
Serlicina		10-19	10-15 heparina CS	mastocitos, leucocitos, células endoteliales, condrocitos, células del músculo liso	empaquetamiento del contenido de granulos, mantenimiento de actividad de la proteasa, regulación después de la secreción de la coagulación, defensa del huésped y reparación de heridas	inflamación, progresión del cáncer



**Figura 9.** Tipos de proteoglicanos de heparán sulfato y sus diferentes localizaciones: anclados a la membrana celular o en la matriz extracelular.

### 3.1.1. HSPGs de superficie celular

En las membranas celulares podemos encontrar dos tipos predominantes de HSPGs, los sindecanos y los glipicanos. También en esta localización habría que mencionar al betaglicano, que además de cadenas de HS, contiene cadenas de CS (Bernfield et al., 1999) (figura 10).

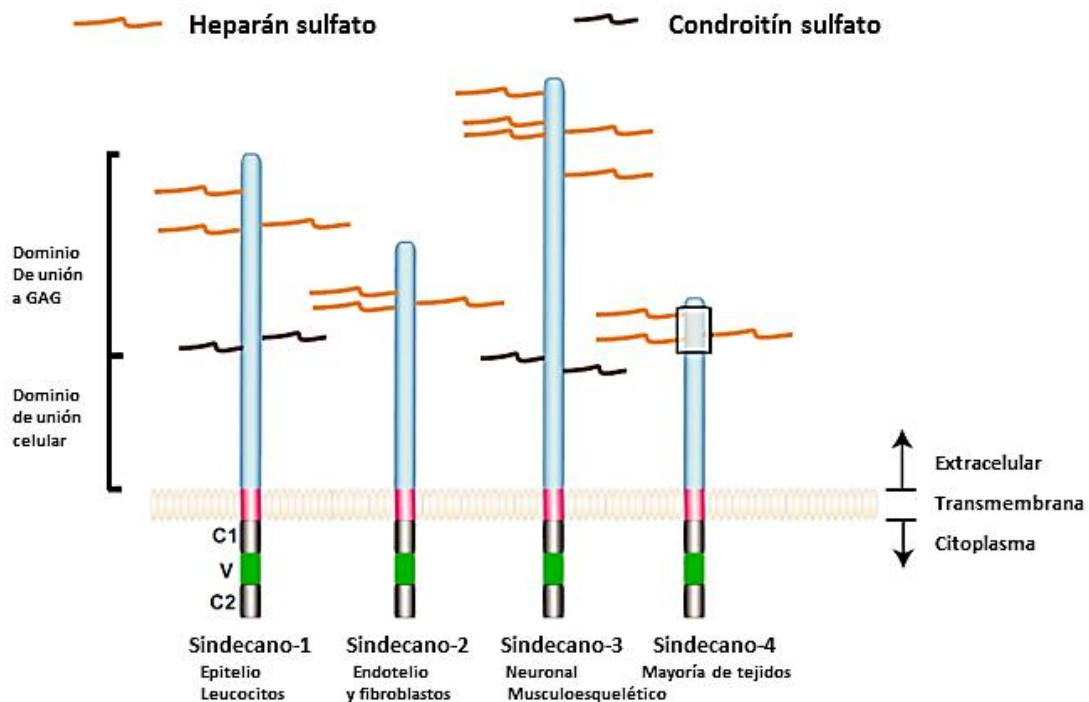


**Figura 10.** Proteoglicanos de heparán sulfato de la superficie celular. (Modificado de Iozzo y Schaefer, 2015)



### a. Sindecanos

La familia de los SDCs la conforman cuatro miembros SDC-1, SDC-2, SDC-3 y SDC-4. Son proteínas transmembrana de tipo I, divididas en tres dominios: una porción citoplasmática que desempeña funciones de señalización e interacción proteica, un dominio hidrofóbico transmembrana que promueve la asociación con otras proteínas núcleo, y un dominio extracelular, que sirve de soporte para la unión de las cadenas de GAGs y que puede ser escindido por proteólisis, (figura 11).



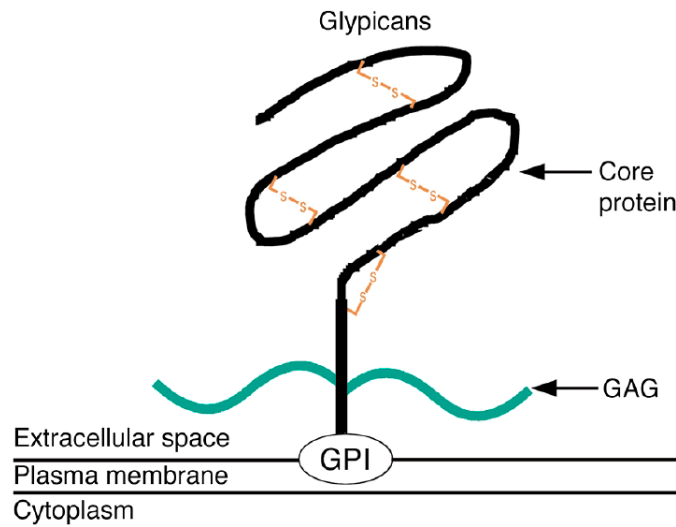
**Figura 11. Estructura de los SDCs.** (Modificado de Couchman et al. 2015)

Los SDC-1 y -3 pueden albergar cadenas tanto de HS como de CS, los SDC-2 y -4 solo contienen HS (Bernfield et al., 1992). Identificadas inicialmente en la superficie de las células epiteliales, actualmente sabemos que, salvo el SDC-4 que muestra menor especificidad de localización, SDC-1 puede encontrarse también en leucocitos, SDC-2 en endotelio y fibroblastos y SDC-3 en tejido neural y musculoesquelético (Couchman et al., 2015).

Las proteínas núcleo están codificadas por los genes *SDC1*, *SDC2*, *SDC3* y *SDC4* respectivamente, cuyas mutaciones pueden dar lugar a procesos cancerígenos, infecciones, alteraciones cardiovasculares y del sistema inmunológico (Sarrazin et al., 2011).

## b. Glipicanos

Los GPCs se anclan a la superficie celular mediante un glicolípido de membrana conocido como Glicosilfosfatidilinositol, que se une a los aa hidrofóbicos del extremo C-terminal de la proteína núcleo. Este tipo de PG sólo contiene cadenas de HS localizadas preferentemente en los residuos de serina de los 50 aa últimos más cercanos a la membrana celular, lo que sugiere su importante papel en la comunicación molecular (figura 12) (Filmus y Selleck, 2001).



**Figura 12. Esquema de un glipicano.** (Filmus y Selleck, 2001)

En mamíferos se han identificado 6 GPCs. Su función principal tiene lugar durante el desarrollo embrionario, mediando efectos estimuladores e inhibidores que regulan la señalización entre células (Filmus et al., 2008). GPC-1 y GPC-2 se detectan en SNC durante el periodo embrionario (Stipp et al., 1994; Jen et al., 2009), GPC-4 y GPC-5 se han identificado en hígado y cerebro adultos (Saunders et al., 1997), GPC-6 en corazón, intestino, vasos sanguíneos, riñón, gónadas (Veugelers et al., 1999). Como la mayoría de PGs, además de posibilitar el correcto funcionamiento del organismo, los GPCs también están implicados en enfermedades. Así, alteraciones en el GPC-3 causan el Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel y, junto con GPC-1, participa en algunos tipos de cáncer (Filmus et al., 1988; Tenorio et al., 2014).

## c. Betaglicano

El betaglicano, también conocido como receptor tipo III del factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ), es una proteína transmembrana con una pequeña región

intracitoplasmática que da estabilidad, y un dominio extracelular donde se unen cadenas de HS y CS. Se relaciona con funciones que median la interacción intercelular, parece que evita la progresión de ciertos cánceres (aunque también actúa como reservorio de TGF $\beta$ ) y regula fisiológicamente muchos tipos celulares, con acción directa en el desarrollo y crecimiento fetal (López-Casillas et al., 1991; Ikushima y Miyazono, 2010; Bilandzic y Stenvers, 2011).

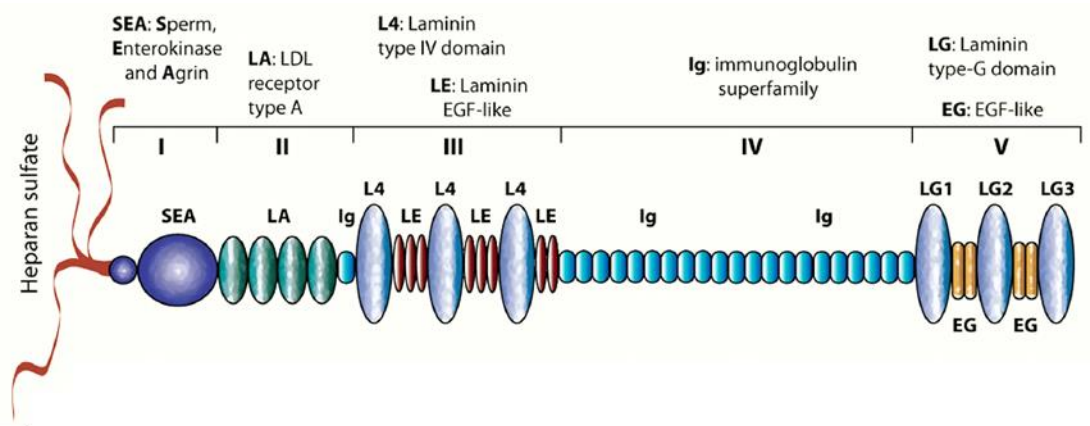
### **3.1.2. HSPGS de matriz extracelular**

La MEC es una estructura fisiológica con importantes propiedades bioquímicas y mecánicas que facilitan su participación en labores de soporte, regeneración y eliminación de productos de desecho de las células. Para ello, necesita moléculas como los PGs, entre otras. De la familia de HSPGs encontramos tres en la MEC: perlecano, agrina y colágeno 18 (Iozzo, 1998).

#### **a. Perlecano**

La proteína núcleo del perlecano (PRCAN) está codificada por el gen *HSPG2* y es una de las más grandes identificadas formando parte de los PGs, con un tamaño que ronda los 400 kDa (Dodge et al., 1991; Iozzo, 2005).

Se divide en 5 dominios que contienen proteínas relacionadas con moléculas efectoras en procesos de adhesión, del metabolismo y de la división celular. El dominio I presenta en su extremo una región llamada SEA (siglas en inglés de las tres proteínas donde fue localizado inicialmente: proteína espermática, enteroquinasa y agrina); en la región SEA se anclan 3 cadenas de HS. El dominio II tiene 4 repeticiones similares al receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y una unidad similar a la inmunoglobulina G (IgG). En el dominio III hay 3 regiones globulares similares al brazo corto de la laminina, interrumpidas por repeticiones similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF). Las 21 subunidades de IgG que conforman el dominio IV son homólogas a las de la molécula neural de adhesión celular (N-MAC). Finalmente, el dominio V o endorrepelina muestra tres regiones globulares homólogas a la laminina 1 y entre ellas, se localizan 2 unidades repetidas similares al EGF (figura 13) (Murdoch et al., 1992; Brown et al., 1997; Iozzo, 1998; McCarthy, 2015).



**Figura 13. Molécula de perlecano con los 5 dominios.** En dominio I se localiza zona de unión del HS y la región SEA. Dominio II con regiones LA y una IgG. Dominio III con regiones L4 intercaladas con LE. Dominio IV con subunidades de IgG. Dominio V con subunidades LG y EG. SEA: siglas en inglés de proteína espermática, enteroquinasa y agrina; LA: receptor tipo A del LDL; L4: dominio de laminina tipo IV; LE: subunidades de laminina similares al factor de crecimiento epidérmico; IgG: inmunoglobulina G; LG: dominios de laminina tipo G; EG: subunidades similares al factor de crecimiento epidérmico. (Traducido y modificado de Whitelock et al., 2008)

El PRCAN es uno de los componentes esenciales de las membranas basales y es posible encontrarlo en diferentes tejidos y líneas celulares. Estas dos características, ubicuidad y diversidad estructural, le permiten participar en la modulación de la migración, adhesión y muerte celulares. También regula el ensamblaje de la MEC, con acción predominante en la biomecánica del hueso y del cartílago. Tiene la capacidad de presentar factores de crecimiento por lo que interviene en la embriogénesis. Además, se sabe que participa en la regulación del metabolismo lipídico, controla la fibrogénesis, la angiogénesis y algunos factores protumorales; en cerebros sanos se ha observado que ejerce cierto efecto neuroprotector (Farach-Carson y Carson, 2007; Whitelock et al., 2008; Roberts et al., 2012; Iozzo y Schaefer, 2015; Lord et al., 2018).

La presencia de PRCAN ha sido demostrada en las alteraciones que acontecen en la EA: unido a la ApoE, al péptido  $\beta$ a de placas neuríticas y difusas (incluso se ha identificado en las placas primitivas, donde estabiliza las fibrillas de amiloide y su acúmulo progresivo). Se ha relacionado con el PPA, donde la heparina parece promover la escisión por la  $\beta$ secretasa; y también se ha asociado a la afectación vascular de los pequeños vasos conocida como CAA, (Snow et al., 1994a; Castillo et al., 1997; García de Yébenes et al., 1999).

## **b. Agrina**

La AGRN es una proteína de unos 220 kDa de peso codificada por el gen *AGRN* (Rupp et al., 1992). Hasta la fecha, se conocen seis isoformas según se encuentre unida a la lámina basal (LB) (las isoformas más cortas) o secretada en la MEC (Gesemann et al., 1995).

Presenta un extremo N-terminal con sitios de unión a lamininas, y este extremo se modifica cuando aparece anclada a la LB en las isoformas cortas. A continuación del extremo N-terminal se identifican nueve módulos similares a la folistatina. La zona C-terminal comprende cuatro unidades similares al EGF y 3 unidades similares a la laminina G. Las cadenas de GAGs se unen en sitios concretos en la zona central. Cerca del C-terminal hay un sitio específico para unión de heparina cuando la AGRN se encuentra en forma secretada. En ese extremo reside su actividad de agrupación y estabilización de los receptores de acetilcolina en la unión neuromuscular, acción que, por otro lado, es inhibida por la heparina soluble (Denzer et al., 1998; Ruegg y Bixby, 1998).

La presencia de AGRN en el SNC, sobre todo durante el desarrollo, y su interacción con N-MAC sugieren su participación en procesos de neurogénesis y sinaptogénesis (McMahan, 1992; O'Connor et al., 1994). Por otro lado, se ha demostrado su asociación con las PS y los ONFs en la EA, de manera que podría intervenir estabilizando dichas lesiones una vez formadas. (Kröger y Schröder, 2002).

Otra parte de su actividad parece estar relacionada con el mantenimiento de células madre hematopoyéticas, la adhesión de factores de crecimiento vascular, interviene en la maduración y supervivencia de los condrocitos y en el desarrollo esquelético (Bezakova 2003; Eldridge et al., 2015).

## **c. Colágeno XVIII**

El gen *COL18A1* codifica tres isoformas de colágeno XVIII. Está presente en la LB de casi todos los tejidos, pero su localización depende de la isoforma. Es miembro de una subfamilia del colágeno llamada multipexinas.

La molécula posee varios dominios, algunos de los cuales unen los GAGs. El extremo N-terminal determina la longitud de la isoforma y el extremo C-terminal, conocido como endostatina, tiene actividad anti-angiogénica, de supresión tumoral y

función reguladora en el desarrollo del sistema vascular (O'Reilly et al, 1997; Saarela et al., 1998; Elamaa et al., 2003).

En relación con la EA, en los últimos años se ha demostrado que las isoformas cortas y largas se acumulan en vasos cerebrales afectados con CAA y también en las placas seniles clásicas. La endostatina liberada tras el proceso de escisión del colágeno interacciona con  $\beta$  y se observa, por tanto, en las neuronas y el espacio extracelular de cerebros afectados de EA (Heljasvaara et al, 2017).

### **3.1.3. Otros proteoglicanos**

#### **a. Serglicina**

La serglicina (SRGN) es el único HSPG intracelular descubierto hasta la fecha, y está codificada por el gen *SRGN*. Su estructura tiene tres dominios: un péptido señal, un dominio central N-terminal y el dominio de glicosilación donde se unen los GAGs, que serán fundamentalmente cadenas de heparina y, en ocasiones CS, unidas covalentemente a repeticiones sucesivas del dímero Ser-Gly (Alliel et al., 1988; Kolset y Tveit, 2008).

SRGN se acumula en gránulos de muchas poblaciones celulares (mastocitos, leucocitos, condrocitos, células endoteliales, miocitos del músculo liso); colabora en el empaquetamiento de proteasas, histamina, citoquinas, quimiocinas, mediadores lipídicos, factores de crecimiento y otras moléculas necesarias para la respuesta inflamatoria, la proliferación celular y el remodelamiento de tejidos dañados. Por otro lado, puede ser secretado fuera de la célula, favoreciendo la proliferación de ciertos cánceres como el mieloma múltiple, timoma, linfoma y el cáncer de mama (Douaiher et al., 2014; Korpetinou et al., 2014; Iozzo y Schaefer, 2015).

### 3.2. BIOSÍNTESIS DEL HEPARÁN SULFATO

La biosíntesis de las cadenas de HS es un proceso complejo secuencial, que se lleva a cabo en el aparato de Golgi. Es catalizado por gran variedad de enzimas (figura 14) que son proteínas transmembrana (menos la 3-O-sulfotransferasa) codificadas por 23 genes. La síntesis tiene lugar en tres pasos: inicio, polimerización y modificación de la cadena (Kreuger y Kjellén, 2012).

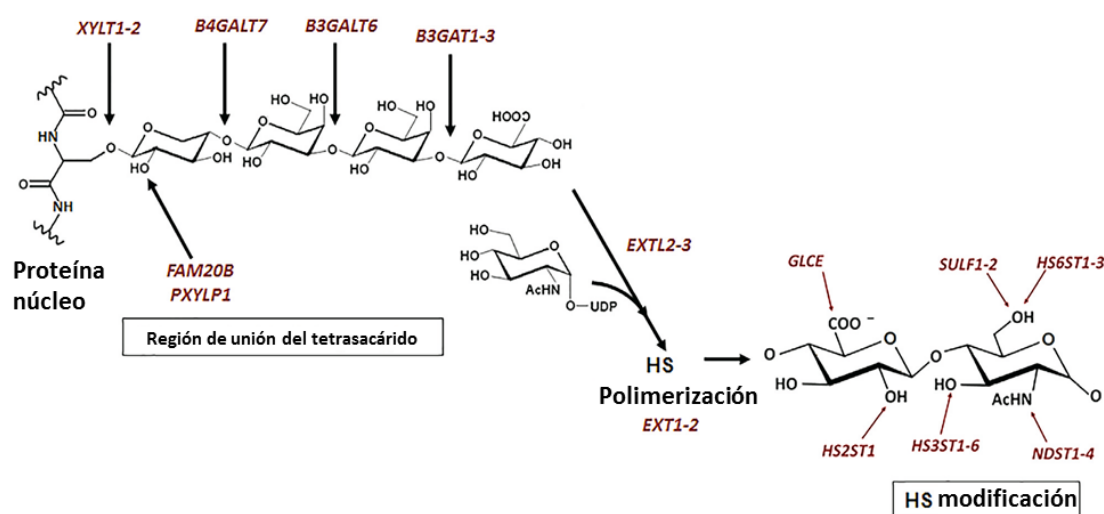


Figura 14. Representación esquemática de los genes que codifican las enzimas de la biosíntesis del Heparán Sulfato.

Las 3 primeras etapas de la síntesis del HS, inicio, polimerización y modificación de la cadena conferirán especificidad funcional y tisular y se completan con remodelaciones posteriores (Lawrence et al., 2008).

#### 3.2.1. Inicio de la síntesis de la cadena de heparán sulfato

Esta etapa es común para las cadenas de HS y de CS. Sobre regiones de serina-glicina flanqueadas por aa ácidos (-O-ser) de la proteína núcleo ya formada tiene lugar la síntesis de una secuencia de iniciación o *linker*, formada por un tetrasacárido integrado por un residuo de xilosa (Xyl), dos residuos consecutivos de galactosa (Gal) y un residuo de GlcA (Esko y Zhang, 1996; Whitelock y Iozzo, 2005).

El residuo de Xyl se añade a partir de uridin-difosfato-xilosa (UDP-Xyl) por acción de dos xilosiltransferasas, XYLT-1 y -2, (Götting et al., 2000; Pönighaus et al., 2007). A continuación, las enzimas galactosiltransferasa I y II, codificados por los genes *B4GALT7* y *B3GALT6* respectivamente, incorporan dos residuos de Gal usando como donador UDP-Gal (Bai et al., 2001; Hennet, 2002).

Seguidamente, el residuo de Xyl es fosforilado por la enzima FAM20B (Moses et al., 1999; Koike et al., 2014), lo que actúa de señal para que la enzima glucuroniltransferasa I (GlcAT-I) catalice la transferencia desde el UDP-GlcA del residuo GlcA (Pedersen et al., 2000). De forma concomitante, la enzima 2-fosfoxilosa fosfatasa, XYLP, retira el fosfato de Xyl, y queda de esta manera, el tetrasacárido linker completamente formado (figura 14).

A partir de la constitución del tetrasacárido de unión, la síntesis continúa hacia HS o CS en función de las necesidades biológicas de la célula en ese momento (McCormick et al., 2000).

### **3.2.2. Polimerización de la cadena de heparán sulfato**

En esta etapa intervienen cinco glicosiltransferasas diferentes. Las N-acetil glucosaminiltransferasas-I, de las que se conocen tres isoformas, EXTL1, -2 y -3, codificadas por los genes *EXTLs*, y las proteínas supresoras de tumores de exotosinas o sintasas de heparán sulfato, EXT1 y -2, codificadas por los genes *EXT1* y -2.

La síntesis de las cadenas de HS propiamente dichas comienza por acción de un residuo de GlcNAc al tetrasacárido de unión, catalizado por las EXTLs, principalmente EXTL3, aunque EXTL2 también parece estar implicada (Kreuger y Kjellén, 2012). EXTL1 es la isoforma menos efectiva en la transferencia, se ha relacionado con la elongación, aunque son necesarios más estudios para aclarar su papel en la polimerización (Kim et al., 2001).

A partir de este punto, intervienen EXT1 y -2, codificadas por los genes *EXT1* y *EXT2* respectivamente. Estas enzimas incorporan alternativamente sacáridos de GlcA y GlcNAc a la cadena. Se organizan en un complejo heterooligomérico EXT1/EXT2, también conocido como copolimerasa o HS-polimerasa (HS-pol). El complejo parece mostrar una actividad catalítica mucho más eficiente que si las enzimas actuaran por separado (Lind et al., 1998; McCormick et al., 2000; Senay et al., 2000).



### 3.2.3. Modificación de la cadena de heparán sulfato

La introducción de los cambios específicos en la cadena de HS constituirá la estructura fina de la molécula donde estará codificada la información biológica que permitirá la interacción con ligandos específicos (Esko y Lindahl, 2001).

En esta etapa, se suceden de manera secuencial e interrelacionada tres tipos de modificaciones: una N-deacetilación seguida de N-sulfatación, una epimerización y diversas O-sulfataciones (Lidholt et al., 1989; Esko y Selleck, 2002) (figura 14).

#### a. N-deacetilación/N-sulfatación

La primera modificación tiene lugar sobre el residuo de GlcNAc, y es llevado a cabo por una familia 4 enzimas bifuncionales, denominadas N-deacetilasas/N-sulfatasas (NDSTs), codificadas por los genes *NDST1*, *-2*, *-3* y *-4* (Esko y Lindahl, 2001). Estas enzimas eliminan mediante hidrólisis los grupos acetilo de los residuos de GlcNAc (función de deacetilación) y transfieren posteriormente grupos sulfato a dichos residuos (función sulfatación), pasando de GlcNAc a GlcNS, lo que aporta carga negativa. A veces, tras la deacetilación no se transfiere el sulfato, quedando libre el residuo de GlcN (Esko y Selleck, 2002).

Las distintas NDSTs presentan actividad y localización diferente, NDST3 es menos efectiva para la función de sulfatación y NDST4 tiene menor capacidad para la hidrólisis de restos acetilo; la expresión de ambas isoformas parece quedar restringida fundamentalmente a la etapa embrionaria (Aikawa, et al., 2001; Grobe et al., 2002). Por el contrario, NDST1 y *-2* se expresan en todos los tejidos adultos y su doble actividad es fuerte, sobre todo en el caso de NDST2 (Lindahl et al., 1998; Sugahara y Kitagawa, 2002). Se ha descrito que la sobreexpresión de estas enzimas originará cadenas más largas de lo normal (Esko y Selleck, 2002; Sheng et al., 2011).

Las reacciones son subestequiométricas, y no ocurren aleatoriamente a lo largo de la cadena, sino que se sitúan de forma espaciada. El resultado es una organización en dominios, apareciendo regiones sulfatadas (dominios NS) de entre 2 y 9 unidades de longitud, regiones poco modificadas que conservan el residuo acetilo (dominios NA), habitualmente de mayor longitud, y dominios con grado intermedio de sulfatación, regiones conocidas como zonas de transición (dominios NA/NS) (Kreuger et al., 2006; Staples et al., 2010; Dou et al., 2015). Generalmente los 10 primeros disacáridos que se unen al linker forman un dominio NA (Mobli et al., 2008).

## **b. Epimerización**

El segundo paso de modificación es la epimerización del grupo carboxilo de GlcA convirtiéndolo en un residuo de ácido idurónico (IdoA). Esta reacción es llevada a cabo por la enzima glucuronil C-5 epimerasa (GLCE), codificada por el gen *GLCE*, que actúa preferentemente en los dominios NS sobre residuos GlcA asociados a GlcNS (Hagner-Mcwhirter et al., 2000). La epimerización da a la cadena de HS mayor flexibilidad y versatilidad, incrementando la interacción con ligandos porque los residuos de IdoA pueden adoptar tres conformaciones estructurales diferentes ( ${}^1C_4$ ,  ${}^4C_1$  o  ${}^2S_0$ ), mientras que GlcA sólo presenta una conformación ( ${}^4C_1$ ) (Mulloy y Forster, 2000; Esko y Selleck, 2002; Sheng et al., 2011).

## **c. O-sulfataciones**

A continuación, tienen lugar diversas O-sulfataciones en ambos residuos del disacárido de HS.

La primera de estas reacciones es llevada a cabo por la iduronosil 2-O-sulfotransferasa, HS2ST, que cataliza la transferencia de un sulfato al grupo hidroxilo en el carbono 2 (C-2) de los residuos de IdoA y algunos GlcA. Su actividad ocurre predominantemente sobre los dominios de la cadena ya sulfatados y epimerizados por GLCE (Crawford et al., 2001; Smeds et al., 2010).

El siguiente paso en la modificación de la cadena de HS es la sulfatación del C-6 del residuo de glucosamina que es catalizada por tres glucosaminil 6-O-sulfotransferasas (HS6ST1-3), que presentan algunos rasgos diferenciales (Habuchi et al., 2000; Nagai et al., 2007). HS6ST1 es más abundante en hígado, y muestra preferencia por los residuos GlcNS que forman el disacárido con IdoA en los dominios NS. HS6ST2 predomina en cerebro y bazo, y su actividad depende de la concentración del sustrato, es más afín a IdoA en bajas concentraciones y a GlcA a altas concentraciones. HS6ST3 no muestra preferencia de sustrato, y se encuentra en casi todos los tejidos (figura 14) (Nakato y Kimata, 2002; Habuchi et al., 2003).

La última modificación durante la síntesis de la cadena de HS es la transferencia de un grupo sulfato al grupo hidroxilo en el C-3 de residuos de GlcNS o de GlcNAc por varias glucosaminil 3-O-sulfotransferasas (HS3STs). Esta sulfatación no es frecuente, pero sí juega un papel primordial en el incremento de la selectividad de interacción de los ligandos a la molécula (Merry et al., 1999; Yabe et al., 2001).

Las HS3STs son una familia formada por 7 miembros, HS3ST-1,-2,-3A,-3B,-4,-5,-6, que muestran distintos patrones de actividad relacionados con la preferencia por ciertas unidades disacáridicas (Lawrence, et al., 2007). Se pueden establecer dos grupos en función de que las isoformas necesiten que el C-2 del residuo IdoA o GlcA esté sulfatado. De un lado, HS3ST-2, -3A, -3B, -4 y -6, que conforman el subgrupo sulfotransferasas-gD por su capacidad para producir zonas de unión para la glicoproteína gD del virus Herpes Simple tipo 1, precisan la sulfatación en C-2 para su acción. (Xia et al., 2002; Xu et al., 2005; Liu y Pedersen, 2007; Mochizuki et al., 2008; Nguyen et al., 2012). De otro lado, HS3ST-1 y -5 conforman el subgrupo llamado sulfotransferasas-AT porque pueden establecer un lugar de anclaje para la antitrombina (AT), y no necesitan que la sulfatación previa del C-2 (Zhang et al., 2001; Mochizuki et al., 2008).

Como resultado de todo lo descrito se obtiene una macromolécula de entre 30 y 200 unidades disacáridicas agrupadas en dominios, con una gran carga negativa debida a los numerosos grupos sulfato (Esko y Selleck, 2002; Kreuger y Kjellén, 2012). Una vez formado, el HS portará un código de información relevante para su participación en procesos fisiológicos y patológicos (Nakato y Kimata, 2002; Sarrazin et al., 2011).

Actualmente, se desconoce la regulación exacta del proceso de biosíntesis de HS. Algunos autores defienden la hipótesis del GAGosoma propuesta por Esko y Selleck, en la que las enzimas se encuentran organizadas en complejos reguladores de la actividad catalítica. En este supuesto algunas enzimas pueden estar interrelacionadas, como se ha mostrado para EXT1/EXT2, EXT2/NDST1, y GLCE/HS2ST. Además, se cree que la disponibilidad de sustrato en las reacciones puede influir limitando o facilitando el proceso (Kreuger y Kjellén, 2012, Préchoux et al., 2015; Deligny et al., 2016).

### **3.2.4. Modificaciones del heparán sulfato posteriores a la síntesis**

Las cadenas formadas pueden sufrir diversas modificaciones posteriores a su síntesis, con finalidad funcional específica de la célula o del tejido donde se encuentre. Estas modificaciones son realizadas por tres enzimas, dos sulfotransferasas (SULF1 y -2) y una heparanasa (HPSE) (Kreuger y Kjellén, 2012).

#### **a. Sulfotransferasas**

SULF1 y SULF2 son endosulfatasas extracelulares que se encargan de retirar selectivamente grupos sulfato del C-6, principalmente de GlcNS de los dominios NS,

aunque también actúan en algunos dominios NA/NS. La actividad catalítica de estas sulfatasas reside en su extremo N-terminal, mientras que en su un extremo C-terminal, hidrofílico y característico de las dos isoformas, se encuentra la zona de unión específica a GlcNS. Está descrito que modulan las interacciones del HSPG con determinados ligandos, y su labor resulta imprescindible durante el desarrollo embrionario, la reparación tisular y el crecimiento tumoral (Morimoto-Tomita et al., 2002; Ai et al., 2006; El Masri et al., 2017).

#### **b. Heparanasa**

La HPSE es una endo-beta-glucuronidasa. Cataliza la escisión de la cadena de HS en zonas concretas, liberando fragmentos de entre 10 y 20 unidades sacarídicas, con pesos moleculares entre 5 y 7 kDa, que pueden tener diversas actividades biológicas (Okada et al., 2002; Peterson y Liu, 2010).

La HPSE está involucrada en funciones biológicas esenciales modulando la señalización y la capacidad de unión del HS a multitud de proteínas, incluyendo factores de crecimiento, quimiocinas, enzimas y proteínas de la MEC. Además, su actividad está estrechamente relacionada con procesos de inflamación y angiogénesis y patologías como la diabetes, infecciones, determinados tipos de cáncer y progresión metastásica y estados neurodegenerativos como la EA (Vlodavsky et al., 2008; Wilson et al., 2014; Rivara et al., 2016).

### **3.3. FUNCIONES DEL HEPARÁN SULFATO**

Las cadenas de HS están implicadas en multitud de funciones esenciales para la biología humana. Su participación en el control de los procesos fisiológicos sucede sobre todo mediante interacción de los patrones específicos de sulfatación de las cadenas con diferentes ligandos como citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, antígenos, enzimas, moléculas lipídicas, proteínas y otros componentes de la MEC. Su función está condicionada no solo por su estructura fina, sino también por la asociación a diferentes proteínas núcleo. Por otro lado, se han relacionado también con muchos procesos patológicos. Esta doble actividad se debe a las estructuras específicas que adoptan las cadenas en los diferentes tejidos celulares. (Whitelock e Iozzo, 2005).

### 3.3.1. Papel fisiológico del HS

La interacción de los HSPGs con otras moléculas se establece fundamentalmente mediante enlaces iónicos de las cadenas de GAGs que, en ocasiones, requieren estabilización adicional por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Las moléculas ligando tienen secuencias de aa concretas, lisina y arginina en su mayoría, que se unen, preferentemente, a los grupos sulfato y carboxilo del HS. Una vez asociadas, el HS puede modificar características de la molécula y, por ejemplo, protegerla de mecanismos de degradación. También puede posibilitar su almacenamiento y/o transporte, modular su conformación para incrementar la capacidad de interacción del ligando con su receptor, actuar como marcadores de señalización celular o puede, incluso, inhibir la acción del ligando (Thompson et al., 1994; Esko y Selleck, 2002; Kreuger et al., 2006; Guimond et al., 2009).

Como decíamos anteriormente, la unión no se produce de forma aleatoria. Normalmente tiene lugar en dominios NS concretos de la cadena del GAG. Con esas regiones los ligandos pueden establecer asociaciones más o menos específicas (Kreuger y Kjellén, 2012), dependiendo de si reconocen:

- a. Patrones de distribución de dominios (NS y NA/NS), como es el caso de la endostatina, el factor 4 plaquetario o la interleukina-8 que se unen a dominios llamados SAS, formados por dos dominios NS separados por zonas con residuos GlcNAc menos modificados (Stringer y Gallagher, 1997; Spillmann et al., 1998; Kreuger et al., 2002).
- b. Una distribución concreta de grupos sulfato, como hace el FGF2 que reconoce una secuencia mínima de 5 sacáridos con unidades GlcNS (6s)-IdoA (2s) (Reiland et al., 2006).
- c. Disposiciones específicas de epímeros de ácido urónico y ciertos residuos sulfatados, como es el caso de la sulfatación por las HS3STs en la etapa última de la biosíntesis del HS. A pesar de que en humanos hay descritas 7 enzimas implicadas en la adición de un sulfato en el carbono 3, no es una modificación frecuente. En cualquier caso, queda reservada a un número limitado de moléculas (glicoproteína D del VHS, FGFs, ciclofilina B, estabilina, AT). La AT es el paradigma de molécula que reconoce grupos 3-O-S; concretamente, la AT se une a un pentasacárido de la cadena sacarídica que contiene un grupo 3-O-sulfato central. Esta unión potencia la actividad anticoagulante

de la AT y su papel secundario como inhibidor de la inflamación y la angiogénesis (Wiedermann y Romisch, 2002; de Agostini et al., 2008; Thacker et al., 2014).

- d. Habría que añadir que la presencia de residuos IdoA dota a la cadena de mayor flexibilidad y cierta disposición helicoidal en la estructura secundaria y esta característica también influye en la unión a otras moléculas (Lindahl et al., 1998; Mulloy y Forster, 2000).

Los HSPGs son esenciales durante el desarrollo embrionario porque median la señalización de factores de crecimiento, participando en la diferenciación celular y la organogénesis. (Nakato y Kimata, 2002; Patel et al., 2017). Organizan el espacio extracelular y el citoesqueleto en numerosos tejidos, intervienen en la reparación del daño tisular, regulan la homeostasis, participan en procesos como la proliferación celular, la inflamación y la vascularización. Concretamente en el cerebro, mediante la unión a lamininas, PPA y FGF<sub>2</sub>, modulan la plasticidad neuronal y sináptica interviniendo en actividades relacionadas con la memoria (Bernfield et al., 1999; Schaefer y Schaefer, 2010; Zhang et al., 2014a; Lindahl et al., 2017).

### **3.3.2. Patología**

Las moléculas de HS también participan en muchos eventos patológicos. En este sentido, están relacionados con procesos infecciosos, algunas enfermedades del metabolismo como dislipemias y diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas, pulmonares, gastrointestinales, renales, hematológicas y autoinmunes. La mutación en los genes que codifican las enzimas de la síntesis de HS, y también la alteración en las enzimas que intervienen en la degradación de las cadenas, pueden dar lugar a enfermedades raras (mucopolisacaridosis), malformaciones congénitas, enfermedades por depósito de proteínas (conocidas como amiloidosis) y varios tipos de cáncer (Fernández-Vega et al., 2015; Freeze et al., 2017; Lorente-Gea et al., 2017; Martin et al., 2018).

#### **a. HS en infecciones**

El HS participa en la transmisión de enfermedades infecciosas. Los microorganismos utilizan estas moléculas para potenciar su virulencia e infectividad. Hay que tener en cuenta que los HSPGs se encuentran en prácticamente todas las células del cuerpo humano por lo que, además de bacterias, priones, virus, y otros parásitos interactúan con sus cadenas. Estos microorganismos, mediante la adhesión a las cadenas

de GAGs pueden evitar ser destruidos por los mecanismos de defensa del huésped. Algunos virus como el virus de la hepatitis B, el virus herpes simple y el VIH se unen a cadenas de HS para ser vehiculados al interior de las células y diseminarse. Pueden hacerlo por mecanismos de endocitosis de forma general o incluso más específicos como la internalización por macropinocitosis. El grado de sulfatación de las cadenas es reconocido por algunos parásitos para su unión al HS, por ejemplo, *Plasmodium spp.*, *Leishmania spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*. También muchas bacterias Gram + y Gram- se valen de los HSPGs como co-receptores para diseminarse, pudiendo incluso escindir la proteína núcleo y dar lugar al proceso conocido como *shedding* (Hess et al., 2006; Holmes et al., 2013; García et al., 2016b; Rajas et al., 2017; Martin et al., 2018).

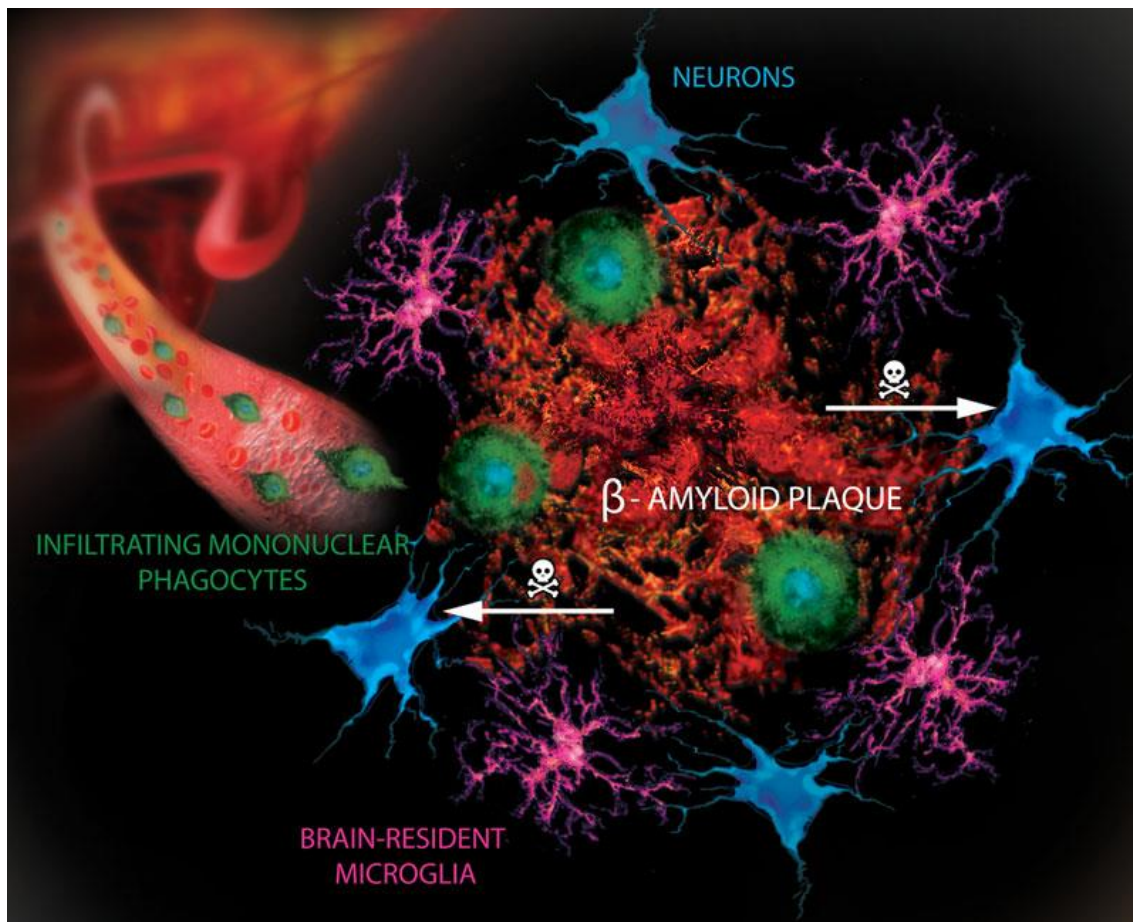
Los procesos infecciosos cobran cada vez más importancia en el establecimiento y progresión de la EA. Conociendo la relación entre patógenos y HS, estudios recientes sugieren la implicación de infecciones en la patogenia de la enfermedad, en tanto que los parásitos atraviesan la BHE y dan lugar a una respuesta inmunológica sostenida en el tiempo que podría ser el origen de la formación de las PS y los ONFs (Miklossy, 2011; Allen, 2016; Vijaya et al., 2016).

#### **b. HS en cáncer**

Los HSPGs se relacionan estrechamente con la patogénesis y la progresión de tumores (Nagarajan et al., 2018). Su ubicuidad favorece su participación en diferentes tipos de cánceres cuando se alteran las enzimas encargadas de la biosíntesis y modificación de la molécula. De esta forma, el HS está implicado en neoplasias hematológicas, cáncer de colon, próstata, cérvix, páncreas, mama, hepatoblastomas, rhabdomyosarcomas y otros cánceres pediátricos (Fernández-Vega et al., 2013; Kaur y Cummings, 2019). Puede favorecer el crecimiento celular incidiendo directamente en la multiplicación aberrante de las líneas celulares y/o promover procesos de angiogénesis que aseguran sustrato a dichas células cancerígenas, además de favorecer el remodelamiento de la MEC y alterar ciertas funciones de las células inmunitarias. Aunque aún hay incógnitas por resolver, se sabe que las modificaciones en los patrones de sulfatación y ciertas modificaciones como metilaciones en las cadenas son las responsables de su alteración funcional (Fernández-Vega et al., 2015; Garcia et al., 2016a; Denys y Allain, 2019;).

#### **c. HS en cerebro**

En la EA, las lesiones responsables de la destrucción progresiva de los tejidos llevan asociado un componente inflamatorio. Alrededor de las PS y los ONF se encuentran restos de células de la glía, macrófagos y moléculas mediadoras de la respuesta al daño tisular: reactantes de fase aguda, FGF, citoquinas, interleucinas, HSPGs, etc. Por otro lado, los HSPGs están relacionados directamente con enfermedades neurodegenerativas por depósito proteico como la EA, en tanto que se asocian con las proteínas responsables de la enfermedad:  $\beta$ a, Tau, APP. Las cadenas sacarídicas facilitan y estabilizan la formación de los agregados proteicos en PS y ONFs, y algunos estudios recientes confirman este hecho al demostrar que los depósitos de amiloide se interrumpen al inhibir la biosíntesis del HS. La unión con estos agregados favorece su diseminación e impide su eliminación (Li et al., 2005; Iannuzzi et al., 2015; Sepulveda-Diaz et al., 2015) (figura 15).



**Figura 15. Macrófagos en la enfermedad de Alzheimer.** Representación esquemática que muestra el papel de los macrófagos en la enfermedad de Alzheimer. A la izquierda se muestra una arteria cerebral y a la derecha la placa de amiloide. Los macrófagos infiltran el parénquima cerebral y penetran en la placa para fagocitar y eliminar los depósitos de proteína  $\beta$ a. Los macrófagos se representan en verde, la microglía cerebral en rosa, las neuronas en azul y la placa de  $\beta$ a en rojo. (Traducido de Gate et al., 2010)



Como ya se comentó anteriormente, la formación de las PS y ONF sucede de modo progresivo. Inicialmente estas moléculas se organizan en estructuras prefibrilares (placas difusas y filamentos helicoidales pareados) que madurarán hasta constituir los agregados característicos. El HS interactúa y participa en todas las fases del proceso, en muchos casos promoviendo la agregación de proteínas formadoras de amiloides como Tau, alfa-sinucleína, el péptido  $\beta$ a y priones (Ancsin, 2003; Motamedi-Shad et al., 2009; Iannuzzi et al., 2015; Lorente-Gea et al., 2020).

En relación con los agregados de  $\beta$ a, las regiones altamente sulfatadas del HS son más prevalentes en los depósitos que contienen  $\beta$ a40 y  $\beta$ a42, mientras que los sacáridos con menor grado de sulfatación solo se encuentran en placas que contienen  $\beta$ a40 (Zhang et al., 2014b).

En el caso de la proteína Tau, las moléculas de HS altamente sulfatadas parecen favorecer la hiperfosforilación de Tau por quinasas dependientes de sustrato. El GAG se agrega a los ONF y es necesario para la transformación de los filamentos pareados en agregados fibrilares. Además, juega un papel principal en la internalización de estos agregados de Tau hiperfosforilada utilizando mecanismos de endocitosis y macropinocitosis, similares a los empleados por priones y algunos virus. El HS se une a regiones específicas de Tau y se internaliza en las células sanas, alterando su estructura y funcionamiento (Snow et al., 1994b; Konno et al., 2004; Holmes et al., 2013; Zhao et al., 2017).

De las enzimas modificadoras de la síntesis cabe destacar el papel que juegan las HPSEs. La HPSE parece que bloquea la formación de fibrillas intracelulares de Tau y descompone los depósitos de  $\beta$ a-HS frenando la progresión de la enfermedad, sin embargo, la HPSE2 podría interferir en la función de la HPSE inhibiéndola e impidiendo, por tanto, la eliminación de ambas proteínas (García et al., 2017; Lorente-Gea et al., 2017; Maiza et al., 2018).



## **HIPÓTESIS**

Nuestra premisa es que la estructura fina del HS está alterada en la EA, y además, lo está de manera singular entre los diferentes grados de la enfermedad y las zonas cerebrales afectadas. Dado que la estructura del HS viene determinada principalmente por los enzimas implicados en su biosíntesis y modificación, es esperable detectar variaciones en la expresión de los genes que dan lugar a dichos enzimas.

## **OBJETIVOS**

1. Identificar, en pacientes con EA en diferentes grados de afectación (“grados leve, moderado y severo”) y pacientes sin EA (clasificados como “grado normal”), las diferencias en la expresión de los genes codificantes de los enzimas encargados de la síntesis de las cadenas de HS, incluyendo glicosiltransferasas, N-sulfotransferasas, epimerasa, O-sulfotransferasas y sulfatasas con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).
2. Analizar las diferencias en la expresión de dichos genes en función de la zona cerebral para cada grado de patología mediante análisis estadístico.
3. Analizar histológicamente la presencia de HS con técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) en las diferentes estructuras del cerebro de pacientes con EA.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS**

Las muestras de tejido cerebral fueron cedidas por el Biobanco de cerebros del Hospital Universitario de Araba, donde se fueron recogidas en autopsias realizadas entre febrero de 2013 y octubre de 2015, previa aprobación de la Junta de Revisión de Procedimientos Éticos de dicha institución. Además, para la investigación se recibió un consentimiento informado firmado por cada paciente o sus familiares.

El diagnóstico de EA fue realizado en función de criterios inmunohistoquímicos y morfológicos, basados en las recomendaciones para la clasificación de la EA del NIA-RI (National Institute on Aging and Reagan Institute), publicadas por consenso en 1997 (NIA-RI, 1997). De cada muestra se registró el momento de la autopsia y las características individuales de los pacientes (edad, sexo, y peso cerebral). Se utilizaron 20 muestras de 7 zonas de cerebro procedente de cadáver, 5 de pacientes (sanos) sin diagnóstico de EA en el momento de su fallecimiento, que actuaban como control y 15 procedentes de pacientes que habían padecido EA (tabla 3).

Los 15 pacientes enfermos se agruparon por grados de afectación siguiendo la clasificación en estadios progresivos de afectación de Braak y Braak, publicada en 1991 (Braak y Braak, 1991), en: cinco pacientes con grado leve (estadios I-II de Braak), cinco pacientes con grado moderado (estadios III-IV) y cinco pacientes con grado severo de enfermedad (estadios V-VI). En todos los pacientes se evaluó el deterioro cognitivo con el cuestionario Mini Examen del Estado Mental (MMSE).

Para la elección de las áreas del cerebro a analizar, también se siguió la clasificación de Braak y Braak (Braak y Braak, 1991) que correlaciona áreas concretas del cerebro en función de la progresión de la enfermedad: zona 1, región transentorrinal (amígdala); zona 2, hipocampo anterior; zona 3, hipocampo posterior; zona 4, Claustrum; zona 5, cisura calcarina; zona 6, globo pálido (parte más medial del núcleo lenticular de los ganglios de la base); zona 7, cerebelo (tabla 4).

**Tabla 3. Datos de las muestras empleadas para la realización del trabajo.** EA Leve: estadios I y II de Braak y Braak; EA Moderada: estadios III y IV de Braak y Braak; EA Severa: estadios V y VI de Braak y Braak.

Características / datos estadísticos descriptivos		Pacientes				
		Total (N=20)	Control (N=5)	EA Leve (N=5)	EA Moderada (N=5)	EA severa (N=5)
Clasificación Braak y Braak				Estadios I-II	Estadios III-IV	Estadios V-VI
Sexo (%)	Hombre	6 (30)	2 (40)	1 (20)	2 (40)	1 (20)
	Mujer	14 (70)	3 (60)	4 (80)	3 (60)	4 (80)
Edad (media $\pm$ ds)		84 $\pm$ 11	79 $\pm$ 16	89 $\pm$ 5	89 $\pm$ 10	80 $\pm$ 12
Peso cerebral (g)		1128 $\pm$ 111	1148 $\pm$ 57	1177 $\pm$ 26	1122 $\pm$ 31	967 $\pm$ 19
Intervalo Postmortem (h)		17 $\pm$ 5	18 $\pm$ 5	19 $\pm$ 5	15 $\pm$ 5	20 $\pm$ 4
MMSE		-	-	22 $\pm$ 3	14 $\pm$ 4	7 $\pm$ 3

**Tabla 4. Zonas analizadas en las muestras recogidas.**

ZONA	REGIÓN
1	Transentorrinal (amígdala)
2	Hipocampo anterior
3	Hipocampo posterior
4	Clastrum
5	Cisura calcarina
6	Globo pálido
7	Cerebelo

## 2. MATERIALES

Para la realización de los procedimientos en el laboratorio se utilizaron los siguientes materiales, comprados a los fabricantes que se indican: RNeasy Kit y RNase-Free DNase de Qiagen (Hilden, Alemania); High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit y PowerSYBR Green PCR Master Mix de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA); GenElute PCR clean-up kit y 3-3' diaminobenzidina de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis,

MO, USA); suero fetal bovino Gibco-FBS de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA); solución de lavado Tween20® de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA) .

Para las técnicas de inmunohistoquímica se utilizaron los siguientes compuestos: anticuerpos primarios monoclonales anti-HS de ratón IgM F58-10E4, IgM JM403 todos de amsbio (AMS Biotechnology, Abingdon, UK); anticuerpo secundario anti-ratón marcado con polímero-HRP m-IgGκ BP-HRP (sc-516102) de Santa Cruz Biotechnology, Inc., (Dallas, Texas, USA); medio anhidro Entellan® (Merck, Germany)

### **3. AISLAMIENTO DE ARN**

Muestras cerebrales de entre 20 y 30 mg de peso fueron homogeneizadas con un polytron PT 2100 (Kinematica Inc.; Bohemia, NY, USA). A continuación, se procedió a la purificación del ARN con el kit RNeasy (Qiagen), como indican las especificaciones del fabricante. Las muestras se trataron con ADNasa libre de ARNasa (Qiagen) durante el proceso de purificación, para eliminar cualquier resto contaminante de ADN. Mediante espectrofotometría se determinó la concentración obtenida de ARN midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro Picodrop Microliter UV/Vis (Picodrop Limited, Hinxton, UK). Las muestras obtenidas se dividieron en alícuotas de 10 µl, usándose para la reacción de transcripción inversa, o se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

### **4. OBTENCIÓN DEL ADNc: REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

La síntesis de ADNc se llevó a cabo empleando 2 µg del ARN purificado de cada muestra, utilizando el kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” siguiendo las instrucciones del fabricante. Los componentes de la reacción fueron 2 µl de mezcla de nucleótidos, 2 µl de tampón, 0,8 µl de dNTPs, 0,5 µl de RT polimerasa, 2 µg de ARN y los µl necesarios en cada caso de H<sub>2</sub>O milliQ, hasta completar 20 µl de volumen final.

Una vez preparada, la reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador iCycler IQ (BioRad; Hercules, CA, USA) siguiendo el programa especificado en las instrucciones: 10 minutos a 25 °C, 2 horas a 37 °C, 5 segundos a 85 °C. Los productos resultantes se limpiaron con el kit “PCR Clean-Up GenElute” (Sigma-Aldrich) como recomienda el fabricante. Las muestras con ADNc fueron diluidas 1:20 con agua para la realización de las reacciones de PCR, o se conservaron a -20 °C para su uso posterior.

## **5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR)**

Los niveles de transcripción de los genes codificantes de las enzimas que participan en la síntesis y modificación de las moléculas de HS en las muestras fueron analizados mediante técnicas de amplificación en tiempo real. Para cada gen se emplearon oligonucleótidos específicos situados en diferentes exones o uniones de exones (Fernández-Vega et al., 2013). Las secuencias de los oligonucleótidos se detallan en la tabla 5. En todos los casos, el tamaño de los amplicones se situó en el intervalo comprendido entre 70 y 150 pares de bases, y se comprobó que las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) superasen los 77 °C; para cada amplicón se determinó la temperatura de fusión teórica utilizando el programa Biomath <https://www.promega.es/Resources/Tools/biomath/?fq=biomath>.

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ l, que incluía 1  $\mu$ l de del ADNc, 2  $\mu$ l de mezcla de oligonucleótidos del gen a analizar (directo y reverso) a una concentración final 200 nM, 2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milliQ y 5  $\mu$ l de PowerSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Las reacciones se llevaron a cabo como mínimo por triplicado, y el gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como control para normalizar la expresión génica individual. Una vez preparadas, las muestras fueron ensambladas en placas de microtitulación de 96 pocillos, selladas con película óptica y centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm.

La PCR a tiempo real fue llevada a cabo en un dispositivo de termociclación Real-Time HT7900 ABI Prism Detection System (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), en los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo. El programa utilizado fue: 10 minutos a 95 °C de temperatura, 50 ciclos de 15 segundos a 95 °C seguidos de 60 segundos a 60 °C y, finalmente, 60 segundos a 60 °C. Posteriormente, para evitar artefactos, se comprobó la especificidad de los productos obtenidos por PCR, verificándose para cada muestra un solo valor de  $T_m$  correspondiente al valor teóricamente esperado. Para ello, al fin de la reacción de PCR, se realizó un protocolo de disociación para cada amplicón empleando 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, y luego incrementando 0.5 °C por ciclo, durante 80 ciclos de 10 segundos cada uno.



**Tabla 5. Oligonucleótidos directos y reversos utilizados y características de los amplicones obtenidos.**

GEN		SECUENCIA		Longitud Amplicón	Tm amplicón
<b>POLIMERASAS DE HS</b>					
<i>EXTL2</i>	N-acetil-glucosaminiltransferasa-1	D5'→3'	TGAACTGGAAACCAATGCAG	97	76
		R5'→3'	AGGAAATTGCTGCCAAACTG		
<i>EXTL1</i>	N-acetil-glucosaminiltransferasa-2	D5'→3'	GATGAGAGGCTCCCACTTCA	143	83
		R5'→3'	CCTCCAGAGTGGTATGGATGA		
<i>EXTL3</i>	N-acetil-glucosaminiltransferasa-1,2 (Exostosina-like 3)	D5'→3'	CTCCGCCATGACGAAATC	127	84
		R5'→3'	AGTTGGAGTTGTAGAGCCAGGA		
<i>EXT1</i>	<b>HS sintasa-1 (Exostosina 1)</b>	D5'→3'	TTCCTGGTGTCTGTGTGAC	134	80
		R5'→3'	CTCTGTCGCTGGGCAAAG		
<i>EXT2</i>	<b>HS sintasa-2 (Exostosina 2)</b>	D5'→3'	CTGGGACCATGAGATGAATA	133	75
		R5'→3'	GATATCCCAGGCATTTTGTGA		
<b>MODIFICADORES DE HS</b>					
<i>NDST1</i>	<b>N-deacetilasa/N-sulfotransferasa-1</b>	D5'→3'	TCCCAAAGCTCCTCATCATC	124	81
		R5'→3'	AACTGGATCTCCTCAAAGGTCTC		
<i>NDST2</i>	<b>N-deacetilasa/N-sulfotransferasa-2</b>	D5'→3'	TCTGGACAGTTGCTGATTGTG	117	80
		R5'→3'	GAGGGTCCGTGTGTAGTTCAG		
<i>NDST3</i>	<b>N-deacetilasa/N-sulfotransferasa-3</b>	D5'→3'	CCTTGCAGAAGAGATGTTTGG	124	77
		R5'→3'	GTAGCAGGATCAGTTCTTAGTTGTTG		
<i>NDST4</i>	<b>N-deacetilasa/N-sulfotransferasa-4</b>	D5'→3'	GACATTGGGCTCCATCTGAC	132	75
		R5'→3'	GCTGCTGTCCATCAATAATTAGC		
<i>GLCE</i>	<b>Glucuronil C-5 epimerasa</b>	D5'→3'	TGTGGAAAGTCCGAGACAGAG	96	76
		R5'→3'	CTGGATTGGATAGAAATAGCCTTG		
<i>HS2ST1</i>	<b>Heparán sulfato 2-O-sulfotransferasa-1</b>	D5'→3'	TGGAGATGATTATAGACCAGGGTTAC	139	78
		R5'→3'	GCTATGGCCACAGAAGAACG		
<i>HS6ST1</i>	<b>Heparán sulfato 6-O-sulfotransferasa-1</b>	D5'→3'	GCAGGGAGTGGAGCTAACAG	133	82
		R5'→3'	AACAGTTCAGTTCCTCCGAAA		
<i>HS6ST2</i>	<b>Heparán sulfato 6-O-sulfotransferasa-2</b>	D5'→3'	CGGTGCGATCTTCTCCAA	117	80
		R5'→3'	AGGACGATCACGGCAAATAG		
<i>HS6ST3</i>	<b>Heparán sulfato 6-O-sulfotransferasa-3</b>	D5'→3'	CAACCACGCCACACCAG	135	77
		R5'→3'	CTTCTCCATCACACATATGAAGAG		
<i>HS3ST1</i>	<b>Heparán sulfato 3-O-sulfotransferasa-1</b>	D5'→3'	CAGCCAGATGCCCTTCTC	89	82
		R5'→3'	AGACTCGCTCAGGCACTTTG		
<i>HS3ST2</i>	<b>Heparán sulfato 3-O-sulfotransferasa-2</b>	D5'→3'	GATTGGTACAGGAGCCTGATG	85	79
		R5'→3'	GGAGCCTCTTGAGTGACAAAG		
<i>HS3ST3A1</i>	<b>Heparán sulfato 3-O-sulfotransferasa-3 A1</b>	D5'→3'	GGCCGAGAGAACCTGAACTC	90	81
		R5'→3'	CGAGCGACAGTACTTCCA		
<i>HS3ST3B1</i>	<b>Heparán sulfato 3-O-sulfotransferasa-3 B1</b>	D5'→3'	GCAGATCTTGCTCGATGTC	133	83
		R5'→3'	GCGCACGAGTACAGGAACATA		
<i>HS3ST4</i>	<b>Heparán sulfato 3-O-sulfotransferasa-4</b>	D5'→3'	TAGAGCCGCACTTCTTCGAC	132	78
		R5'→3'	TGGGAGCCTCATTGTGCAC		
<i>HS3ST5</i>	<b>Heparán sulfato 3-O-sulfotransferasa-5</b>	D5'→3'	CATCCGGCAGTAGTCAAAGC	121	74
		R5'→3'	TTGTGATTTGCTGAGGGTAGG		
<i>HS3ST6</i>	<b>Heparán sulfato 3-O-sulfotransferasa-6</b>	D5'→3'	GCCCTGCTGGAGTTTCTG	85	85
		R5'→3'	GCGCTCGTAGCACCTGTC		
<i>SULF1</i>	<b>Sulfatasa-1</b>	D5'→3'	CCAGCAGAAGCCAAAGAAAG	97	77
		R5'→3'	GAACGTGTCTGCCGAGTATG		
<i>SULF2</i>	<b>Sulfatasa-2</b>	D5'→3'	GCTCCAGTCTGCATCCTTTC	97	81
		R5'→3'	AGCAGCTTGCGGAGTTTC		
<b>CONTROL</b>					
<i>GAPDH</i>	<b>Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa</b>	D5'→3'	GAGTCCACTGGCGTCTTCAC	120	82
		R5'→3'	GTTCACACCCATGACGAACA		

## **6. INMUNOHISTOQUÍMICA**

A partir de secciones de tejido conservadas, se desparafinaron utilizando xileno como disolvente inicial y, posteriormente, para su rehidratación se fueron lavando con concentraciones decrecientes de alcohol hasta que la dilución fue del 100 % en agua. Una vez concluido el proceso, las muestras se enjuagaron en tampón fosfato salino (FBS) incluyendo Tween20® al 1 %. Las peroxidasas endógenas tisulares se bloquearon con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 %. A continuación, las secciones se lavaron de nuevo con FBS incluyendo Tween20® al 1 %. Seguidamente, se bloquearon las uniones inespecíficas de los anticuerpos mediante suero fetal bovino al 25 %, y se procedió a su incubación a 4 °C durante 48 horas en cámara húmeda con los anticuerpos primarios: F58-10E4 a dilución 1:100, JM403 a dilución 1:100 y F69-3G10 a dilución 1:50. Pasado este tiempo, se volvieron a lavar durante 10 minutos con FBS con Tween20® al 1 % y se incubaron 90 minutos con el anticuerpo secundario BP-HRP sc-516102 en dilución 1:50, usando como cromógeno 3-3' diaminobencidina. Finalmente, las secciones fueron contrastadas con hematoxilina, deshidratadas y montadas en medio anhidro Entellan® para ser estudiadas y fotografiadas con un microscopio óptico (Nikon-Eclipse 80i) (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

## **7. ANÁLISIS DE DATOS**

Los datos proporcionados por la qRT-PCR se analizaron con el programa SDS 2.3 y RQ Manager 1.2 de AppliedBiosystems. El análisis estadístico se realizó con el test no paramétrico U de Mann-Whitney-Wilcoxon, comparando los resultados, de cada gen y cada zona, de pacientes controles y con grados leve, moderado y severo de EA. Se aceptaron como significativos los valores que cumplían  $p < 0,05$ . Para estos cálculos se utilizó el programa Statistica para Windows (Statsoft Inc.; Tulsa, OK, USA).

## **RESULTADOS**

### **1. ALTERACIONES DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES DE BIOSÍNTESIS DEL HEPARÁN SULFATO EN DISTINTAS ZONAS DEL CEREBRO EN PACIENTES CON EA.**

Se ha desarrollado un estudio para determinar diferencias en la expresión de los genes que codifican las enzimas que sintetizan las cadenas de HS en pacientes con EA. Los pacientes fueron clasificados en tres categorías según el grado de afectación: leve, moderado y severo. Se introdujo un grupo control de pacientes sanos, sin EA en el momento de la autopsia. Se incluyeron enfermos de ambos sexos, con edades comprendidas entre 52 y 103 años. Se registró también el intervalo de tiempo (entre 10 y 24 horas) transcurrido desde el fallecimiento hasta la realización de la autopsia, así como el peso en gramos de los cerebros analizados.

De cada paciente se obtuvo una muestra de 6 zonas de cerebro y una zona de cerebelo como se describió en el apartado 1 de material y métodos.

La cuantificación de los resultados obtenidos tras la técnica de RT-PCR, así como su localización e identificación por técnicas inmunohistoquímicas se describen a continuación en los siguientes apartados.

#### **1.1. ALTERACIONES EN LA REGIÓN TRANSENTORRINAL (AMÍGDALA).**

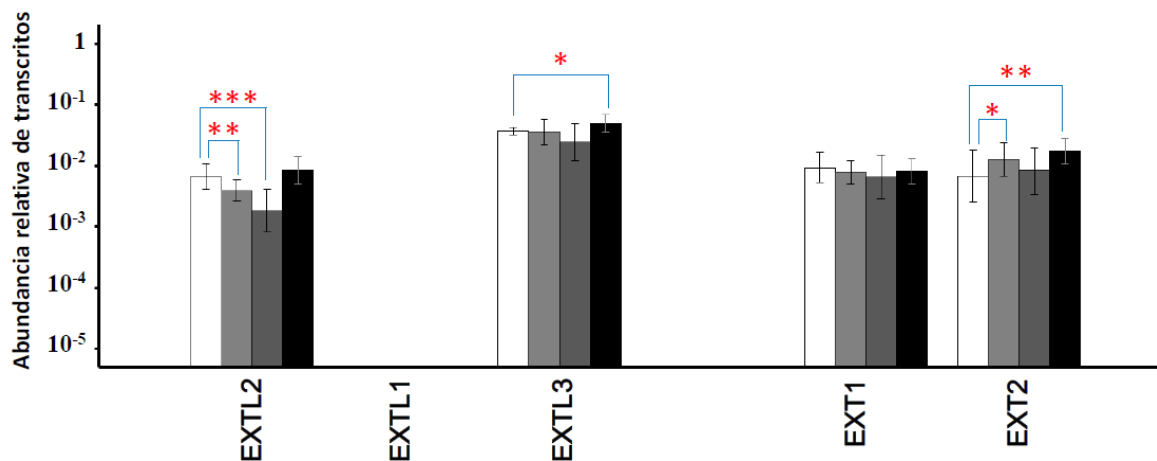
##### **1.1.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena**

De los 3 genes implicados en el inicio de la síntesis de la cadena de HS, solo se detectó la expresión de *EXTL2* y *EXTL3* en las muestras de amígdala, tanto sanas como en los diferentes grados de patología. Sin embargo, no se pudieron cuantificar niveles detectables de *EXTL1* en ninguno de los casos.

La expresión de *EXTL2* experimentó diferencias significativas tanto en los casos leves como en los moderados, mientras que no se pudieron detectar alteraciones en los casos severos. En pacientes con grado leve de patología, *EXTL2* experimentó una subexpresión de en torno a un 40%, mientras que en los moderados se redujo a un 25% ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  respectivamente) (figura 16).

Contrariamente a *EXTL2*, *EXTL3* no mostró diferencias significativas en leves ni moderados, pero sus niveles de transcripción en severos se sobreexpresaron por encima de un tercio respecto a los valores del control ( $p < 0.05$ , figura 16).

En lo que respecta a los genes encargados de la polimerización de la cadena del polisacárido, no se observaron diferencias en *EXT1* en ninguno de los diferentes grados de la patología. Sin embargo, *EXT2* apareció sobreexpresado en torno a un 90% y un 150% en pacientes leves ( $p < 0.05$ ) y severos ( $p < 0.001$ ) respectivamente (figura 16). Curiosamente, en los pacientes con grado moderado analizados, se observó únicamente un pequeño incremento en sus niveles de ARN que no resultó significativo.



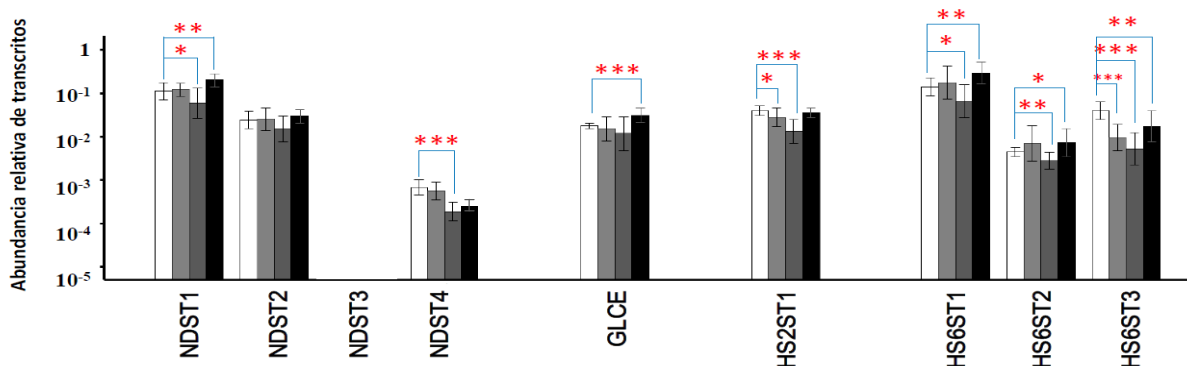
**Figura 16. Transcripción diferencial de genes responsables de la polimerización de la cadena en amígdala.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

### 1.1.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación

De los 4 genes codificantes de NDSTs, solo se pudieron detectar transcritos de 3 de ellos, no apareciendo niveles cuantificables de *NDST3* (figura 17). *NDST2* y, especialmente, *NDST1* fueron las formas predominantemente transcritas, mientras que los valores de *NDST4* se situaron en torno a dos órdenes de magnitud por debajo (figura 17).

*NDST2* no presentó diferencias significativas en sus niveles de expresión en ninguno de los grupos de pacientes analizados. *NDST1*, por el contrario, apareció subexpresado en torno a un 50% en pacientes moderados, y sobreexpresó un 80% en los casos graves ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente) (figura 17). Por su parte, los niveles de

*NDST4* experimentaron una reducción superior a un 70% en pacientes moderados ( $p < 0.001$ ) (figura 17).



**Figura 17. Transcripción diferencial de genes responsables de N-deacetilación/N-sulfatación, genes modificadores del residuo de ácido urónico y genes responsables de C-6 sulfatación en amígdala.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

### 1.1.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico

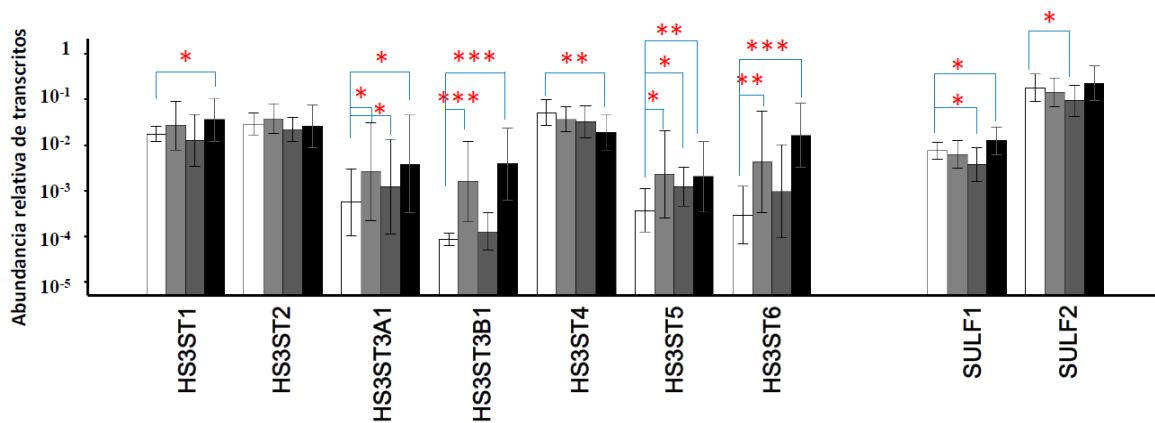
Tanto *GLCE*, responsable de la epimerización, como *HS2ST1*, responsable de la sulfatación en C2 del residuo de ácido urónico, aparecieron expresados en todos los casos analizados. *GLCE* sobreexpresó un 75% en pacientes severos ( $p < 0.001$ ), mientras *HS2ST1* redujo sus niveles un 30% en leves y un 70% en moderados ( $p < 0.05$  y  $p < 0.001$  respectivamente) (figura 17).

### 1.1.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina

De los 3 genes implicados en la sulfatación de C6 de la glucosamina, pudieron detectarse transcritos para todos ellos y en todos los grados de la patología; *HS6ST1* resultó la isoforma más abundante, expresándose en niveles por encima de 10 veces superiores a las otras 2 isoformas (figura 17). Los 3 genes se subexpresaron en los casos de patología moderada, en torno a un 50% las isoformas -1 y -2 y un 90% la isoforma -3 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ ); en patología grave, *HS6ST1* y -2 sobreexpresaron alrededor de un 10% y un 70% ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ ) respectivamente, mientras la isoforma -3 subexpresó un 50% ( $p < 0.001$ ); la isoforma -3 también subexpresó en leves en torno a un 75% ( $p < 0.001$ ) (figura 17).

De los 7 genes codificantes de enzimas responsables de la sulfatación en el C3 de la glucosamina, se pudieron detectar transcritos de todos ellos, aunque las diferencias superaron los dos órdenes de magnitud entre las isoformas menos y más abundantes, siendo estas últimas *HS3ST1* -2 y -4 (figura 18).

*HS3ST2* no mostró diferencias significativas entre los diferentes grados de la patología. Las isoformas -1 y -4 únicamente presentaron diferencias estadísticamente significativas en los casos severos, apareciendo *HS3ST1* a niveles dobles respecto al control ( $p < 0.05$ ), y *HS3ST4* decreció sus niveles por encima de un 60% ( $p < 0.01$ ). El gen *HS3ST3A1* sobreexpresó en todos los grados de enfermedad como sigue: 4,5 veces en leves, 2 veces en moderados y 7 veces por encima del control en severos ( $p < 0.05$ ). *HS3ST3B1* y -6 mostraron sobreexpresiones significativas en pacientes leves (18 y 14 veces, con  $p < 0.001$  y  $p < 0.01$  respectivamente), y en severos los valores de sobreexpresión alcanzaron las 45 y 56 veces respectivamente ( $p < 0.001$  en ambos casos); curiosamente, en estos genes no se pudieron detectar alteraciones significativas en pacientes moderados. Por último, *HS3ST5* sobreexpresó en todos los casos, en valores en torno a 5 veces ( $p < 0.05$  en leves y moderados y  $p < 0.01$  en severos) (figura 18).



**Figura 18. Transcripción diferencial de genes responsables de C-3 sulfatación y genes responsables de endosulfatasas extracelulares en amígdala.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

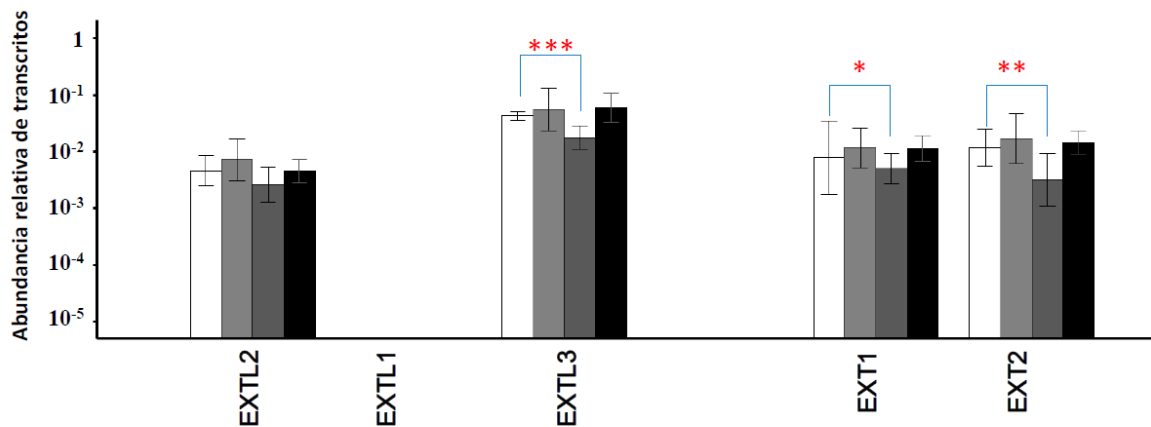
### 1.1.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares

Tanto *SULF1* como *-2* mostraron niveles de expresión detectables en todos los casos. *SULF1* apareció subexpresada un 50% en pacientes moderados ( $p < 0.05$ ), mientras sobreexpresó un 65% en graves ( $p < 0.05$ ). Por su parte, *SULF2* solo mostró una subexpresión significativa de en torno a un 50% en los pacientes moderados ( $p < 0.05$ , figura 18).

## 1.2. ALTERACIONES EN HIPOCAMPO ANTERIOR

### 1.2.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena

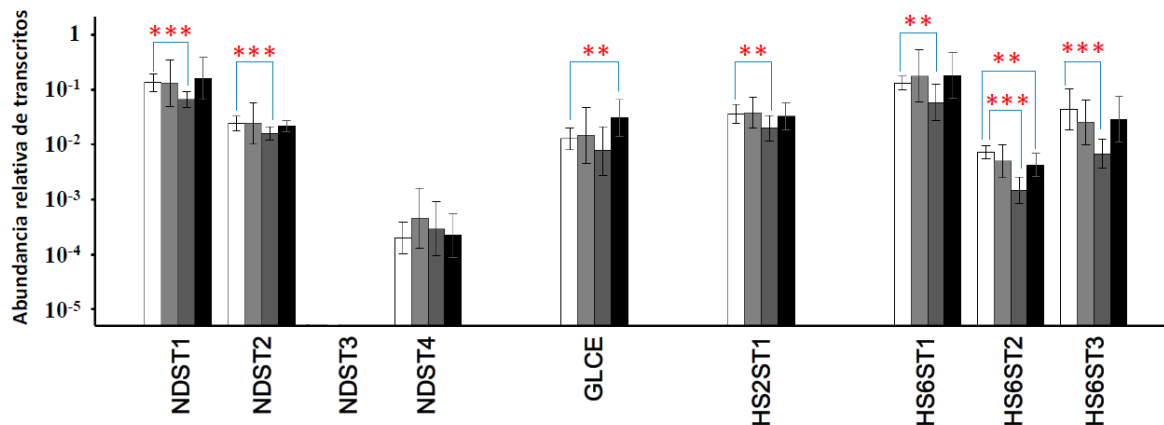
En las muestras de hipocampo anterior analizadas tampoco se detectaron niveles del gen *EXTL1*. En los pacientes en grado moderado de enfermedad se observaron valores de subexpresión en todos los genes detectados, tanto del inicio como de la polimerización de la cadena. *EXTL2* no tuvo significancia estadística. Para *EXTL3*, *EXT1* y *EXT2* los porcentajes de subexpresión fueron del 60 % ( $p < 0.001$ ), 35 % ( $p < 0.05$ ) y 70 % ( $p < 0.01$ ) respectivamente (figura 19).



**Figura 19. Transcripción diferencial de genes responsables de la polimerización de la cadena en hipocampo anterior.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

### 1.2.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación

Se pudieron detectar transcritos de 3 de las 4 isoformas, estando ausente *NDST3*. Las isoformas 1 y 2 fueron las más abundantes, apareciendo los niveles de *NDST4* reducidos entre 2 y 3 órdenes de magnitud. *NDST1* y -2 mostraron una subexpresión significativa en los pacientes moderados, apareciendo a niveles de un 50 % y un 35 % respecto al control respectivamente, con  $p < 0.001$ , en ambos casos (figura 20).



**Figura 20. Transcripción diferencial de genes responsables de N-deacetilación/N-sulfatación, genes modificadores del residuo de ácido urónico y genes responsables de C-6 sulfatación en hipocampo anterior.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

### 1.2.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico

El gen *GLCE* manifestó niveles de expresión 2,4 veces superiores en pacientes severos ( $p < 0.01$ ). Por su parte, *HS2ST1* subexpresó un 50 % ( $p < 0.01$ ) en los pacientes con grado moderado de enfermedad (figura 20).

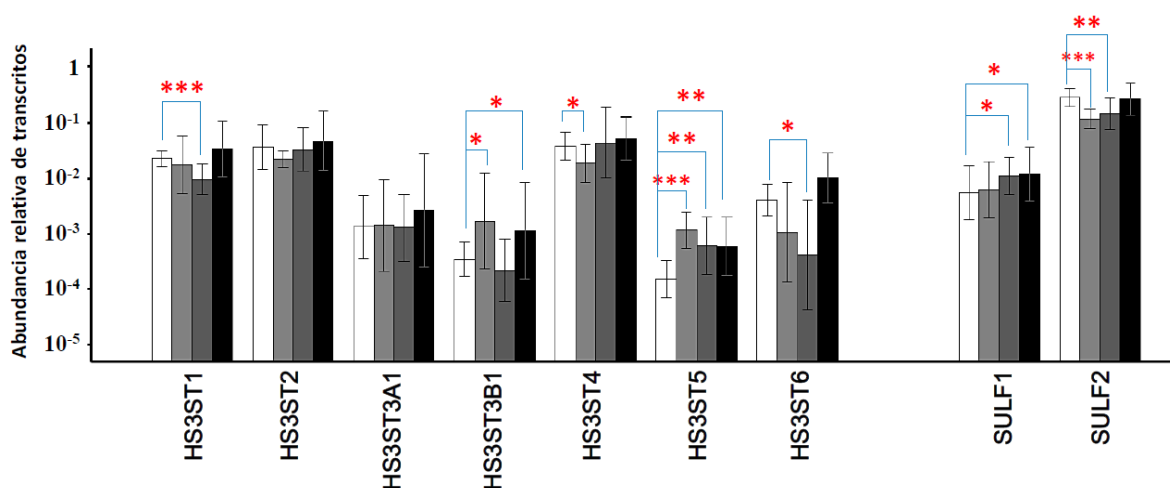
### 1.2.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina

Las 3 isoformas del gen *HS6ST* redujeron sus niveles de expresión en los casos moderados, un 55 % en la isoforma -1 ( $p < 0.01$ ) y alrededor de un 80 % en las isoformas -2 y -3, con una significación  $p < 0.001$ . Además, la isoforma -2 subexpresó en pacientes severos un 40 % respecto al control ( $p < 0,01$ ) (figura 20).



Para los genes responsables de la sulfatación en C3, se vio que las isoformas *-1*, *-2* y *-4* mostraron valores de transcripción entre 1 y 2 órdenes de magnitud por encima de las demás isoformas (figura 21). Los genes *HS3ST1* y *-6* subexpresaron en pacientes moderados un 60 % ( $p < 0.001$ ) y un 90 % ( $p < 0.05$ ) respectivamente (figura 21).

Por su parte, la isoforma *-3B1* sobreexpresó 5 veces más en pacientes leves y 3 veces más en pacientes severos ( $p < 0.05$  en ambos) (figura 21). También *HS3ST5* mostró sobreexpresión de transcritos, pero en su caso, en todos los grados de enfermedad, con un incremento de 7,5 veces en pacientes leves ( $p < 0.001$ ) y 4 veces en moderados y severos ( $p < 0.01$  en los dos grupos) (figura 21).



**Figura 21. Transcripción diferencial de genes responsables de C-3 sulfatación y genes responsables de endosulfatasas extracelulares en hipocampo anterior.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

### 1.2.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares

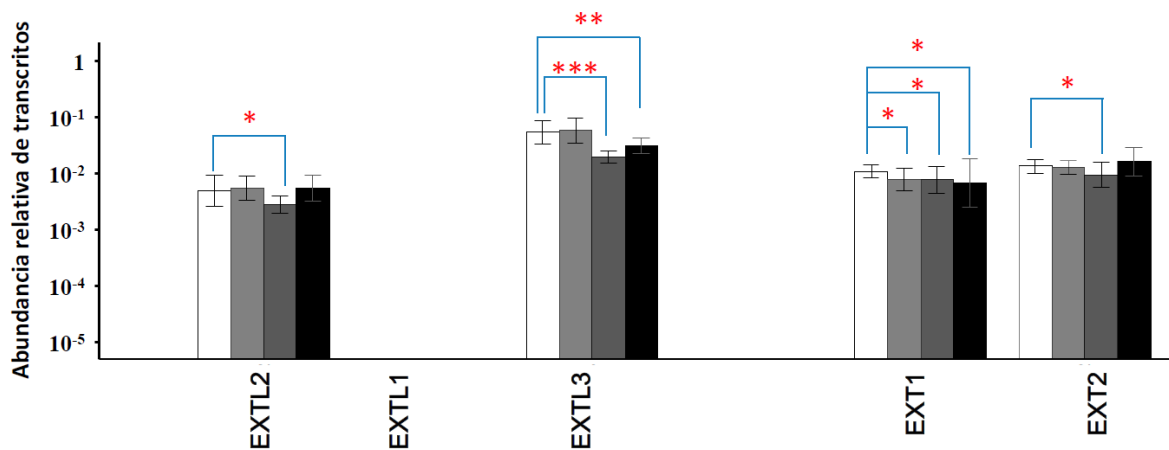
El gen *SULF1* manifestó valores de transcripción 1 orden de magnitud inferiores a *SULF2*, aunque, curiosamente, *SULF1* sobreexpresó en torno al 100 % en pacientes moderados y severos ( $p < 0.05$  en ambos casos) (figura 21). *SULF2* se vio que subexpresaba en torno al 50 % en las muestras con afectación leve y moderada de enfermedad ( $p < 0.001$  y  $p < 0.01$  respectivamente) (figura 21).

### 1.3. ALTERACIONES EN HIPOCAMPO POSTERIOR

#### 1.3.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena

En las muestras de hipocampo posterior, *EXTL2* y *EXTL3* redujeron sus niveles de expresión en pacientes moderados un 40 % ( $p < 0.05$ ) y un 60 % ( $p < 0.001$ ) respectivamente. *EXTL3*, además, mostró niveles de ARNm inferiores al 40 % ( $p < 0.01$ ) en los casos severos. En los casos leves, para ambos genes, pudo detectarse un pequeño incremento en los valores aunque no resultó relevante (figura 22).

Para los genes que codifican la copolimerasa del HS, se detectó una disminución al 30 % ( $p < 0.05$ ) en todos los pacientes para *EXT1*, y en pacientes moderados para *EXT2*; en esta zona, la sobreexpresión de *EXT2* en los casos graves tampoco fue significativa (figura 22).



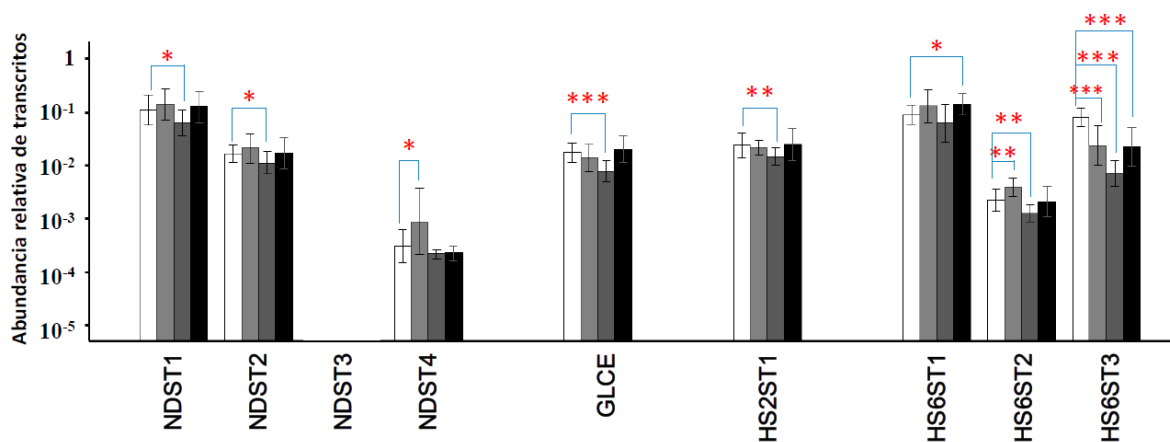
**Figura 22. Transcripción diferencial de genes responsables de la polimerización de la cadena en hipocampo posterior.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

#### 1.3.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación

Solamente tres de los 4 genes encargados de la N-deacetilación/N-sulfatación mostraron transcritos detectables: *NDST1*, -2 y -4. También en esta región del cerebro predominaron las isoformas -1 y -2, siendo los niveles de la isoforma -4 casi tres órdenes de magnitud inferiores (figura 23).

Tanto en *NDST1*, como en *NDST2* y -4 los valores de expresión en pacientes leves fueron superiores al control, aunque sólo estadísticamente relevantes en *NDST4*, donde se detectó 3 veces más cantidad de ARNm ( $p < 0.005$ ) (figura 23).

Por el contrario, tanto en *NDST1* y -2 hubo una disminución al 40 % de la expresión en pacientes moderados ( $p < 0.05$  para ambos genes) (figura 23).



**Figura 23. Transcripción diferencial de genes responsables de N-deacetilación/N-sulfatación, genes modificadores del residuo de ácido urónico y genes responsables de C-6 sulfatación en hipocampo posterior.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

### 1.3.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico

Para los genes que modifican el residuo de ácido urónico se detectó expresión en todos los casos de enfermedad. *GLCE* decreció un 65 % en pacientes moderados ( $p < 0.001$ ). *HS2ST1*, al igual que en la zona de hipocampo anterior, redujo sus niveles de expresión en pacientes moderados, en este caso a un 40 % ( $p < 0.01$ ) (figura 23).

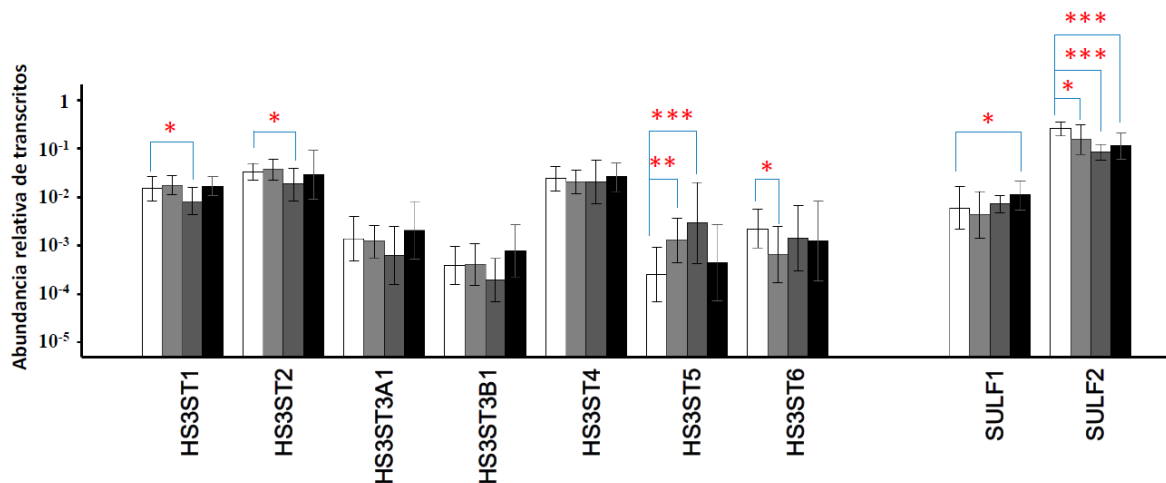
### 1.3.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina

En la transcripción de los genes responsables de la sulfatación del C6 del residuo de glucosamina se observaron las siguientes diferencias (figura 23):

- La isoforma -1 sólo manifestó cambios relevantes en la expresión en pacientes severos, con un incremento del 60 % ( $p < 0.05$ ).
- La isoforma -2 sobreexpresó un 75 % ( $p < 0.01$ ) en casos leves y subexpresó un 45 % ( $p < 0.01$ ) en casos moderados.
- La isoforma -3 mostró disminución en la expresión de transcritos en todos los grados de enfermedad, siendo del 30 % ( $p < 0.001$ ) en leves y severos y casi del 100 % ( $p < 0.001$ ) en moderados (figura 23).

Únicamente 4 de las 7 isoformas de los genes responsables de la infrecuente sulfatación del C3 mostraron diferencias en el análisis. *HS3ST1* y -2 disminuyeron su expresión un 45 % ( $p < 0.05$ ) en pacientes moderados y *HS3ST6* decreció un 70 % ( $p < 0.05$ ) en pacientes leves (figura 24).

Por el contrario, *HS3ST5* incrementó sus valores de expresión, hasta 4 veces en casos leves ( $p < 0.01$ ) y unas 11 veces ( $p < 0.001$ ) en casos moderados (figura 24).



**Figura 24. Transcripción diferencial de genes responsables de C-3 sulfatación y genes responsables de endosulfatasas extracelulares en hipocampo posterior.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

### 1.3.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares

Por último, *SULF1* sobreexpresó un 80 % en enfermos severos ( $p < 0.05$ ) mientras que *SULF 2* subexpresó en todos los casos: un 40 % ( $p < 0.05$ ) en leves, 70 % ( $p < 0.001$ ) en moderados y el 55 % ( $p < 0.001$ ) en severos (figura 24).

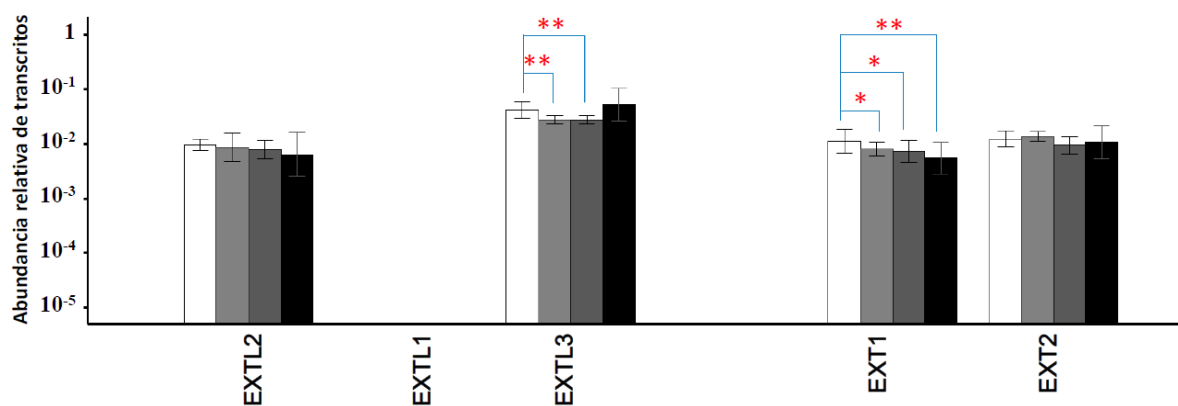
## 1.4. ALTERACIONES EN CLAUSTRUM

La región denominada “claustrum” (claustrum) se encuentra inmersa en el lóbulo temporal, entre el núcleo putamen y la región insular. Conecta, de forma predominante, regiones corticales y subcorticales del cerebro y se le atribuyen funciones relacionadas con la atención y el estado de consciencia.

### 1.4.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena

De los genes que participan en la biosíntesis del HS, en la zona del claustrum, solamente 16 de los 23 genes analizados presentaron alteraciones.

Los genes encargados del inicio y la polimerización de la cadena mostraron similares niveles de expresión. Únicamente *EXTL3* y *EXT1* disminuyeron significativamente la cantidad de transcritos. En el caso de *EXTL3* se observó disminución de una tercera parte en casos leves y moderados ( $p < 0.01$ ). Por su parte, *EXT1* decreció un 30 % en leves y moderados ( $p < 0.05$ ) y un 50 % en severos ( $p < 0.01$ ) (figura 25).

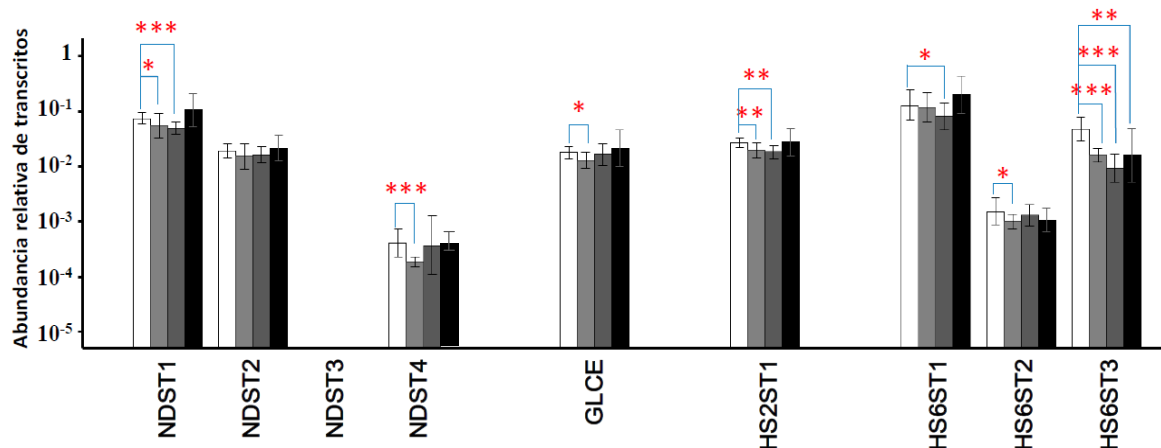


**Figura 25. Transcripción diferencial de genes responsables de la polimerización de la cadena en claustrum.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

### 1.4.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación

De los genes responsables de la creación de dominios sulfatados se observó que *NDST4* se expresó 3 órdenes de magnitud por debajo de las isoformas 1 y 2; en grado leve la subexpresión del gen se acercó al 55 % ( $p < 0.001$ ) (figura 26).

*NDST1* mostró una subexpresión cercana al 30 % en los casos leves y moderados ( $p < 0.05$  y  $p < 0.001$  respectivamente) (figura 26).



**Figura 26. Transcripción diferencial de genes responsables de N-deacetilación/N-sulfatación, genes modificadores del residuo de ácido urónico y genes responsables de C-6 sulfatación en claustrum.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

#### 1.4.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico

*GLCE* y *HS2ST1* mostraron disminución transcripcional del 30 % en pacientes leves, con un nivel de significación de  $p < 0.05$  para el primero y  $p < 0.01$  para el segundo. *HS2ST1* también decreció un 30 % en pacientes moderados ( $p < 0.01$ ) (figura 26).

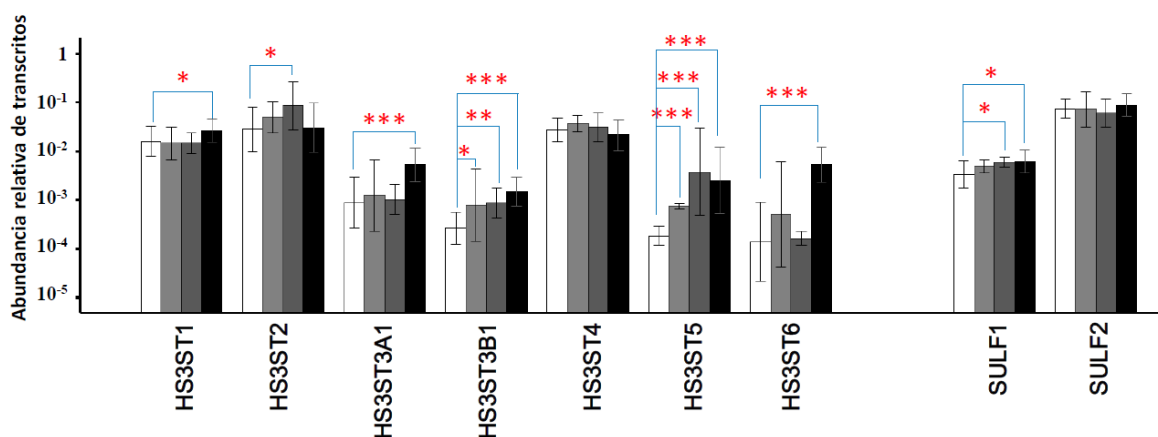
#### 1.4.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina

En todas las isoformas responsables de la adición de un grupo  $-S$  en C6 se observaron diferencias relevantes. *HS6ST1* y *-2*, los cuales aparecieron a niveles de un 35 % en pacientes moderados y leves respectivamente ( $p < 0.05$  en ambos). Del mismo modo, *HS6ST3* disminuyó el 65 % en los casos leves ( $p < 0.001$ ) y severos ( $p < 0.01$ ) y cerca del 80 % en moderados ( $p < 0.001$ ) (figura 26).

En lo referente a la sulfatación de C3, todas las isoformas se vieron alteradas significativamente a excepción de *HS3ST4*. Los niveles de *HS3ST3A1*, *-3B1*, *-5* y *-6* se situaron en torno a uno o dos órdenes de magnitud por debajo de las demás. Para las sulfotransferasas-gD, *HS3ST2* experimentó un incremento dos veces superior respecto al control en los casos moderados ( $p < 0.05$ ); *HS3ST3A1* sobreexpresó en todos los pacientes, siendo los datos significativos únicamente en pacientes severos ( $p < 0.001$ ), con un aumento de cinco veces sobre el control; para *HS3ST3B1* los transcritos de ARN aumentaron cerca de un 200 % en los pacientes leves ( $p < 0.05$ ) y moderados ( $p < 0.01$ ) y en los casos severos

las cifras alcanzaron el 500 % ( $p < 0.001$ ); la isoforma -6 sobreexpresó también en todos los pacientes aunque el incremento solo fue relevante en los casos severos ( $p < 0.001$ ) para una cantidad de transcritos en torno a 40 veces superior al control (figura 27).

En las sulfotransferasas-AT (isoformas *HS3ST1* y -5), se observó un aumento del 70 % de expresión en casos severos de la isoforma -1 ( $p < 0.05$ ) y en la isoforma -5, en todos los pacientes: 3 veces por encima del control en leves, 20 veces superior en moderados y 13 veces superior en severos ( $p < 0.001$  en todos los grupos) (figura 27).



**Figura 27. Transcripción diferencial de genes responsables de C-3 sulfatación y genes responsables de endosulfatasas extracelulares en claustrum.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas

#### 1.4.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares

Finalmente, *SULF1* apareció sobreexpresada en pacientes moderados y severos, con un aumento del 80 % ( $p < 0.05$ ); *SULF2* mostró niveles superiores a *SULF1* pero las variaciones no fueron significativas (figura 27).

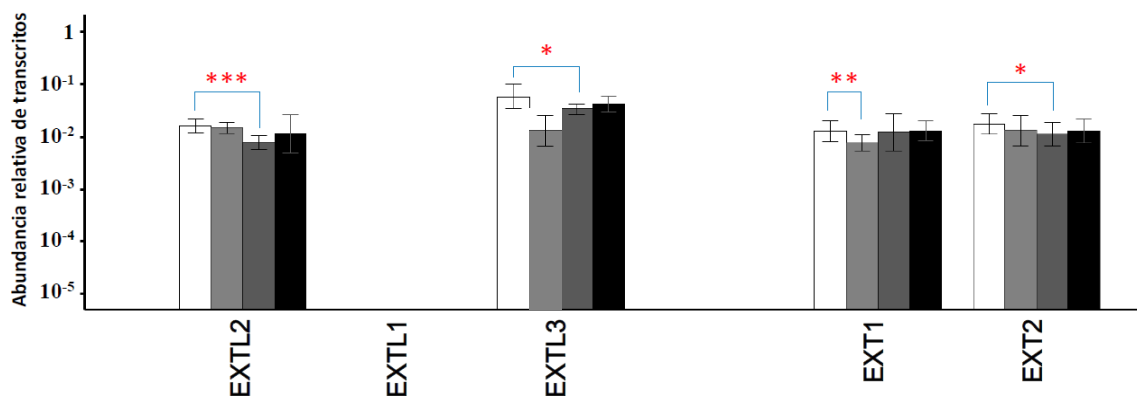
### 1.5. ALTERACIONES EN CISURA CALCARINA

#### 1.5.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena

En la región occipital de la cisura calcarina tampoco pudieron cuantificarse niveles de *EXTL1* (figura 28).

La expresión de *EXTL2* y *-3* experimentó diferencias en pacientes moderados, observándose un detrimento de la expresión del 50 % ( $p < 0.001$ ) y del 40 % ( $p < 0.05$ ) respectivamente (figura 28).

En cuanto a los genes de las polimerasas, *EXT1* y *EXT2* mostraron un descenso del 40 % de la expresión en pacientes leves ( $p < 0.01$ ) y moderados ( $p < 0.05$ ) respectivamente (figura 28).



**Figura 28. Transcripción diferencial de genes responsables de la polimerización de la cadena en cisura calcarina.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

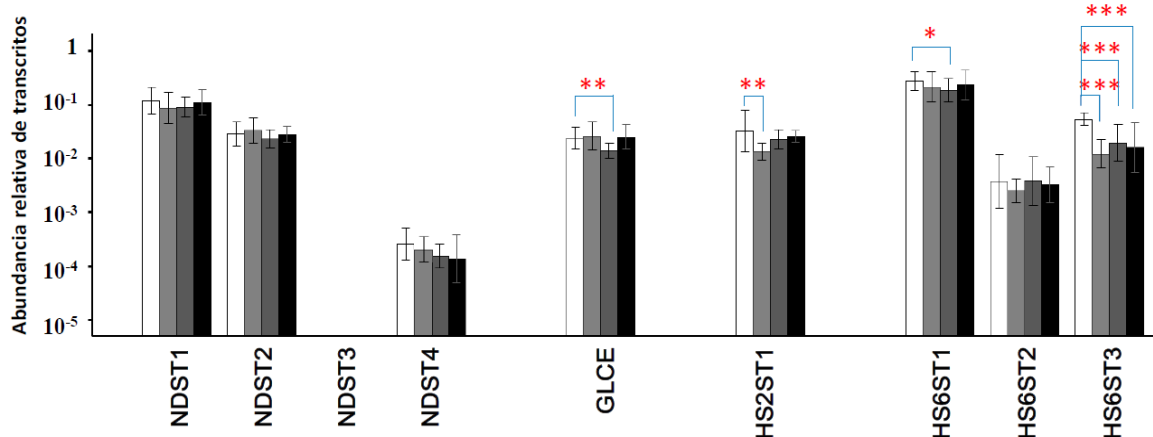
### 1.5.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación

Los genes responsables de la formación de dominios sulfatados, NDSTs, no mostraron diferencias de transcripción estadísticamente significativas. No se detectaron transcritos de *NDST3* en ningún grupo. *NDST4* expresó valores 3 órdenes de magnitud inferiores a las isoformas *-1* y *-2* (figura 29).

### 1.5.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico

Entre los genes que modifican el residuo de ácido urónico, *GLCE* mostró una disminución en la expresión del 40 % en el grupo moderado ( $p < 0.01$ ) y *HS2ST1* subexpresó un 60 % en el grupo leve ( $p < 0.01$ ) (figura 29).



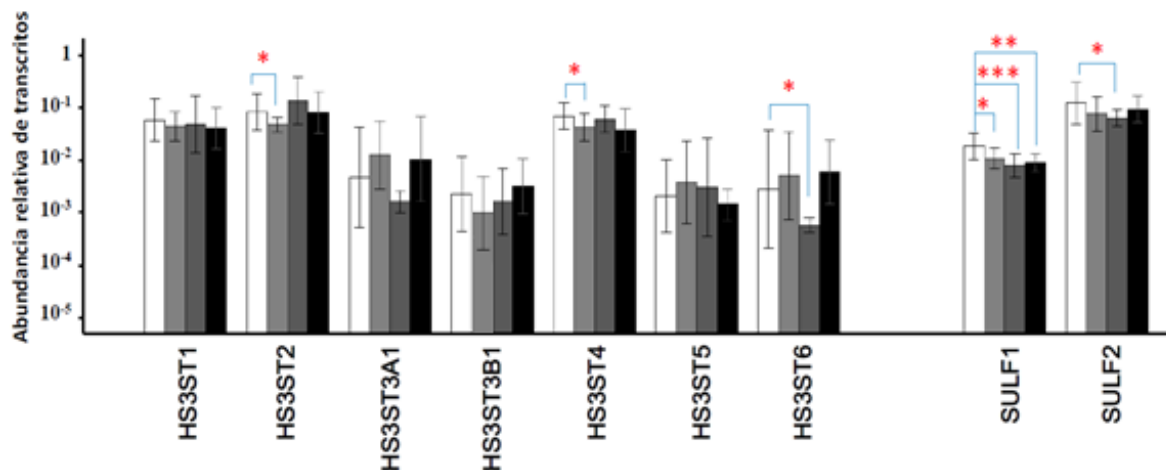


**Figura 29. Transcripción diferencial de genes responsables de N-deacetilación/N-sulfatación, genes modificadores del residuo de ácido urónico y genes responsables de C-6 sulfatación en cisura calcarina.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

#### 1.5.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina

Los tres genes que adicionan un grupo sulfato al C6 de la glucosamina mostraron transcritos en todas las isoformas y en todos los grados de patología. *HS6ST2* fue la isoforma menos abundante, con niveles 2 órdenes de magnitud inferiores a la isoforma *-1*. Tanto *HS6ST1* como *-3* redujeron su expresión en todos los grupos de pacientes. En el caso de *HS6ST1*, la expresión disminuyó significativamente un 50 % en pacientes moderados ( $p < 0.05$ ), mientras que en *HS6ST3* los tres grados de patología subexpresaron en torno al 70 % ( $p < 0.001$ ) (figura 29).

En la familia de genes HS3STs, todas las isoformas fueron detectadas. Únicamente *HS3ST2*, *-4* y *-6* mostraron relevancia estadística: *-2* y *-4* subexpresaron un 40 % en pacientes leves y *-6*, un 80 % en pacientes moderados ( $p < 0.05$  en ambos casos). En los demás casos no se observaron alteraciones de significancia (figura 30).



**Figura 30. Transcripción diferencial de genes responsables de C-3 sulfatación y genes responsables de endosulfatasas extracelulares en cisura calcarina.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

### 1.5.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares

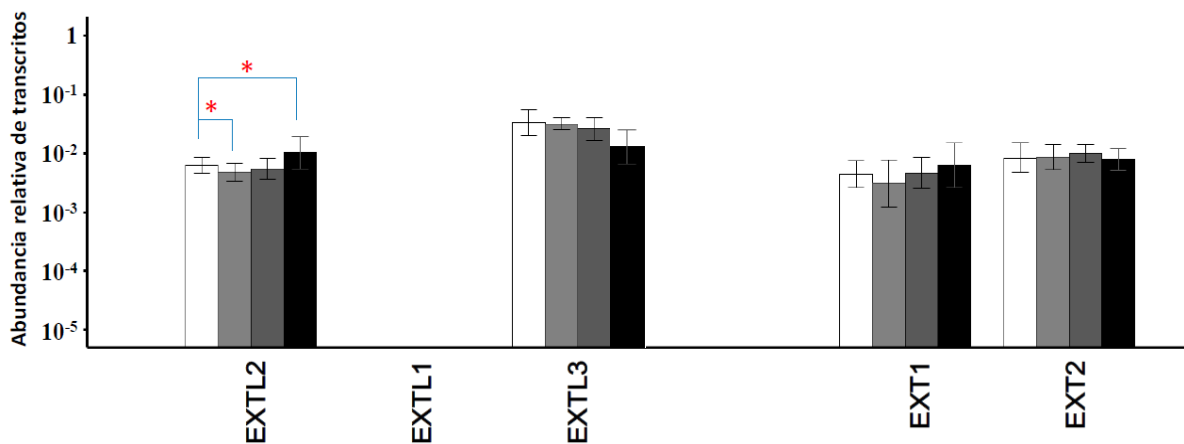
Transcritos de ambas sulfatasas extracelulares pudieron detectarse en esta zona cerebral. *SULF1* subexpresó en todos los grupos como sigue: un 40 % en leves ( $p < 0.05$ ), un 60 % en moderados ( $p < 0.001$ ) y el 50 % en severos ( $p < 0.01$ ). Para *SULF2* únicamente la disminución del 50 % en la expresión del grupo moderado fue significativa ( $p < 0.05$ ) (figura 30).

## 1.6. ALTERACIONES EN GLOBO PÁLIDO

### 1.6.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena

En la zona del núcleo pálido no se detectaron niveles cuantificables del gen *EXTL1* y solamente fueron relevantes las pequeñas alteraciones detectadas en *EXTL2*, que experimentó una subexpresión del 25 % en el grupo de pacientes leves ( $p < 0.05$ ) y se sobreexpresó en el grupo severo un 60 % ( $p < 0.05$ ) respecto al control (figura 31).

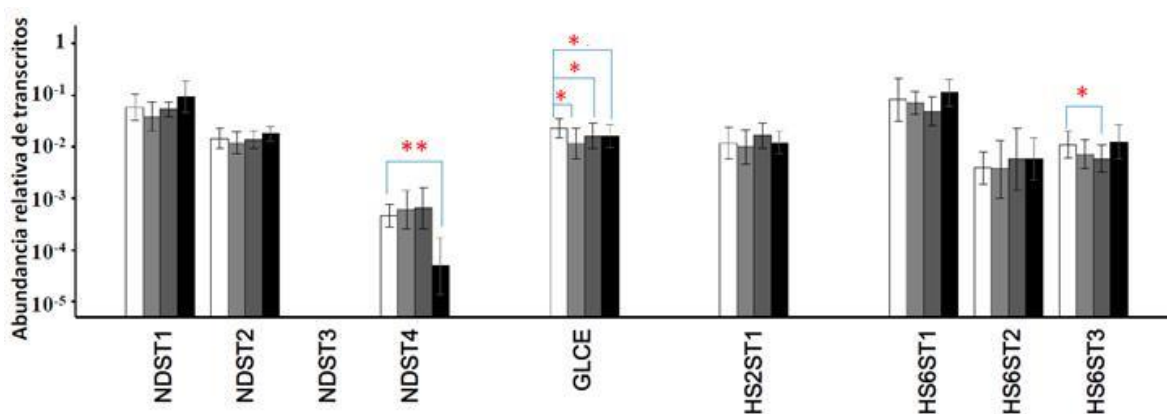
Los genes de la polimerización de la cadena, *EXT1* y *EXT2*, se detectaron en todos los grupos, sin embargo, no mostraron alteraciones estadísticamente significativas (figura 31).



**Figura 31. Transcripción diferencial de genes responsables de la polimerización de la cadena en núcleo pálido.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

### 1.6.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación

Por su parte la familia de NDSTs tampoco mostró diferencias salvo en el grupo de casos severos de la isoforma -4 donde el gen se subexpresó un 90 % ( $p < 0.01$ ). En esta zona tampoco fue posible detectar niveles cuantificables de *NDST3* (figura 32).



**Figura 32. Transcripción diferencial de genes responsables de N-deacetilación/N-sulfatación, genes modificadores del residuo de ácido urónico y genes responsables de C-6 sulfatación en núcleo pálido.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

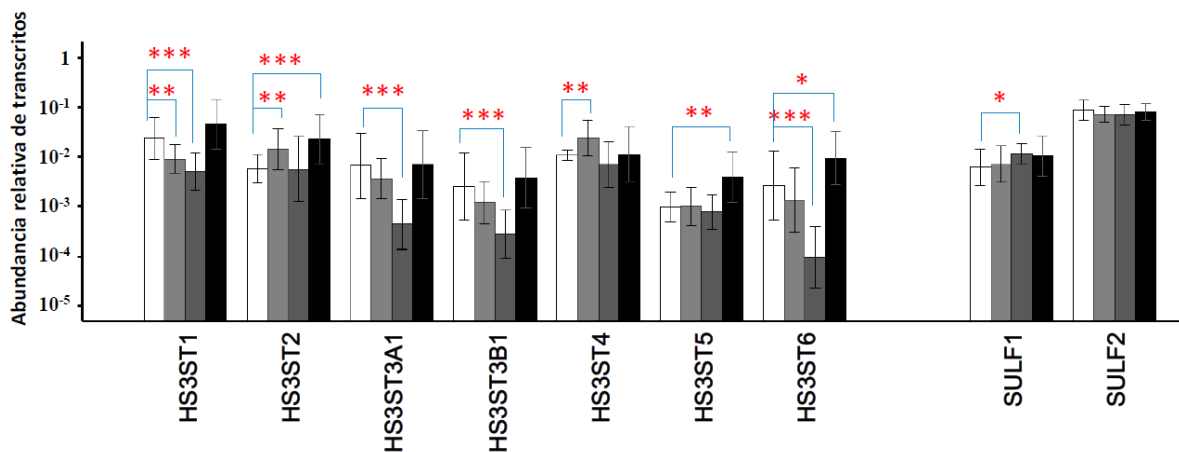
### 1.6.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico

Tanto *GLCE* como *HS2ST1* pudieron ser cuantificados sin presentar cambios relevantes, únicamente el gen *GLCE* redujo su expresión a la mitad en leves y en un 30 % en moderados y severos ( $p < 0.01$ ) (figura 32).

### 1.6.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina

Tampoco se observaron cambios en los genes responsables de la sulfatación de la glucosamina en C6, detectándose transcritos en todos los casos. *HS6ST1* superó en expresión a las otras 2 isoformas (un orden de magnitud por encima). La isoforma -3 vio disminuida su expresión un 50 % en los pacientes moderados ( $p < 0.05$ ) (figura 32).

Contrariamente, los genes de las sulfotransferasas de C3 mostraron alteraciones significativas en todas las isoformas. *HS3ST1* subexpresó en pacientes leves un 60 % ( $p < 0.01$ ) y en pacientes moderados un 80 % ( $p < 0.001$ ). *HS3ST2* y *HS3ST4* sobreexpresaron en pacientes leves 1,5 veces y 1,17 veces respectivamente ( $p < 0.01$  en ambos casos). Además, la isoforma -2 aumentó 3 veces su valor respecto al control en pacientes severos ( $p < 0.001$ ). Por otro lado, el grupo de muestras con afectación moderada disminuyó su expresión casi al 100 % en las isoformas -3A1, -3B1 y -6 con un nivel de significación  $p < 0.001$ . En *HS3ST6* y *HS3ST5* se evidenciaron valores de expresión mayor que el control en pacientes severos 2,6 veces ( $p < 0.05$ ) para el primero y 3 veces ( $p < 0.01$ ) para el segundo (figura 33).



**Figura 33. Transcripción diferencial de genes responsables de C-3 sulfatación y genes responsables de endosulfatasas extracelulares en núcleo pálido.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

### 1.6.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares

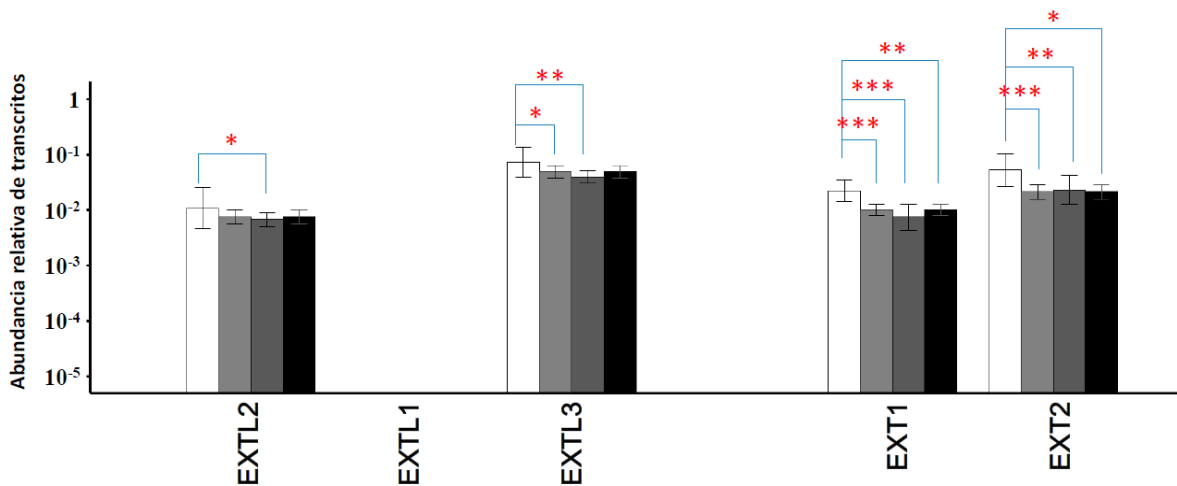
En la última modificación de la biosíntesis de la cadena de HS, se detectaron todos los transcritos de las dos isoformas pero solo *SULF1* mostró un incremento significativo del 90 % en pacientes moderados ( $p < 0.05$ ) (figura 33).

## 1.7. ALTERACIONES EN CEREBELO

### 1.7.a. Genes responsables de la polimerización de la cadena

En el cerebelo no se detectaron transcritos para el gen *EXTL1*. Tanto en *EXTL2* como en *EXTL3* los casos moderados mostraron una disminución de la expresión del 40 % ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente); además en la isoforma -3 también se vio subexpresión del 40 % en las formas leves ( $p < 0.05$ ) (figura 34).

En todos los grupos de pacientes, los genes responsables de la polimerización del GAG disminuyeron sus niveles de expresión en torno al 60 % ( $p < 0.001$  en los grupos leves y moderados de *EXT1* y leves de *EXT2*,  $p < 0.01$  en el grupo severo de *EXT1* y moderado de *EXT2* y  $p < 0.05$  en el grupo severo de *EXT2*) (figura 34).

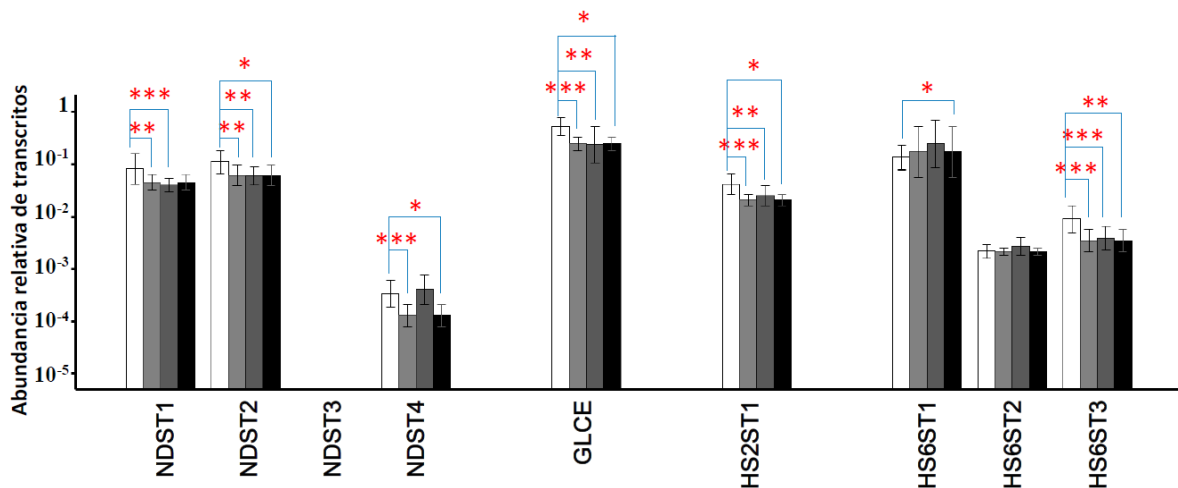


**Figura 34. Transcripción diferencial de genes responsables de la polimerización de la cadena en cerebelo.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

### 1.7.b. Genes responsables de la N-deacetilación/N-sulfatación

Todos los genes encargados de la formación de dominios sulfatados mostraron alteración en la expresión de los transcritos. *NDST3*, una vez más, no pudo detectarse y *NDST4* se expresó con valores 3 órdenes de magnitud inferiores a las isoformas -1 y -2 (figura 35).

La expresión disminuyó en general para las tres isoformas en todos los grupos de pacientes, salvo en moderados en *NDST4*, donde se vio un leve incremento no significativo. *NDST1* y -2 subexpresaron un 50 % en todos los grupos, siendo significativamente relevantes:  $p < 0.01$  en leves de *NDST1* y -2 y moderados de *NDST2*,  $p < 0.001$  en moderados de *NDST1* y  $p < 0.05$  en severos de *NDST2* (figura 35). *NDST4* también subexpresó en pacientes leves y severos un 60 % ( $p < 0.001$  y  $p < 0.05$  respectivamente) (figura 35).



**Figura 35. Transcripción diferencial de genes responsables de N-deacetilación/N-sulfatación, genes modificadores del residuo de ácido urónico y genes responsables de C-6 sulfatación en cerebelo.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.

### 1.7.c. Genes modificadores del residuo de ácido glucurónico

Ambos genes redujeron su expresión de forma significativa en los 3 grupos de pacientes. *GLCE* experimentó un detrimento del 55 % ( $p < 0.001$  en leves,  $p < 0.01$  en moderados y  $p < 0.05$ ). De la misma manera *HS2ST1* decreció un 50 % en los casos leves ( $p < 0.001$ ) y severos ( $p < 0.05$ ) y un 40 % en los casos moderados ( $p < 0.01$ ) (figura 35).

#### **1.7.d. Genes responsables de la sulfatación del residuo de glucosamina**

Para la familia *HS6STs* se detectaron transcritos en todas las isoformas, siendo *HS6ST1* predominante (2 órdenes de magnitud superior) con un incremento del 30 % ( $p < 0.05$ ) en las formas severas; *HS6ST2* no mostró alteraciones (figura 35). Por su parte, *HS6ST3* experimentó una disminución del 60 % en todos los grupos de afectación ( $p < 0.001$  en leves y moderados,  $p < 0.01$  en severos) (figura 35).

En el caso de las transferasas de grupos sulfato al C3, todas las isoformas fueron detectadas, predominando *HS3ST1* que experimentó pequeñas variaciones no significativas (figura 36).

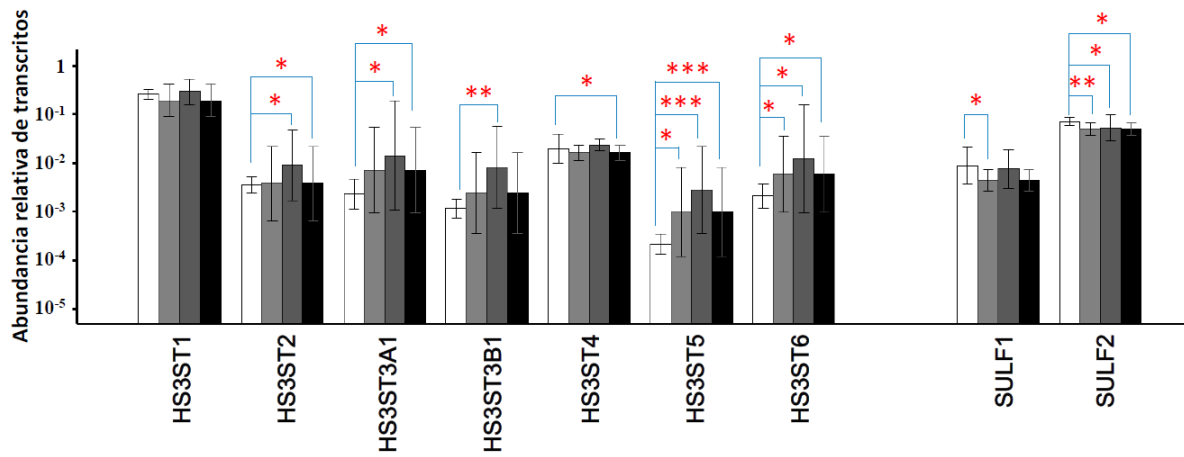
*HS3ST2* mostró sobreexpresión significativa ( $p < 0.05$ ) en los casos moderados 1,5 veces superior al control, también en los casos severos. Curiosamente en este grupo el incremento fue significativo ( $p < 0.05$ ) a pesar de ser solo del 6% (figura 36).

*HS3ST3A1* y *-3B1* sobreexpresaron en todos los grupos de pacientes pero solo se observó relevancia estadística para la isoforma *-3A1* ( $p < 0.05$ ) en moderados, donde el incremento fue 5 veces superior y en severos 2 veces superior al control; para la isoforma *-3B1* el grupo de pacientes moderados superó 6 veces el valor del control ( $p < 0.01$ ) (figura 36).

En *HS3ST4* únicamente se produjo una disminución del 20 % en pacientes severos ( $p < 0.05$ ). Por el contrario, en *HS3ST5* y *HS3ST6* los valores se incrementaron notablemente. En la isoforma *-5* el grupo leve sobreexpresó 3,7 veces ( $p < 0.05$ ), el grupo moderado 12 veces ( $p < 0.001$ ) y el grupo severo 3,7 veces ( $p < 0.001$ ). En la isoforma *-6* los casos leves y severos incrementaron su expresión 1,7 veces y los casos moderados 4,7 veces ( $p < 0.05$  en todos) (figura 36).

#### **1.7.e. Genes responsables de sulfatasas extracelulares**

Finalmente, en las sulfatasas extracelulares los niveles de transcritos se redujeron un 50 % en el grupo leve para *SULF1* ( $p < 0.05$ ), y un 30 % en leves ( $p < 0.01$ ), moderados y severos (ambos  $p < 0.05$ ) para *SULF2* (figura 36).



**Figura 36. Transcripción diferencial de genes responsables de C-3 sulfatación y genes responsables de endosulfatasas extracelulares en cerebelo.** Las barras representan la abundancia de ARNm en tejido sano (blanco) y diferentes grados de patología (leve: gris claro, moderado: gris oscuro, severo: negro). Los genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas están indicados (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ). Los valores en el eje Y están expresados en escala logarítmica; las desviaciones estándar aparecen representadas.



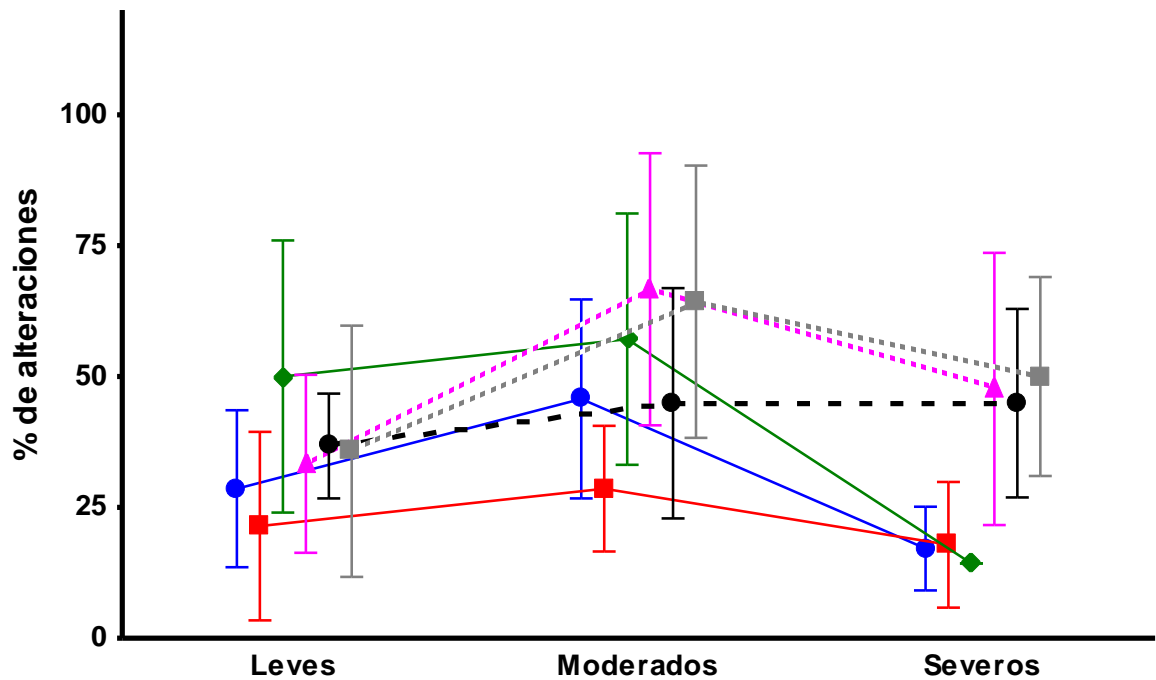
## 2. EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES OBSERVADAS EN LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA.

Tabla 6. Genes de biosíntesis de HS cuya transcripción resulta alterada en la EA, representados en función del grado de la patología y la región cerebral. Las flechas rojas indican sobreexpresiones, las negras subexpresiones. AM, región amígdala; HA, hipocampo anterior; HP, hipocampo posterior; CL, Claustrum; CC, cisura calcarina; NP, globo pálido; CB, cerebelo

	LEVE							MODERADO						SEVERO								
	AM	HA	HP	CL	CC	NP	CB	AM	HA	HP	CL	CC	NP	CB	AM	HA	HP	CL	CC	NP	CB	
EXTI2	↓							↓														
EXTI1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EXTI3				↑			↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
EXTI			↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
EXT2	↑						↑															
NDST1				↑			↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
NDST2							↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
NDST3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NDST4			↑	↑			↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
GLCE				↑			↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
HS2ST1	↑			↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
HS6ST1							↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
HS6ST2				↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
HS6ST3	↑		↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
HS3ST1						↑																
HS3ST2				↑	↑	↑																
HS3ST3A1	↑			↑																		
HS3ST3B1	↑	↑		↑																		
HS3ST4		↑			↑	↑																
HS3ST5	↑	↑		↑																		
HS3ST6	↑	↑	↑	↑			↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
SULF1					↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
SULF2		↑	↑				↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑

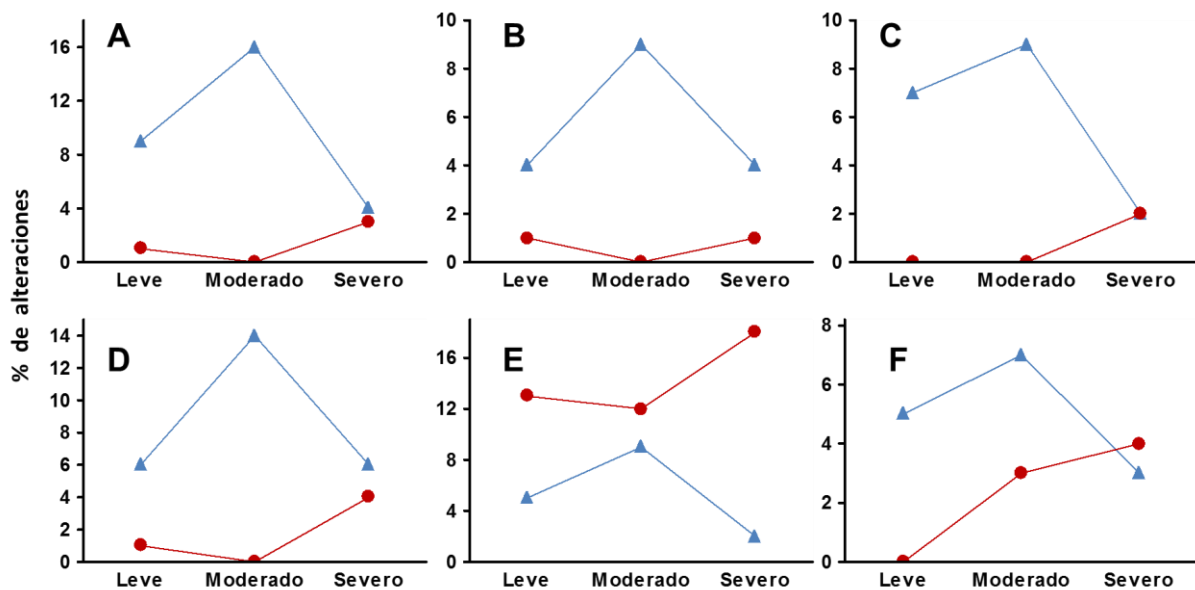
El conjunto de las alteraciones en la transcripción determinadas en los apartados anteriores se resume en la tabla 6, donde se destacan aquellos casos en los que la variación se debió a sobreexpresión o a subexpresión del gen correspondiente. Los resultados muestran un incremento total de alteraciones en pacientes de grado moderado respecto al leve, principalmente debido a subexpresiones, y un descenso de alteraciones en pacientes de grado severo, aunque con un notable incremento de las sobreexpresiones (tabla 6).

Los genes responsables de la biosíntesis del HS se pueden categorizar en grupos homogéneos que incluyen los responsables de la polimerización (*EXTL1-3*, *EXT1-2*), la N-deacetilación-N-sulfatación (*NDST1-4*), la modificación del residuo de ácido urónico (*GLCE*, *HS2ST1*), la 6-O y la 3-O sulfatación de la glucosamina (*HS6ST1-3* y *HS3ST1-6* respectivamente), y las 6-O sulfatasas (*SULF1-2*). Cuando las alteraciones de la expresión génica en cada grupo se expresan en términos porcentuales (representando el valor 100 el número de genes incluido en el grupo), se observa un incremento en todas las categorías en pacientes de grado moderado (figura 37). En pacientes severos aparece un descenso, pero debido fundamentalmente a la menor alteración en los niveles de transcripción de los genes responsables de las primeras etapas de la biosíntesis del polímero, involucrando los implicados en la polimerización, la N-deacetilación-N-sulfatación, y la modificación del residuo de ácido urónico. Los genes que codifican proteínas cuya acción enzimática tiene lugar en las etapas tardías de la biosíntesis del HS sufren descensos mucho menores o, incluso, un incremento, como es el caso de los implicados en 3-O sulfatación de la glucosamina (figura 37).



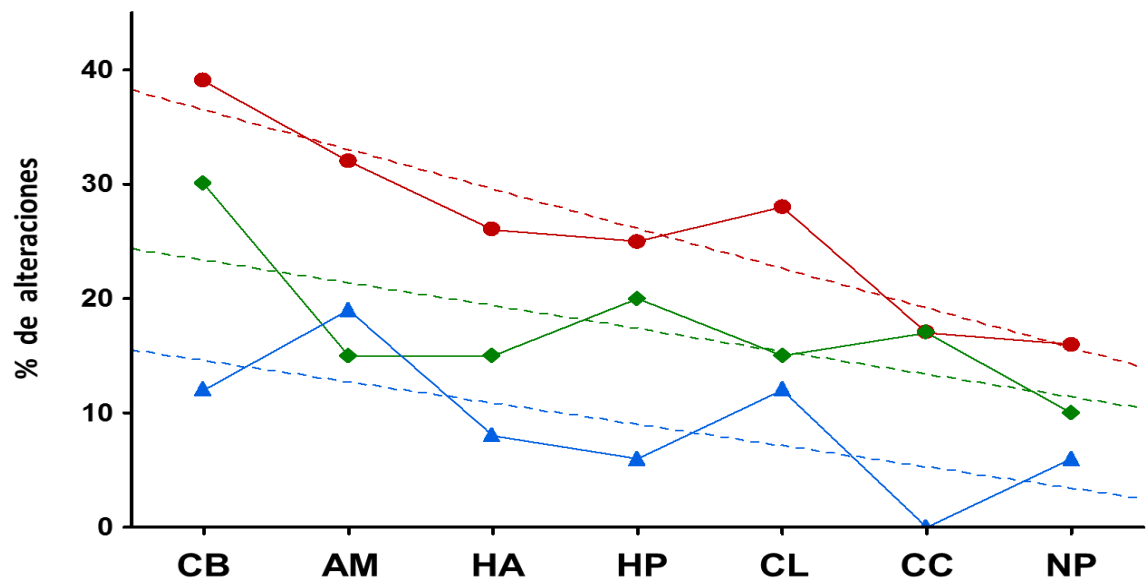
**Figura 37. Porcentaje de genes cuya transcripción se ve alterada en diferentes grados de EA.** ●: genes de polimerización de la cadena; ■: NDSTs; ◆: modificación del residuo de ácido urónico; ▲: 6-O-sulfotransferasas; ●: 3-O-sulfotransferasas; ■: SULFs

Cuando las alteraciones en los niveles de transcripción de las diferentes familias de genes se analizan en función de su tendencia (sub o sobreexpresión) y del grado de la patología, se observa que todos los grupos de genes responsables de cada una de las etapas de la biosíntesis experimentan un incremento de la subexpresión en todos los pacientes moderados respecto a leves, para luego disminuir en pacientes severos a niveles similares a los observados en los leves (NDSTs, 6STs) o niveles inferiores (polimerasas, modificadores del urónico, HS3STs, SULFs) (figura 38). Por el contrario, las sobreexpresiones aumentaron en los pacientes severos en todos los casos, pero muy especialmente en los genes responsables de las últimas etapas de la biosíntesis (figura 38).



**Figura 38. Porcentaje de genes que experimentan (▲) sub y (●) sobre expresión en diferentes grados de EA. A: genes de polimerización de la cadena; B: NDSTs; C: modificación del residuo de ácido urónico; D: 6-O-sulfotransferasas; E: 3-O-sulfotransferasas; F: SULFs.**

Cuando el análisis de la proporción en la alteración génica en cada familia de genes se analizó de forma conjunta y los resultados se expresaron en función de la región cerebral analizada, se observó que existía una tendencia decreciente secuencial amígdala - hipocampo anterior - hipocampo posterior – claustrum - cisura calcarina - globo pálido apareciendo, interesantemente, el cerebelo como la región con mayores alteraciones. Cuando el mismo tipo de análisis se llevó a cabo de forma separada para sub y sobreexpresiones, se observaron también patrones descendentes (figura 39).



**Figura 39. Porcentaje de genes que experimentan alteraciones en sus niveles de transcripción en diferentes regiones cerebrales.** (●), totales; (◆) subexpresiones (▲) sobreexpresiones. CB, cerebelo; AM, región amígdala; HA, hipocampo anterior; HP, hipocampo posterior; CL, Claustrum; CC, cisura calcarina; NP, globo pálido. Las líneas punteadas representan la regresión lineal



### **3. CORRELACIONES EN LAS ALTERACIONES DE LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA**

Se llevó a cabo un análisis de los valores de la transcripción para determinar la existencia de correlaciones que pudiesen afectar a la estructura del HS o a las diferentes regiones cerebrales estudiadas. Para ello, se determinaron los coeficientes de correlación entre los valores de expresión de cada par de genes, y se consideraron positivos aquellos para los que la  $p < 0.05$ .

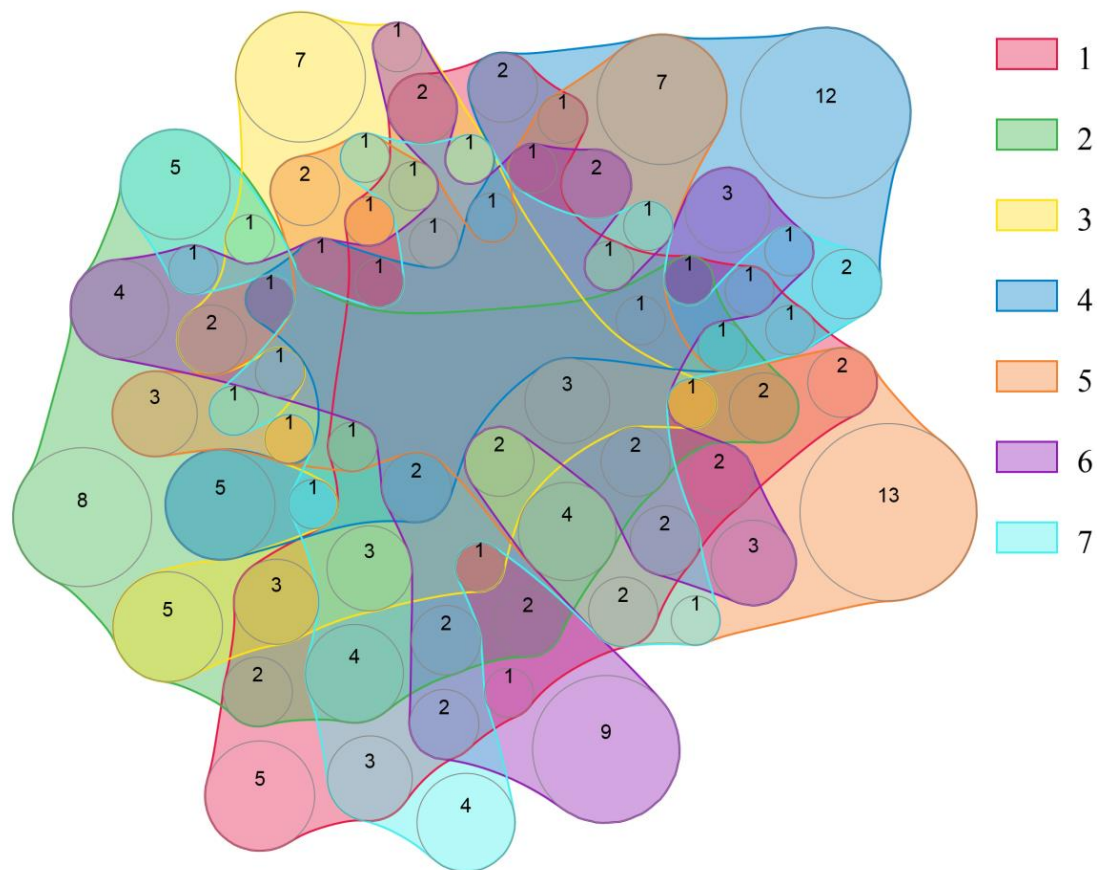
La correlación entre pares de genes en las diferentes zonas analizadas se presenta en la tabla 7. Cuando se consideraron las correlaciones positivas, se pudo determinar la existencia de valores significativos en la mayoría de las zonas (>4) en uno de los genes implicado en el inicio de la síntesis de la cadena (*EXTL3*), y en los responsables de la polimerización de la misma (*EXT1* y *EXT2*). También se determinó la existencia de numerosas correlaciones significativas entre las polimerasas y los principales genes responsables de la formación de los dominios sulfatados, *NDST1* y *NDST2*, así como de estos últimos entre sí. Los genes responsables de la modificación del residuo del ácido urónico (*GLCE* y *HS2ST1*) presentaron elevados de correlación tanto entre sí como con las *NDSTs* -1 y -2 y las polimerasas (Tabla 7, figura 40).

El número de correlaciones positivas detectado en las diferentes zonas desciende de manera notable para los genes implicados en etapas más tardías de la biosíntesis del HS. Las únicas excepciones vienen dadas por *HS6ST1*, correlacionado con *NDSTs* y polimerasas en numerosas zonas, y *HS3ST1*, correlacionado con *EXTL3*, *NDST2* y *HS6ST1*. *HS6ST2*, la mayoría de las isoformas de *HS3STs* y las sulfatasas extracelulares (*SULFs*), presentan correlaciones mucho más limitadas a zonas concretas (Tabla 7, figura 40).

**Tabla 7. Correlaciones positivas entre genes responsables de la síntesis de las cadenas de HS.** Los números indican las regiones cerebrales para las que las correlaciones presentan un nivel de correlación estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ). 1, región amígdala; 2, hipocampo anterior; 3, hipocampo posterior; 4, Claustrum; 5, cisura calcarina; 6, globo pálido; 7, cerebelo.

	EXTL2	EXTL3	EXT1	EXT2	NDST1	NDST2	NDST4	GLCE	HS2ST1	HS6ST1	HS6ST2	HS6ST3	HS3ST1	HS3ST2	HS3ST3A1	HS3ST3B1	HS3ST4	HS3ST5	HS3ST6	SULF1	SULF2	
EXTL2		1,2,7	1,2,5	2,7	1,2,3,7	2,6,7	1,5,6	1,2,3	1,2,7	1,2,3,5	1	1,5,7	1,2,5									
EXTL3			1,2,5,7	1,2,5,7	1,2,7	1,2,5,7	6	1,7	1,2,7	1,2,6	1	1,7	1,2,6,7	5	3	3	1,5,7	2		1,3,5		
EXT1				1,2,3,5,6,7	1,2,5,6,7	1,2,3,5,7	1,4	1,4,5,7	1,2,3,4,6,7	1,2,4,6		1,2,4,7	1,2	4,5			1,5	7		5,6		
EXT2					1,2,6,7	1,5,6,7	6	1,2,3,5,6,7	1,2,3,5,7	2,5	2,3	7	2,3	3,5			5,7	2,7	4	3,4,5,6		
NDST1							4	1,2,3,4,6,7	1,2,4,5,6,7	1,2,3,6		1,6,7	1,2,3		2,3		1	2,3,7		6		
NDST2							2,6	1,3,5,6,7	4,7	1,2,3,7		1,7	1,2,3,7	5	2,3	2	5	2		5,6		
NDST4								2,4,7		2,4		1,4,5	2,7	4	2	2	4	2,4	2,4	4		
GLCE									1,2,5,7	2,3,5		1,4,7	3,5,7	4,5	2,3	3	1,3,5,7	2,7		2,5,7		
HS2ST1										1,2,6	3	1,3,7	1,2	3	5	4	1	2,7		1,5,6		
HS6ST1											1,4,5,6	1,2,3,5,6,7	4,6	2,3,4,6	2,3,6	1,3,4,5,6	2,4	2,4	4,6	6		
HS6ST2							2					3	1,3,6	4	5	6	5	5				
HS6ST3												1,5,6,7	4,6	6	6	1,4	4,7	4	4	3		
HS3ST1														6	2,3,6	2,6	1,3,6		2,6	5		
HS3ST2															4,6,7	1,6,7	4,5,6	4,5,7	1,4,6,7	4,5		
HS3ST3A1															1,2,5,6,7		6	7	2,5,6,7	2,5		
HS3ST3B1																	3,6	7	1,3,4,6,7			
HS3ST4																		4,5	2,6	4,5		
HS3ST5																			4,5	4		
HS3ST6																				4		
SULF1																						
SULF2																						



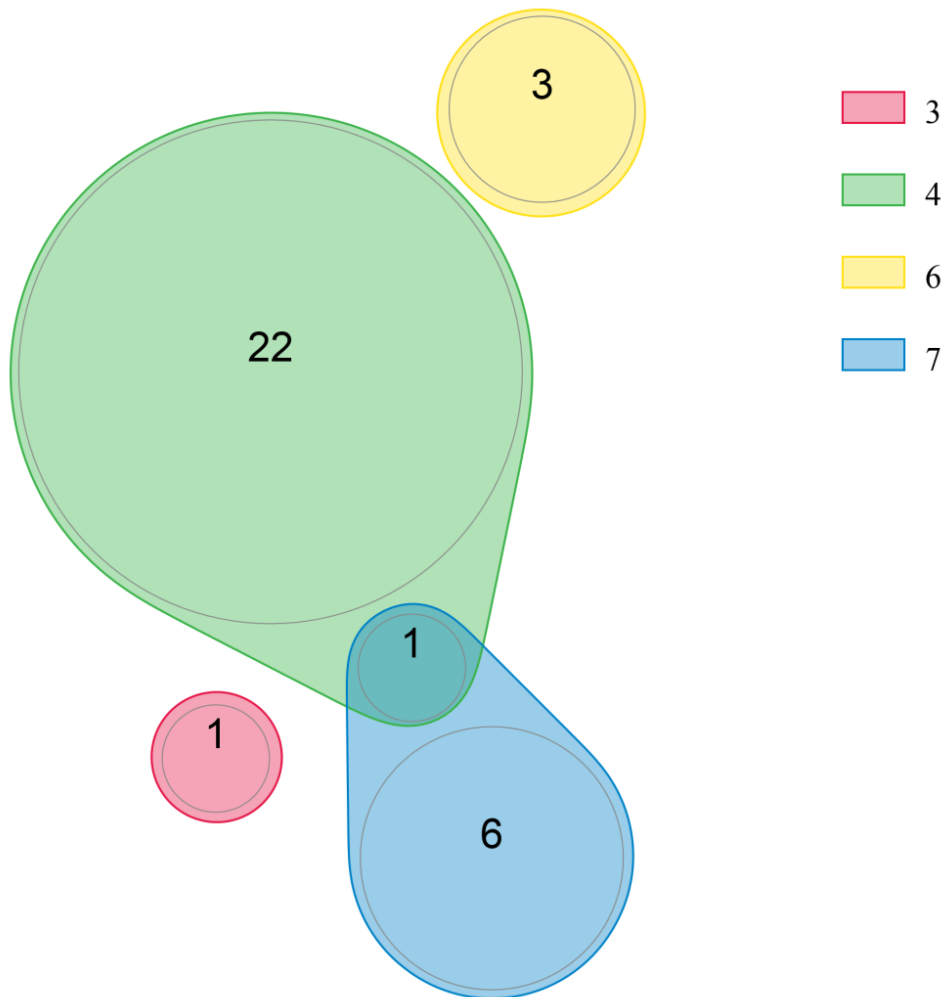


**Figura 40. Diagrama de Venn representativo de las correlaciones positivas entre diferentes genes de la síntesis de las cadenas de HS.** Las diferentes regiones cerebrales (1, región amígdala; 2, hipocampo anterior; 3, hipocampo posterior; 4, Claustrum; 5, cisura calcarina; 6, globo pálido; 7, cerebelo) aparecen indicadas por código de colores. Los números incluidos en el interior de la figura indican el número de genes detectables en cada una de las regiones.

Curiosamente, los datos apenas mostraron la existencia de correlaciones negativas estadísticamente significativas, y las pocas detectadas afectaron únicamente a genes implicados en etapas tardías de la biosíntesis, principalmente ciertas isoformas de HS3STs y SULFs, y únicamente en regiones muy limitadas (Tabla 8, figura 41).

**Tabla 8. Correlaciones negativas entre genes responsables de la síntesis de las cadenas de HS.** Los números indican las regiones cerebrales para las que las correlaciones presentan un nivel de correlación estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ). 3, hipocampo posterior; 4, Clastrum; 6, globo pálido; 7, cerebelo.

	EXTL2	EXTL3	EXT1	EXT2	NDST1	NDST2	NDST4	GLCE	HS2ST1/HS6ST1	HS6ST2	HS6ST3	HS3ST1	HS3ST2	HS3ST3A1	HS3ST3B1	HS3ST4	HS3ST5	HS3ST6	SULF1	SULF2
EXTL2										4										4
EXTL3																				3
EXT1										7							7	4	4	
EXT2																	7			
NDST1																				
NDST2																				
NDST4																				
GLCE																				
HS2ST1																				
HS6ST1																				
HS6ST2																				
HS6ST3										6										
HS3ST1																				
HS3ST2																				
HS3ST3A1																				
HS3ST3B1																				
HS3ST4																				
HS3ST5																				
HS3ST6																				
SULF1																				
SULF2																				



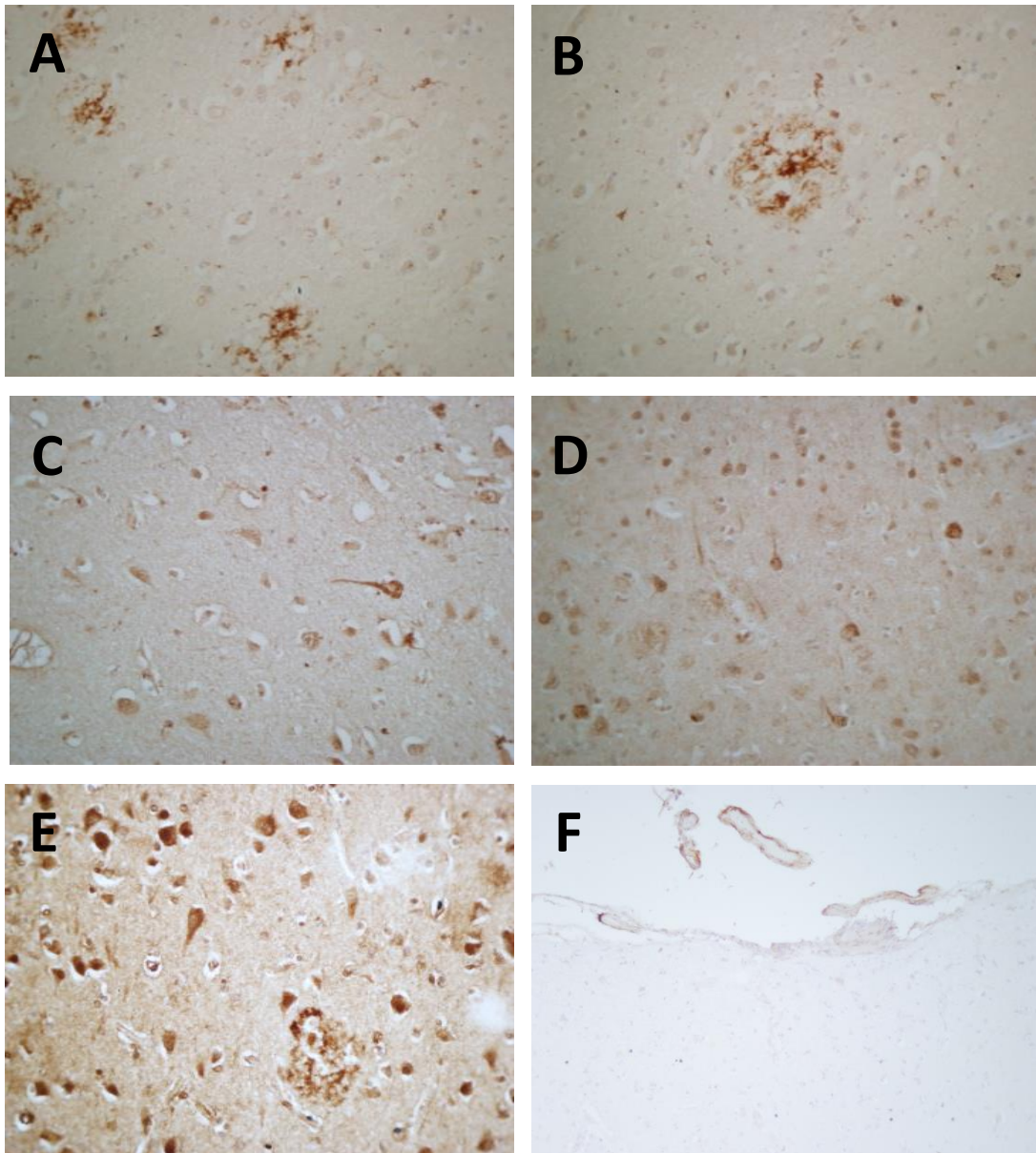
**Figura 41. Diagrama de Venn representativo de las correlaciones negativas entre diferentes genes de la síntesis de las cadenas de HS.** Las diferentes regiones cerebrales (3, hipocampo posterior; 4, Clastrum; 6, globo pálido; 7, cerebelo) aparecen indicadas por código de colores. Los números en el interior de la figura indican el número de genes detectables en cada una de las regiones.



#### **4. DETECCIÓN DE ALTERACIONES EN LA ESTRUCTURA DE LAS CADENAS DE HS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA.**

Dado que los resultados de transcripción mostraron cambios relevantes en los niveles de distintas enzimas implicados en la síntesis de las cadenas de HS, es lógico deducir que tanto los niveles del polisacárido como sus patrones de modificación, responsables de su estructura fina, deben estar alterados. Para analizar esto, llevamos a cabo estudios de IHQ sobre secciones de cerebro de pacientes de Alzheimer utilizando dos anticuerpos monoclonales diferentes: 10E4, capaz de detectar epitopos que incluyen residuos de glucosamina N-sulfatados, y JM403, capaz de detectar residuos no sustituidos.

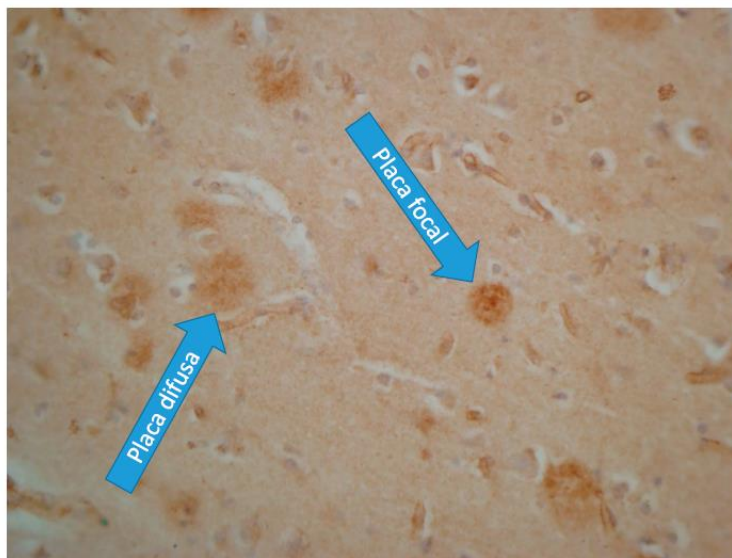
La detección del epitopo 10E4, y consiguientemente de dominios sulfatados en las cadenas de HS, pudo llevarse a cabo a nivel de todas las lesiones propias de la EA. Las inmunotinciones mostraron la existencia de una sobreexpresión moderada a nivel del núcleo de las placas neuríticas (figura 42 A y B); también se observó una sobreexpresión intensa en neuronas con ovillos neurofibrilares y más débilmente a nivel del neurópilo (figura 42 C y D), así como en placas neuríticas (figura 42 E). El epitopo 10E4 también mostró una sobreexpresión intensa a nivel de la pared de los vasos leptomeníngeos con angiopatía amiloidea (figura 42 F).



**Figura 42. Detección del epítipo 10E4 del heparán sulfato, que incluye residuos de glucosamina N-sulfatados, en secciones cerebrales. A: amplificación 200x; B-F: amplificación 400x.**

La detección de dominios con glucosaminas no sustituidas mediante el AC JM403, a diferencia de los datos reportados en el párrafo anterior, no fue capaz de detectar lesiones típicas de la EA. Los inmunomarcajes no identificaron tinción significativa a nivel de las neuronas, y se pudo observar una sobreexpresión moderada a nivel de placas de amiloide difusas y focales sin que se apreciase marcaje significativo en las placas neuríticas (figura 43).

NO SE IDENTIFICA  
MARCAJE  
SIGNIFICATIVO A NIVEL  
DE LAS NEURONAS



SOBREEXPRESIÓN MODERADA A NIVEL DE PLACAS DE AMILOIDE DIFUSAS Y  
FOCALES SIN APRECIAR MARCAJE SIGNIFICATIVO EN LAS PLACAS NEURÍTICAS

**Figura 43. Detección del epitopo JM403 del heparán sulfato, que incluye residuos de glucosamina sin sustitución en N, en secciones cerebrales. Amplificación 200x; B-F: amplificación 400x.**





## **DISCUSIÓN**

La EA es la causa más común de demencia. Es un trastorno degenerativo que afecta de forma progresiva a amplias áreas del cerebro. El desarrollo de la patología conlleva una serie de lesiones histopatológicas, las más características de las cuales son los depósitos extracelulares de proteína  $\beta$ , denominados placas amiloides, los depósitos de  $\beta$  sobre la pared de los vasos sanguíneos, denominados CAA, y las acumulaciones intraneuronales de proteína Tau hiperfosforilada, denominadas ONFs. Estas lesiones aparecen acompañadas de otras que incluyen los hilos del neurópilo, consistentes en segmentos dendríticos y axonales que contienen agregados hiperfosforilados tau que acompañan a los ONFs, y neuritas distróficas que contienen tau hiperfosforilada. Por otro lado, y sumado a este conjunto de lesiones características de la EA, se producen alteraciones graves debidas a tanto a pérdida de neuronas como de sinapsis (Serrano-Pozo et al., 2011). Sin embargo, no todas estas alteraciones parecen ocurrir en riguroso paralelo con el desarrollo de la patología, sino que el desarrollo de las placas amiloides tiene lugar con antelación a la aparición de los síntomas de déficit cognitivo, mientras que los ONFs, la pérdida de neuronas y, particularmente, la pérdida de sinapsis parece ocurrir de modo simultáneo al desarrollo de la demencia (Masters et al., 2015).

El desarrollo de las lesiones propias de la EA en el cerebro sigue un patrón característico de atrofia progresiva que implica de forma secuencial a diferentes regiones. Aunque existen diferencias de detalle entre diferentes estudios, en función de las muestras y la tecnología de análisis aplicada, las lesiones tempranas se dan en el cortex entorrinal y perirrinal, seguido de subcampos dentro del hipocampo, la corteza asociativa y, finalmente, el neocórtex (Scahill et al., 2002; Smith, 2002; Serrano-Pozo et al., 2011).

La presencia de placas amiloides y ONFs en el cerebro de pacientes de EA se relaciona también con la existencia de neuroinflamación. La neuroinflamación es un proceso que presenta un conjunto de características especiales, dado que se produce en un órgano considerado un lugar de privilegio inmune (Ziebell y Morganti-Kossmann, 2010). Contrariamente a la infiltración de neutrófilos que tiene lugar en las fases agudas de la inflamación en los tejidos periféricos, seguido de monocitos/macrófagos y linfocitos en la inflamación crónica, la característica primordial de la neuroinflamación es la activación de las células inmunes residentes en el órgano: la microglía (Streit et al., 2004). Esta

activación se produce en respuesta a una variedad de agresiones, que incluyen desde lesiones a infecciones, y conlleva un cambio morfológico de la microglía, capaz de actuar como fagocitos, además de la liberación de moléculas proinflamatorias, incluyendo citoquinas, quimioquinas, prostaglandinas y óxido nítrico. Esta reacción de la microglía conforma la respuesta innata propia de fases agudas de la inflamación, que puede ir continuada por la adopción de fenotipos anti-inflamatorios (Takeuchi y Akira, 2010). Por otro lado, la neuroinflamación crónica se caracteriza por una activación de la microglía prolongada en el tiempo y con producción sostenida de los factores proinflamatorios (Frank-Cannon et al., 2009).

Aunque tanto en las placas amiloides como en la CAA los depósitos extracelulares de proteína  $\beta$  constituyen un elemento esencial, estas estructuras son en realidad más complejas e integran también otras moléculas, entre las que se encuentran diferentes proteínas inflamatorias (Verbeek et al., 1997), apolipoproteína E (Schmechel et al., 1993) y HSPGs (Van Horssen et al., 2001; Cui et al., 2013). Además, los HSPGs pueden unirse directamente a la proteína tau, componente esencial de ONFs (Cui et al., 2013; Huynh et al., 2019), y promover su incorporación celular (Stopschinski et al., 2018).

La importancia de los HSPGs en relación con el desarrollo y la función cerebral ha sido mostrada por diferentes estudios (Cui et al., 2013). Estas moléculas han sido relacionadas con diferentes aspectos que incluyen adhesión y migración celular (Ford-Perriss et al., 2003), formación y elongación de neuritas, guía de axones (Lee et al., 2004), sinaptogénesis y plasticidad de sinapsis (Reist et al., 1987) o respuesta a daños y heridas (Hagino et al., 2003).

Los PGs han sido relacionados con todo tipo de amiloidosis desarrolladas en el ser humano, y los HSPGs en concreto, y particularmente las cadenas sacarídicas de HS, han sido relacionadas con algunas de las características esenciales de la patogénesis en la EA, incluida la génesis de las placas seniles, del amiloide cerebrovascular y de los ONFs (Van Horssen et al., 2003). En estudios *in vitro*, se ha podido determinar cómo las cadenas de HS son capaces de participar en el plegamiento erróneo, la oligomerización y la fibrilación de las proteínas amiloidogénicas implicadas en la EA, incluidas tanto  $\beta$  como Tau. El HS también participa en la estabilización de los agregados proteicos que se producen, los protege de la proteólisis, y actúa como receptor para la incorporación celular (Maíza et al., 2018).

La base molecular sobre la que se sustentan las múltiples acciones biológicas del HS es su complejidad estructural, así como la plasticidad de la misma, que permite a las células adaptarse y modificar esta estructura en función del estado fisiológico y patológico (Kjellén y Lindahl, 1991; Fransson et al., 2000). Este proceso se sustenta sobre un mecanismo de biosíntesis peculiar, y distinto al presente en otros polímeros con estructuras complejas portadoras de información como proteínas o ácidos nucleicos. Dicha biosíntesis tiene lugar por la polimerización de la cadena sobre un tetrasacárido de unión unido a residuos específicos de la proteína núcleo, en la cual actúan distintas enzimas responsables de la iniciación y la posterior elongación. Además, y simultáneamente a su polimerización, estas cadenas experimentan una serie de reacciones enzimáticas que producen una enorme diversidad estructural, y que pueden incluir N-deacetilaciones, N-sulfataciones, epimerizaciones y una amplia variedad de O-sulfataciones (Kjellén y Lindahl, 1991; Fransson et al., 2000). Como resultado final de la biosíntesis, se genera una molécula compleja con alternancia de dominios no sulfatados y sulfatados, presentando estos últimos secuencias de alta afinidad por ligandos específicos que, en el caso del cerebro, incluyen factores de crecimiento y sus receptores, quimioquinas, morfógenos, moléculas de guía de axones o moléculas de matriz extracelular entre otros (Cui et al., 2013).

Dado el papel esencial que las cadenas de HS desempeñan en la función y estructura cerebral, así como su relación directa con la regulación de diferentes procesos moleculares que conducen a algunos de los daños esenciales asociados a la EA, diferentes estudios previos han abordado algunos aspectos acerca del papel de estas moléculas en la EA y las alteraciones que experimentan asociadas al desarrollo de esta patología (Cui et al., 2013). Sin embargo, hasta la fecha ningún trabajo ha descrito las alteraciones que estas moléculas experimentan asociadas al desarrollo de la patología. En base a los datos actualmente disponibles, la estructura de estas moléculas parece controlada esencialmente por la expresión de isoenzimas concretas responsables de reacciones específicas, sin perjuicio de la posible existencia de moléculas reguladoras, hoy desconocidas (Esko y Selleck, 2002). Este razonamiento hace que el acercamiento a las alteraciones estructurales experimentadas por la molécula pueda sustentarse sobre el estudio de los niveles de transcripción de los 23 genes conocidos responsables de su biosíntesis. Otra forma de acercamiento, previamente utilizada por otros autores, es la identificación de epitopos con diferente grado de sulfatación en la molécula final del polisacárido mediante el empleo de anticuerpos específicos (Zhang et al., 2014a). Además, los eventos neuropatológicos

asociados a la progresión de la EA siguen un orden espacial y temporal preciso y propio tanto para  $\beta$ a como para Tau (Maíza et al., 2018), por lo que resulta interesante analizar los cambios en pacientes con grado de patología leve, moderado y severo, y en diferentes regiones cerebrales: amígdala, hipocampo anterior, hipocampo posterior, claustrum, cisura calcarina, globo pálido y cerebelo.

La síntesis del esqueleto polisacárido de las cadenas de HS es llevada a cabo por glicosiltransferasas de la familia de las exostosinas (EXTs), de las cuales han sido identificados 5 genes codificantes de las mismas en mamíferos: *EXTL1*, *EXTL2*, *EXTL3*, *EXT1* y *EXT2* (Busse-Wicher et al., 2014). Nuestro estudio ha podido detectar la presencia de transcritos para 4 de estos genes *EXTL2*, *EXTL3*, *EXT1* y *EXT2*, en todas las muestras analizadas, tanto control como con diferentes grados de patología, y en todas las áreas cerebrales estudiadas. Sin embargo, en ningún caso se pudo detectar la presencia de ARNm codificante de *EXTL1*. *EXTL1* es un gen cuya expresión está limitada a muy pocos tejidos; pese a ello, estudios previos lo han descrito en cerebro, junto a músculo esquelético, piel y, en bajos niveles, en corazón (Wise et al., 1997). *EXTL1* ha sido identificado como codificante de una GlcNAc transferasa; la falta de estudios bioquímicos hace que no esté perfectamente caracterizado su papel en relación con la síntesis del HS (Busse-Wicher et al., 2014), aunque se han descrito alteraciones en sus niveles de transcripción en algunos procesos tumorales (Liu et al., 2006).

*EXTL2* y *EXTL3* se expresan en todos los casos analizados, y experimentan alteraciones en varios de ellos. Los cambios observados son subexpresiones, principalmente en pacientes de grado moderado; en pacientes severos se observa un número de modificaciones limitado, aunque, contrariamente al resto de casos, aquí se producen algunas sobreexpresiones. Ambos genes codifican enzimas con actividad GlcNAc transferasa, capaz de adicionar el primer residuo de GlcNAc al tetrasacárido de unión, lo que constituye una reacción crítica en el direccionamiento de la biosíntesis hacia el HS, en detrimento del CS (Kreuger y Kjellén, 2012). Sin embargo, *EXTL2* presenta una actividad débil, y se ha propuesto que su transferencia de un residuo de GlcNAc a una región de unión fosforilada termina la elongación de la cadena, asignándole un papel de control de la biosíntesis, por lo que su alteración se relacionaría con algunos procesos patológicos (Nadanaka et al., 2013). Por su parte, *EXTL3* parece ser el responsable de la iniciación de la elongación; también se le ha vinculado con interacciones con otras

moléculas lo que se relacionaría con otro tipo de funciones biológicas (Busse-Wicher et al., 2014).

La transcripción de *EXT1* y *EXT2* se detecta en todos los casos analizados en este estudio y también, de modo semejante a *EXTL2* y *EXTL3*, sus modificaciones asociadas a EA son más abundantes en regiones cerebrales correspondientes a pacientes de grado moderado, pero en este caso el descenso de alteraciones en los niveles de ARNm en pacientes severos es más acusado. *EXT1* y *EXT2* codifican enzimas bifuncionales que incluyen actividades transferasas de GlcNAc y GlcA, y son responsables de la elongación de la cadena *in vivo*, formando un heterooligómero (Busse-Wicher et al., 2014). Sin embargo, algunos estudios sugieren que *EXT2* desempeñaría funciones más complejas, no únicamente circunscritas a la biosíntesis, sino en la interacción y transporte de ciertas moléculas (Busse-Wicher et al., 2014). *EXT1* y *EXT2* son genes supresores de tumores cuya mutación se relaciona con el desarrollo de condrosarcomas múltiples hereditarios. Aunque no existen estudios que vinculen de una manera directa estos genes con la EA, se ha descrito que la depleción de *EXT1* en ratones afecta al desarrollo neuronal, resultando en anormalidades y malfunción cerebral (Yu et al., 2017). También, en el caso de ratones, se ha demostrado que la delección condicional de *Ext1* produce una disminución del HS que apareja una reducción de la oligomerización de  $\beta$ , mostrando conexión del HS con la patología amiloidea mediada por modulación de la eliminación y agregación de  $\beta$  (Liu et al., 2016).

La primera etapa en la modificación de las cadenas de HS es la conversión de GlcNAc en glucosamina N-sulfatada (GlcNS). Esta reacción es crítica, pues conduce a la formación de dominios N-sulfatados (NS) distribuidos a lo largo de la cadena y espaciados por regiones formadas por disacáridos esencialmente no sulfatados denominadas dominios NA por su alto contenido en GlcNAc (Grobe et al., 2002). Existen 4 isoformas responsables de estas reacciones, *NDST1-4*, y este estudio permitió determinar la presencia de transcritos para 3 de ellos en todas las muestras analizadas, con independencia de la existencia o no de patología, siendo la isoforma *NDST3* la única no detectada. *NDST1* y *-2* fueron las isoformas preferentemente transcritas, aunque los niveles de *NDST1* se situaron a valores superiores, de hasta un orden de magnitud en todas las regiones cerebrales excepto en el cerebelo, donde las transcripciones de ambos genes fueron comparables. Por su parte, *NDST4* se transcribió a niveles netamente inferiores a las otras dos, en torno a 2 órdenes de magnitud, en todos los casos analizados. El análisis de las muestras patológicas

mostro diversas alteraciones, en su mayor parte subexpresiones, y principalmente en muestras procedentes de pacientes de grado moderado, mientras que un número mucho más reducido de modificaciones pudo ser detectado en pacientes de grado leve y severo.

Ha sido previamente descrito que *NDST1* y -2 constituyen las isoformas más ampliamente expresadas, apareciendo en todos los tejidos embrionarios y adultos, pero a niveles diferentes (Grobe et al., 2002), y parecen ser las principales responsables de la generación de los dominios sulfatados en el HS, particularmente *NDST1* (Sheng et al., 2011). *NDST3* y -4 presentan un espectro de expresión mucho más reducido, y sus transcritos son detectables predominantemente durante el desarrollo embrionario (Aikawa y Esko, 1999; Aikawa et al., 2001); no obstante, trabajos previos han detectado la expresión de *NDST4* en cerebro adulto a bajos niveles (Aikawa et al., 2001), y *NDST3* en cerebro y corazón adultos (Aikawa y Esko, 1999), dato este último no concordante con los resultados de este trabajo. La expresión de las diferentes isoformas y los niveles de la misma son relevantes, por cuanto *NDST1* y -2 son capaces ambos de formar dominios sulfatados, pero con extensiones diferentes, mientras *NDST3* muestra alta actividad deacetilasa pero baja sulfotransferasa, y *NDST4* invierte estas proporciones (Grobe et al., 2002). Por otra parte, tanto *NDST1* como *NDST2* han mostrado desempeñar un papel crítico en el desarrollo neural, y su depleción en modelos de ratón conduce a anomalías y disfunción cerebral (Yu et al., 2017); estas alteraciones parecen tener que ver con deficiencias en señalización con factores de crecimiento como es el caso del FGF4 (Johnson et al., 2007). Curiosamente, en modelos de EA en ratón se ha podido determinar un incremento significativo en la transcripción de *NDST2*, pero no del resto de NDSTs (Hosono-Fukao et al., 2012).

Tras la formación de los dominios NS, las subsiguientes modificaciones tienen lugar preferentemente dentro de o adyacente a estos dominios. Las dos siguientes reacciones afectan como sustrato al residuo de ácido glucurónico presente en el disacárido unidad del HS, e implican la epimerización del C5 y la O-sulfatación del C2 (Kreuger y Kjellén, 2012). La primera de las reacciones es catalizada por una epimerasa codificada por el gen *GLCE*, y el resultado de su acción catalítica es la generación de un residuo de ácido idurónico, el cual puede adoptar diferentes conformaciones ( ${}^1C_4$ ,  ${}^4C_1$  y  ${}^2S_0$ ) lo que provee a la cadena de flexibilidad conformacional, facilitando la existencia de interacciones específicas con diferentes ligandos (Préchoux et al., 2015). La siguiente reacción es la 2-O sulfatación del residuo de ácido idurónico formado, lo que estabiliza el

producto final al no ser sustrato de nuevo para la epimerasa (Préchoux et al., 2015); además, la sulfatación en C2 es esencial para el establecimiento de ciertas interacciones específicas con ligandos. El estudio de la alteración de estas enzimas en EA detectó la transcripción de ambos genes en todos los casos analizados, y además los niveles eran semejantes en las diferentes áreas cerebrales con la única excepción del cerebelo, en el que se observaron niveles de transcritos de *HS2ST1* algo inferiores a los de *GLCE*. En pacientes leves se detectó la existencia de subexpresiones que afectaba a uno o ambas enzimas en varias regiones cerebrales, mientras que en los pacientes moderados las subexpresiones pudieron ser observadas en todas las regiones analizadas. De nuevo, el nivel de alteración fue menor en pacientes severos, afectando a menos zonas, aunque la mitad de las modificaciones observadas fueron sobreexpresiones.

Los estudios previos han mostrado que las reacciones de modificación del ácido urónico son esenciales en el desarrollo de la EA, por cuanto se ha demostrado una interacción *in vitro* entre  $\beta$  y HS. El  $\beta$  presenta un motivo en un extremo N-terminal con secuencia HHQK que es capaz de unir HS y también células de microglía, lo que sugiere que la microglía interacciona con  $\beta$  mediante cadenas de HS (Zhang et al., 2014a). Para permitir la interacción con esta secuencia, en córtex cerebral humano se ha descrito que se requiere un dominio hexasacárido N-sulfatado en el HS que contiene residuos de ácido idurónico 2-O-sulfatados críticos para la interacción. La longitud de la cadena sacarídica es también un factor esencial pues la interacción no tiene lugar cuando la longitud de la cadena es inferior a 6 azúcares (Lindahl et al., 1999). Interesantemente, el dominio de HS capaz de interaccionar selectivamente con  $\beta$  también lo hace con FGF2, al cual se le ha atribuido un papel neuroprotector, sugiriendo que ambas moléculas compiten por un mismo lugar de anclaje (Lindahl et al., 1999). Se ha propuesto que la interacción  $\beta$ -HS es mutuamente protectora, evitando la degradación de la cadena de HS por la heparanasa y la de  $\beta$  por proteasas (Gupta-Bansal et al., 1995). Otros estudios centrados en el cerebro, también han mostrado que la 2-O-sulfatación del ácido idurónico se encuentra relacionada con heridas, incrementándose junto al sindecano-1 (Properzi et al., 2008), y que decrecimientos en 2-O-sulfatación unidos a incrementos en N- y 3-O-sulfatación, pero no en 6-O-sulfatación ocurren en el hipocampo de sujetos a edades avanzadas, lo que podría relacionarse con la patogénesis de la EA (Huynh et al., 2012).

La polimerización y las 3 primeras reacciones de modificación de las cadenas de HS confieren el cuadro estructural y funcional básico, que incluye la organización de la

cadena, los dominios NS y la relación glucurónico/idurónico. Estas modificaciones son esenciales para la unión de muchos ligandos, pero compartidas por todos ellos. Sin embargo, las etapas finales de la síntesis, responsables del control de la 6-O- y 3-O-sulfatación de la glucosamina se relacionan con interacciones más selectivas, capaces de discriminar ligandos específicos, muy especialmente en el caso de la 3-O-sulfatación, ocupando la 6-O-sulfatación una posición intermedia (El Masri et al., 2017).

La 6-O-sulfatación es una modificación muy relevante, por cuanto se encuentra implicada en la unión y activación de numerosos factores de crecimiento (El Masri et al., 2017), de todas las quimioquinas (Zlotnik y Yoshie, 2012), y de miembros de las 3 principales familias de morfógenos (Yan y Lin, 2009; Coulson-Thomas, 2016), además de muchas otras proteínas como la proteína de guía de axones slit-2 (Shipp y Hsieh-Wilson, 2007). Además, es un tipo de modificación muy peculiar en tanto que presenta propiedades únicas: es la única sulfatación que se puede encontrar a niveles significativos fuera de los dominios NS, es la única que puede tener lugar extracelularmente (Habuchi et al., 1995), y es la única que se regula tanto mediante procesos biosintéticos como post-sintéticos, mediante la acción de dos grupos de enzimas: las 6-O-sulfotransferasas (HS6OST1-3) y las endosulfatasas (SULF1-2) (El Masri et al., 2017).

Las 3 isoformas de HS6OST (1-3) llevan a cabo un ajuste fino de la estructura de la cadena mediante actividades catalíticas solapantes pero complementarias, a través de sutiles diferencias en sus especificidades de sustrato (Habuchi et al., 2000). Presentan una distribución espacio-temporal específica en los diferentes tejidos, habiéndose descrito una moderada transcripción de *HS6OST1* y una presencia de *HS6OST2* en cerebro, mientras la presencia de *HS6OST3* es ubicua (Habuchi et al., 2000; El Masri et al., 2017). En nuestro estudio, se detectó la presencia de transcritos para las 3 isoformas en todas las regiones cerebrales analizadas, aunque con algunas diferencias; *HS6OST1* fue en todos los casos la isoforma más transcrita, y *HS6OST2* la menos, oscilando la diferencia de niveles entre ellas en uno o dos órdenes de magnitud dependiendo de la región analizada. *HS6OST3* se expresó a niveles variables, normalmente intermedios entre las otras dos isoformas, aunque más próximo o incluso igualando a *HS6OST1*, con la excepción del cerebelo, en el que los niveles de transcripción de las isoformas -2 y -3 estuvieron próximos. El análisis de los pacientes de EA de grado leve mostró diferentes alteraciones aberrantes, prácticamente todas subexpresiones, las cuales se duplicaron en pacientes moderados, apareciendo en todos los casos como subexpresiones. En los pacientes moderados se pudo observar



también una progresión en las alteraciones, que afectaban a las 3 isoformas en regiones tempranas (amígdala, hipocampo anterior) a dos de ellas en regiones intermedias (hipocampo posterior, claustrum, cisura calcarina) y solo a la isoforma 3 en tardías (globo pálido y cerebelo). Llamativo es el número de alteraciones detectadas en los pacientes severos, prácticamente la mitad de ellas fueron sobreexpresiones, esencialmente ausentes en los otros dos grupos. Estas alteraciones pueden ser interesantes a la hora de comprender el desarrollo de la patología, por cuanto se ha descrito que las 6-O-sulfatos están implicados en la unión a  $\beta$ a (Lindahl et al., 1999) y en la modulación del procesamiento de la PPA (Scholefield et al., 2003).

La 6-O-sulfatación del HS es la única modificación de la cadena sacarídica que puede sufrir modificaciones tras la biosíntesis mediante un mecanismo que implica dos endosulfatasas extracelulares (SULF1-2) (Morimoto-Tomita et al., 2002). La actividad de estas endosulfatasas es limitada, por cuanto su substrato preferente es el disacárido [UA2S-GlcNS6S], que constituye normalmente menos del 10% de la cadena (Staples et al., 2011; Seffouh et al., 2013; El Masri et al., 2017). Sin embargo, su acción es capaz de producir drásticos cambios en la capacidad de unir ligandos, actuando como antagonista de los mismos, afectando a rutas de señalización, y afectando a procesos fisiológicos importantes, entre ellos en desarrollo neuronal (Al Oustah et al., 2014; Kalus et al., 2015). Estas enzimas han sido también implicados en el desarrollo de ciertas patologías, y particularmente en inflamación, dado que la 6-O-sulfatación es crítica para la unión de muchas quimioquinas (Uchimura et al., 2006). En el análisis llevado a cabo en este trabajo, pudo detectarse la presencia de transcritos para ambos genes en todas las regiones cerebrales. *SULF2* presentó niveles de ARNm superiores en todos los casos, si bien en amígdala, hipocampo anterior, hipocampo posterior y claustrum sus niveles estuvieron por encima de *SULF1* en un orden de magnitud o superior, mientras en cisura calcarina, globo pálido y cerebelo la diferencia fue menos acusada. En las muestras de EA de grado leve se pudieron detectar subexpresiones de alguno de estos enzimas en la mitad de regiones analizadas, mientras en el grado moderado se duplicaron, apareciendo en todas las zonas cerebrales, pudiendo detectarse que en un 33% estaban constituidas por sobreexpresiones; en pacientes severos el número de modificaciones se redujo en una pequeña proporción, pero se incrementaron las sobreexpresiones. Curiosamente, en todos los casos en los que los niveles de ARNm aparecieron incrementados, se correspondió con transcritos de *SULF1*. Estos resultados concuerdan en parte con el descenso en la expresión de *SULF2*

previamente descrito en varias regiones cerebrales de pacientes con EA, aunque en esos estudios no detectan alteraciones en *SULF1* contrariamente a los resultados expuestos en el presente trabajo (Roberts et al., 2017). En modelos de ratón, también se ha descrito una depleción de las isoformas de SULF como resultado de malformaciones y anomalías cerebrales (Yu et al., 2017). Aunque se ha descrito la existencia de un gran solapamiento entre las funciones de SULF1 y SULF2 con efectos compensatorios (Holst et al., 2007), también existen datos que apuntan a una no redundancia de las funciones de SULFs durante el desarrollo cerebral en ratón, dado que ambas formas contribuyen de modo diferencial al crecimiento de neuritas, a la plasticidad sináptica y a la actividad motora (Thacker et al., 2014).

La sulfatación en el C3 del residuo de glucosamina constituye el último paso en el proceso biosintético de las cadenas de HS, solo continuado por la acción extracelular de las SULFs. Esta es una modificación rara presente en algunas cadenas en cantidad limitada o ausente por completo en otras para la que, paradójicamente, existe un mayor número de enzimas diferentes implicados (codificados por *HS3ST1*, -2, -3A, -3B, 4, 5, 6). Esto significa que los sustratos de esta reacción ya han sido previamente modificados y, de hecho, esta modificación se ha relacionado con interacciones con ligandos muy específicas, basadas en secuencias con una disposición de sulfatos muy concreta (Thacker et al., 2014; Denys y Allain, 2019). La expresión de los genes *HS3ST* está minuciosamente controlada espaciotemporalmente, y todas las células expresan al menos una de las isoformas, aunque frecuentemente se expresan varias (Thacker et al., 2014). La expresión está particularmente regulada en el sistema nervioso, lo que sugiere un papel neurológico importante para la 3-O-sulfatación (Thacker et al., 2014). En el cerebro, diferentes trabajos previos han descrito la expresión de las isoformas -1, -2, -4 y -5 (Shworak et al., 1997; Xia et al., 2002; Mochizuki et al., 2003). En el presente estudio pudo detectarse la presencia de transcritos para las 7 isoformas en todas las regiones cerebrales analizadas, si bien las diferencias en los niveles de transcripción entre ellas fueron muy notables, superando los 3 órdenes de magnitud. Las isoformas -1 y -4 se expresaron a elevados niveles en todos los casos, mientras la isoforma -2 también lo hizo en todas las regiones excepto en el cerebelo, donde sus niveles de ARNm se redujeron entre uno y dos órdenes de magnitud; el resto de isoformas mostraron valores mucho más reducidos. Las *HS3STs* experimentaron numerosas alteraciones en EA, afectando en torno a un 40% de los transcritos. Además, e interesantemente, la mayor parte de las modificaciones observadas fueron

sobreexpresiones, situándose en torno a un 70% en los casos leves y moderados, pero elevándose hasta un 90% en los pacientes severos. Estudios previos en hipocampo de pacientes con EA han descrito una sobreexpresión de *HS3ST2* (aunque no de otras *HS3STs*), originándose cadenas de HS 3-O sulfatadas que pueden ser internalizadas por las células, interaccionando con Tau y promoviendo su fosforilación anormal (Sepulveda-Diaz et al., 2015). En otros estudios, también en hipocampo de pacientes con EA, se ha descrito una sobreexpresión de *HS3ST2* y *HS3ST4* lo que, junto a alteraciones en otras sulfataciones, hace que las cadenas de HS presenten capacidades alteradas para unir y potenciar las actividades de factores de crecimiento, incluido FGF2, VEGF y BDNF, mientras incrementa su capacidad de unión a Tau (Huynh et al., 2019).

La maquinaria de biosíntesis de las cadenas de HS sulfato es compleja, y su regulación dista de comprenderse en detalle. Para poder tener una visión más general de lo que representan las modificaciones observadas en la progresión de la patología, los resultados se analizaron para cada familia de genes relacionados como porcentaje de alterados. El resultado de este tipo de análisis muestra que en los pacientes moderados se incrementa la alteración de todos los grupos, pero muy particularmente de las dos familias implicadas en la sulfatación del C6 de la glucosamina. Cuando se produce la transición a pacientes severos, el porcentaje de genes alterados en las familias responsables de las etapas iniciales de la biosíntesis (polimerización, N-deacetilación-N-sulfatación y modificación del residuo de ácido urónico) descienden notablemente sus niveles de alteración, pero no así los involucrados en las etapas tardías de la biosíntesis (6-O- y 3-O-sulfatación).

También es interesante analizar los datos desde el punto de vista de las sub y sobreexpresiones. Las sobreexpresiones tienen un papel muy discreto en las alteraciones observadas en pacientes leves y moderados, con la única excepción de las *HS3STs*, que son mayoritarias. Sin embargo, en pacientes severos existe un incremento en las sobreexpresiones en todas las familias de genes que, interesantemente, se vuelve más acentuado en las familias responsables de las etapas tardías de la biosíntesis.

Como se indicó anteriormente, la evolución de la patología en el cerebro sigue un patrón característico de atrofia progresiva que implica de forma secuencial a diferentes regiones (Scahill et al., 2002; Smith, 2002; Serrano-Pozo et al., 2011), motivo por el cual para este trabajo se seleccionaron biopsias de amígdala, hipocampo anterior, hipocampo

posterior, claustrum, cisura calcarina, globo pálido y cerebelo. Cuando los resultados, expresados como porcentaje de alteraciones se representan frente a estas diferentes regiones, se observa un patrón descendente, lo que estaría de acuerdo con el patrón de evolución de la enfermedad. Sin embargo, para que este patrón se ajuste es preciso colocar como primera región al cerebelo el cual, curiosamente, acumula el mayor porcentaje de alteraciones totales. Estos datos son relevantes, por cuanto el cerebelo se ha considerado durante mucho tiempo como implicado únicamente en la coordinación de la actividad motora y, consiguientemente, no relevante en el desarrollo de la EA (Jacobs et al., 2018). Sin embargo, en los últimos años se han acumulado evidencias que implican al cerebelo en las redes funcionales cerebrales de amplia escala y en la cognición, y numerosos estudios han determinado la existencia de depósitos de  $\beta$ a en el cerebelo, principalmente en la capa molecular del córtex cerebelar (Heckmann et al., 2004; Rudzinski et al., 2008; Sepulveda-Falla et al., 2014). Notablemente, en otros tipos de demencia no pudo constatar la presencia de  $\beta$ a en el cerebelo, sugiriendo la especificidad de estos hallazgos (Mavroudis et al., 2010; Jacobs et al., 2018). Por otra parte, también algunos estudios han reportado la existencia de oligómeros solubles tóxicos y de ovillos (Tomic et al., 2009; Lalli et al., 2014; Sepulveda-Falla et al., 2014), lo que evidencia la existencia de alteraciones en el cerebelo en la EA, posiblemente ya en la fase preclínica, que pueden contribuir a la sintomatología y patofisiología de la EA (Jacobs et al., 2018). Los resultados presentes en este estudio refuerzan estos datos, sugiriendo que el cerebelo acumula numerosas alteraciones en genes responsables de la síntesis del HS en el cerebelo, por encima de otras regiones, lo que podría ser indicio del inicio de los cambios en etapas muy tempranas de la patología.

En el estado del conocimiento actual, la síntesis del HS se lleva a cabo sin molde, y principalmente sustentada por la expresión de isoformas enzimáticas concretas. Sin embargo, se conoce la existencia de asociaciones in vivo entre algunos de estos enzimas, como el heterodímero entre EXT1 y EXT2 (McCormick et al., 2000), su interacción con la NDST1 (Lidholt et al., 1989), o la asociación entre GLCE y HS2ST1 (Pinhal et al., 2001). Además, diversas evidencias experimentales apuntan a la formación de complejos entre la maquinaria biosintética, denominados gagosomas, que pudiesen contribuir a la regulación de la biosíntesis junto a hipotéticos factores reguladores (Esko y Selleck, 2002; Kreuger y Kjellén, 2012). Por este motivo, se analizó las correlaciones existentes entre las alteraciones observadas en la expresión génica en diferentes regiones cerebrales. Los

resultados obtenidos mostraron la existencia de correlaciones positivas entre pares de genes para los que se conocía su asociación (*EXT1* y *2*, *GLCE* y *HS2ST*) pero, además, mostraron que las asociaciones eran mucho más intensas para los genes implicados en las primeras etapas de la biosíntesis del polímero, disminuyendo de manera muy marcada en los responsables de las etapas tardías. Asimismo, e interesantemente, las correlaciones negativas fueron escasas y afectaron casi exclusivamente a genes responsables de etapas tardías de la biosíntesis. En el caso de las correlaciones positivas, se veían afectadas en gran medida las regiones cerebrales más tempranas, mientras en las negativas eran regiones más tardías.

El conjunto de alteraciones descritas en este trabajo apunta claramente a diferencias en los niveles de transcripción de numerosos enzimas implicados en la biosíntesis del HS, lo que debería conducir a modificaciones en la estructura final de la molécula. Sin embargo, un estudio pionero sobre la estructura del HS en cerebro de pacientes de EA no detectó alteraciones importantes en la misma, más allá de sugerir una distribución diferencial de los grupos N-sulfato en 4 regiones del córtex cerebral: frontal, parietal, occipital y temporal (Lindahl et al., 1995). Sin embargo, nuestros datos van en la dirección de otros trabajos posteriores en los que sí se detectan alteraciones en la expresión de los enzimas biosintéticos, aunque los resultados concretos no siempre son coincidentes entre los diferentes estudios (Lindahl et al., 1999; Scholefield et al., 2003; Hosono-Fukao et al., 2012; Huynh et al., 2012; Sepulveda-Diaz et al., 2015; Roberts et al., 2017; Huynh et al., 2019). Un acercamiento directo a la estructura de la cadena sacarídica es el uso de anticuerpos frente a diferentes dominios. En este estudio se pudo comprobar que todas las lesiones propias de la EA producían inmunotinciones positivas frente a un anticuerpo capaz de detectar un dominio sulfatado (10E4), incluyendo placas neuríticas, ovillos neurofibrilares y vasos. Por el contrario, anticuerpos frente a regiones no sulfatadas (JM403) únicamente dieron cierto grado de tinción en placas de amiloide difusas, resultados que fueron en gran medida coincidentes con estudios previos basados en inmunohistoquímica de los que se dedujeron patrones similares (O'Callaghan et al., 2008; Bruinsma et al., 2010).



## CONCLUSIONES

1. El análisis de las alteraciones en la transcripción de los genes de biosíntesis de las cadenas de HS en amígdala, hipocampo anterior, hipocampo posterior, claustrum, cisura calcarina, globo pálido y cerebelo en pacientes de EA leves, moderados y severos muestra importantes alteraciones en todos los casos.
2. Todas las familias de genes resultan alteradas en menor grado en pacientes leves y se incrementan en grado moderado. En pacientes severos disminuyen las alteraciones en los genes responsables de las primeras etapas de la biosíntesis (polimerización, N-deacetilación-N-sulfatación y modificación del residuo de ácido urónico), pero se mantienen en niveles elevados los responsables de etapas tardías (6-O y 3-O sulfatación de la glucosamina).
3. En pacientes leves y moderados las sobreexpresiones son escasas con la única excepción de las *HS3STs*, donde son mayoritarias. Sin embargo, en pacientes severos existe un incremento en las sobreexpresiones en todas las familias de genes, y muy acentuado en las familias responsables de las etapas tardías de la biosíntesis.
4. El análisis de las alteraciones por zonas muestra un patrón descendente, lo que estaría de acuerdo con el patrón de evolución de la enfermedad. Sin embargo, el cerebelo es la región con mayor número de modificaciones porcentuales, lo que refuerza su papel en el desarrollo de la patología.
5. Existen numerosas correlaciones positivas entre genes que afectan fundamentalmente a los responsables de las primeras etapas de la biosíntesis y a regiones cerebrales tempranas. Por el contrario, las correlaciones negativas son escasas, afectan a genes implicados en etapas posteriores, y se detectan sobre todo en regiones cerebrales más tardías.
6. El análisis inmunohistoquímico muestra la existencia de HS con epitopos sulfatados asociado a todo tipo de lesiones de EA, mientras que epitopos no sulfatados solo pudieron detectarse en placas difusas y focales no neuríticas.





## **BIBLIOGRAFÍA**

- Ai X, Do AT, et al. (2006). "Substrate specificity and domain functions of extracellular heparan sulfate 6-O-endosulfatases, QSulf1 and QSulf2." *J Biol Chem* 281(8):4969-4976.
- Aikawa J and Esko JD. (1999). "Molecular cloning and expression of a third member of the heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/ N-sulfotransferase family." *J Biol Chem* 274(5):2690-2695.
- Aikawa J, Grobe K, et al. (2001). "Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4." *J Biol Chem* 276(8):5876-5882.
- Al Oustah A, Danesin C, et al. (2014). "Dynamics of sonic hedgehog signaling in the ventral spinal cord are controlled by intrinsic changes in source cells requiring sulfatase 1." *Development*. Mar;141(6):1392-1403.
- Albert MS, DeKosky ST, et al. (2011). "The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement* 7(3):270-279.
- Allen HB. (2016). "Alzheimer's Disease: Assessing the Role of Spirochetes, Biofilms, the Immune System, and Amyloid with Regard to Potential Treatment and Prevention." *J Alzheimers Dis* 53(4):1271-1276.
- Alliel PM, Périn JP, et al. (1988). "Complete amino acid sequence of a human platelet proteoglycan." *FEBS Lett* 236(1):123-126.
- Almeida CG, Takahashi RH et al. (2006). "Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system." *J Neurosci* 26(16):4277-4288.
- Alonso A del C, Grundke-Iqbal I, et al. (1997). "Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: Sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(1): 298-303.
- Alonso R, Pisa D, et al. (2014). "Fungal infection in patients with Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* 41(1):301-311.
- Annweiler C, Rolland Y, et al. (2012). "Higher vitamin D dietary intake is associated with lower risk of Alzheimer's disease: a 7-year follow-up." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67(11):1205-1211.
- Ancsin JB. (2003). "Amyloidogenesis: historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans as a major culprit." *Amyloid* 10(2):67-79.
- Armstrong RA. (2009). "The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." *Folia Neuropathol* 47(4):289-299.
- Armstrong RA. (2011). "The pathogenesis of Alzheimer's disease: a reevaluation of the "amyloid cascade hypothesis". *Int J Alzheimers Dis* 2011:630865.
- Asociación Americana de Psiquiatría. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, cuarta edición (DSM-IV). Madrid: Masson; 1995.
- Asti A and Gioglio L. (2014). "Can a bacterial endotoxin be a key factor in the kinetics of amyloid fibril formation?" *J Alzheimers Dis* 39(1):169-179.
- Attems J and Jellinger KA. (2014). "The overlap between vascular disease and Alzheimer's disease - lessons from pathology." *BMC Medicine* 12(1):206.

- Bai X, Zhou D, et al. (2001). "Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans. Cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase family ( $\beta$ 3GalT6)." *J Biol Chem* 276(51):48189-48195.
- Ball SL, Holland AJ, et al. (2006). "Personality and behaviour changes mark the early stages of Alzheimer's disease in adults with Down's syndrome: findings from a prospective population-based study." *Int J Geriatr Psychiatry* 21(7):661-673.
- Ballard C, Gauthier S, et al. (2011). "Alzheimer's disease." *Lancet* 377(9770):1019-1031.
- Barnes DE and Yaffe K. (2011). "The Projected Impact of Risk Factor Reduction on Alzheimer's Disease Prevalence." *Lancet Neurol* 10(9): 819-828.
- Barrett PJ, Song Y, et al. (2012). "The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol." *Science* 336(6085):1168-1171.
- Bartus RT. (2000). "On neurodegenerative diseases, models and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis." *Exp Neurol* 163(2):495-529
- Baruch-Suchodolsky R and Fischer B. (2009). "A $\beta$ 40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems." *Biochemistry* 48(20):4354-4370.
- Basak JM and Kim J. (2010). "Differential effects of ApoE isoforms on dendritic spines in vivo: linking an Alzheimer's disease risk factor with synaptic alterations." *J Neurosci* 30(13):4526-4527.
- Bekris LM, Yu C-E, et al. (2010). "Genetics of Alzheimer Disease." *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23(4): 213–227.
- Bennett DA, Schneider JA, et al. (2006). "Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies." *Neurology* 66:1837-1844.
- Benson DF, Davis RJ, et al. (1988). "Posterior cortical atrophy." *Arch Neurol* 45(7):789-793.
- Berchtold NC and Cotman CW. (1998). "Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s." *Neurobiol Aging* 19(3):173-189.
- Bernfield M, Götte M, et al. (1999). "Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans." *Annu Rev Biochem* 68:729-777.
- Bernfield M, Kokenyesi R, et al. (1992). "Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans." *Annu Rev Cell Biol* 8:365-393.
- Bertram L and Tanzi RE. (2004). "Alzheimer's disease: one disorder, too many genes?" *Hum Mol Genet* 13(Spec No1):R135-141.
- Bezakova G and Ruegg MA. (2003). "New insights into the roles of agrin." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(4):295-308.
- Bihaqi SW, Bahmani A, et al. (2014). "Infantile exposure to lead and late-age cognitive decline: Relevance to AD." *Alzheimers Dement* 10(2):187-195.
- Bilandzic M and Stenvers KL. (2011). "Betaglycan: a multifunctional accessory." *Mol Cell Endocrinol* 339(1-2):180-189.
- Bird TD, Lampe TH, et al. (1989). "Characteristics of familial Alzheimer's disease in nine kindreds of Volga German ancestry." *Prog Clin Biol Res* 317:229-234.
- Blennow K. (2004). "Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease." *NeuroRx* 1:213-225.

- Boada M, Anaya F, et al. (2017). "Efficacy and safety of plasma exchange with 5% albumin to modify cerebrospinal fluid and plasma Amyloid- $\beta$  concentrations and cognition outcomes in Alzheimer's disease patients: A multicenter, randomized, controlled clinical trial." *J Alzheimers Dis* 56:129-143.
- Boller F and Forbes MM. (1998). "History of dementia and dementia in history: an overview." *J Neurol Sci* 158(2):125-133.
- Bondi MW, Edmonds EC, et al. (2017). "Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future." *J Int Neuropsychol Soc* 23(9-10):818-831.
- Braak H, Alafuzoff I, et al. (2006). "Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry." *Acta Neuropathol* 112(4):389-404.
- Braak H, Braak E. (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." *Acta Neuropathol* 82(4):239-259.
- Braak H and Braak E. (1995). "Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes." *Neurobiol Aging* 16(3):271-278.
- Braak H and Braak E. (1996). "Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease." *Acta Neurol Scand* 94(S165):3-12.
- Braak H and Del Tredici K. (2018). "Spreading of Tau Pathology in Sporadic Alzheimer's Disease Along Cortico-cortical Top-Down Connections." *Cereb Cortex* 28(9):3372-3384.
- Braak H, Thal DR, et al. (2011). "Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years." *J Neuropathol Exp Neurol* 70(11):960-969.
- Brier MR, Gordon B, et al. (2016). "Tau and A $\beta$  imaging, CSF measures, and cognition in Alzheimer's disease." *Sci Transl Med* 8(338):338ra66.
- Broce IJ, Tan CH, et al. (2018). "Dissecting the genetic relationship between cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease." *Acta Neuropathol* 9.
- Brown JC, Sasaki T, et al. (1997). "The C-terminal domain V of perlecan promotes beta1 integrin-mediated cell adhesion, binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by glycosaminoglycans." *Eur J Biochem* 250(1):39-46.
- Bruggink KA, Kuiperij HB, et al. (2013). "The diagnostic value of CSF amyloid-beta(43) in differentiation of dementia syndromes." *Curr Alzheimer Res* 10(10):1034-1040.
- Bruinsma IB, te Riet L, et al. (2010). "Sulfation of heparan sulfate associated with amyloid-beta plaques in patients with Alzheimer's disease." *Acta Neuropathol* 119(2):211-20.
- Bruun M, Rhodius-Meester HFM, et al. (2018). "Evaluating combinations of diagnostic tests to discriminate different dementia types." *Alzheimers Dement (Amst)* 10:509-518.
- Busse-Wicher M, Wicher KB, et al. (2014). "The exostosin family: proteins with many functions." *Matrix Biol* 35:25-33.
- Bussière T, Bard F, et al. (2004). "Morphological Characterization of Thioflavin-S-Positive Amyloid Plaques in Transgenic Alzheimer Mice and Effect of Passive A $\beta$  Immunotherapy on Their Clearance." *Am J Pathol* 165(3): 987-995.
- Cacabelos R. (1990). "Neurobiología y genética molecular de la enfermedad de Alzheimer: marcadores diagnósticos y terapéuticos." *Med Clin* 95:502-516.

- Cárdenas AM, Ardiles AO, et al. (2012). "Role of tau protein in neuronal damage in Alzheimer's disease and Down syndrome." *Arch Med Res* 43(8):645-654.
- Castillo GM, Ngo C, et al. (1997). "Perlecan binds to the beta-amyloid proteins (A beta) of Alzheimer's disease, accelerates A beta fibril formation, and maintains A beta fibril stability." *J Neurochem* 69(6):2452-2465.
- Chartier-Harlin MC, Parfitt M, et al. (1994). "Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region." *Hum Mol Genet* 3(4):569-574.
- Chiu WC, Tsan YT, et al. (2014). "Hepatitis C viral infection and the risk of dementia." *Eur J Neurol* 21(8):1068-e59.
- Corder EH, Saunders AM, et al. (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." *Science* 261(5123):921-923.
- Coulson-Thomas VJ. (2016). "The role of heparan sulphate in development: the ectodermal story." *Int J Exp Pathol* 97(3):213-29.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR. (1983). "Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation." *Science* 219(4589):1184-1190.
- Craig LA, Hong NS, McDonald RJ. (2011). "Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease." *Neurosci Biobehav Rev* 35:1397-1409
- Cras P, Smith MA, et al. (1995). "Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease." *Acta Neuropathol* 89(4):291-295.
- Crawford BE, Olson SK, et al. (2001). "Cloning, Golgi localization, and enzyme activity of the full-length heparin/heparan sulfate-glucuronic acid C5-epimerase." *J Biol Chem* 276(24):21538-21543.
- Crook R, Verkoniemi A, et al. (1998). "A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1." *Nat Med* 4(4):452-455.
- Crutch SJ, Lehmann M, et al. (2012). "Posterior Cortical Atrophy." *Lancet Neurol* 11(2):170-178.
- Cui H, Freeman C, et al. (2013). "Proteoglycans in the central nervous system: role in development, neural repair, and Alzheimer's disease." *IUBMB Life* 65(2):108-20.
- Dani M, Wood M, et al. (2018). "Microglial activation correlates in vivo with both tau and amyloid in Alzheimer's disease." *Brain* 141(9):2740-2754.
- David G, Lories V, et al. (1990). "Molecular cloning of a phosphatidylinositol-anchored membrane heparan sulfate proteoglycan from human lung fibroblasts." *J Cell Biol* 111(6Pt2):3165-3176.
- de Agostini AI, Dong JC, et al. (2008). "Human follicular fluid heparan sulfate contains abundant 3-O-sulfated chains with anticoagulant activity." *J Biol Chem* 283(42):28115-28124.
- de Meyer G, Shapiro F, et al. (2010). "Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Diagnosis-independent Alzheimer disease biomarker signature in cognitively normal elderly people." *Arch. Neurol* 67:949-956.
- De Strooper B, Iwatsubo T, et al. (2012). "Presenilins and  $\gamma$ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(1):a006304.
- Dean DC 3rd, Jerskey BA, et al. (2014). "Brain differences in infants at differential genetic risk for late-onset Alzheimer disease: a cross-sectional imaging study." *JAMA Neurol* 71(1):11-22.

- Deligny A, Dierker T, et al. (2016). "NDST2 (N-Deacetylase/N-Sulfotransferase-2) Enzyme Regulates Heparan Sulfate Chain Length." *J Biol Chem* 291(36):18600-18607.
- Denys A and Allain F. (2019). "The Emerging Roles of Heparan Sulfate 3-O-Sulfotransferases in Cancer." *Front Oncol* (9):507.
- Denzer AJ, Schulthess T, et al. (1998). "Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin-1." *EMBO J* 17(2):335-343.
- DeSimone CV, Graff-Radford J, et al. (2017). "Cerebral Amyloid Angiopathy: Diagnosis, Clinical Implications, and Management Strategies in Atrial Fibrillation." *J Am Coll Cardiol* 70(9):1173-1182.
- Diario Médico. (2018). "Alzheimer: se estima que entre el 30-40% de los pacientes no tienen un diagnóstico." Disponible en: <https://www.diariomedico.com/salud/alzheimer-se-estima-que-entre-el-30-40-de-los-pacientes-no-tienen-un-diagnostico.html> (consultado 15 febrero 2019).
- Djordjevic J, Sabbir MG, et al. (2016). "Traumatic Brain Injury as a Risk Factor for Alzheimer's Disease: Is Inflammatory Signaling a Key Player?" *Curr Alzheimer Res* 13(7):730-738.
- Dodge GR, Kovalszky I, et al. (1991). "Heparan sulfate proteoglycan of human colon: partial molecular cloning, cellular expression, and mapping of the gene (HSPG2) to the short arm of human chromosome 1." *Genomics* 10(3):673-680.
- Doran E, Keator D, et al. (2017). "Down Syndrome, Partial Trisomy 21, and Absence of Alzheimer's Disease: The Role of APP." *J Alzheimers Dis* 56(2):459-470.
- Dou W, Xu Y, et al. (2015). "Role of Deacetylase Activity of N-Deacetylase/N-Sulfotransferase 1 in Forming N-Sulfated Domain in Heparan Sulfate." *J Biol Chem* 290(33):20427-20437.
- Douaiher J, Succar J, et al. (2014). "Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing." *Adv Immunol* 122:211-252.
- Drachman DA. (2014). "The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement* 10(3):372-380.
- Dubois B. (2018). "The Emergence of a New Conceptual Framework for Alzheimer's Disease." *J Alzheimers Dis* 62(3):1059-1066.
- Dubois Bruun B, Feldman HH, et al. (2007). "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria." *Lancet Neurol* 6(8):734-746.
- Duyckaerts C, Braak H, et al. (2015). "PART is part of Alzheimer disease." *Acta Neuropathol* 129(5):749-756.
- El Masri R, Seffouh A, et al. (2017). "The "in and out" of glucosamine 6-O-sulfation: the 6th sense of heparan sulfate." *Glycoconj J* 34(3):285-298.
- Elamaa H, Snellman A, et al. (2003). "Characterization of the human type XVIII collagen gene and proteolytic processing and tissue location of the variant containing a frizzled motif." *Matrix Biol* 22(5):427-442.
- Eliasz E and Da Mota GM. (2015). "Alzheimer's 100th anniversary of death and his contribution to a better understanding of Senile dementia." *Arq. Neuro-Psiquiatr* 73(2):159-162.
- Emre M. (2003). "What causes mental dysfunction in Parkinson's disease?" *Mov Disord* 8(S6):S63-71.
- Esko JD and Lindahl U. (2001). "Molecular diversity of heparan sulfate." *J Clin Invest* 108(2):169-173.

- Esko JD and Selleck SB. (2002). "Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate." *Annu Rev Biochem* 71:435-471.
- Esko JD and Zhang L. (1996). "Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly." *Curr Opin Struct Biol* 6(5):663-670.
- Esparza TJ, Zhao H, et al. (2013). "Amyloid- $\beta$  oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls." *Ann Neurol* 73(1):104-119.
- Farach-Carson MC and Carson DD. (2007). "Perlecan--a multifunctional extracellular proteoglycan scaffold." *Glycobiology* 17(9):897-905.
- Fechheimer M, Furukawa R, et al. (2002). "Hirano bodies in health and disease." *Trends Mol Med* 8(12):590-591.
- Fernández-Vega I, García O, Crespo A, Castañón S, Menéndez P, Astudillo A, et al. (2013). "Specific genes involved in synthesis and editing of heparan sulfate proteoglycans show altered expression patterns in breast cancer." *BMC Cancer* 13:24.
- Fernández-Vega I, García-Suárez O, et al. (2015). "Heparan sulfate proteoglycans undergo differential expression alterations in right sided colorectal cancer, depending on their metastatic character." *BMC Cancer* 15:742.
- Fernández-Viadero C, Rodríguez E, et al. (2013). "Genética y enfermedad de Alzheimer: población en riesgo." *Rev Esp Geriatr Gerontol* 48(1):39-44.
- Ferris LT, Williams JS, et al. (2007). "The effect of acute exercise on serum brain-derived neurotrophic factor levels and cognitive function." *Med Sci Sports Exerc* 39(4):728-734.
- Filmus J, Capurro M, et al. (2008). "Glypicans." *Genome Biol* 9(5):224.
- Filmus J, Church JG, et al. (1988). "Isolation of a cDNA corresponding to a developmentally regulated transcript in rat intestine." *Mol Cell Biol* 8(10):4243-4249.
- Filmus J and Selleck SB. (2001). "Glypicans: proteoglycans with a surprise." *J Clin Invest* 108(4):497-501.
- Ford-Perriss M, Turner K, et al. (2003). "Localisation of specific heparan sulfate proteoglycans during the proliferative phase of brain development." *Dev Dyn* 227(2):170-184.
- Foster NL, Chase TN, et al. (1983). "Alzheimer's disease: focal cortical changes shown by positron emission tomography." *Neurology* 33(8):961-965.
- Frank-Cannon TC, Alto LT, et al. (2009). "Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?" *Mol Neurodegener* 4, 47.
- Fransson L, Belting M, et al. (2000). "Biosynthesis of decorin and glypican." *Matrix Biol* 19:367-376.
- Fratiglioni L, Wang HX, et al. (2000). "Influence of social network on occurrence of dementia: a community-based longitudinal study." *Lancet* 355(9212):1315-1319.
- Freeman C and Parish CR. (1998). "Human platelet heparanase: purification, characterization and catalytic activity." *Biochem J* 330(Pt3):1341-1350.
- Freeze HH, Kinoshita T, et al. (2017). "Glycans in Acquired Human Diseases". In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 46.

- Fukui T. (2015). "Historical review of academic concepts of dementia in the world and Japan: with a short history of representative diseases." *Neurocase* 21(3):369-376.
- Fukutani Y, Kobayashi K, et al. (1995). "Neurons, intracellular and extracellular neurofibrillary tangles in subdivisions of the hippocampal cortex in normal ageing and Alzheimer's disease." *Neurosci Lett* 200(1):57-60.
- Fundación del Cerebro. Sociedad Española de Neurología (SEN). Sala de prensa. (2017). "Impacto Social de la Enfermedad de Alzheimer y otras Demencias." Disponible en: <http://www.sen.es/saladeprensa/pdf/Link219.pdf>, [http://www.fundaciondelcerebro.es/docs/IS\\_EA\\_y\\_otras\\_demencias.pdf](http://www.fundaciondelcerebro.es/docs/IS_EA_y_otras_demencias.pdf) (consultado el 15 febrero 2019).
- Funderburgh JL. (2002). "Keratan sulfate biosynthesis." *IUBMB Life* 54(4):187-194.
- Funk KE, Mirbaha H, et al. (2015). "Distinct Therapeutic Mechanisms of Tau Antibodies: Promoting Microglial Clearance Versus Blocking Neuronal Uptake." *J Biol Chem* 290(35):21652-21662.
- Fuster-Matanzo A, Hernández F, et al. (2018). "Tau Spreading Mechanisms; Implications for Dysfunctional Tauopathies." *Int J Mol Sci* 19(3):645.
- García B, García-Suarez O, et al. (2016a). "Heparanase and heparanase 2 display differently deregulation in neuroendocrine tumors, depending on their differentiation grade." *Histol Histopathol* 31:73-81.
- García B, Merayo-Lloves J, et al. (2016b). "Surface Proteoglycans as Mediators in Bacterial Pathogens Infections." *Front Microbiol* 7:220.
- García B, Martín C, et al. (2017). "Upregulated Expression of Heparanase and Heparanase 2 in the Brains of Alzheimer's Disease." *J Alzheimers Dis* 58(1):185-192.
- García-Albea E. (1999). "La neurología en los papiros médicos faraónicos." *Rev Neurol* 28(4):430-433.
- García de Yébenes E, Ho A, et al. (1999). "Regulation of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, by injury and interleukin-1alpha." *J Neurochem* 73(2):812-820.
- Garre Olmo J. (2018). "Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias." *Rev Neurol* 66(11):377-386.
- Gate D, Rezai-Zadeh K, et al. (2010). "Macrophages in Alzheimer's disease: the blood-borne identity." *J Neural Transm* 117:961-970.
- Gesemann M, Denzer AJ, et al. (1995). "Acetylcholine receptor-aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site." *J Cell Biol* 128(4):625-636.
- Giannakopoulos P, Herrmann FR, et al. (2003). "Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease." *Neurology* 60:1495-1500.
- Gilman S, Koller M, et al., AN1792(QS-21)-201 Study Team. (2005). "Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial." *Neurology* 64(9):1553-1562.
- Glenner GG and Wong CW. (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." *Biochem Biophys Res Commun* 120(3):885-890. Descubrimiento app
- Goedert M. (1993). "Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease." *Trends Neurosci* 16(11):460-5.
- Goedert M, Spillantini MG, et al. (1992). "Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms." *Neuron* 8(1):159-168.

- Goedert M. (2015). "NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A $\beta$ , tau, and  $\alpha$ -synuclein." *Science* 349(6248):1255-555. ESTADIOS BRAAK
- Golde TE, Schneider LS, et al. (2011). "Anti- $\beta$  therapeutics in Alzheimer's disease: the need for a paradigm shift." *Neuron* 69:203-13.
- Gómez-Ramos A, Díaz-Hernández M, et al. (2006). "Extracellular tau is toxic to neuronal cells." *FEBS Lett* 580(20):4842-4850.
- Götting C, Kuhn J, et al. (2000). "Molecular cloning and expression of human UDP-D-xylose:proteoglycan core protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase and its first isoform XT-II." *J Mol Biol* 304(4):517-528.
- Green RC, Schneider LS, et al.; Tarenflurbil Phase 3 Study Group. (2009). "Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial." *JAMA* 302(23):2557-2564.
- Grinberg LT, Rüb U, et al.; Brazilian Brain Bank Study Group. (2009). "The dorsal raphe nucleus shows phospho-tau neurofibrillary changes before the transentorhinal region in Alzheimer's disease. A precocious onset?" *Neuropathol Appl Neurobiol* 35(4):406-416.
- Grobe K, Ledin J, et al. (2002). "Heparan sulfate and development: differential roles of the N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulfotransferase isozymes." *Biochim Biophys Acta* 1573(3):209-215.
- Grønning H, Rahmani A, et al. (2012). "Does Alzheimer's disease with early onset progress faster than with late onset? A case-control study of clinical progression and cerebrospinal fluid biomarkers." *Dement Geriatr Cogn Disord* 33(2-3):111-117.
- Grudzien A, Shaw P, et al. (2007). "Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 28(3):327-335.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, et al. (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(13):4913-4917.
- Guimond SE, Rudd TR, et al. (2009). "Cations modulate polysaccharide structure to determine FGF-FGFR signaling: a comparison of signaling and inhibitory polysaccharide interactions with FGF-1 in solution." *Biochemistry* 48(22):4772-4779.
- Gupta-Bansal R, Frederickson RC, et al. (1995). "Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation." *J Biol Chem* 270(31):18666-18671.
- Haass C, Kaether C, et al. (2012). "Trafficking and proteolytic processing of APP." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(5):a006270.
- Haass C and Selkoe DJ. (1993). "Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide." *Cell* 75(6):1039-1042.
- Habuchi H, Habuchi O, et al. (1995). "Purification and characterization of heparan sulfate 6-sulfotransferase from the culture medium of Chinese hamster ovary cells." *J Biol Chem* 270(8):4172-4179.
- Habuchi H, Miyake G, et al. (2003). "Biosynthesis of heparan sulphate with diverse structures and functions: two alternatively spliced forms of human heparan sulphate 6-O-sulphotransferase-2 having different expression patterns and properties." *Biochem J* 371(Pt1):131-142.
- Habuchi H, Tanaka M, et al. (2000). "The occurrence of three isoforms of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase having different specificities for hexuronic acid adjacent to the targeted N-sulfoglucosamine." *J Biol Chem* 275(4):2859-2868.



- Hagino S, Iseki K, et al. (2003). "Expression pattern of glypican-1 mRNA after brain injury in mice." *Neurosci Lett* 349(1):29-32.
- Hagner-Mcwhirter A, Lindahl U, et al. (2000). "Biosynthesis of heparin/heparan sulphate: mechanism of epimerization of glucuronyl C-5." *Biochem J* 347(Pt1):69-75.
- Halfter W, Dong S, et al. (1998). "Collagen XVIII Is a Basement Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan." *J Biol Chem* 273(39):25404-25412.
- Hall B, Mak E, et al. (2017). "In vivo tau PET imaging in dementia: Pathophysiology, radiotracer quantification, and a systematic review of clinical findings." *Ageing Res Rev* 36:50-63.
- Hammond CJ, Hallock LR, et al. (2010). "Immunohistological detection of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's disease brain." *BMC Neurosci* 11:121.
- Hampel H, Toschi N, et al. (2018). "Revolution of Alzheimer Precision Neurology: Passageway of Systems Biology and Neurophysiology." *J Alzheimers Dis* 64(Suppl1):S47-S105.
- Harasty JA, Halliday GM, et al. (2001). "Cortical degeneration associated with phonologic and semantic language impairments in AD." *Neurology* 56(7):944-950.
- Hardy J. (2006). "A hundred years of Alzheimer's disease research." *Neuron* 52(1):3-13.
- Hardy J and Allsop D. (1991). "Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease." *Trends Pharmacol Sci* 12(10):383-388.
- Hardy J, Bogdanovic N, et al. (2014). "Pathways to Alzheimer's disease." *Intern Med* 275(3):296-303.
- Hardy JA and Higgins GA. (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." *Science* 256(5054):184-185.
- Harold D, Abraham R, et al. (2009). "Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease." *Nat Genet* 41(10):1088-1093.
- Harris FM, Brecht WJ, et al. (2003). "Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19):10966-10971.
- Hauser PS, Narayanaswami V, et al. (2011). "Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology." *Prog Lipid Res* 50(1):62-74.
- Hebert LE, Scherr PA, et al. (2003). "Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census." *Arch Neurol* 60(8):1119-1122.
- Heckmann JM, Low WC, et al. (2004). "Novel presenilin 1 mutation with profound neurofibrillary pathology in an indigenous Southern African family with early-onset Alzheimer's disease." *Brain* 127(Pt 1):133-42.
- Heljasvaara R, Aikio M, et al. (2017). "Collagen XVIII in tissue homeostasis and dysregulation - Lessons learned from model organisms and human patients." *Matrix Biol* 57-58:55-75.
- Hennet T. (2002). "The galactosyltransferase family." *Cell Mol Life Sci* 59(7):1081-1095.
- Hess DJ, Henry-Stanley MJ, et al. (2006). "Heparan sulfate proteoglycans mediate *Staphylococcus aureus* interactions with intestinal epithelium." *Med Microbiol Immunol* 195(3):133-141.
- Hill JM, Clement C, et al. (2014). "Pathogenic microbes, the microbiome, and Alzheimer's disease (AD)." *Front Aging Neurosci* 6:127.

- Hof PR, Vogt BA, et al. (1997). "Atypical form of Alzheimer's disease with prominent posterior cortical atrophy: a review of lesion distribution and circuit disconnection in cortical visual pathways." *Vision Res* 37(24):3609-3625.
- Holmes BB, DeVos SL, et al. (2013). "Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. PNAS E3138-E3147
- Holst CR, Bou-Reslan H, et al. (2007). "Secreted sulfatases Sulf1 and Sulf2 have overlapping yet essential roles in mouse neonatal survival." *PLoS One* 2(6):e575.
- Honig LS, Vellas B, et al. (2018). "Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease." *Engl J Med* 378:321-330.
- Hosono-Fukao T, Ohtake-Niimi S, et al. (2012). "Heparan sulfate subdomains that are degraded by Sulf accumulate in cerebral amyloid  $\beta$  plaques of Alzheimer's disease: evidence from mouse models and patients." *Am J Pathol* 180(5):2056-67.
- Hulette CM, Welsh-Bohmer KA, et al. (1998). "Neuropathological and neuropsychological changes in "normal" aging: evidence for preclinical Alzheimer disease in cognitively normal individuals." *J Neuropathol Exp Neurol* 57(12):1168-1174.
- Huynh MB, Ouidja MO, et al. (2019). "Glycosaminoglycans from Alzheimer's disease hippocampus have altered capacities to bind and regulate growth factors activities and to bind tau." *PLoS One* 14(1):e0209573.
- Huynh MB, Villares J, et al. (2012). "Glycosaminoglycans from aged human hippocampus have altered capacities to regulate trophic factors activities but not A $\beta$ 42 peptide toxicity." *Neurobiol Aging* 33(5):1005.e11-22.
- Iannuzzi C, Irace G, et al. (2015). "The effect of glycosaminoglycans (GAGs) on amyloid aggregation and toxicity." *Molecules* 20(2):2510-2528.
- Ikushima H and Miyazono K. (2010). "TGF $\beta$  signalling: a complex web in cancer progression." *Nat Rev Cancer* 10:415-424.
- INE (Instituto Nacional de Estadística). "Las 15 causas de muerte más frecuentes en España en 2017". (Consultado 15 febrero 2019). Disponible en: <https://public.tableau.com/views/CAUSASDEMUERTE1/Dashboard1?:showVizHome=no&:embed=true>
- Iozzo RV. (1998). "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function." *Annu Rev Biochem* 67:609-652.
- Iozzo RV. (2005). "Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8):646-656.
- Iozzo RV and Schaefer L. (2015). "Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans." *Matrix Biol* 42:11-55.
- Irvine K, Laws KR et al. (2012). "Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: a meta analysis." *J Clin Exp Neuropsychol* 34(9):989-998.
- Jacobs HIL, Hopkins DA, et al. (2018). "The cerebellum in Alzheimer's disease: evaluating its role in cognitive decline." *Brain* 141(1):37-47.

- Janssen JC, Beck JA, et al. (2003). "Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families." *Neurology* 60(2):235-239.
- Jarrett JT, Berger EP, et al. (1993). "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Biochemistry* 32(18):4693-4697.
- Jellinger KA and Mitter-Ferstl E. (2003). "The impact of cerebrovascular lesions in Alzheimer disease--a comparative autopsy study." *J Neurol* 250(9):1050-1055.
- Jen YH, Musacchio M, et al. (2009). "Glypican-1 controls brain size through regulation of fibroblast growth factor signaling in early neurogenesis." *Neural Dev* 4:33.
- Johnson CE, Crawford BE, et al. (2007). "Essential alterations of heparan sulfate during the differentiation of embryonic stem cells to Sox1-enhanced green fluorescent protein-expressing neural progenitor cells." *Stem Cells* 25(8):1913-23.
- Johnson JK, Head E, et al. (1999). "Clinical and pathological evidence for a frontal variant of Alzheimer disease." *Arch Neurol* 56(10):1233-1239.
- Kallapur SG and Akesson RA. (1992). "The neural cell adhesion molecule (NCAM) heparin binding domain binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans." *J Neurosci Res* 33(4):538-548.
- Kalus I, Rohn S, et al. (2015). "Sulf1 and Sulf2 Differentially Modulate Heparan Sulfate Proteoglycan Sulfation during Postnatal Cerebellum Development: Evidence for Neuroprotective and Neurite Outgrowth Promoting Functions." *PLoS One* 10(10):e0139853.
- Kamer AR, Craig RG, et al. (2009). "TNF- $\alpha$  and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects." *J Neuroimmunol* 216(1-2):92-97.
- Kanekiyo T, Xu H, et al. (2014). "ApoE and A $\beta$  in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners?" *Neuron* 81(4):740-754.
- Kang J, Lemaire HG, et al. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." *Nature* 325(6106):733-736.
- Karran E. (2012). "Current status of vaccination therapies in Alzheimer's disease." *J Neurochem* 123(5):647-651.
- Kaur SP and Cummings BS. (2019). "Role of glypicans in regulation of the tumor microenvironment and cancer progression." *Biochem Pharmacol* (168):108-118.
- Kelly SC, He B, et al. (2017). "Locus coeruleus cellular and molecular pathology during the progression of Alzheimer's disease." *Acta Neuropathol Commun* 5(1):8.
- Kidd M. (1963). "Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease." *Nature* 197:192-193.
- Kim W, Lee S, et al. (2010). "Secretion of human tau fragments resembling CSF-tau in Alzheimer's disease is modulated by the presence of the exon 2 insert." *FEBS Lett* 584(14):3085-3088.
- Kimura H, Tooyama I, et al. (1994). "Acidic FGF Expression in the Surroundings of Senile Plaques." *Tohoku J Exp Med* 174(3):279-293.
- Kirk-Sanchez NJ and McGough EL. (2014). "Physical exercise and cognitive performance in the elderly: current perspectives." *Clin Interv Aging* 9:51-62.

- Kjellén L and Lindahl U. (1991). "Proteoglycans: structures and interactions." *Annu Rev Biochem* 60:443-475.
- Kolset SO and Tveit H. (2008). "Serglycin--structure and biology." *Cell Mol Life Sci* 65(7-8):1073-1085.
- Koike T, Izumikawa T, et al. (2014). "Identification of Phosphatase That Dephosphorylates Xylose in the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region of Proteoglycans." *J Biol Chem* 289(10):6695-6708.
- Konno T, Oiki S, et al. (2004). "Anionic contribution for fibrous maturation of protofibrillar assemblies of the human tau repeat domain in a fluoroalcohol solution." *Biochemistry* 43:13613-13620.
- Korpetinou A, Skandalis SS et al. (2014). "Serglycin: at the crossroad of inflammation and malignancy." *Front Oncol* 3:327.
- Kreuger J and Kjellén L. (2012). "Heparan sulfate biosynthesis: regulation and variability." *J Histochem Cytochem* 60(12):898-907.
- Kreuger J, Matsumoto T, et al. (2002). "Role of heparan sulfate domain organization in endostatin inhibition of endothelial cell function." *EMBO J* 21(23): 6303-6311.
- Kreuger J, Spillmann D, et al. (2006). "Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity." *J Cell Biol* 174(3):323-327.
- Kröger S y Schröder JE. (2002). "Agrin in the developing CNS: new roles for a synapse organizer." *News Physiol Sci* 17:207-212.
- LaFerla FM, Green KN, et al. (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci* 8(7):499-509.
- Lalli MA, Cox HC, et al. (2014). "Origin of the PSEN1 E280A mutation causing early-onset Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement* 10(5 Suppl):S277-S283.e10.
- Lambert JC, Heath S, et al. (2009). "Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease." *Nat Genet* 41(10):1094-1099.
- Lanzi C, Yates EA, et al. (2020). "Heparan Sulfate Proteoglycans and Their Endogenous Modifying Enzymes: Cancer Players, Biomarkers and Therapeutic Targets". *Front Oncol* (10):195.
- Law LL, Rol RN, et al. (2018). "Moderate intensity physical activity associates with CSF biomarkers in a cohort at risk for Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement (Amst)* 10:188-195.
- Lawrence R, Olson SK, et al. (2008). "Evolutionary differences in glycosaminoglycan fine structure detected by quantitative glycan reductive isotope labeling." *J Biol Chem* 283(48):33674-33684.
- Lawrence R, Yabe T, et al. (2007). "The principal neuronal gD-type 3-O-sulfotransferases and their products in central and peripheral nervous system tissues." *Matrix Biol* 26(6):442-455.
- Lee JS, von der Hardt S, et al. (2004). "Axon sorting in the optic tract requires HSPG synthesis by ext2 (dackel) and extl3 (boxer)." *Neuron* 44(6):947-60.
- Li JP, Galvis ML, et al. (2005). "In vivo fragmentation of heparan sulfate by heparanase overexpression renders mice resistant to amyloid protein A amyloidosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6473-6377.
- Lidholt K, Kjellén L, et al. (1989). "Biosynthesis of heparin. Relationship between the polymerization and sulphation processes." *Biochem J* 261(3):999-1007.
- Lidsky TI and Schneider JS. (2003). "Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates." *Brain* 126(1):5-19.

- Lind T, Tufaro F, et al. (1998). "The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate." *J Biol Chem* 273(41):26265-26268.
- Lindahl U, Couchman J, et al. (2017). "Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans." In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 17.
- Lindahl B, Eriksson L, et al. (1995). "Structure of heparan sulphate from human brain, with special regard to Alzheimer's disease." *Biochem J* 306 ( Pt 1):177-184.
- Lindahl U, Kusche-Gullberg M, et al. (1998). "Regulated diversity of heparan sulfate." *J Biol Chem* 273(39):24979-24982.
- Lindahl B, Westling C, et al. (1999). "Common binding sites for beta-amyloid fibrils and fibroblast growth factor-2 in heparan sulfate from human cerebral cortex." *J Biol Chem* 274(43):30631-30635.
- Lindeboom J and Weinstein H. (2004). "Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment." *Eur J Pharmacol* 490(1-3):83-86.
- Liu F, Park PJ, et al. (2006). "A genome-wide screen reveals functional gene clusters in the cancer genome and identifies EphA2 as a mitogen in glioblastoma." *Cancer Res* 66(22):10815-10823.
- Liu J and Pedersen LC. (2007). "Anticoagulant heparan sulfate: structural specificity and biosynthesis." *Appl Microbiol Biotechnol* 74(2):263-272.
- Liu CC, Zhao N, et al. (2016). "Neuronal heparan sulfates promote amyloid pathology by modulating brain amyloid- $\beta$  clearance and aggregation in Alzheimer's disease." *Sci Transl Med* 8(332):332ra44.
- Livingston G, Sommerlad A, et al. (2017). "Dementia prevention, intervention, and care." *Lancet* 390(10113):2673-2734.
- López-Casillas F, Cheifetz S, et al. (1991). "Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system." *Cell* 67(4):785-795.
- Löppönen M, Rähkä I, et al. (2003). "Diagnosing cognitive impairment and dementia in primary health care – a more active approach is needed." *Age and Ageing* 32:606-612.
- Lord MS, Tang F, et al. (2018). "The multifaceted roles of perlecan in fibrosis." *Matrix Biol* 68-69:150-166.
- Lorente-Gea L, García B, et al. (2017). "Heparan sulfate proteoglycans and heparanases in Alzheimer's disease: current outlook and potential therapeutic targets." *Neural Regen Res* 12(6):914-915.
- Lorente-Gea L, García B, et al. (2020). "Heparan Sulfate Proteoglycans Undergo Differential Expression Alterations in Alzheimer Disease Brains." *J Neuropathol Exp Neurol* 79(5):474-483.
- Lurain NS, Hanson BA, et al. (2013). "Virological and immunological characteristics of human cytomegalovirus infection associated with Alzheimer disease." *J Infect Dis* 208(4):564-572.
- Mahley RW and Huang Y. (2012). "Apolipoprotein E sets the stage: response to injury triggers neuropathology." *Neuron* 76:871-885.
- Maïza A, Chantepie S, et al. (2018). "The role of heparan sulfates in protein aggregation and their potential impact on neurodegeneration." *FEBS Lett* 592(23):3806-3818.
- Malavaki C, Mizumoto S, et al. (2008). "Recent advances in the structural study of functional chondroitin sulfate and dermatan sulfate in health and disease." *Connect Tissue Res* 49(3):133-139.

- Martin JJ, Gheuens J, et al. (1991). "Early-onset Alzheimer's disease in 2 large Belgian families." *Neurology* 41(1):62-68.
- Martin C, Lozano-Iturbe V, et al. (2018). "Glycosaminoglycans are differentially involved in bacterial binding to healthy and cystic fibrosis lung cells." *J Cyst Fibros pii:S1569-1993(18)30920-30922*.
- Masters CL, Bateman R, et al. (2015). "Alzheimer's disease." *Nat Rev Dis Primers* 1:15056.
- Mather M and Harley CW. (2016). "The Locus Coeruleus: Essential for Maintaining Cognitive Function and the Aging Brain." *Trends Cogn Sci* 20(3):214-226.
- Maurer K and Maurer U. (2006). "Alzheimer. La vida de un médico y la historia de una enfermedad." Ed. Días de Santos. ISBN: 84-7978-758-9. Edición española 2006.
- Mavroudis IA, Fotiou DF, et al. (2010). "Morphological changes of the human purkinje cells and deposition of neuritic plaques and neurofibrillary tangles on the cerebellar cortex of Alzheimer's disease." *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 25(7):585-591.
- Mawuenyega KG, Sigurdson W, et al. (2010). "Decreased Clearance of CNS  $\beta$ -Amyloid in Alzheimer's Disease." *Science* 330(6012):1774.
- McCarthy KJ. (2015). "The Basement Membrane Proteoglycans Perlecan and Agrin: Something Old, Something New." *Curr Top Membr* 76:255-303.
- McCartney M. (2015). "The "breakthrough" drug that's not been shown to help in Alzheimer's disease." *BMJ* 351:h4064.
- McCormick C, Duncan G, et al. (2000). "The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2):668-673.
- McGeer PL, Guo JP, et al. (2018). "Alzheimer's Disease Can Be Spared by Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs." *J Alzheimers Dis* 62(3):1219-1222.
- McKhann GM, Knopman DS, et al. (2011). "The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement* 7(3):263-269.
- McMahan UJ, Horton SE et al. (1992). "Agrin isoforms and their role in synaptogenesis." *Curr Opin Cell Biol* (4):869-874.
- Merdes AR, Hansen LA, et al. (2003). "Influence of Alzheimer pathology on clinical diagnostic accuracy in dementia with Lewy bodies." *Neurology* 60(10):1586-1590.
- Merry CL, Lyon M, et al. (1999). "Highly sensitive sequencing of the sulfated domains of heparan sulfate." *J Biol Chem* 274(26):18455-18462.
- Mikami T and Kitagawa H. (2013). "Biosynthesis and function of chondroitin sulfate." *Biochim Biophys Acta* 1830(10):4719-4733.
- Miklossy J. (2011). "Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease." *Expert Rev Mol Med* 13:e30.
- Mobli M, Nilsson M, et al. (2008). "The structural plasticity of heparan sulfate NA-domains and hence their role in mediating multivalent interactions is confirmed by high-accuracy (15)N-NMR relaxation studies." *Glycoconj J* 25(5):401-414.

- Mochizuki H, Yoshida K, et al. (2003). "Characterization of a heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-5, an enzyme synthesizing a tetrasulfated disaccharide." *J Biol Chem* 278(29):26780-26787. Mochizuki H, Yoshida K, et al. (2008). "Tetrasulfated disaccharide unit in heparan sulfate: enzymatic formation and tissue distribution." *J Biol Chem* 283(45):31237-31245.
- Morimoto-Tomita M, Uchimura K, et al. (2002). "Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans." *J Biol Chem* 277(51):49175-49185.
- Morsch R, Simon W, et al. (1999). "Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles." *J Neuropathol Exp Neurol* 58(2):188-197.
- Moses J, Oldberg A, et al. (1999). "Initiation of galactosaminoglycan biosynthesis. Separate galactosylation and dephosphorylation pathways for phosphoxylosylated decorin protein and exogenous xyloside." *Eur J Biochem* 260(3):879-884.
- Motamedi-Shad N, Monsellier E, et al. (2009). "Kinetic analysis of amyloid formation in the presence of heparan sulfate: faster unfolding and change of pathway." *J Biol Chem* 284(43):29921-29934.
- Mucke L and Selkoe DJ. (2012). "Neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein: synaptic and network dysfunction." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(7):a006338.
- Mufson EJ, Malek-Ahmadi M, et al. (2016). "Braak stage and trajectory of cognitive decline in noncognitively impaired elders." *Neurobiol Aging* 43:101-110.
- Müller U, Winter P, et al. (2013). "A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease." *Lancet Neurol* 12(2):129-30.
- Mulloy B and Forster MJ. (2000). "Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate." *Glycobiology* 10(11):1147-1156.
- Munoz DG, Wang D, et al. (1993). "Hirano bodies accumulate C-terminal sequences of beta-amyloid precursor protein (beta-APP) epitopes." *J Neuropathol Exp Neurol* 52(1):14-21.
- Murdoch AD, Dodge GR, et al. (1992). "Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor." *J Biol Chem* 267(12):8544-8557.
- Nadanaka S, Zhou S, et al. (2013). "EXTL2, a member of the EXT family of tumor suppressors, controls glycosaminoglycan biosynthesis in a xylose kinase-dependent manner." *J Biol Chem* 288(13):9321-9333.
- Nagai N, Habuchi H, et al. (2007). "Regulation of heparan sulfate 6-O-sulfation by beta-secretase activity." *J Biol Chem* 282(20):14942-14951.
- Nagarajan A, Malvi P, et al. (2018). "Heparan Sulfate and Heparan Sulfate Proteoglycans in Cancer Initiation and Progression." *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:483.
- Nakamura Y, Haines N, et al. (2002). "Identification of a *Drosophila* gene encoding xylosylprotein beta4-galactosyltransferase that is essential for the synthesis of glycosaminoglycans and for morphogenesis." *J Biol Chem* 277(48):46280-46288.
- Nakato H and Kimata K. (2002). "Heparan sulfate fine structure and specificity of proteoglycan functions." *Biochim Biophys Acta* 1573(3):312-318.
- Nelson L, Gard P, et al. (2014) "Hypertension and inflammation in Alzheimer's disease: close partners in disease development and progression." *Alzheimers Dis* 41(2):331-343.

- Nguyen TK, Arungundram S, et al. (2012). "A synthetic heparan sulfate oligosaccharide library reveals the novel enzymatic action of D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3a." *Mol Biosyst* 8(2):609-614.
- NIA-RI. (1997). "Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease." *Neurobiol Aging* 18(4Suppl):S1-2.
- Nicoll JA, Barton E, et al. (2006). "Abeta species removal after abeta42 immunization." *J Neuropathol Exp Neurol* 65(11):1040-1048.
- Nusgens BV. (2010). "Acide hyaluronique et matrice extracellulaire: une molécule primitive?" *Ann Dermatol Venereol* 137(Suppl1):53-58.
- O'Callaghan P, Sandwall E, et al. (2008). "Heparan sulfate accumulation with Abeta deposits in Alzheimer's disease and Tg2576 mice is contributed by glial cells." *Brain Pathol* 18(4):548-561.
- O'Connor LT, Lauterborn JC, et al. (1994). "Localization and alternative splicing of agrin mRNA in adult rat brain: transcripts encoding isoforms that aggregate acetylcholine receptors are not restricted to cholinergic regions." *J Neurosci* 14(3Pt1):1141-1152.
- O'Reilly MS, Boehm T, et al. (1997) Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth." *Cell* (88):277-285.
- Okada M, Nadanaka S, et al. (2010). "Biosynthesis of heparan sulfate in EXT1-deficient cells." *Biochem J* 428:463-471.
- Okada Y, Yamada S, et al. (2002). "Structural recognition by recombinant human heparanase that plays critical roles in tumor metastasis. Hierarchical sulfate groups with different effects and the essential target disulfated trisaccharide sequence." *J Biol Chem* 277(45):42488-42495.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Clasificación Internacional de Enfermedades, décima edición (CIE-10). Geneva: WHO; 1992.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). "Proyecto de plan de acción mundial sobre la respuesta de salud pública en la demencia." (2017-2025). Disponible en: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA70/A70\\_28-sp.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA70/A70_28-sp.pdf).
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). "Demencia." Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (consultado el 20/11/2018).
- Ori A, Wilkinson MC, et al. (2008). "The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges." *Front Biosci* 13:4309-4338.
- Ossenkoppele R, Smith R, et al. (2019). "Associations between tau, A $\beta$ , and cortical thickness with cognition in Alzheimer disease." *Neurology* 92(6):e601-e612.
- Ossenkoppele R, Zwan MD, et al. (2012). "Amyloid burden and metabolic function in early-onset Alzheimer's disease: parietal lobe involvement." *Brain* 135(Pt7):2115-2125.
- Ozcanakaya R and Delibas N. (2002). "Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study." *Croat Med J* 43(1):28-32.
- Papavramidou N. (2018). "The ancient history of dementia." *Neurol Sci* 39(11):2011-2016.
- Patel VN, Pineda DL, et al. (2017). "The function of heparan sulfate during branching morphogenesis." *Matrix Biol* 57-58:311-323.



- Pedersen LC, Tsuchida K, et al. (2000). "Heparan/chondroitin sulfate biosynthesis. Structure and mechanism of human glucuronyltransferase I." *J Biol Chem* 275(44):34580-34585.
- Pérez-Trullén JM. (2013). "Breve biografía de Alois Alzheimer." *Neurosci Hist* 1(3):125-136.
- Pérez-Tur J. (2000). "[Genetics and Alzheimer's disease]." *Rev Neurol* 30(2):161-169.
- Peterson S and Liu J. (2012). "Deciphering mode of action of heparanase using structurally defined oligosaccharides." *J Biol Chem* 287(41):34836-34843.
- Petitti DB, Crooks VC, et al. (2005). "Blood pressure levels before dementia." *Arch Neurol* 62(1):112-116.
- Pinhal MA, Smith B, et al. (2001). "Enzyme interactions in heparan sulfate biosynthesis: uronosyl 5-epimerase and 2-O-sulfotransferase interact in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23):12984-12989.
- Pomin VH. (2015). "Keratan sulfate: an up-to-date review." *Int J Biol Macromol* 72:282-289.
- Pönighaus C, Ambrosius M, et al. (2007). "Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans." *J Biol Chem* 282(8):5201-5206.
- Prandota J. (2014). "Possible link between *Toxoplasma gondii* and the anosmia associated with neurodegenerative diseases." *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 29(3):205-214.
- Prasad S, Sajja RK, et al. (2014). "Diabetes Mellitus and Blood-Brain Barrier Dysfunction: An Overview." *J Pharmacovigil* 2(2):125.
- Préchoux A, Halimi C, et al. (2015). "C5-epimerase and 2-O-sulfotransferase associate in vitro to generate contiguous epimerized and 2-O-sulfated heparan sulfate domains." *ACS Chem Biol* 10(4):1064-1071.
- Price JL and Morris JC. (2004). "So what if tangles precede plaques?" *Neurobiol Aging* 25(6):721-723.
- Priller C, Bauer T, et al. (2006). "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein." *J Neurosci* 26(27):7212-7221.
- Properzi F, Lin R, et al. (2008). "Heparan sulphate proteoglycans in glia and in the normal and injured CNS: expression of sulphotransferases and changes in sulphation." *Eur J Neurosci* 27(3):593-604.
- Prusiner SB. (2013). "Biology and Genetics of Prions Causing Neurodegeneration." *Annu Rev Genet* 47:601-623.
- PWC. (2013). Estado del arte de la EA en España. Madrid: PWC. Disponible en: [https://www.ceafa.es/files/2014/06/estado\\_del\\_arte-2.pdf](https://www.ceafa.es/files/2014/06/estado_del_arte-2.pdf).
- Rajas O, Quirós LM, et al. (2017). "Glycosaminoglycans are involved in bacterial adherence to lung cells." *BMC Infect Dis* 17(1):319.
- Reiland J, Kempf D, et al. (2006). "FGF2 binding, signaling and angiogenesis are modulated by heparanase in metastatic melanoma cells." *Neoplasia* 8(7): 596-606.
- Reiman EM and Caselli RJ. (1999). "Alzheimer's disease." *Maturitas* 31(3):185-200.
- Reist NE, Magill C, et al. (1987). "Agrin-like molecules at synaptic sites in normal, denervated, and damaged skeletal muscles." *J Cell Biol* 105(6 Pt 1):2457-2469.
- Reitz C. (2013). "Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's disease." *Curr Atheroscler Rep* 15(3):307.
- Rensink AA, de Waal RM, et al. (2003). "Pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy." *Brain Res Brain Res Rev* 43(2):207-223.
- Ricard-Blum S and Lisacek F. (2017). "Glycosaminoglycanomics: where we are." *Glycoconj J* 34(3):339-349.

- Rivara S, Milazzo FM, et al. (2016). "Heparanase: a rainbow pharmacological target associated to multiple pathologies including rare diseases." *Future Med Chem* 8(6):647-680.
- Roberts J, Kahle MP, et al. (2012). "Perlecan and the blood-brain barrier: beneficial proteolysis?" *Front Pharmacol* 3:155.
- Roberts RO, Kang YN, et al. (2017). "Decreased Expression of Sulfatase 2 in the Brains of Alzheimer's Disease Patients: Implications for Regulation of Neuronal Cell Signaling." *J Alzheimers Dis Rep* 1(1): 115–124.
- Rogaev EI, Sherrington R, et al. (1995). "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene." *Nature* 376(6543):775-778.
- Rolland Y, Abellan van Kan G, et al. (2008). "Physical activity and Alzheimer's disease: from prevention to therapeutic perspectives." *J Am Med Dir Assoc* 9(6):390-405.
- Rudzinski LA, Fletcher RM, et al. (2008). "Early onset familial Alzheimer Disease with spastic paraparesis, dysarthria, and seizures and N135S mutation in PSEN1." *Alzheimer Dis Assoc Disord* 22(3):299-307.
- Ruegg MA and Bixby JL. (1998). "Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction." *Trends Neurosci* 21(1):22-27.
- Ruoslahti E and Yamaguchi Y. (1991). "Proteoglycans as modulators of growth factor activities." *Cell* 64(5):867-869.
- Rupp F, Ozçelik T, et al. (1992). "Structure and chromosomal localization of the mammalian agrin gene." *J Neurosci* 12(9):3535-3544.
- Saarela J, Rehn M, et al. (1998). "The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans." *Am J Pathol* 153(2):611-626.
- Saint-Aubert L, Lemoine L, et al. (2017). "Tau PET imaging: present and future directions." *Molecular Neurodegeneration* 12:19.
- Saito T, Suemoto T, et al. (2011). "Potent amyloidogenicity and pathogenicity of Abeta43." *Nat Neurosci* 14:1023-1032.
- Sarrazin S, Lamanna WC, et al. (2011). "Heparan sulfate proteoglycans." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(7):a004952.
- Saunders S, Paine-Saunders S, et al. (1997). "Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain." *Dev Biol* 190(1):78-93.
- Scahill RI, Schott JM, et al. (2002). "Mapping the evolution of regional atrophy in Alzheimer's disease: unbiased analysis of fluid-registered serial MRI." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7):4703-4707.
- Schaefer L and Schaefer RM. (2010). "Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules." *Cell Tissue Res* 339(1):237-246.
- Schmechel DE, Saunders AM, et al. (1993). "Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9649-9653.
- Schneider JA, Watts RL, et al. (1997). "Corticobasal degeneration: neuropathologic and clinical heterogeneity." *Neurology* 48(4):959-969.

- Scholefield Z, Yates EA, et al. (2003). "Heparan sulfate regulates amyloid precursor protein processing by BACE1, the Alzheimer's beta-secretase." *J Cell Biol* 163(1):97-107.
- Scian SG and Reisberg B. (1992). "Functional assessment staging (FAST) in Alzheimer's disease: reliability, validity, and ordinality." *Int Psychogeriatr* 4(Suppl1):55-69.
- Seffouh A, Milz F, et al. (2013). "HSulf sulfatases catalyze processive and oriented 6-O-desulfation of heparan sulfate that differentially regulates fibroblast growth factor activity." *FASEB J* 27(6):2431-2439.
- Segura Munguía S. (2004). "Diccionario etimológico de Medicina". Universidad de Deusto, Bilbao, pág 79.
- Selkoe DJ. (1994). "Alzheimer's disease: a central role for amyloid." *J Neuropathol Exp Neurol* 53(5):438-447.
- Selkoe DJ. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." *Physiol Rev* 81(2):741-766.
- Selkoe DJ, Abraham CR, et al. (1986). "Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease." *J Neurochem* 46(6):1820-1834.
- Selkoe DJ and Hardy J. (2016). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years." *EMBO Mol Med* 8(6):595-608.
- Senay C, Lind T, et al. (2000). "The EXT1/EXT2 tumor suppressors: catalytic activities and role in heparan sulfate biosynthesis." *EMBO Rep* 1(3):282-286.
- Sepulveda-Diaz JE, Alavi Naini SM, et al. (2015). "HS3ST2 expression is critical for the abnormal phosphorylation of tau in Alzheimer's disease-related tau pathology." *Brain* 138(Pt5):1339-1354.
- Sepulveda-Falla D, Barrera-Ocampo A, et al. (2014). "Familial Alzheimer's disease-associated presenilin-1 alters cerebellar activity and calcium homeostasis." *J Clin Invest* 124(4):1552-1567.
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, et al. (2011). "Neuropathological alterations in Alzheimer disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* 1(1):a006189.
- Shen L and Ji HF. (2015). "Vitamin D deficiency is associated with increased risk of Alzheimer's disease and dementia: evidence from meta-analysis." *Nutr J* 14:76.
- Sheng J, Liu R, et al. (2011). "The dominating role of N-deacetylase/N-sulfotransferase 1 in forming domain structures in heparan sulfate." *J Biol Chem* 286(22):19768-19776.
- Shin RW, Lee VM, et al. (1994). "Aluminum modifies the properties of Alzheimer's disease PHF tau proteins in vivo and in vitro." *J Neurosci* 14(11):7221-7233.
- Shipp EL and Hsieh-Wilson LC. (2007). "Profiling the sulfation specificities of glycosaminoglycan interactions with growth factors and chemotactic proteins using microarrays." *Chem Biol* 14(2):195-208.
- Shworak NW, Liu J, et al. (1997). "Molecular cloning and expression of mouse and human cDNAs encoding heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase." *J Biol Chem* 272(44):28008-28019.
- Simic G, Stanic G, et al. (2009). "Does Alzheimer's disease begin in the brainstem?" *Neuropathol Appl Neurobiol* 35(6):532-554.
- Small DH. (2008). "Network dysfunction in Alzheimer's disease: does synaptic scaling drive disease progression?" *Trend Mol Med* 14(3):103-108.
- Smeds E, Feta A, et al. (2010). "Target selection of heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfotransferase." *Glycobiology* 20(10):1274-1282.
- Smith AD. (2002). "Imaging the progression of Alzheimer pathology through the brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7):4135-4137.

- Snow AD, Sekiguchi RT, et al. (1994a). "Heparan sulfate proteoglycan in diffuse plaques of hippocampus but not of cerebellum in Alzheimer's disease brain." *Am J Pathol* 144(2):337-347.
- Snow AD, Sekiguchi RT, et al. (1994b). "An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain." *Neuron* 12:219-234.
- Soscia SJ, Kirby JE, et al. (2010). "The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide." *PLoS One* 5(3):e9505.
- Sperling-Reisa A, Aisen-Paul S, et al. (2011). "Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." *Alzheimer Dement* (7): 280-292.
- Spillmann D, Witt D, et al. (1998). "Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate." *J Biol Chem* 273(25): 15487-15493.
- Stamer K, Vogel R, et al. (2002). "Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress." *J Cell Biol* 156(6):1051-1063.
- Staples GO, Shi X, et al. (2010). "Extended N-sulfated domains reside at the nonreducing end of heparan sulfate chains." *J Biol Chem* 285(24):18336-18343.
- Staples GO, Shi X, et al. (2011). "Glycomics Analysis of Mammalian Heparan Sulfates Modified by the Human Extracellular Sulfatase HSulf2." *PLoS One* 6(2): e16689.
- Stern Y, Albert S, et al. (1999). "Rate of memory decline in AD is related to education and occupation: Cognitive reserve?" *Neurology* 53:1942-1947.
- Stipp CS, Litwack ED, et al. (1994). "Cerebroglycan: An Integral Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan That Is Unique to the Developing Nervous System and Expressed Specifically during Neuronal Differentiation." *J Cell Biol* 124(1):149-160.
- Stites SD, Milne R, et al. (2018). "Advances in Alzheimer's imaging are changing the experience of Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement (Amst)* 10:285-300.
- Stopschinski BE, Holmes BB, et al. (2018). "Specific glycosaminoglycan chain length and sulfation patterns are required for cell uptake of tau versus  $\alpha$ -synuclein and  $\beta$ -amyloid aggregates." *J Biol Chem* 293(27):10826-10840.
- Storandt M, Mintun MA, et al. (2009). "Cognitive decline and brain volume loss as signatures of cerebral amyloid-beta peptide deposition identified with Pittsburgh compound B: Cognitive decline associated with Abeta deposition." *Arch Neurol* 66:1476-1481.
- Streit WJ, Sammons NW, et al. (2004). "Dystrophic microglia in the aging human brain." *Glia* 45(2):208-212.
- Stringer SE and Gallagher JT. (1997). "Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulfate." *J Biol Chem* 272(33):20508-20514
- Strittmatter WJ, Saunders AM, et al. (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5):1977-1981.
- Sugahara K and Kitagawa H. (2002). "Heparin and heparan sulfate biosynthesis." *IUBMB Life* 54(4):163-175.
- Takeuchi O and Akira S. (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." *Cell* 140(6):805-820.

- Tammi MI, Day AJ, et al. (2002). "Hyaluronan and homeostasis: a balancing act." *J Biol Chem* 277(7):4581-4584.
- Taylor KR and Gallo RL. (2006). "Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation." *FASEB J* 20(1):9-22.
- Tenorio J, Arias P, et al. (2014). "Simpson-Golabi-Behmel syndrome types I and II." *Orphanet J Rare Dis* 9:138.
- Terry AV Jr and Buccafusco JJ. (2003). "The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development." *J Pharmacol Exp Ther* 306(3):821-827.
- Terry RD, Hansen LA, et al. (1987). "Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles." *J Neuropath Exp Neurol* 46:262-268.
- Thacker BE, Xu D, et al. (2014). "Heparan sulfate 3-O-sulfation: a rare modification in search of a function." *Matrix Biol* 35:60-72.
- Thal DR, Rüb U, et al. (2002). "Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD". *Neurology* 58: 1791-1800.
- Theofilas P, Ehrenberg AJ, et al. (2016). "Locus coeruleus volume and cell population changes during Alzheimer's disease progression: A stereological study in human postmortem brains with potential implication for early-stage biomarker discovery." *Alzheimers Dement* 13(3):236-246.
- Thompson, L. D., M. W. Pantoliano, et al. (1994). "Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain." *Biochemistry* 33(13): 3831-3840.
- Tomic JL, Pensalfini A, et al. (2009). "Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction." *Neurobiol Dis* 35(3):352-358.
- Tsepilov RN and Beloded AV. (2015). "Hyaluronic Acid--an "Old" Molecule with "New" Functions: Biosynthesis and Depolymerization of Hyaluronic Acid in Bacteria and Vertebrate Tissues Including during Carcinogenesis." *Biochemistry (Mosc)* 80(9):1093-1108.
- Tsuchiya K1, Yagishita S, et al. (2004). "Coexistence of CJD and Alzheimer's disease: an autopsy case showing typical clinical features of CJD." *Neuropathology* 24(1):46-55.
- Turnbull JE. (2010). "Heparan sulfate glycomics: towards systems biology strategies." *Biochem Soc Trans* 38(5):1356-1360.
- Turner PR, O'Connor K, et al. (2003). "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory." *Prog Neurobiol* 70(1):1-32.
- Uchimura K. (2015). "Keratan sulfate: biosynthesis, structures, and biological functions." *Methods Mol Biol* 229:389-400.
- Uchimura K, Morimoto-Tomita M, et al. (2006). "HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1." *BMC Biochem* 7:2.
- Vallejo-Johnson MA and Marcial-Velasteguí P. (2017). "Influencia del estrés en la Enfermedad de Alzheimer." *Ciencia UNEMI* 25(10):123-133.

- Van Horssen J, Otte-Holler I, et al. (2001). "Heparan sulfate proteoglycan expression in cerebrovascular amyloid beta deposits in Alzheimer's disease and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch) brains." *Acta Neuropathol* 102:604-614.
- Van Horssen J, Wesseling P, et al. (2003). "Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders." *Lancet Neurol* 2(8):482-492.
- Verbeek MM, Eikelenboom P, et al. (1997). "Differences between the pathogenesis of senile plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer disease." *J Neuropathol Exp Neurol* 56:751-761.
- Veugelers M, De Cat B, et al. (1999). "Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans." *J Biol Chem* 274(38):26968-26977.
- Vijaya Kumar DK, Choi SH, et al. (2016). "Amyloid- $\beta$  Peptide Protects Against Microbial Infection In Mouse and Worm Models of Alzheimer's Disease." *Sci Transl Med* 8(340):340ra72.
- Villarejo Galende A, Eimil Ortiz M, et al. (2017). "Informe de la Fundación del Cerebro. Impacto social de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias." *Neurología*. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2017.10.005>
- Vlodavsky I, Elkin M, et al. (2008). "Heparanase: one molecule with multiple functions in cancer progression." *Connect Tissue Res* 49:207-210.
- Waldemar G, Dubois B, et al. (2007). "Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline." *Eur J Neurol* 14(1):e1-26.
- Wallin A and Blennow K. (1996). "Clinical subgroups of the Alzheimer syndrome." *Acta Neurol Scand* 94(S165):51-57.
- Walsh DM and Selkoe DJ. (2004). "Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration." *Protein Pept Lett* 11(3):213-228.
- Wang S, Mims PN, et al. (2016). "Is Beta-Amyloid Accumulation a Cause or Consequence of Alzheimer's Disease?" *J Alzheimers Parkinsonism Dement* 1(2):007.
- Wechalekar AD, Gillmore JD, et al. (2016). "Systemic amyloidosis." *Lancet* 387(10038):2641-2654.
- Weiner MW, Aisen PS, et al. (2010). "The Alzheimer's disease neuroimaging initiative: progress report and future plans." *Alzheimers Dement* 6(3):202-11.e7.
- Weingarten MD, Lockwood AH, et al. (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(5):1858-1862.
- Welling MM, Nabuurs RJ, et al. (2015). "Potential role of antimicrobial peptides in the early onset of Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement* 11(1):51-57.
- Whitehouse PJ, Price DL, et al. (1982). "Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain." *Science* 215(4537):1237-1239.
- Whitelock Götting JM and Iozzo RV. (2005). "Heparan sulfate: a complex polymer charged with biological activity." *Chem Rev* 105(7):2745-2764.
- Whitelock JM, Melrose J, et al. (2008). "Diverse cell signaling events modulated by perlecan." *Biochemistry* 47(43):11174-11183.
- Wiedermann CH J and Romisch J. (2002). "The anti-inflammatory actions of antithrombin-a review." *Acta Med Austriaca* 29, 89-92.
- Wilson JC, Laloo AE, et al. (2014). "1H NMR spectroscopic studies establish that heparanase is a retaining glycosidase." *Biochem Biophys Res Commun* 443(1):185-188.

- Winkler, E.A., Nishida, Y., et al. (2015). "GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration." *Nat Neurosci* 18(4):521-530.
- Wise CA, Clines GA, et al. (1997). "Identification and localization of the gene for EXTL, a third member of the multiple exostoses gene family." *Genome Res* 7:10–16.
- Xia G, Chen J, et al. (2002). "Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1." *J Biol Chem* 277(40):37912-37919.
- Xu D, Tiwari V, et al. (2005). "Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1." *Biochem J* 385(Pt2):451-459.
- Yabe T, Shukla D, et al. (2001). "Portable sulphotransferase domain determines sequence specificity of heparan sulphate 3-O-sulphotransferases." *Biochem J* 359(Pt1):235-241.
- Yan D and Lin X. (2009). "Shaping morphogen gradients by proteoglycans." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(3):a002493.
- Yao ZX and Papadopoulos V. (2002). "Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity." *FASEB J* 16(12):1677-1679.
- Ye S, Huang Y, et al. (2005). "Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid  $\beta$  peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51):18700-18705.
- Youmans KL, Tai LM, et al. (2012). "APOE4-specific changes in A $\beta$  accumulation in a new transgenic mouse model of Alzheimer disease." *J Biol Chem* 287(50):41774-41786.
- Young JE, Fong LK, et al. (2018). "Stabilizing the retromer complex in a human stem cell model of Alzheimer's disease reduces TAU phosphorylation independently of amyloid precursor protein." *Stem Cell Reports* 10(3):1046-1058.
- Younkin, SG. (1998). "The role of A beta 42 in Alzheimer's disease." *J Physiol Paris* 92(3-4):289-292.
- Yu C, Griffiths LR, et al. (2017). "Exploiting Heparan Sulfate Proteoglycans in Human Neurogenesis-Controlling Lineage Specification and Fate." *Front Integr Neurosci* 11:28.
- Yu JT, Tan L, et al. (2014). "Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update." *Annu Rev Neurosci* 37:79-100.
- Zhang L, Lawrence R, et al. (2001). "The effect of precursor structures on the action of glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-1 and the biosynthesis of anticoagulant heparan sulfate." *J Biol Chem* 276(31):28806-28813.
- Zhang GL, Zhang X, et al. (2014a). "Towards understanding the roles of heparan sulfate proteoglycans in Alzheimer's disease." *Biomed Res Int* 2014:516028.
- Zhang, X., Li, Y., et al. (2014b). "The  $\gamma$ -secretase complex: from structure to function." *Front Cell Neurosci* 8:427.
- Zhao J, Huvent I, et al. (2017). "Glycan determinants of heparin-tau interaction." *Biophys J* 112:921-932.
- Zhao Y and Lukiw WJ. (2015). "Microbiome-generated amyloid and potential impact on amyloidogenesis in Alzheimer's disease (AD)." *J Nat Sci* 1(7):e138.
- Zhou ZD, Chan CH, et al. (2011). "The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease." *Cell Adh Migr* 5(4):280-292.

Ziebell JM and Morganti-Kossmann MC. (2010). "Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury." *Neurotherapeutics* 7(1):22-30.

Zigman WB and Lott IT. (2007). "Alzheimer's disease in Down syndrome: neurobiology and risk." *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 13(3):237-246.

Zlotnik A and Yoshie O. (2012). "The chemokine superfamily revisited." *Immunity* 36(5):705-716.

Zunzunegui Pastor MV, del Ser T, et al. (2003). "Demencia no detectada y utilización de los servicios sanitarios: implicaciones para la atención primaria." *Aten Primaria* 31(9):581-586.

INTERNET:

Human pathology. Alzheimer disease [internet] [consultado el 5 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.humpath.com/spip.php?>



## **ANEXOS**

Póster “ ALTERACIONES EN LA SÍNTESIS DE LA ESTRUCTURA FINA DEL HEPARÁN SULFATO EN EL HIPOCAMPO ANTERIOR DE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”, presentado en el XXVIII Congreso Nacional SEAP-IAP, XXIII Congreso Nacional SEC, IV Congreso Nacional SEPAF. 24/26 de Mayo de 2017, Palacio de Congresos de Valencia.



XXVIII Congreso Nacional SEAP-IAP  
XXIII Congreso Nacional SEC  
IV Congreso Nacional SEPAF

24/26 Mayo 2017 Palacio de Congresos de Valencia



## ALTERACIONES EN LA SÍNTESIS DE LA ESTRUCTURA FINA DEL HEPARÁN SULFATO EN EL HIPOCAMPO ANTERIOR DE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Natalia Pérez López<sup>1</sup>, Iván Fernández-Vega<sup>2,3</sup>, María Pilar Solís-Hernández<sup>4</sup>, Yolanda García Mesa<sup>5</sup>, Víctor Lozano Iturbe<sup>1,3</sup>, Carla Martín Cueto<sup>1,3</sup>, Olivia García-Suárez<sup>3,5</sup>, Luis M. Quirós Fernández<sup>3,5</sup> y Beatriz García Fernández<sup>3,5</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. Oviedo. <sup>2</sup>Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. <sup>3</sup>Instituto Universitario Fernández-Vega. Universidad de Oviedo. Oviedo. <sup>4</sup>Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. <sup>5</sup>Departamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo. Oviedo

### INTRODUCCIÓN:

El elemento patológico central en la enfermedad de Alzheimer (EA) es la formación de depósitos del péptido citotóxico  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) en el parénquima cerebral con la hiperfosforilación de Tau. Tanto en modelos animales como en el cerebro de pacientes con EA los depósitos de  $A\beta$  se han descrito asociados a cadenas de heparán sulfato (HS). Estudios recientes han descrito la existencia de interacciones particulares entre distintos tipos de agregados de  $A\beta$  y cadenas de HS con diferente grado de sulfatación.

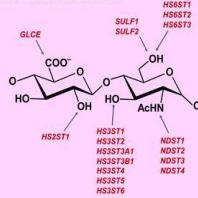


Figura 1. Estructura de la unidad disacáridica del HS. Se muestran los genes codificantes de los enzimas modificadores de la estructura y su lugar de acción.

El HS es un polisacárido lineal constituido por la unión alternada de un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y uno de ácido glucurónico (GlcA) (Figura 1). El polímero experimenta una serie de reacciones que incluyen la N-deacetilación seguida de sulfatación de la GlcNAc, reacción catalizada por 4 isoenzimas codificados por los genes *NDST1-4*; la epimerización de GlcA a ácido idurónico (IdoA) seguida de la sulfatación del C2 de ese mismo residuo, codificadas por los genes *GLCE* u *HS2ST1*; la sulfatación del C6 y C3 de la glucosamina, codificadas por las familias de genes *HS6ST1-3* y *HS3ST1-6* respectivamente, y la eliminación de sulfatos concretos de C6, codificada por *SULF1-2*. Las reacciones son subestequiométricas, y el resultado es una molécula compleja con dominios de alta y baja sulfatación (Figura 2).

### MÉTODOS:

La transcripción diferencial de los genes responsables de la síntesis del HS fue determinada por PCR en tiempo real, aislando ARN de hipocampo anterior de cerebros de pacientes con EA e individuos sanos. Las cadenas de HS se detectaron mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo comercial anti-HS (10E4, Amsbio)

### RESULTADOS:

**TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL:** la transcripción de dos glicosiltransferasas implicadas en el inicio de las cadenas (*EXTL2* y *EXTL3*), pero no de *EXTL1*, pudo ser detectada en todas las muestras analizadas (Figura 3); también se detectaron transcritos de las dos polimerasas del HS (*EXT1* y *EXT2*), pero en ningún caso se pudieron observar cambios significativos en sus niveles en las muestras patológicas (Figura 3). De las 4 *NDSTs* responsables de la síntesis de los dominios sulfatados en las cadenas sacarádicas, la isoforma 3 (*NDST3*) pudo ser detectada en las muestras sanas, pero no en los pacientes. La epimerasa del ácido glucurónico (*GLCE*) se sobreexpresó, mientras la isoforma 2 de la glucosamina C-6 sulfotransferasa (*HS6ST2*) se subexpresó en las muestras de EA. Las mayores alteraciones se observaron en los enzimas responsables de la sulfatación en C-3 de la glucosamina, 4 de los cuales (*HS3ST3A1*, *HS3ST3B1*, *HS3ST5* y *HS3ST6*) se sobreexpresaron en los pacientes analizados

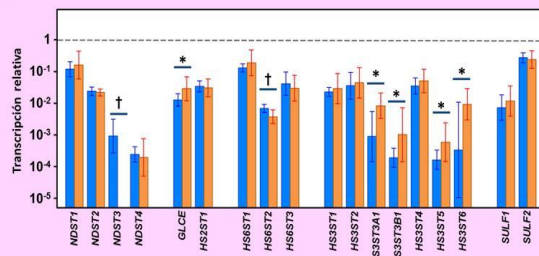


Figura 4. Transcripción diferencial de los enzimas modificadores de las cadenas de HS. Barras azules: individuos sanos; barras naranja: pacientes de EA. Los genes cuya expresión se altera significativamente en EA aparecen señalados; †: subexpresión, \*: sobreexpresión.

### INMUNOHISTOQUÍMICA:

Las cadenas de HS fueron visualizadas en el hipocampo anterior empleando anticuerpos específicos frente a epitopos sulfatados de HS (epitopo 10E4). Los cerebros sanos no mostraron marcaje, el cual fue claramente identificable en los pacientes con EA (Figura 5)

### CONCLUSIONES:

Las cadenas de HS experimentan modificaciones que afectan a la sulfatación y a la epimerización, pero no a la polimerización, en el hipocampo anterior de pacientes con EA, apareciendo asociadas con los de agregados de  $A\beta$  y Tau hiperfosforilada.

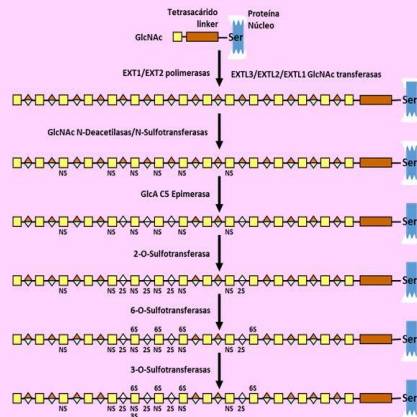


Figura 2. Síntesis del HS. El proceso tiene lugar sobre un tetrasacárido unido a residuos de serina de la proteína núcleo de un proteoglicano. La síntesis implica la polimerización de residuos de GlcA (♦) y GlcNAc (□) seguido de la epimerización a IdoA (◊) y diversas sulfataciones

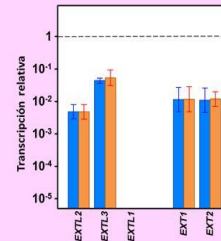


Figura 3. Transcripción diferencial de los enzimas responsables de la polimerización de la cadena del HS. Barras azules: individuos sanos; barras naranja: EA.

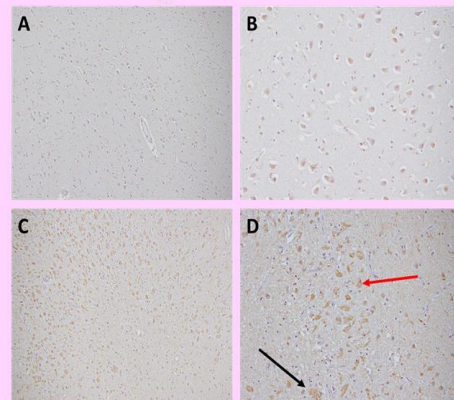


Figura 5. IHQ utilizando anticuerpos frente a epitopos sulfatados de HS (epitopo 10E4): (A-B) Cerebros control. No se identifican inmunorreacciones. (B-C) Cerebros con enfermedad de Alzheimer. Se observó un intenso marcaje a nivel extracelular en las placas neuríticas (flecha negra) y a nivel intracelular en los ovillos neurofibrilares (flecha roja). A:100x; B:200x; C:100x; D:200x