

Tesis Doctoral

Estudio de la expresión de glicanos y glicosiltransferasas en el cerebro de ratas expuestas a paradigmas de aprendizaje

Burgos, Valeria Laura

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Burgos, Valeria Laura. (2011). Estudio de la expresión de glicanos y glicosiltransferasas en el cerebro de ratas expuestas a paradigmas de aprendizaje. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Burgos, Valeria Laura. "Estudio de la expresión de glicanos y glicosiltransferasas en el cerebro de ratas expuestas a paradigmas de aprendizaje". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio de la expresión de glicanos y glicosiltransferasas en el cerebro de ratas expuestas a paradigmas de aprendizaje

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas

Autor: Lic. Valeria Laura Burgos

Director: Dr. Pablo Francisco Argibay

Director Asistente: Dr. Mariano Martín Boccia

Consejero de Estudios: Dr. Osvaldo Uchitel

Lugar de trabajo: Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME) – Hospital Italiano
de Buenos Aires

Buenos Aires, 2011

Estudio de la expresión de glicanos y glicosiltransferasas en el cerebro de ratas expuestas a paradigmas de aprendizaje

Resumen

Dado el carácter dinámico de la maquinaria de glicosilación y su participación en el sistema nervioso, en la presente Tesis estudiamos la expresión de estructuras oligosacáridas y la expresión génica de glicosiltransferasas en el cerebro de ratas luego de la exposición a dos modelos inductores de plasticidad neural: el Enriquecimiento Ambiental y el aprendizaje de Evitación Inhibitoria..

La estimulación ofrecida por el Enriquecimiento Ambiental claramente modificó el perfil génico de algunos componentes de la O-glicosilación tipo mucina. Por otra parte, luego del entrenamiento en Evitación Inhibitoria la expresión génica de varias O-glicosiltransferasas pareció ser regulada de manera diferencial en respuesta al aprendizaje. Además, los perfiles génicos de algunas de estas glicosiltransferasas parecieron estar diferencialmente reguladas dependiendo de qué fase de la formación de la memoria estaba siendo estudiada.

Esta tesis doctoral se ha enfocado principalmente en la O-glicosilación del cerebro de rata y se han observado resultados interesantes sobre el perfil de algunos genes de glicosiltransferasas asociados previamente a patologías en humanos, como distrofias musculares congénitas. El entendimiento de los factores que modulan a los glicanos neurales en respuesta a modelos inductores de plasticidad podría aportar una mayor comprensión sobre la fisiología de un organismo, especialmente en casos de deficiencias en la glicosilación que involucran defectos y anormalidad en el cerebro.

Palabras clave: glicosiltransferasas, O-glicosilación, enriquecimiento ambiental, evitación inhibitoria, sistema nervioso central.

A study of the expression of glycans and glycosyltransferases in the brain of rats exposed to learning paradigms

Abstract

Given the highly dynamic character of the glycosylation machinery and its involvement in the nervous system, in the present dissertation we studied the expression of oligosaccharide structures and gene expression of O-glycosyltransferases in the rat brain after exposure to two neural plasticity-inducing models, the Environmental Enrichment model and the Inhibitory Avoidance Task.

The stimulation offered by the Enriched Environment clearly modified the gene profile of some components of the mucin-type O-glycosylation, some of which were previously known to be involved in certain pathological conditions of neural plasticity. On the other hand, after training in the Inhibitory Avoidance task the gene expression of several O-glycosyltransferases seemed to be differentially regulated in response to learning. Furthermore, the gene profiles of some of these glycosyltransferases seemed to be differentially regulated depending on which phase of memory formation was being studied (consolidation or reconsolidation).

This dissertation has focused mainly on the O-glycosylation in the rat brain and interesting results have been obtained regarding the gene profile of some glycosyltransferases known to be associated to neural pathological conditions in humans, such as congenital muscular disorders. Understanding the regulation of the brain glycosylation pathways in response to plasticity-inducing models could provide mechanistic insights into the physiology of an organism, especially in those cases where glycosylation deficits engage abnormal brain defects.

Keywords: glycosyltransferases, O-glycosylation, enriched environment, inhibitory avoidance task, central nervous system.

A mis padres, Ana y Celso.

A Robert y Sophia.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer muy especialmente a cada una de las siguientes personas, las cuales han contribuido a que esta tesis sea posible:

A Pablo Argibay, por haberme brindado la posibilidad de realizar esta tesis y permitir mi desarrollo profesional.

A Mariano Boccia, por su buena onda en ayudarme y aconsejarme con los experimentos de conducta.

A Mónica Loresi y Alejandra Hidalgo, por ayudarme con las lectinas.

A las siguientes personas en el ICBME: Adriana Rinflerch, Analía Quijano, Marcelo Ielpi, Lucas Costa, Gloria Rada, Eduardo Pérez y las "Chicas de Bioterio": Graciela Dabrowski y Emiliana Herrero.

A mis amigas Caro Luchetti, Ceci Martinez, Ceci Forcato y Julia Martínez.

Al Hospital Italiano de Buenos Aires y al CONICET, por la ayuda económica.

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| BDNF | <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> |
| CaMKII α | subunidad α de <i>Ca²⁺/Calmodulin dependent Kinase II</i> |
| CREB | <i>cAMP-dependent Response Element Binding</i> |
| CMP-NeuAc | <i>Neuroaminic Acid</i> |
| Dol-P-Man | Dolicol fosfato manosa |
| Dol-P-Glc | Dolicol fosfato glucosa |
| EA | Enriquecimiento Ambiental |
| EI | Evitación Inhibitoria |
| Fwd | <i>Forward</i> |
| Fuc | Fucosa |
| Gal | Galactosa |
| GalNAc | N-acetilgalactosamina |
| GlcNAc | N-acetilglucosamina |
| Man | Manosa |
| mARN | ARN mensajero |
| MCT | Memora de Corto Término |
| MLT | Memoria de Largo Término |
| MPT | Modificación post-traducciona |
| MWM | <i>Morris Water Maze</i> |
| NOR | <i>Novel Object Recognition</i> |
| NS | No Significativo |
| O-GT | O-Glicosiltransferasa |
| RE | Retículo Endoplasmático |
| Rev | <i>Reverse</i> |
| Ser | Serina |
| Sia | <i>Sialic Acid</i> |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| Thr | Treonina |

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

| | |
|---|----|
| 1. 1. Glicobiología..... | 1 |
| 1.1.1. Biosíntesis y factores involucrados..... | 2 |
| 1.1.2. Glicosiltransferasas..... | 5 |
| 1. 2. Tipos de glicosilación..... | 6 |
| 1. 2. 1. N-glicosilación..... | 7 |
| 1. 2. 2. O-glicosilación..... | 7 |
| 1. 3. O-glicosilación tipo mucina..... | 8 |
| 1. 4. O-manosilación | 10 |
| 1. 5. O-GlcNAc | 11 |
| 1. 6. O-fucosilación..... | 12 |
| 1.7. Estructura de la sinapsis..... | 13 |
| 1. 7. 1. Neuroglicobiología..... | 14 |
| 1. 7. 2. Glicobiología y Aprendizaje..... | 15 |
| 1. 8. Marco teórico e hipótesis de trabajo..... | 16 |
| 1. 9. Objetivos..... | 17 |

CAPÍTULO II: ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL.....

19

| | |
|---|----|
| 2. 1. Introducción..... | 20 |
| 2. 1. 1. Efectos morfológicos..... | 22 |
| 2. 1. 2. Efectos neuroquímicos..... | 23 |
| 2. 1. 3. Efectos comportamentales..... | 24 |
| 2. 1. 4. Efectos sobre injurias en el Sistema Nervioso Central..... | 24 |
| 2. 2. Resultados..... | 26 |
| 2. 2. 1. Desempeño conductual de ratas sometidas al EA..... | 27 |
| 2. 2. 1. 1. Laberinto Acuático de Morris..... | 27 |
| 2. 2. 1. 2. Reconocimiento de objetos..... | 28 |
| 2. 2. 1. 3. Evitación Inhibitoria..... | 29 |
| 2. 2. 2. Efectos del EA en la expresión de glicanos en el cerebro de ratas...31 | |
| 2. 2. 3. Expresión de genes de O-glicosiltransferasas..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 2. 2. 3. 1. O-glicosilación tipo mucina. Efectos sobre el hipocampo... | 38 |
| 2. 2. 3. 2. O-glicosilación tipo mucina. Efectos sobre la corteza..... | 42 |
| 2. 2. 3. 3. O-manosilación. Efectos sobre el hipocampo..... | 45 |
| 2. 2. 3. 4. O-manosilación. Efectos sobre la corteza..... | 48 |
| 2. 2. 3. 5. O-fucosilación. Efectos sobre el hipocampo..... | 49 |
| 2. 2. 3. 6. O-fucosilación. Efectos sobre la corteza | 50 |
| 2. 2. 3. 7. O-GlcNAc. Efectos sobre el hipocampo..... | 51 |
| 2. 2. 3. 8. O-GlcNAc. Efectos sobre la corteza..... | 52 |
| 2. 2. 4. Expresión proteica de O-glicosiltransferasas..... | 55 |
| 2. 3. Discusión..... | 57 |

CAPÍTULO III: EVITACIÓN INHIBITORIA.....63

| | |
|--|-----|
| 3. 1. Introducción..... | 64 |
| 3. 1. 1. Fases de la Memoria | 64 |
| 3. 1. 2. Evitación inhibitoria | 66 |
| 3. 2. Resultados..... | 69 |
| 3. 2. 1. Caracterización de la distribución de glicanos mediante lectinas...71 | |
| 3. 2. 2. Expresión de genes de O-glicosiltransferasas.....79 | |
| 3. 2. 2. 1. O-glicosilación tipo mucina. Efectos en el hipocampo.....81 | |
| 3. 2. 2. 2. O-glicosilación tipo mucina. Efectos en la corteza.....87 | |
| 3. 2. 2. 3. O-manosilación. Efectos en el hipocampo.....88 | |
| 3. 2. 2. 4. O-GlcNAc. Efectos en el hipocampo.....92 | |
| 3. 2. 2. 5. O-fucosilación. Efectos en el hipocampo.....95 | |
| 3. 2. 2. 6. O-fucosilación. Efectos en la corteza.....97 | |
| 3. 3. Discusión..... | 102 |

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN GENERAL.....108

| | |
|--------------------------------|-----|
| 4. 1. Comentarios finales..... | 109 |
|--------------------------------|-----|

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO V: MATERIALES Y MÉTODOS..... | 113 |
| 5. 1. Enriquecimiento Ambiental..... | 114 |
| 5. 1. 1. Sujetos experimentales..... | 114 |
| 5. 1. 2. Procedimiento..... | 114 |
| 5. 2. Pruebas conductuales..... | 115 |
| 5. 2. 1. Reconocimiento de Objetos..... | 115 |
| 5. 2. 1. 1. Dispositivo..... | 115 |
| 5. 2. 1. 2. Procedimiento | 116 |
| 5. 2. 2. Laberinto acuático de Morris..... | 117 |
| 5. 2. 2. 1. Dispositivo..... | 117 |
| 5. 2. 2. 2. Procedimiento | 117 |
| 5, 2, 3, Evitación inhibitoria..... | 119 |
| 5. 3. Evitación inhibitoria..... | 119 |
| 5. 3. 1. Sujetos experimentales..... | 119 |
| 5. 3. 2. Dispositivo..... | 119 |
| 5. 3. 3. Procedimiento..... | 120 |
| 5. 3. 4. Grupos experimentales..... | 120 |
| 5. 4. Análisis histológico..... | 121 |
| 5. 4. 1. Preparación del tejido..... | 121 |
| 5. 4. 2. Histoquímica de lectinas..... | 121 |
| 5. 5. Biología Molecular..... | 122 |
| 5. 5. 1. Extracción de ARN total..... | 123 |
| 5. 5. 2. Preparación de cADN de hipocampo y corteza..... | 123 |
| 5. 5. 3. Diseño de <i>primers</i> de glicosiltransferasas | 123 |
| 5. 5. 4. <i>Real-time</i> PCR..... | 124 |
| 5. 6. SDS-PAGE y <i>Western blot</i> | 126 |
| 5. 6. 1. Extracción de glicoproteínas de hipocampo y corteza | 125 |
| 5. 6. 2. SDS-PAGE y transferencia | 126 |
| 5. 6. 3. <i>Western blot</i> | 126 |
| 5. 7. Mediciones de resultados y variables explicatorias..... | 127 |
| 5. 7. 1. Análisis de marcaciones histoquímicas | 127 |
| 5. 7. 2. Análisis de <i>Real-time</i> PCR | 128 |

| | |
|---|------------|
| 5. 8. Análisis estadístico..... | 129 |
| 5. 8. 1. Expresión de genes de glicosiltransferasas | 129 |
| 5. 8. 2. Evitación inhibitoria.. | 129 |
| 5. 8. 3. Reconocimiento de objetos | 129 |
| 5. 8. 4. Laberinto acuático de Morris | 129 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 130 |

Capítulo I
INTRODUCCIÓN

1. 1. Glicobiología

La glicobiología, definida en su sentido más amplio, es el estudio de la estructura, biosíntesis, biología y función de los azúcares o glicanos en un organismo. El proceso de glicosilación es muy interesante desde el punto de vista del contenido de información ya que tiene el potencial de producir un gran número de estructuras químicas por procesos de combinación: cada monosacárido tiene varios posibles sitios de formación de un enlace glicosídico con otros glicanos, y la configuración de cada uno de estos enlaces (α o β) ofrece la posibilidad de complejizar los patrones de ramificación de la estructura oligosacárida. De esta manera, los glicanos son de las moléculas con mejor capacidad de codificación y poseen gran potencial de información contenido en estructuras muy compactas (Laine, 1994; Varki et al, 1999).

Las superficies celulares de las células de mamíferos están decoradas con un complejo y denso arreglo de estructuras oligosacáridas conjugadas mediante un enlace covalente a proteínas (glicoproteínas y proteoglicanos) y lípidos (glicolípidos) (en conjunto denominados **glicoconjugados**). Dentro de los eventos postraduccionales más comunes (como fosforilación, acetilación, etc), la glicosilación es la forma de modificación postraducciona predominante que ofrece un nivel mayor de complejidad al proteoma humano, conformado por aproximadamente 30000 proteínas, un número sorprendentemente bajo (Venter et al, 2001). Además, más del 50% de las proteínas totales están glicosiladas, de acuerdo a estimaciones basadas en la base de datos *SwissProt* (Apweiler et al, 1999). Esto justifica que en los últimos años se haya acuñado el concepto de **glicómica**, un importante dominio emergente detrás, por ahora, de la genómica y proteómica.

1. 1. 1. Biosíntesis

Al contrario de otras macromoléculas como los ácidos nucleicos y proteínas, la biosíntesis de glicanos no depende de un molde – es decir, que una simple lectura del genoma o del proteoma no brindará ninguna información sobre el conjunto total de glicanos en un sistema. De hecho, la biosíntesis de las estructuras oligosacáridas sobre un polipéptido o un lípido sigue un camino complejo en el cual intervienen varios factores que determinan los productos finales, resultando en perfiles de glicosilación característicos.

Tales factores, los cuales difieren bastante en tipos celulares y especies, incluyen (Hubbard, 1988):

- Las acciones concertadas de glicosiltransferasas altamente específicas.
- Concentración y localización celular de moléculas donantes nucleótido-azúcar.
- Localización de glicosidasas y enzimas accesorias.
- Disponibilidad de moléculas aceptoras.
- Otros.

La biosíntesis de glicanos está dirigida primariamente por enzimas denominadas glicosiltransferasas (GTs) (Rini et al, 2009), las cuales transfieren la parte carbohidrato de una molécula donante a una aceptora (ver Tabla 1).

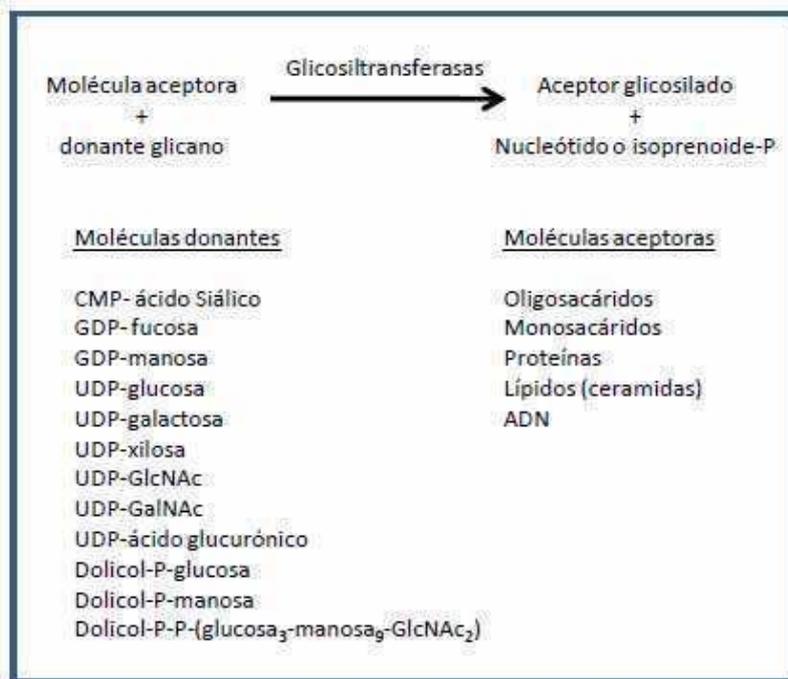


Tabla 1. Esquema de una reacción de glicosilación general, en el cual una glicosiltransferasa utiliza una molécula donante (indicada en la lista) sobre una serie de moléculas aceptoras. (Adaptado de Varki et al, 1999)

En eucariotas, la glicosilación de proteínas generalmente involucra la adición covalente de glicanos a residuos de Serina (Ser), Treonina (Thr) o Asparagina (Asn). La glicosilación de proteínas ha sido clasificada en dos principales vías de biosíntesis, la N- y la O-glicosilación (Figura 1) (ver más adelante punto 1.2 Tipos de glicosilación).

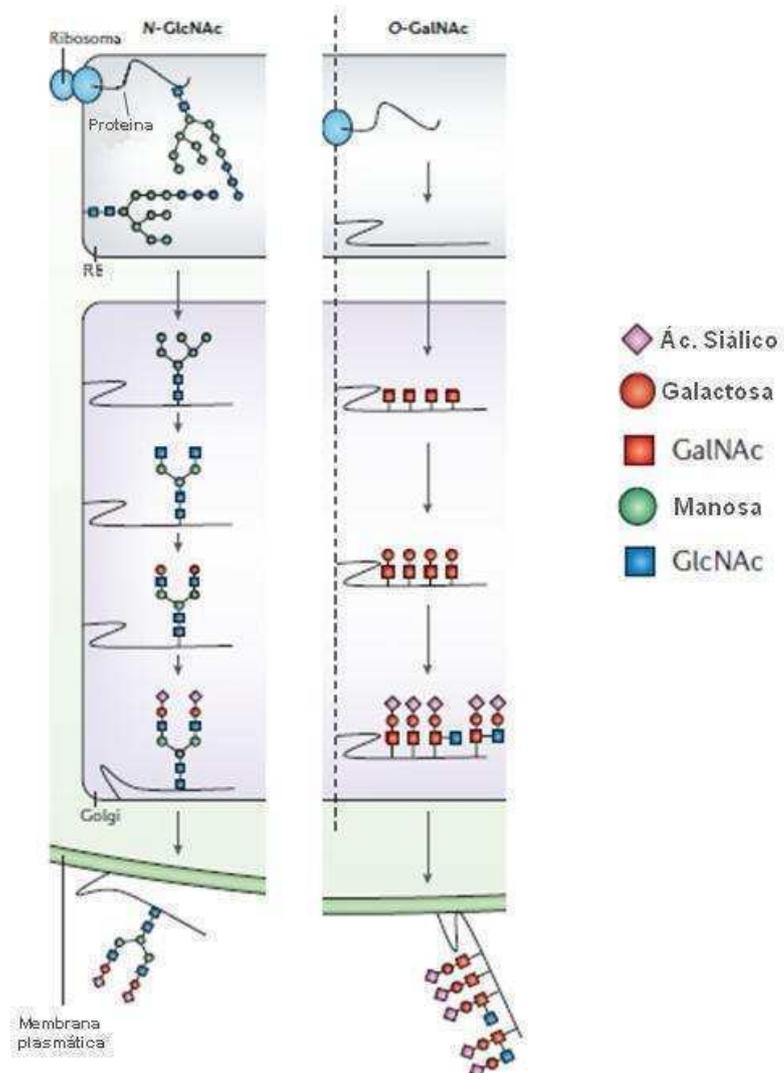


Figura 1. Resumen de las dos principales formas de glicosilación, N- y O-glicosilación. La N-glicosilación (N-GlcNAc) comienza en el Retículo Endoplasmático (RE) con la transferencia de un oligosacárido preformado a medida que la proteína emerge del ribosoma en el lumen del RE y continúa en el Golgi. Por el contrario, todos los pasos de la O-glicosilación (O-GalNAc) ocurren en el Golgi. Por simplicidad, se muestra solamente un sitio de glicosilación por proteína. Adaptado de Freeze, 2006).

1. 1. 2. Glicosiltransferasas

Un punto clave de regulación de la biosíntesis de glicanos es el control de la expresión de **glicosiltransferasas** (GTs), de su especificidad de sustrato, y de su localización tejido-específica. Muchos trabajos indican la importancia de las GTs en una variedad de eventos durante el desarrollo y diferenciación celular al igual que en situaciones de enfermedad.

Las GTs constituyen un gran grupo de enzimas que participan de manera secuencial en la biosíntesis de oligosacáridos, polisacáridos y glicoconjugados (Taniguchi et al, 2002). Son particularmente abundantes las GTs que catalizan la transferencia de un residuo de azúcar a partir de un donante nucleótido-azúcar de alta energía a moléculas aceptoras precursoras específicas, formando enlaces glicosídicos lineales o ramificados (Figura 2).

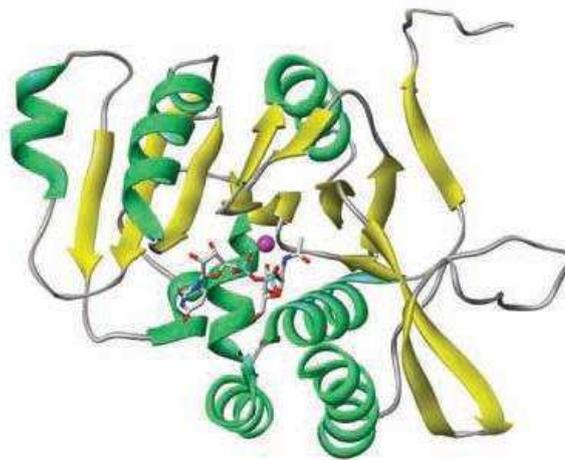


Figura 2. Modelado de cintas representativo de una glicosiltransferasa en acción. El nucleótido-azúcar está representado en el centro, correspondiendo en este caso a UDP-GalNAc y la enzima es α 1,4 N-acetilhexosaminiltransferase de ratón. Adaptado de Pedersen et al, 2002).

De manera general, las GTs actúan de manera secuencial, de tal manera que el producto oligosacárido de una enzima rinde un producto que sirve a su vez como el sustrato aceptor de la siguiente acción de otra glicosiltransferasa. El producto final es un polímero lineal y/o ramificado compuesto de monosacáridos unidos uno al otro (Paulson et al, 1989).

La expresión de GTs parece estar regulada por varios factores principalmente a nivel transcripcional en varios tejidos. Se ha reportado que la exposición de fibroblastos dérmicos en cultivo a radiación UV produce cambios transcripcionales de varias glicosiltransferasas de proteoglicanos (PG) y glicosaminoglicanos (GAG) (Shin J et al, 2011). Esta característica de regulación diferencial probablemente resulte del efecto de que muchos de los genes de GTs están conformados por múltiples regiones promotoras específicas en la región 5' (Saito et al, 1995; Koyama et al, 1996), además de la presencia de secuencias para varios factores de transcripción (Kang et al, 1996; Yu et al, 2004).

1. 2. Tipos de glicosilación

Los azúcares que están asociados a proteínas pueden ser clasificados en dos grupos principales: N-glicanos y O-glicanos.

En los N-glicanos, el extremo reductor del residuo N-acetilglucosamina (GlcNAc) está unido al grupo amida de Asparagina (Asn), formando de esta manera un enlace aspartilglicosilamina. En los O-glicanos, los azúcares son adosados a los grupos hidroxilo (OH) de los aminoácidos Serina o Treonina (Ser/Thr) en la cadena polipeptídica.

Asimismo, las estructuras totales de los N- y O-glicanos pueden dividirse en:

- Una estructura central o *core*.
- Porción externa de la cadena glicosídica, la cual determina la diversidad.

1. 2. 1. N-glicanos

Aunque las estructuras finales de este grupo tienen un alto grado de variabilidad, todas comparten una estructura común central o *core*, porque todos los tipos de N-glicanos (oligomanosa, complejos e híbridos, Figura 3) son sintetizados a partir de un precursor único que se origina en el Retículo Endoplasmático (RE) en una vía biosintética común que diverge solamente en procesamientos posteriores en el aparato de Golgi, donde se generan varias estructuras terminales (Varki et al, 1999).

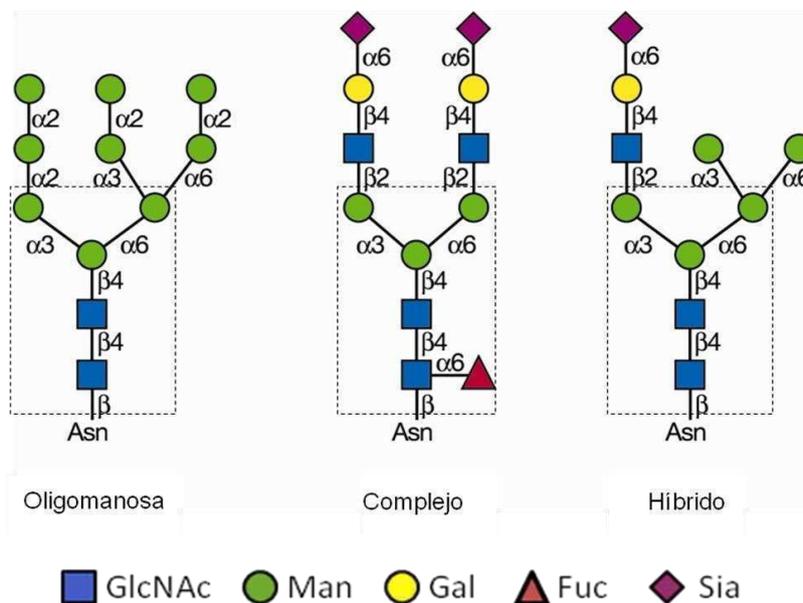


Figura 3. Estructuras de N-glicanos. Todos los N-glicanos comparten la estructura central o *core* encerrada por las líneas punteadas. Los azúcares externos a este *core*, son los que generan diversidad estructural. Adaptado de Varki et al, 1999.

1. 2. 2. O-glicanos

Dado que varios tipos de azúcares pueden formar enlaces O-glicosídicos con residuos de Ser/Thr en la cadena polipeptídica, las estructuras *core* de los O-glicanos presentan mayor variedad que los N-glicanos, pero son generalmente oligosacáridos de menor tamaño. Los azúcares que se encuentran en enlaces O-

glicosídicos en células neurales son: N-acetilgalactosamina (GalNAc), Manosa (Man), Fucosa (Fuc) y N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Figura 4).

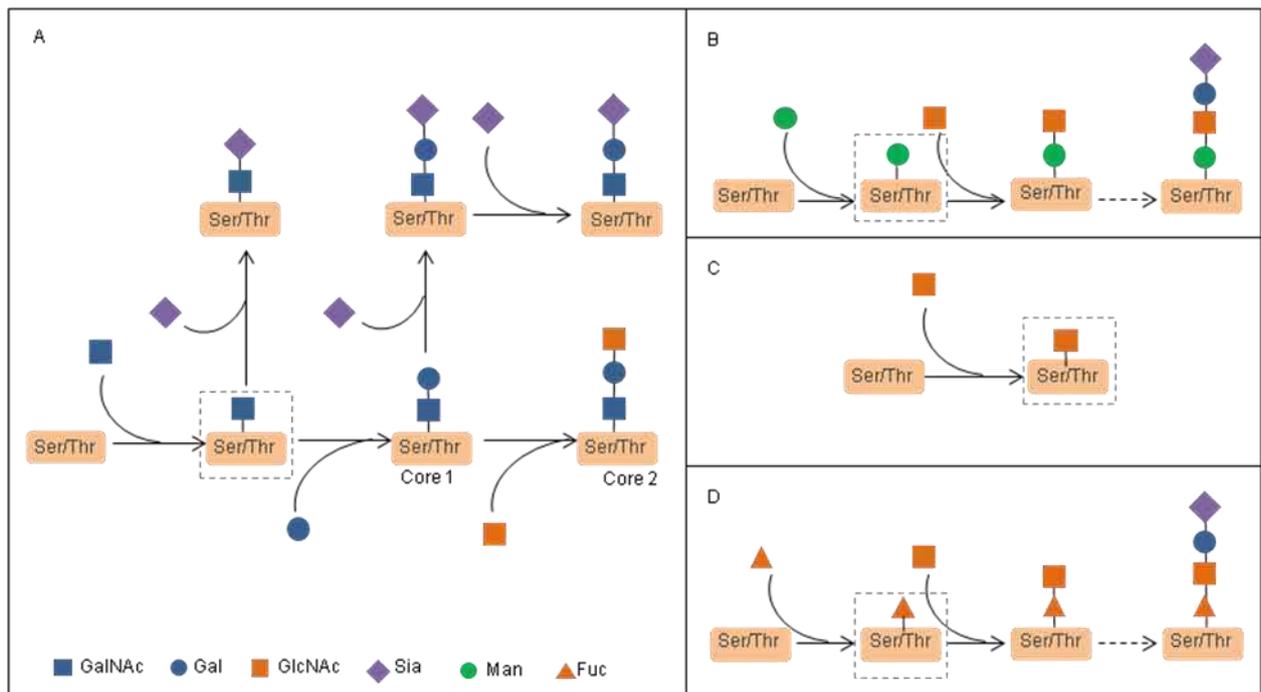


Figura 4. Representación de tipos de O-glicosilación. Las cuatro estructuras centrales o *core* de O-glicanos presentes en células neurales están indicadas con líneas punteadas. (A) O-glicosilación tipo mucina, (B) O-manosilación, (C) O-GlcNAc y (D) O-fucosilación.

A continuación se detallará brevemente los tipos de O-glicosilación:

1. 3. O-glicosilación tipo mucina

Los O-glicanos que se originan a partir del enlace GalNAc α 1- con Ser/Thr (formando el epítopo O-GalNAc, ver Figura 4) se encuentran en numerosas glicoproteínas de membrana y de secreción y son particularmente abundantes en mucinas. Las mucinas constituyen un grupo heterogéneo de glicoproteínas que portan O-glicanos, de ahí que el nombre de este tipo de glicosilación lleva su

nombre (Hanish 2001). Las glicoproteínas con O-glicanos tipo mucinas participan en una variedad de interacciones biológicas durante el desarrollo y en enfermedades, tal como angiogénesis (Xia et al, 2004), formación de tumores (Kim et al, 1996) y respuestas inflamatorias (revisado en Tian & Ten Hagen, 2009).

En la biosíntesis de estos glicanos, iniciada en el Aparato de Golgi, participan un grupo de enzimas denominadas polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasas (ppGalNAcT), las cuales transfieren GalNAc a partir de la molécula donante UDP-GalNAc a los residuos de Ser o Thr de la proteína sustrato, formando así el enlace GalNAc α 1-O-Ser/Thr (también conocido como antígeno Tn).

El glicoeptope O-GalNAc inicial puede ser posteriormente modificado mediante la adición de azúcares (Gal, GlcNAc o GalNAc) y así formar diversas estructuras, clasificadas en *cores*, reguladas por varias glicosiltransferasas específicas, indicadas en la Tabla 2:

| O-glicano | Estructura |
|-----------------------|---|
| Antígeno Tn | GalNAc α Ser/Thr |
| Antígeno Tn sialidado | Sia α 2-6GalNAc α Ser/Thr |
| Core 1 (Antígeno T) | Gal β 1-3GalNAc α Ser/Thr |
| Core 2 | GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α Ser/Thr |
| Core 3 | GlcNAc β 1-3GalNAc α Ser/Thr |
| Core 4 | GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α Ser/Thr |
| Core 5 | GalNAc α 1-3GalNAc α Ser/Thr |
| Core 6 | GlcNAc β 1-6GalNAc α Ser/Thr |
| Core 7 | GalNAc α 1-6GalNAc α Ser/Thr |
| Core 8 | Gal α 1-3GalNAc α Ser/Thr |

Tabla 2. Detalle de las estructuras de los núcleos o *cores* de O-glicanos tipo mucina y sus modificaciones posteriores.

1. 4. O-manosilación

La O-manosilación ha sido conocida en su mayoría como una modificación en proteínas de la pared celular en levaduras (Strahl-Bolsinger et al, 1999). En mamíferos, sin embargo, la O-manosilación no es un tipo común de modificación postraduccional, y hasta ahora se ha descrito un número limitado de glicoproteínas que portan modificaciones con O-manosa, en el cerebro, nervios y músculo esquelético (Endo, 1999).

Las enzimas protein O-manosiltransferasas tipo 1 y 2 (Pomt1 y Pomt2, respectivamente) inician la adición del azúcar manosa en enlace tipo O- a residuos de Ser/Thr en la cadena polipeptídica (Manya et al, 2004), una reacción conservada en eucariotas, desde hongos hasta mamíferos (Lommel & Strahl, 2009).

En relación a la presente tesis, es interesante destacar que ciertos tipos de distrofia muscular congénita (CMD, por sus siglas en inglés *Congenital Muscular Dystrophy*) se observan cuando ocurre algún defecto en la O-manosilación: se ha reportado que mutaciones en los genes que codifican para POMT1 y POMT2 son causantes del Síndrome de Walker-Warburg (WWS), un desorden del desarrollo autosómico recesivo asociado con CMD y varias alteraciones en el sistema nervioso central (SNC), tal como defectos en la migración neuronal y anormalidades oculares (Beltrán-Valero de Bernabé et al, 2002; van Reeuwijk et al, 2005).

Otra glicosiltransferasa involucrada posteriormente en la O-manosilación es Pomgnt1, responsable de la adición de GlcNAc a O-manosa (GlcNAc α 1-2 a Man α 1-Ser/Thr) (Endo, 1999). Mutaciones en el gen Pomgnt1 indican que esta glicosiltransferasa es responsable del desarrollo de la condición *Muscle-Eye Brain Disease* (MEB), un desorden recesivo autosómico caracterizado por CMD, anormalidades oculares y malformación cerebral. (Yoshida et al, 2001) (Figura 5).

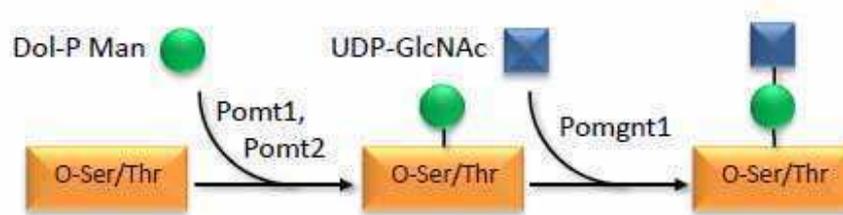


Figura 5. Esquema de los primeros pasos en la biosíntesis de O-manosas

1. 5. O-GlcNAc

La adición del azúcar GlcNAc a Ser/Thr mediante el enlace O-glicosídico (O-GlcNAc) es una modificación postraduccional abundante. En mamíferos, este tipo de O-glicosilación es único en el sentido de que no es modificado a estructuras más complejas y no está restringido a proteínas de secreción o de superficie celular. De hecho, O-GlcNAc puede ser encontrado en varias glicoproteínas nucleares y citosólicas.

La síntesis de O-GlcNAc es catalizada por la enzima O-GlcNAc transferasa (Ogt) a partir de UDP-GlcNAc, mientras que en la remoción del glicano interviene una β -N-acetilglucosaminidasa (O-GlcNAcasa) (Figura 6). La glicosiltransferasa Ogt está codificada por un único gen y es una enzima altamente conservada desde *C.elegans*, hasta ratas y humanos (Lubas et al, 1997).

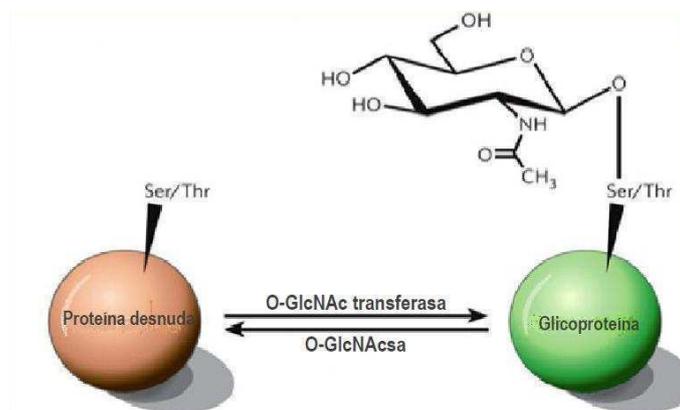


Figura 6. Esquema de la participación de las enzimas involucradas en la adición y remoción de O-GlcNAc

La adición de O-GlcNAc muestra características propias de una modificación regulatoria y varios trabajos han demostrado una relación recíproca e inhibitoria entre la fosforilación y la adición de O-GlcNAc. Ambas modificaciones comparten ciertas características tal como, los residuos y proteínas que modifican, la naturaleza dinámica e inducible y la existencia de enzimas cíclicas (Slawson et al, 2006; Tallent et al, 2009).

1. 6. O-fucosilación

La enzima protein O-fucosiltransferasa 1 (Pofut1) cataliza la adición de fucosa a partir de GDP-Fuc directamente al grupo hidroxilo de residuos de Ser/Thr, solamente en proteínas que contienen dominios similares al Factor de Crecimiento Epidérmico (*EGF-like repeats*) (Harris & Spellman, 1993).

En mamíferos existe un único gen Pofut1 (Wang et al, 2001), el cual parece tener una regulación diferencial durante el desarrollo neuromuscular y del cerebro (Kim et al, 2008). A su vez, en gliomas (un tipo de tumor que se origina en el cerebro o en médula espinal) se ha observado una sobre regulación significativa del gen Pofut1 en comparación con cerebros normales (Kroes et al, 2007).

Además de las repeticiones EGF, existe O-fucosilación en otro dominio proteico pequeño (aproximadamente 60 aminoácidos) pero diferente a las repeticiones EGF: las repeticiones Trombospondin tipo-1 (TSR, *Thrombospondin-1 repeat*) (Hofsteenge et al, 2001). La enzima homóloga de Pofut1 conocida como protein O-fucosiltransferasa 2 (Pofut2) cataliza la adición de fucosa mediante un enlace α a Ser/Thr en las repeticiones TSR (Luo et al, 2006).

1. 7. Sinapsis

Las funciones de señalización críticas del cerebro –el procesamiento de la información sensorial, las respuestas emocionales y motoras y, el aprendizaje y procesamiento de la memoria- dependen de la conexión entre las neuronas, que es la unidad de organización en el SNC (Kandel, 1995). La sinapsis es el sitio de conexión entre una neurona presináptica y otra postsináptica (Figura 7).

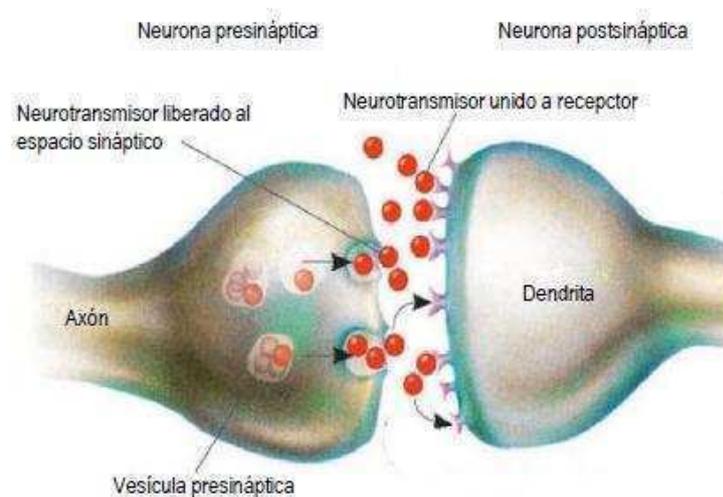


Figura 7. Sinapsis química en el SNC. Básicamente, la comunicación está mediada por una especie química, un neurotransmisor, el cual es sintetizado en la célula presináptica (axón) y liberado en respuesta a la excitación de la neurona presináptica. El neurotransmisor luego difunde a través del espacio sináptico, donde se une a receptores específicos sobre la célula postsináptica (dendrita) desatando la vía de señalización correspondiente.

Uno de los atributos fundamentales del cerebro es su gran plasticidad sináptica, es decir, la alteración en la naturaleza, fuerza o número de contactos sinápticos entre las conexiones interneuronales en respuesta a la actividad neuronal. Esta característica es esencial para la formación y función de los circuitos neurales. Esta idea se enmarca dentro de la hipótesis postulada por Donald Hebb (Hebb, 1949). Básicamente, el aprendizaje de tipo hebbiano indica que cuando ocurre el aprendizaje, se produce un cambio en la conectividad neural, llevado a

cabo por la modulación de fuerzas sinápticas particulares. Esta modulación puede ser transitoria, en cuyo caso la memoria para la experiencia aprendida no es retenida (memoria de corto término) o puede ser convertida en modificaciones más permanentes (memoria de largo plazo).

1. 7. 1. Neuroglicobiología

La composición de las superficies celulares en varios tejidos animales ha sido caracterizada como cubierta por una capa rica en carbohidratos (Rambourg ,1966). Esta ubicación particular ha brindado una base suficientemente firme como para afirmar que los azúcares de superficie participan en procesos de reconocimiento celular y de adhesión durante el desarrollo y en tejidos no neurales (Haltiwanger & Lowe 2004).

En el sistema nervioso, la gran complejidad de las conexiones intercelulares (migración celular, crecimiento y proliferación de axones, regeneración y plasticidad sináptica), requiere una alta especificidad y diversidad de interacción, en el cual se ha propuesto que la glicobiología de la sinapsis juega un rol importante (Martin, 2002; Shapiro et al, 2007).

Los glicanos son abundantes en la estructura sináptica, asociados principalmente a moléculas de adhesión (Yamaguchi, 2002). La Molécula de Adhesión Celular Neural (NCAM, *Neural Cell Adhesion Molecule*) es una glicoproteína cuya modificación postraducciona con ácidos polisiálicos (polímeros lineales de Ácido Siálico en α 2-8, PSA-NCAM) varía en distintas etapas del neurodesarrollo (Rutishauser & Landmesser, 1996) y ha sido implicada también en plasticidad sináptica dependiente de actividad y procesos de memoria en la adultez (Murphy & Regan, 1998; López-Fernández et al, 2007). La gran carga negativa de las cadenas de ácido polisiálico (PSA) modula las propiedades funcionales de NCAM, y se ha postulado que promueve el crecimiento de neuritas y la movilidad celular (Rutishauser & Landmesser, 1996; Doherty et al, 1990).

Muchos autores han vinculado a los glicanos (asociados a glicoconjugados) con un rol modulador dentro de los mecanismos moleculares de unión o interacción celular en procesos tales como migración neuronal, orientación de axones y formación de sinapsis (Kleene & Schachner, 2004; Kalovidouris et al, 2005; Murrey et al, 2006), también como en procesos cognitivos de aprendizaje y memoria (Yoshihara et al, 2009).

1. 7. 2. Glicobiología y aprendizaje

Como ya indicaba Bogoch (Bogoch, 1968), la codificación de la información en el cerebro tiene bases moleculares y no moleculares que generalmente incluye:

- Participación temporal de diferentes regiones del cerebro,
- Las trazas mnésicas están contenidas en neuronas,
- La memoria está mediada por cambios morfológicos,
- Crecimiento de procesos celulares nerviosos,
- Generación de nuevas neuronas,
- Producto de eventos sinápticos,
- Codificación en ácidos nucleicos (ADN y ARN) y proteínas,
- ***Y también, codificación en azúcares neurales.***

De esta manera, sugiere a la glicobiología del sistema nervioso como un código que representa otra dimensión de información, el cual puede contribuir al establecimiento y remodelación de nuevas sinapsis que subyacen al aprendizaje y el procesamiento de la memoria.

En los 70s, Routtenberg y colaboradores estudiaron el metabolismo de glicoproteínas en varias regiones del cerebro de rata en respuesta a una experiencia de aprendizaje de evitación inhibitoria (EI), un aprendizaje asociativo. Mediante el uso de un marcador específico de glicoproteínas ($[^3\text{H}]$ Fucosa), demostraron

alteraciones en la incorporación de Fucosa sobre ciertas proteínas en el estriado y en la corteza temporal de animales que aprendieron la tarea. De acuerdo a los autores, el análisis estuvo enfocado en glicoproteínas sinaptosomales, principalmente debido a la alta concentración de macromoléculas modificadas con azúcares en las uniones sinápticas (Routtenberg et al, 1974).

Por otra parte, en pollos, Rose (Rose, 1989) describió una incorporación aumentada de Fucosa a un subgrupo de glicoproteínas de la sinapsis luego de que los animales fueran entrenados en una tarea de El. La especificidad de la fucosilación asociada al aprendizaje quedó demostrada con la inyección de 2D-Gal (un inhibidor competitivo de galactosa que evita la posterior fucosilación): cuando los pollos fueron evaluados para la tarea 24 horas luego del entrenamiento, el inhibidor de la fucosilación produjo amnesia (Sukumar et al, 1980; Rose & Jork, 1987).

1. 8. Marco teórico e hipótesis de trabajo

La participación de los glicanos en interacciones celulares neurales en el sistema nervioso en desarrollo y adulto es cada vez más reconocida, en diversos modelos de experimentación. La importancia del entendimiento de la regulación de la expresión de los glicanos en el sistema nervioso de mamíferos se pone de manifiesto debido a la participación de los mismos en las enfermedades de glicosilación caracterizadas por malformaciones en el desarrollo del cerebro y desarreglos neuronales en la corteza.

Los glicanos son particularmente abundantes en las estructuras sinápticas, sitio de comunicación entre las neuronas.

La biosíntesis de glicanos está caracterizada por tener varios puntos de regulación.

El procesamiento en el cerebro de un potencial inductor de plasticidad sináptica involucra una serie de eventos moleculares y celulares a nivel sináptico, entre los cuales se ha descrito la participación de glicoconjugados.

El concepto de que las modificaciones en el estado de glicosilación de las células subyacen en algún punto a los mecanismos de almacenamiento de la información es atractivo en su simplicidad y permitiría explicar, dado el alto dinamismo característico de la maquinaria celular de glicosilación y su abundancia en las sinapsis neuronales, su participación en la remodelación de la conectividad sináptica, la cual es un requisito en los eventos de aprendizaje y memoria.

Basado en este marco teórico, la **hipótesis de trabajo** de esta tesis fue:

Dado la relevancia de los glicanos en interacciones celulares en cerebro y su abundancia en estructuras sinápticas, la glicobiología del hipocampo y de la corteza de cerebros de rata debería ser modulada por dos modelos inductores de plasticidad neuronal con diferentes impactos en el cerebro como son el Enriquecimiento Ambiental por un lado, y la Evitación Inhibitoria por el otro. En particular, los efectos se manifestarían a nivel de uno de los principales puntos de regulación de la biosíntesis de glicanos: la expresión de los genes de glicosiltransferasas y en sus productos, las estructuras oligosacáridas.

1. 9. Objetivos

Para contrastar esta hipótesis, se plantearon los siguientes **objetivos generales**:

En dos modelos distintos, el Enriquecimiento Ambiental (EA) y la Evitación Inhibitoria (EI), evaluar en el cerebro de ratas la respuesta de la O-glicosilación, un tipo de glicosilación poco estudiado en relación a cambios neuronales.

Los **objetivos específicos** fueron:

- 1) Identificar un posible patrón de distribución de las estructuras glicanas en el hipocampo y corteza de ratas normales, a fin de establecer un parámetro de comparación con los modelos experimentales de EA y EI.
- 2) Determinar el patrón de distribución de glicanos en el hipocampo y corteza de ratas en EA y EI.
- 3) Estudiar el comportamiento de expresión de genes de diferentes glicosiltransferasas (GTs) dentro de varias formas de O-glicosilación: a) tipo mucina, b) O-manosilación, c) O-fucosilación, y d) O-GlcNAc, en cada condición experimental.
- 4) Antes de las diferencias observables en la expresión de genes de GTs, analizar la expresión proteica de las enzimas en cada condición experimental.

Capítulo II

Enriquecimiento ambiental

2. 1. Introducción

En 1949, el reconocido neuropsicólogo Donald Hebb decidió llevar algunas ratas de su laboratorio a su hogar, las dejó correr libremente en su casa y jugar con sus hijos por algunas semanas. Luego de este tiempo, las devolvió al laboratorio y notó que las ratas expuestas a la gran variedad de estímulos que le ofrecía su hogar en comparación con las ratas que habían permanecido en el laboratorio en una simple y pequeña caja, tenían una mejor habilidad para resolver ciertas tareas cognitivas. Encontró que los animales mejoraron su habilidad para aprender. Hebb concluyó que “una experiencia rica (en estímulos sensoriales, visuales, físicos) de una mascota durante el desarrollo le da más capacidad de aprovechar una nueva experiencia en la madurez”. Estas ideas empezaron a formar la base de uno de los conceptos más sólidos en la psicología del desarrollo y estimularon los estudios sobre los efectos del enriquecimiento ambiental en el desarrollo neural (revisado en Brown & Milner, 2003).

El primer experimento controlado sobre **enriquecimiento ambiental** (EA) fue realizado a principios de los 60s en el laboratorio de Mark Rosenzweig en la Universidad de California, Berkeley. En ese trabajo demostraron claramente efectos neuroanatómicos y neuroquímicos en la corteza cerebral y, a su vez, mejoras en el rendimiento cognitivo asociados a la exposición de ratas a condiciones de **complejidad ambiental** (tal es el término que utilizaron en su momento para referirse al EA) (Krech et al, 1962).

A nivel experimental, se hace referencia al EA como a las condiciones de alojamiento con mayor estimulación y experiencias distintas en comparación a las condiciones estándar, lo que en conjunto brinda al sujeto experimental mayores oportunidades de **aprendizaje informal**. Típicamente, se utiliza roedores, pero también está descrito su uso en otros animales, como perros (Siwak-Tapp et al, 2008) y primates (Kozorovitskiy et al, 2005).

En el caso de roedores, los animales son alojados en jaulas más grandes y el ambiente es complejo en el sentido de que ofrece más **actividad motora** (movimientos exploratorios de la jaula, interacción con rampas, posibilidad de trepar y ruedas de ejercicio [*running wheels*]), **sensorial** (interacción con objetos de tamaños y formas diferentes, acceso a alimentos alternativos a la comida balanceada normal) y **cognitiva** (por ejemplo, la codificación de información relacionada con la ubicación y posicionamiento de los objetos y la novedad del ambiente). Por otra parte, el ambiente estándar consiste en la jaula común de laboratorio, con acceso a agua y comida balanceada normal. Otra condición experimental que se suele utilizar como caso extremo de poca estimulación, es el alojamiento individual y aislado de los animales en jaulas estándar (Black & Greenough, 1998) (Figura 8).

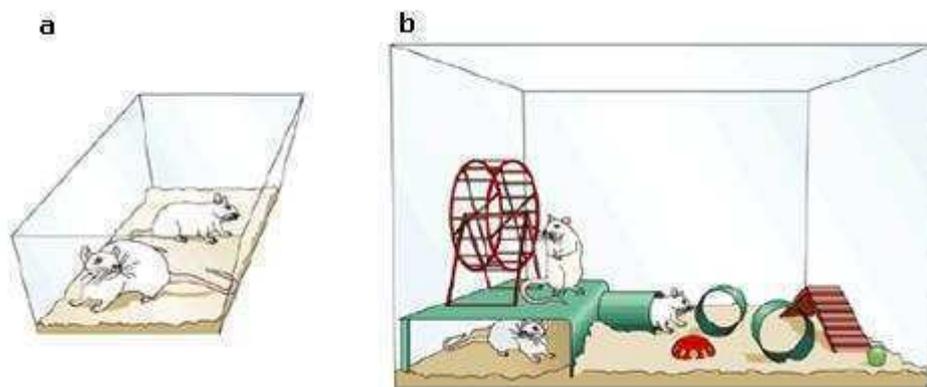


Figura 8. Condiciones de alojamiento estándar (a) y de enriquecimiento ambiental (b) en el laboratorio. Adaptado de Döbrössy & Dunnett, 2001.

2. 1. 1. Efectos morfológicos

Diversos estudios en los cuales la complejidad del ambiente fue manipulada han indicado efectos a nivel microscópico y macroscópico en la estructura del cerebro, en distintas especies (Figura 9).

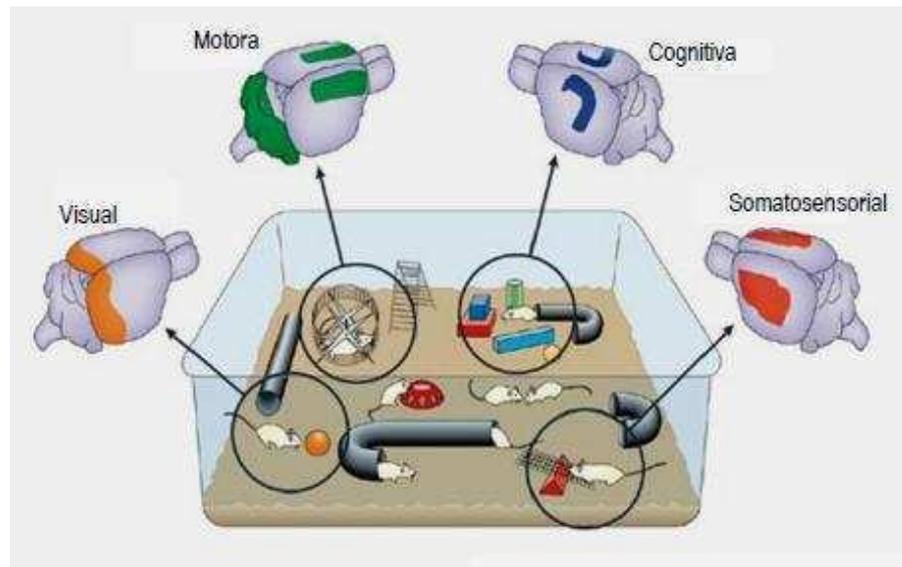


Figura 9. Efectos del EA sobre varias zonas del cerebro de roedores. Adaptado de Nithianantharajah & Hannan, 2006.

En ratas, luego de 30 días en condiciones estándar o enriquecidas, se observó un aumento en el grosor de la corteza cerebral en los animales expuestos al EA en comparación con el control. Mediante estudios más detallados, se determinó que el grosor cortical se debía a varios factores, entre ellos un aumentado tamaño de las células nerviosas y aumento en el engrosamiento postsináptico (Diamond et al, 1964). A su vez, estos trabajos iniciales comenzaron a sugerir la posible existencia de diferencias en el número de conexiones sinápticas. De hecho, se reportaron diferencias de hasta el 20% en la cantidad de dendritas por neurona (o sea, la cantidad de superficie disponible para las sinapsis) en la corteza visual superior de ratas expuestas al EA en comparación con animales aislados (Greenough & Volkmar, 1973).

Uno de los efectos más interesantes desde el punto de vista funcional, es la capacidad del EA de inducir neurogénesis. En mamíferos adultos, la neurogenesis es un proceso que ocurre en el giro dentado (GD) del hipocampo y en la zona subventricular; a partir del cual se generan nuevas neuronas cuya función y mecanismos que lo regulan no están del todo definidas (van Praag et al, 2002; Ming & Song, 2011). Kempermann y colaboradores observaron que la plasticidad neuronal, inducida por la exposición de ratones al EA por un lapso de 40 días, se manifestó en un aumento en la cantidad de nuevas neuronas granulares en el GD (Kempermann et al, 1997).

2 1. 2. Efectos neuroquímicos

La expresión de genes cuyos productos están involucrados en funciones sinápticas y de plasticidad celular también son alterados por la estimulación ofrecida por el EA (revisado en Rampon et al, 2000). En cuanto a las neurotrofinas (proteínas que controlan funciones y plasticidad sinápticas, además de modular la supervivencia neuronal), se ha observado que el EA aumenta los niveles de *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF, por sus siglas en inglés), *Nerve Growth Factor* (NGF) y *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor* (GDNF) (Pham et al, 1999; Kuzumaki, 2011).

En consistencia con el aumento en la sinaptogénesis inducida por el enriquecimiento, los efectos del EA también se reflejan en incrementos en la expresión de proteínas sinápticas, tal como la proteína presináptica *Synaptophysin* y la proteína de la densidad postsináptica (PSD-95) (Nithianantharajah et al, 2004).

2 1. 3. Efectos comportamentales

La importancia del ambiente en la regulación del comportamiento ha sido reflejada en modelos animales de estrés y ansiedad. La exposición de ratas a factores estresantes en una etapa temprana produce respuestas comportamentales similares a depresión y ansiedad en la adultez lo cual se refleja, entre otras cosas, en deficiencias cognitivas (Tsoory et al, 2007). Sin embargo, los animales con una experiencia estresante temprana pueden revertir las deficiencias de aprendizaje si son expuestos a condiciones de EA (Ilin & Richter-Levin, 2009; Cui et al, 2006). Varios trabajos resaltan además la importancia de las condiciones positivas del EA al facilitar la abstinencia y evitar relapsos en la adicción a cocaína en modelos animales de adicción (Solinas et al, 2008; Chauvet et al, 2009).

2 1. 4. Efectos sobre injurias en el SNC

Diversos estudios en modelos experimentales de trauma y lesiones cerebrales han demostrado que la exposición a condiciones de EA facilita la regeneración y la recuperación de funcionalidad. Luego de la oclusión de la arteria cerebral media en ratas (modelo de isquemia cerebral focal), el alojamiento en condiciones de EA produjo mejoras significativas en el resultado funcional (mejores parámetros de coordinación motora) en los animales isquémicos en comparación con animales isquémicos en condiciones estándar (Johansson, 1996).

La injuria cerebral traumática inducida por explosión (bTBI, por *Blast-induced Traumatic Brain Injury*), caracterizada por dificultades en la memoria y elevados niveles de ansiedad, es una causa principal de discapacidad entre los soldados de conflictos recientes (Warden, 2006). Mediante el uso de un modelo de bTBI en ratón se determinó que, luego de alojar en condiciones de EA a ratones con trauma, estos mostraron una mejora significativa en una tarea de memoria espacial, mientras que

los animales con trauma y alojados en condiciones estándar seguían mostrando dificultades persistentes de memoria (Kovesdi et al, 2011).

La abundante evidencia existente sobre el EA en diversos animales de experimentación indica que la manipulación del entorno produce tiene el potencial de inducción de plasticidad sináptica en el cerebro, reflejada en varios niveles: molecular y celular (diferencias en la expresión de neurotrofinas, neurotransmisores, proteínas sinápticas, generación de nuevas células), anatómico (mayor número de dendritas, mayor grosor de la corteza) y comportamentales (mejores rendimientos en tareas cognitivas). Estos resultados beneficiosos se observan tanto en animales intactos como en modelos de injuria cerebral.

RESULTADOS

2. 2. Resultados

2. 2. 1. Desempeño conductual de ratas sometidas a EA

Uno de los primeros objetivos de esta tesis doctoral fue establecer el modelo de Enriquecimiento Ambiental (EA) en ratas machos adultas. En base a la bibliografía existente sobre el tema, se determinó primero la influencia del EA en el desempeño de las funciones cognitivas de los animales.

Luego de 7 días en cada condición experimental (enriquecimiento ambiental y control), se entrenó a distintos grupos de ratas en diferentes tareas reconocidas en la evaluación de memoria espacial, memoria episódica y aprendizaje asociativo, como se detalla a continuación.

2. 2. 1. 1. Laberinto acuático de Morris

El laberinto acuático, también conocido por MWM (por sus siglas en inglés, *Morris Water Maze*) es una tarea de aprendizaje espacial para roedores, el cual se basa en la navegación y orientación mediante claves visuales para encontrar una plataforma de escape sumergida (Morris R, 1984). El aprendizaje espacial se puede determinar a través de ensayos repetidos, de tal manera que el tiempo en encontrar la plataforma es una función decreciente dependiente del número de ensayos.

La observación de los contrastes multivariados en el análisis de medidas repetidas, indicó que los factores intra-sujeto (tiempo y ensayo) son variables a tener en cuenta en el modelo, dado que muestran significancia estadística ($p < 0.05$). No sucediendo lo mismo con el factor inter-sujeto (Grupo), el cual no mostró significancia estadística en ningún caso.

La curva de adquisición del aprendizaje espacial reveló que tanto el grupo Enriquecido como el Control mostraron una disminución en el tiempo necesario para escapar del agua a la plataforma durante el procedimiento, lo cual indica que ambos grupos experimentales resolvieron la tarea. Las curvas no fueron significativamente

diferentes, lo cual indicaría que la exposición al EA no influyó en las habilidades cognitivas evaluadas mediante esta tarea (Figura 10).

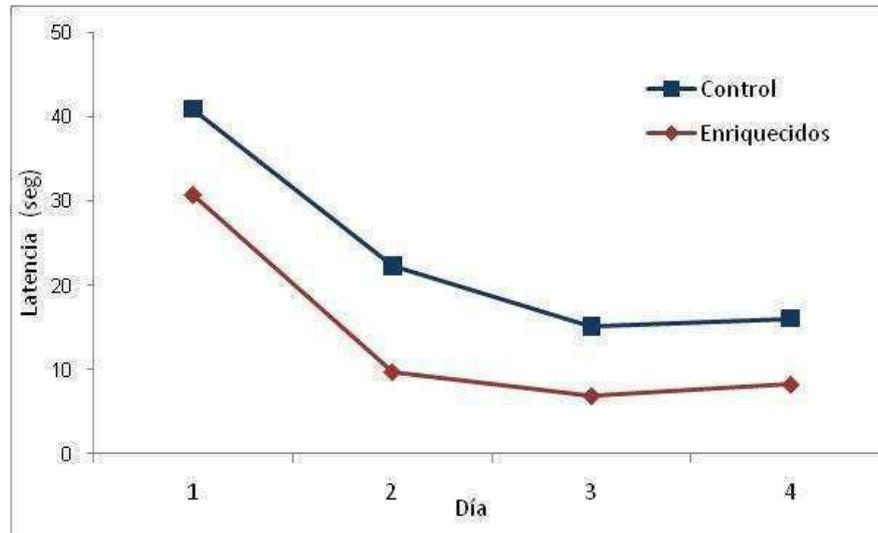


Figura 10. Tiempo en localizar una plataforma sumergida a través de los días. Los datos están expresados en valores medios marginales. Control n = 8, Enriquecidos n = 7.

2. 2. 1. 2. Reconocimiento de objetos

La tarea de reconocimiento de objetos, o también conocida como NOR (por sus siglas en inglés, *Novel Object Recognition*) evalúa la habilidad del animal de experimentación en reconocer un objeto novedoso sobre uno ya conocido (familiar) durante cierto tiempo, habilidad que ha sido denominada *memoria de reconocimiento*. El NOR se basa en el impulso exploratorio intrínseco de la rata para investigar estímulos nuevos (Ennaceur & Delacour, 1988).

Luego de cada condición experimental, se expuso a los animales a un ensayo de entrenamiento o familiarización (como se indica en Materiales y Métodos). Brevemente, se expuso a cada animal a dos objetos idénticos y se les permitió explorarlos libremente durante 5 minutos. Durante esta etapa de entrenamiento, ninguno de los dos grupos mostró diferencias en la exploración de

los objetos similares (Control: $22,83 \pm 3,52$ s vs. Enriquecidos: $20,30 \pm 2,28$ s), lo cual validaría que la exploración posterior en la fase de evaluación se debe a una mayor o menor habilidad de reconocimiento y no a una falta de motivación exploratoria.

Luego de 24 horas, los resultados en el ensayo de evaluación indicaron que del tiempo total de exploración, las ratas del grupo Enriquecido exploraron en mayor porcentaje al objeto novedoso ($56,6\% \pm 4$) en comparación con el grupo Control ($34,6\% \pm 3,9$, $F(1,14) = 15.11$, $p < 0.01$), lo cual indicaría una mejor habilidad cognitiva evaluada a través de esta tarea de reconocimiento (Figura 11)

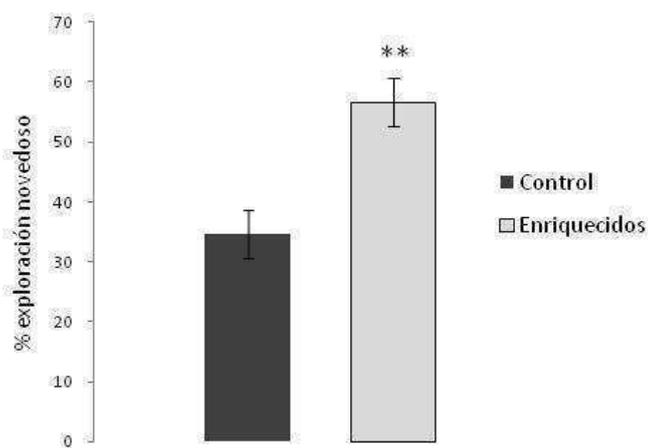


Figura 11. El enriquecimiento ambiental aumenta la memoria de reconocimiento. Porcentaje del tiempo total de exploración del objeto novedoso. El desempeño de cada grupo experimental fue evaluado 24hs después del entrenamiento. Control $n = 8$, Enriquecidos $n = 8$.

2. 2. 1. 3. Evitación inhibitoria

Luego del alojamiento en condiciones de enriquecimiento ambiental y control, un grupo de ratas fueron entrenadas en una tarea de evitación inhibitoria (EI), en la cual aprenden a evitar un contexto asociado a un estímulo negativo (detallado en Materiales y Métodos). Brevemente, el animal es colocado sobre una plataforma en el dispositivo de entrenamiento (contexto), se deja explorar el mismo, e

inmediatamente después de que la rata baja de la plataforma hacia una rejilla de metal, recibe un choque eléctrico suave en las patas. Luego, en la sesión de evaluación, el choque es omitido y la latencia del animal en bajar de la plataforma es considerada como un índice de aprendizaje.

En la sesión de entrenamiento, los animales del grupo Enriquecido tuvieron latencias similares al grupo Control en bajar de la plataforma ($U = 95$, $p = NS$), lo cual indica que la actividad exploratoria innata de los animales es normal y no está alterada por su condición experimental.

En el ensayo de retención de la tarea (24 hs luego del ensayo inicial de entrenamiento) el grupo Enriquecido, contrariamente a lo que se hubiera esperado, tuvo una tendencia a presentar latencias menores que el grupo Control. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($U=56$, $p > 0.05$, Figura 12).

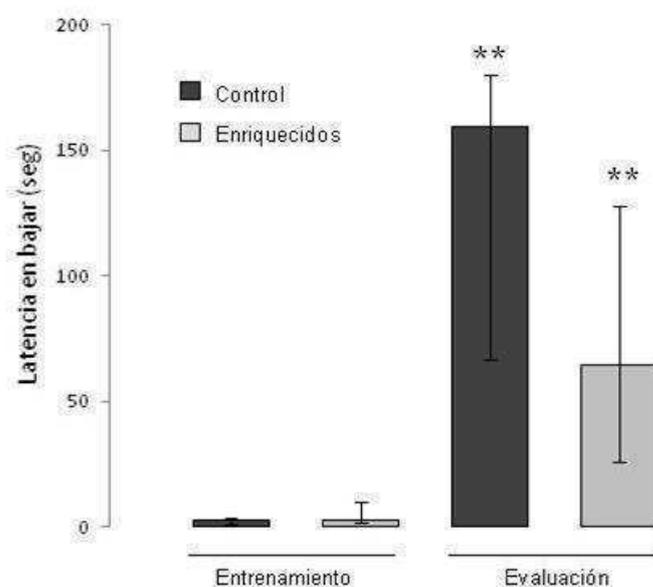


Figura 12. Desempeño de ratas durante la sesión de entrenamiento y evaluación de una tarea de Evitación Inhibitoria. Los datos están representados en medianas y sus respectivos rangos intercuartiles. ** $p < 0.01$ con respecto al entrenamiento. Control $n=16$, Enriquecidos $n=12$.

2. 2. 2. Efectos del enriquecimiento ambiental en la expresión de glicanos en el cerebro de ratas

Una vez que el modelo de enriquecimiento ambiental fue determinado a nivel cognitivo, y por lo tanto, es de esperar que lo es también a nivel del SNC, el siguiente objetivo de esta tesis doctoral fue estudiar si luego de la exposición a condiciones de EA se producirían alteraciones en el patrón de expresión de glicanos en el cerebro de las ratas.

Dentro del análisis de la estructura de los glicoconjugados, la introducción de la técnica de lectina-histoquímica de oligosacáridos mediante proteínas de origen vegetal que reconocen y se unen específicamente a carbohidratos, ha sido muy valiosa desde el punto de vista de la información espacial y temporal, la demostración de la enorme variabilidad de los azúcares y el monitoreo de las posibles modificaciones en la estructura del árbol oligosacárido en varios tejidos adultos y embrionarios.

Estas sustancias, conocidas como lectinas o aglutininas, son proteínas de origen animal o vegetal, de origen no inmunológico que tienen la capacidad de aglutinar células y/o precipitar glicoconjugados mediante la unión específica y reversible a azúcares. Cuando están conjugadas a una marca visible en microscopía de luz o electrónica, las lectinas sirven como agentes histoquímicos para visualizar de manera selectiva estructuras oligosacáridas asociadas a glicoconjugados (van Damme et al, 1998).

La figura 13 indica un corte histológico representativo donde se evaluaron las marcas de lectinas.

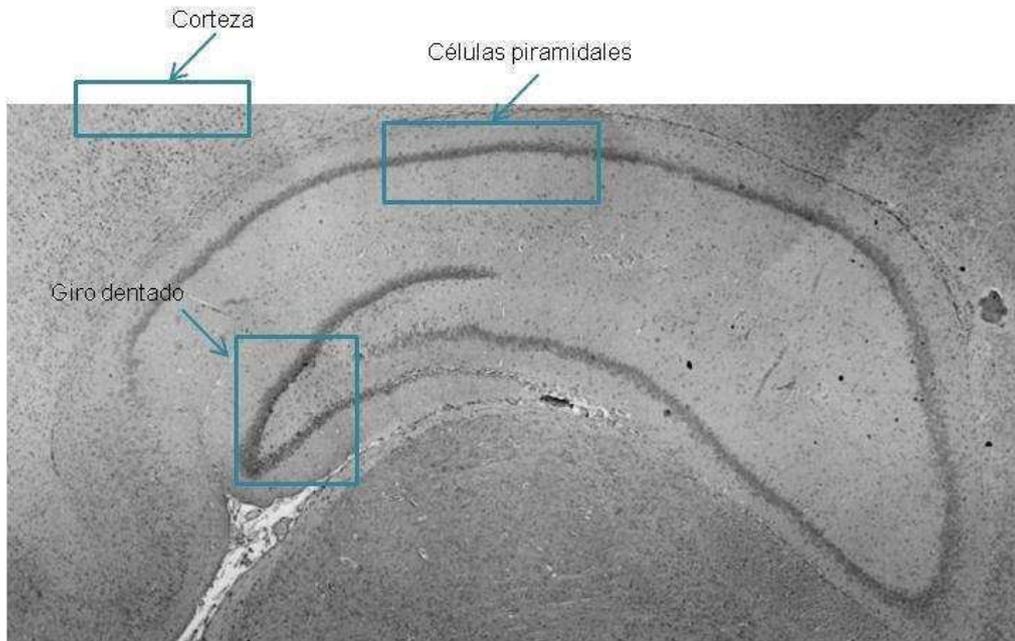


Figura 13. Sección frontal de cerebro de rata adulta, teñida con hematoxilina-eosina. En recuadros se marcan las zonas que fueron evaluadas para el análisis de marcación con lectinas. Magnificación 4X. Bregma: - 4.8 mm. Adaptado de Paxinos & Watson, 1998.

A continuación se indican los resultados obtenidos para las lectinas usadas:

VVL – α/β GalNAc. Esta lectina puede reconocer específicamente al epítopo O-GalNAc, estructura inicial de la vía de O-glicosilación tipo mucina (también conocido como antígeno T, ver Figura 4A). La semicuantificación para la marca de VVL no indicó diferencias entre el grupo Control y Enriquecido en varias regiones analizadas (Figura 14 A). Esta lectina mostró una intensa marca pericelular en algunas células piramidales aisladas en el hipocampo (Figura 15 A y B), además de marcación en las prolongaciones de células en la corteza (Figura 15 C y D). El

citoplasma en las células teñidas para VVL fue negativo, y el neuropilo de las zonas estudiadas tampoco mostró reactividad.

PNA – Gal β 1,3GalNAc. Siguiendo con la biosíntesis de la O-glicosilación tipo mucina, esta lectina reconoce el glicoeptope Gal β 1,3GalNAc que corresponde al *core 1* o antígeno T (ver Figura 4A en Introducción). La semicuantificación para la marca de PNA indicó un aumento significativo solamente en el neuropilo de la corteza de ratas expuestas al EA en comparación con el Control (Figura 14 B, $p < 0.01$) mientras que en el resto de las áreas estudiadas, no hubo diferencias entre los grupos. Las células piramidales revelaron una marcación pericelular para esta lectina y citoplasma negativo (Figura 16 A y B). En el Giro Dentado, se observó positividad para PNA en el neuropilo de la capa polimórfica y alrededor de las células granulares (Figura 16 C y D). En la corteza, la marca de PNA se distribuyó en el neuropilo (Figura 16 E y F).

Jacalin – Gal β 1,3GalNAc con/sin NeuAc y *MAL II – NeuAc α 2,3Gal*. Estas dos lectinas reconocen a glicoeptopes posteriores a la estructura *core 1* en la biosíntesis de O-glicanos tipo mucina (ver Introducción Figura 4A). La semicuantificación para las marcas no mostró cambios luego del EA en el patrón de distribución para estas estructuras oligosacáridas en ninguna región analizada (Figura 14 C y D). En la figura 17 se observan las marcaciones para esta lectina.

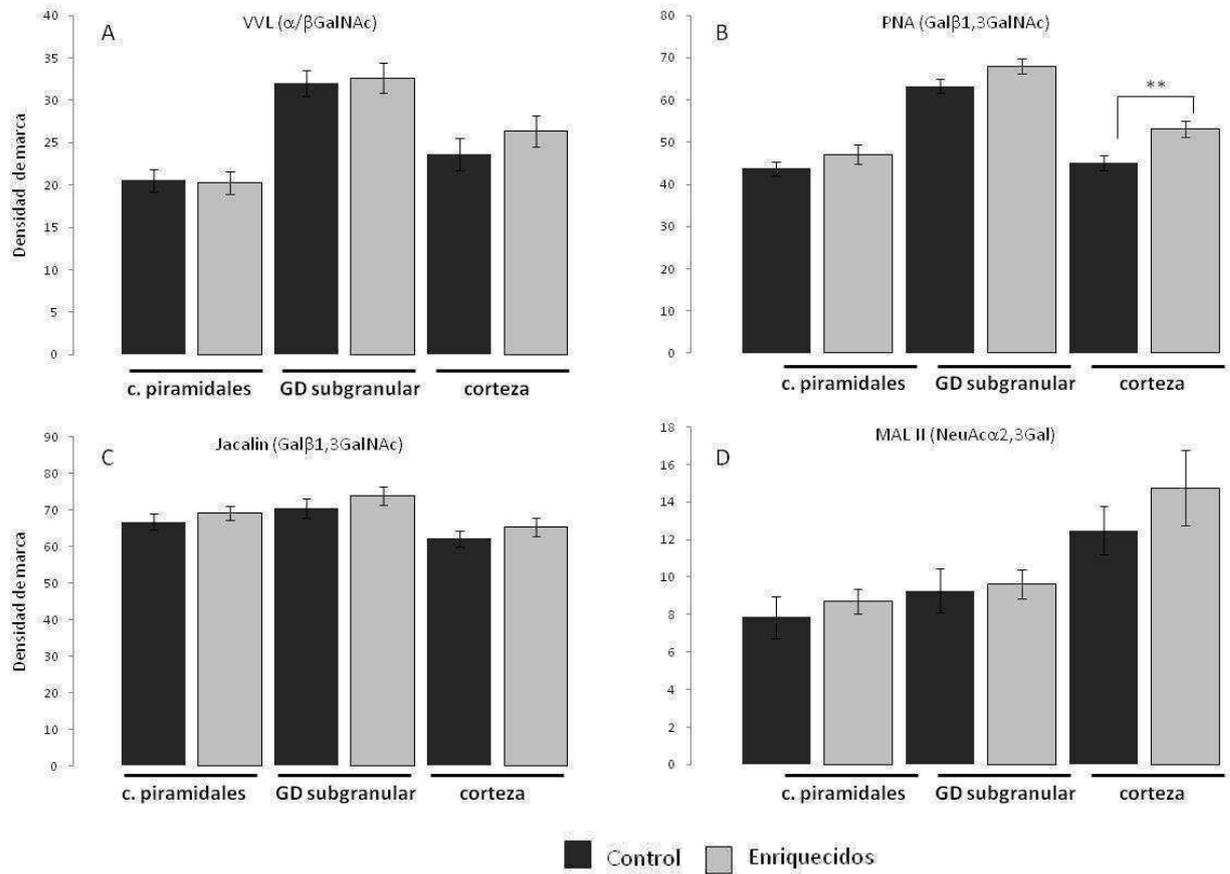


Figura 14. Semicuantificación de marcación para varias lectinas en las células piramidales, capa subgranular y corteza de ratas Control y Enriquecidas. (A) VVL, (B) PNA, (C) Jacalin, (D) MAL II. Los datos están expresados en densidad media \pm error estándar. Control n=6, Enriquecidos n=6. **p < 0.01.

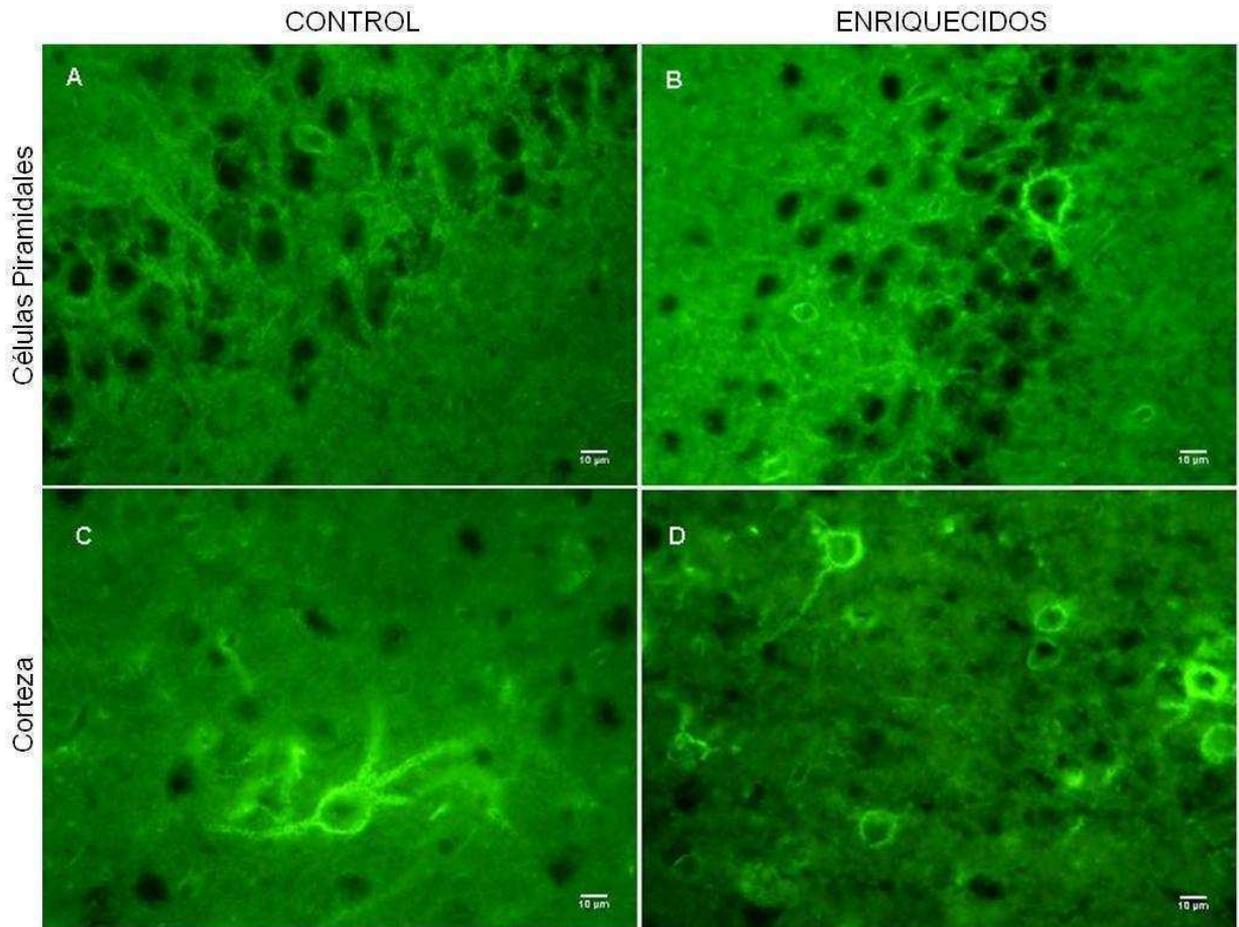


Figura 15. Marcación para VVL, específica para α/β GalNAc en el cerebro de ratas Control (A y C) y Enriquecidos (B y D). Magnificación 40X.

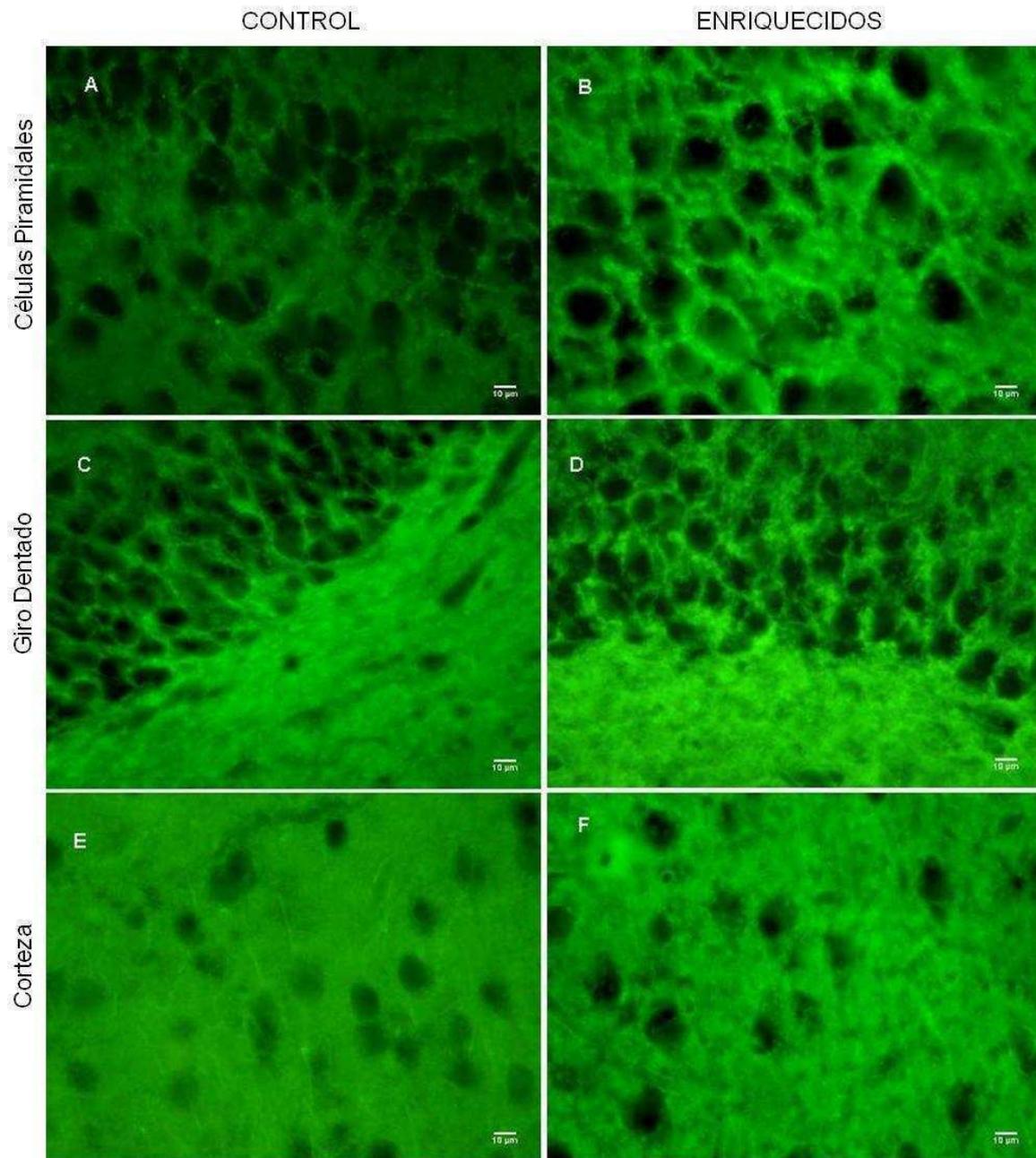


Figura 16. Marcación para PNA, específica para Gal β 1,3GalNAc en el cerebro de ratas Control (A, C y E) y Enriquecidos (B, D y F). Magnificación 40X.

2. 2. 3. Expresión de genes de O-glicosiltransferasas en el hipocampo y corteza de ratas expuestas al EA

Uno de los puntos claves de regulación de la biosíntesis de glicanos es a nivel transcripcional de las glicosiltransferasas. Luego de haber caracterizado la distribución de estructuras oligosacáridas mediante histoquímica de lectinas en el cerebro de ratas expuestas al EA, el siguiente objetivo de esta tesis fue determinar si la condición experimental de EA produciría algún efecto a nivel de expresión de genes de diferentes glicosiltransferasas (GTs) involucradas en varias formas de O-glicosilación: a) tipo mucina, b) O-manosilación, c) O-fucosilación, y d) O-GlcNAc (explicadas en detalle en Introducción General). Para realizar este análisis, se empleó la técnica de *real-time PCR*.

2. 2. 3. 1. O-glicosilación tipo mucina. Efectos sobre el hipocampo.

La biosíntesis de los O-glicanos tipo mucina comienza a partir de la transferencia de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a residuos de Serina o Treonina en la cadena polipeptídica.

La figura 18 indica los pasos de la biosíntesis de O-glicanos tipo mucina y las glicosiltransferasas involucradas en su formación.

La formación del O-GalNAc inicial (denominado también Antígeno Tn) es llevado a cabo por una familia de GalNAc transferasas. Luego, este glicoepitope O-GalNAc será modificado mediante la adición en secuencia de distintos azúcares. El primer azúcar GalNAc adicionado puede ser extendido con otros carbohidratos que incluyen Galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), Fucosa (Fuc) o Ácido Siálico (NeuAc). Dependiendo de los azúcares agregados existen comúnmente cuatro estructuras centrales o *core* en este tipo de O-glicosilación: *core 1* a *core 4*.

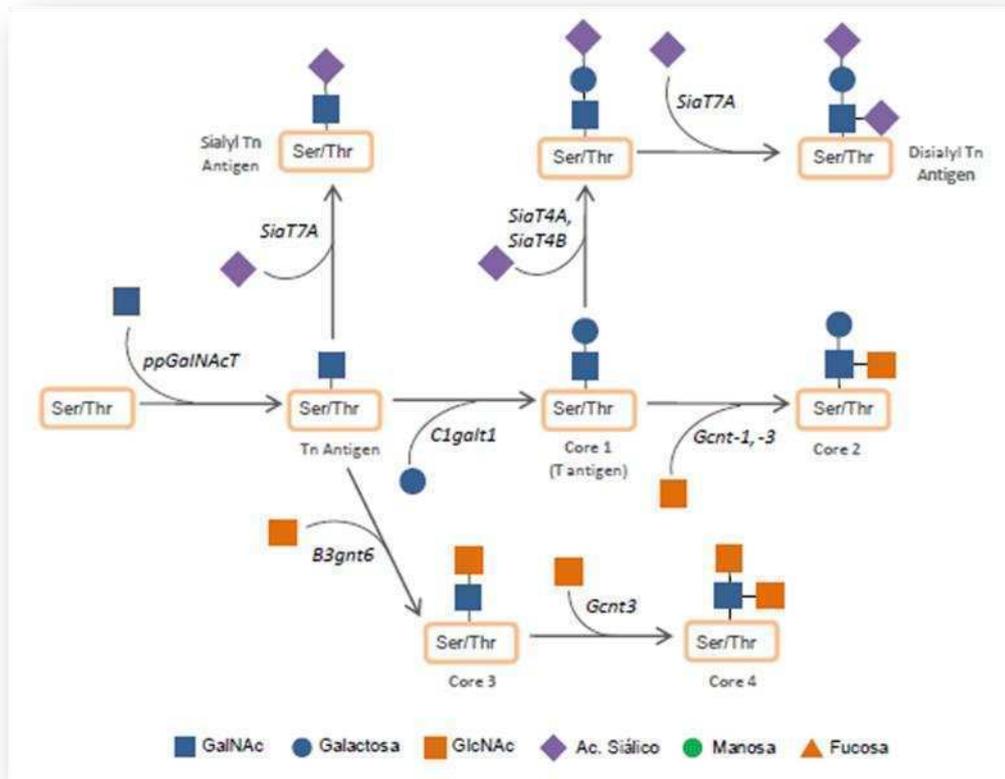


Figura 18. O-glicosilación tipo mucina. Formación del O-GalNAc inicial y modificaciones posteriores. Resaltado en **negrita** se indican las enzimas responsables en cada paso de biosíntesis.

Formación de O-GalNAc inicial.

Los resultados indicaron que en el hipocampo de ratas del grupo Enriquecido no se observaron diferencias significativas con respecto al Control en los niveles de mRNA para ninguna de las glicosiltransferasas que participan en la formación del glicoeptope O-GalNAc inicial ($p > 0.05$, datos no mostrados).

Substituciones posteriores sobre O-GalNAc.

Continuando en los siguientes pasos de la biosíntesis de O-glicanos tipo mucina, se observaron diferencias en los niveles de mRNA para B3Gnt6, una glicosiltransferasa que participa en la formación del *core 3* (GlcNAc β 1,3GalNAc α 1-Ser/Thr): una expresión génica significativamente menor en el hipocampo de ratas del grupo Enriquecido con respecto al Control ($p < 0.01$, Figura 19 A).

Por otra parte, los niveles de expresión génica para la glicosiltransferasa SiaT4A que participa en la sialidación del *core 1* (Sia α 2,3Gal β 1,3GalNAc α 1-Ser/Thr) aumentaron de manera significativa en el hipocampo de ratas del grupo Enriquecido ($p < 0.05$, Figura 19 B).

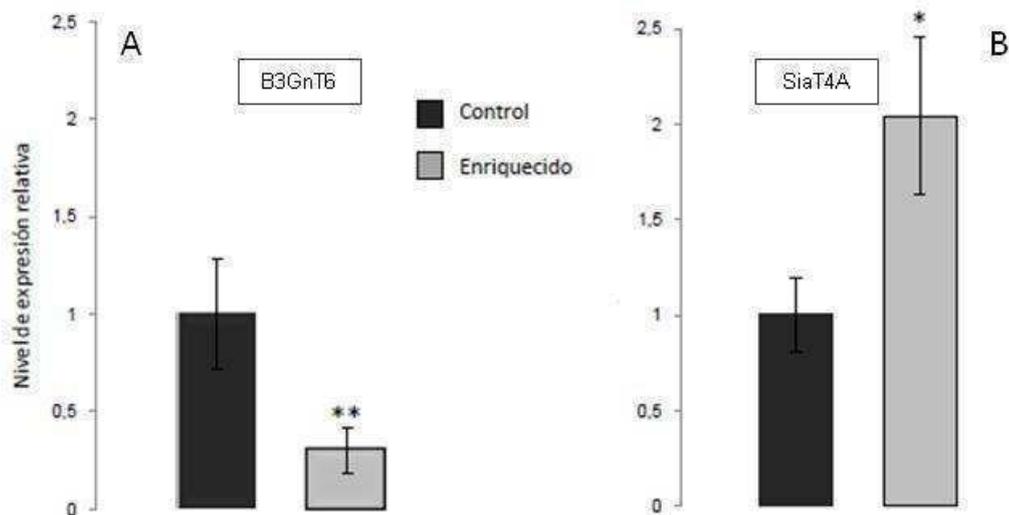


Figura 19. Expresión hipocampal de genes de O-glicosilación tipo mucina alterados por el Enriquecimiento Ambiental. (A) Core 3 sintasa, B3Gnt6 y (B) SiaT4A. La expresión génica de se determinó mediante *real-time PCR*. Los cambios relativos fueron obtenidos al normalizar cada gen al grupo Control. Se grafican valores medios \pm error estándar. Control $n=10$, Enriquecidos $n=12$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

En contraste con las condiciones de EA, otro grupo experimental usado fue el de aislamiento social, con ausencia de la complejidad ambiental y de estimulación. Los resultados en el hipocampo de ratas expuestas a distintas condiciones de alojamiento indicaron que la sialidación presentó una interesante dinámica a nivel génico: mientras que hubo un aumento en el hipocampo luego de condiciones de EA (ver Fig. 19 B), en el grupo Aislado se observó una disminución significativa en los niveles de transcripto de SiaT4A con respecto a las ratas sometidas a EA (Figura 20 A, $p < 0.01$). En cambio, no hubo diferencias con respecto al Control (Figura 20 B, $p > 0.05$). Dada la participación de la sialidación en eventos de plasticidad neural en varios modelos, es importante destacar el comportamiento génico de SiaT4A en el hipocampo de ratas en condiciones tan opuestas, como lo son el EA y el aislamiento.

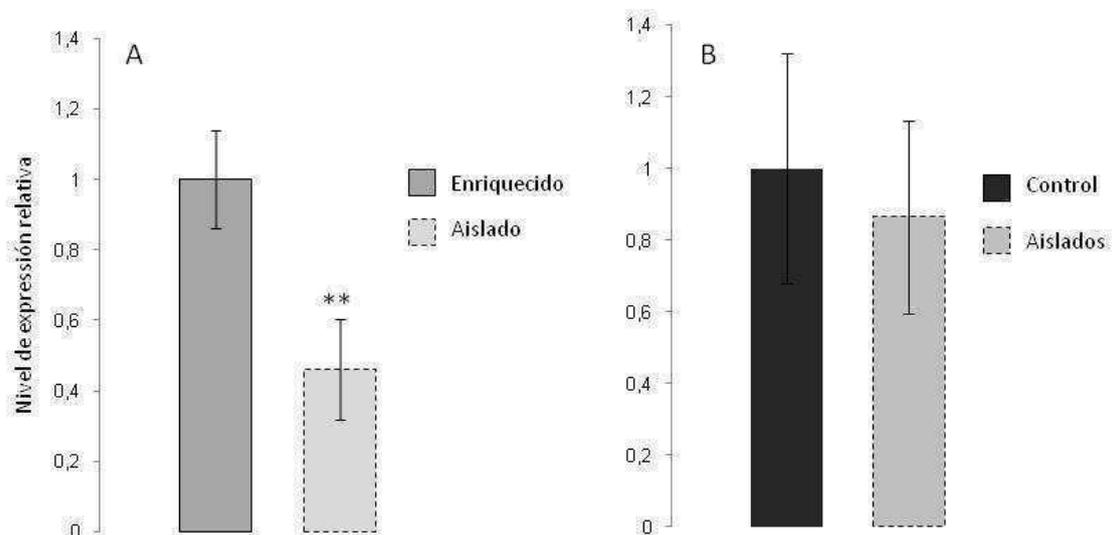


Figura 20. Expresión hipocámpal de la glicosiltransferasa SiaT4A luego de condiciones de aislamiento social. La expresión del gen se determinó mediante *real-time PCR*. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar al grupo Enriquecido (A) o Control (B). Se grafican valores medios \pm error estándar. Control $n = 10$, Enriquecidos $n=12$, Aislado $n=10$. ** $p < 0.01$.

Las restantes glicosiltransferasas indicadas en la Figura 18 no presentaron diferencias de expresión génica en el hipocampo de los grupos experimentales (datos no mostrados).

2. 2. 3. 2. O-glicosilación tipo mucina. Efectos sobre la corteza

Formación de O-GalNAc inicial.

Luego de 7 días en condiciones de EA, dos miembros de la familia de GalNAc-T mostraron cambios en los niveles de transcritos en la corteza: se observó una disminución para Galnt2 ($p < 0.05$) y un aumento significativo para Galnt7 ($p < 0.01$) con respecto al grupo Control (Figura 21).

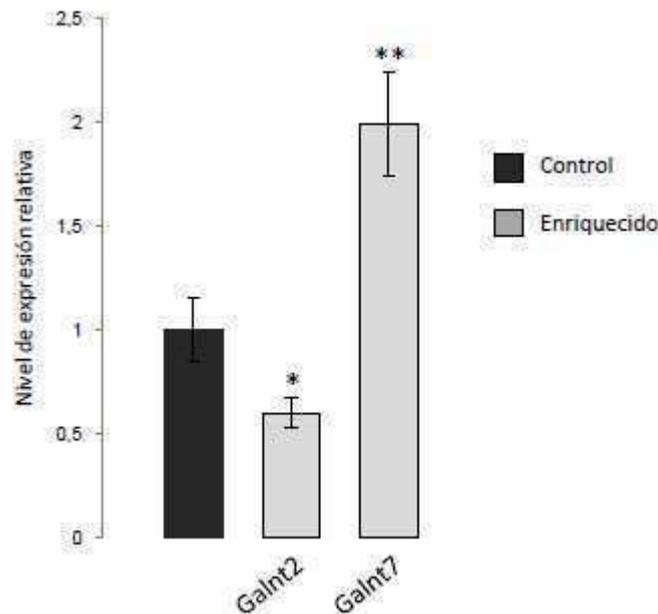


Figura 21. Expresión en corteza de genes iniciadores de la O-glicosilación tipo mucina luego del Enriquecimiento Ambiental. El nivel de transcritos se determinó mediante *real-time PCR*. Los cambios relativos fueron obtenidos al normalizar cada gen al grupo Control. Se grafican valores medios \pm error estándar. Control $n=10$, Enriquecidos $n=12$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Substituciones posteriores sobre O-GalNAc.

A diferencia del hipocampo, en corteza de ratas expuestas al EA se observó la expresión diferencial para una glicosiltransferasa responsable de la formación de otra estructura central; la *core 2 sintasa* o Gcnt1 (Gal β 1,3 [GlcNAc β 1,6]GalNAc α 1–Ser/Thr, ver Figura 18). Los niveles de transcritos para Gcnt1 aumentaron de manera significativa luego de la exposición al EA (Figura 22 A, $p < 0.01$).

A su vez, en la corteza de ratas del grupo Enriquecido se observaron comportamientos opuestos para dos glicosiltransferasas responsables de la sialidación: una disminución significativa en los niveles de mRNA de SiaT4A (Figura 22 B, $p < 0.05$) y un aumento en la expresión génica de otra isoforma de sialiltransferasa que participa en la sialidación del *core 1*: SiaT4B (Figura 22 C, $p < 0.01$).

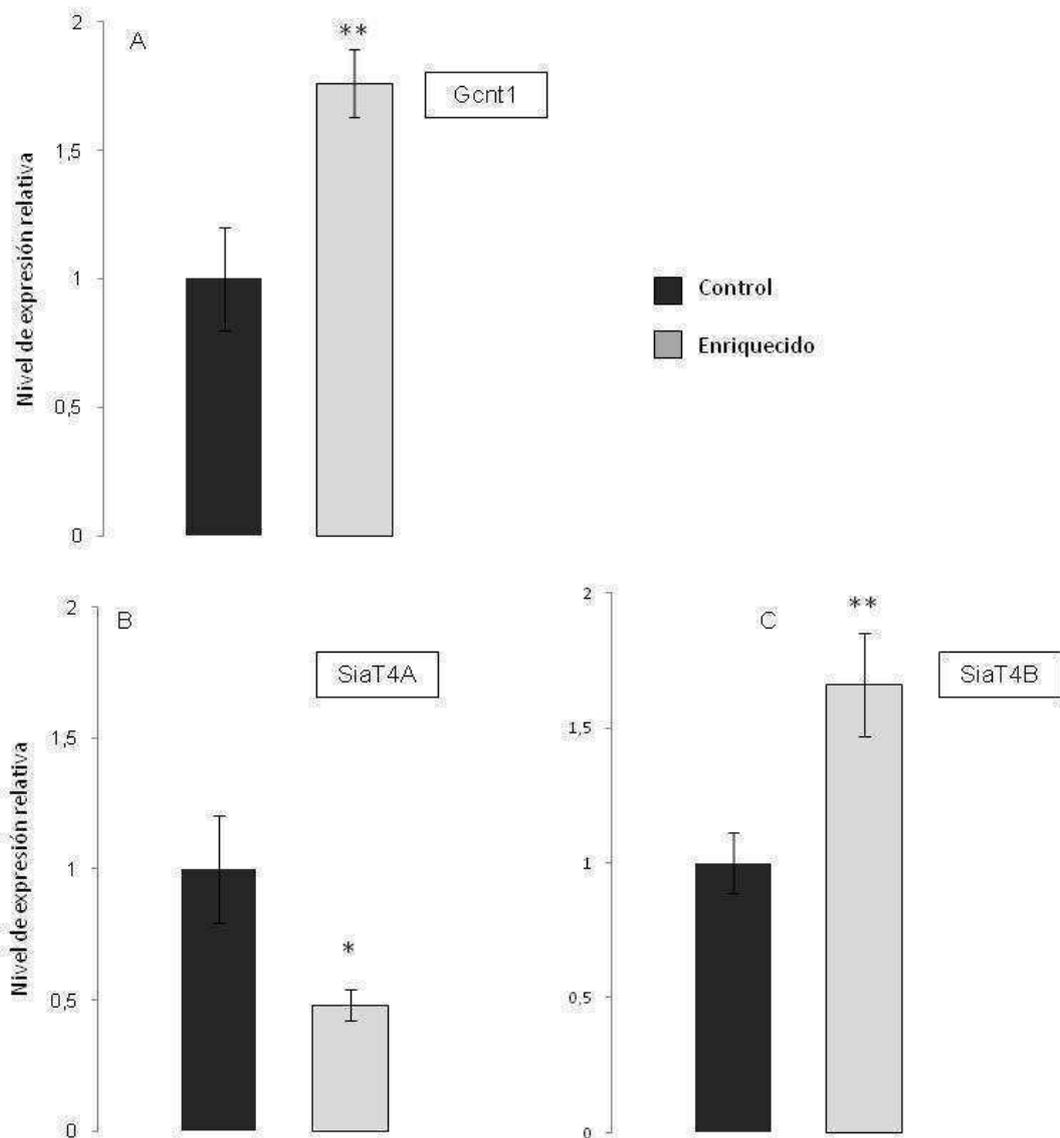


Figura 22. Expresión en corteza de genes de O-glicosilación tipo mucina alterados por el Enriquecimiento Ambiental. (A) *Core 2* sintasa, *Gcnt1*, (B) *SiaT4A* y (C) *SiaT4B*. El nivel de transcripto se determinó mediante *real-time PCR*. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar cada gen al grupo Control. Se grafican valores medios \pm error estándar. Control $n=10$, Enriquecidos $n=12$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

La heterogeneidad de las estructuras oligosacáridas resulta de la competencia de distintas enzimas por un sustrato común. Por ejemplo, la estructura *core 1* puede ser convertida a *core 2* (por parte de la *core 2 sintasa* o *Gcnt1*), y así continuar con la biosíntesis. De manera alternativa, el *core 1* puede ser sialidado

(por parte de la sialiltransferasa SiaT4A), con la consecuente terminación de la vía de glicosilación (ver Figura 18). Se ha reportado que existe una competencia por parte de estas glicosiltransferasas (Dalziel et al, 2001). Es interesante destacar aquí los resultados de los niveles de transcritos para *la core 2 sintasa* (Gcnt1) y la sialiltransferasa SiaT4A (Figura 22 A y B), con comportamientos opuestos que se corresponden con los resultados reportados.

Las restantes glicosiltransferasas indicadas en la Figura 18 no presentaron diferencias de expresión génica en la corteza de los grupos experimentales (datos no mostrados).

2. 2. 3. 3. O-manosilación. Efectos sobre el hipocampo.

La modificación de residuos de Ser o Thr mediante el enlace O-glicosídico del azúcar Manosa es controlada por dos glicosiltransferasas, Pomt1 y Pomt2. Como se indica en la Figura 23, la modificación siguiente sobre O-Manosa es la adición de GlcNAc por parte de la glicosiltransferasa Pomgnt1:

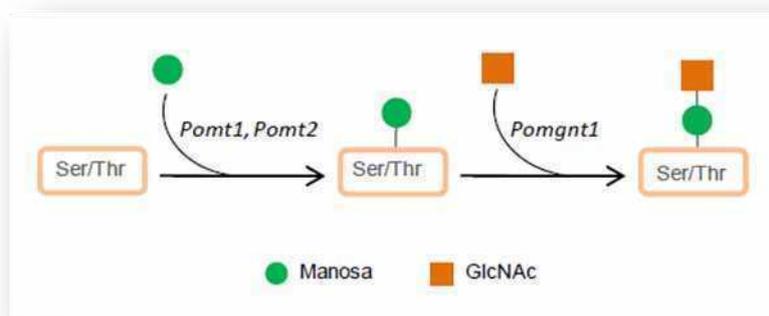


Figura 23. Biosíntesis de los primeros pasos de la O-manosilación y las glicosiltransferasas involucradas

Luego de 7 días en condiciones de EA y Control, no se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA para ninguna de las glicosiltransferasas involucradas en los pasos iniciales de la O-manosilación. Sin embargo, parece haber una tendencia al aumento en los niveles de transcripto de Pomgnt1, aunque esta no tuvo significancia estadística (Figura 24 A, $p > 0.05$).

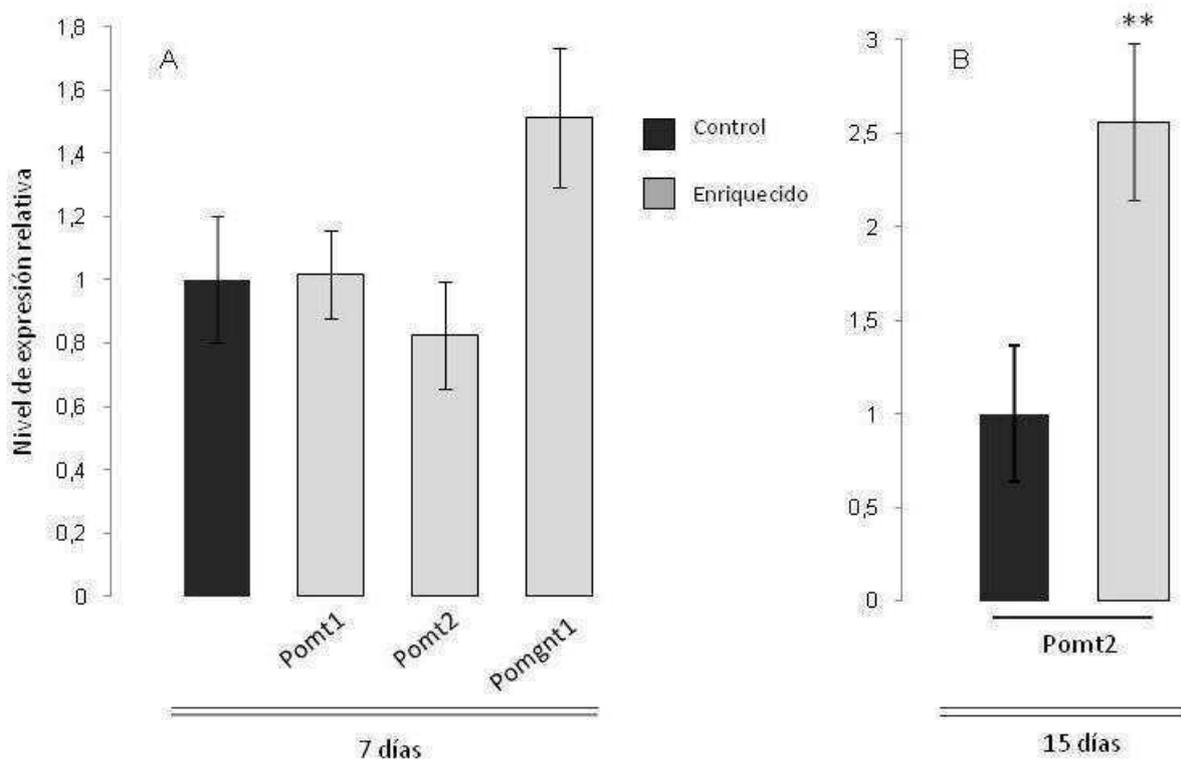


Figura 24. Expresión hipocámpal de componentes de la O-manosilación luego de (A) 7 días y (B) 15 días de Enriquecimiento Ambiental. La expresión de los genes se determinó mediante *real-time PCR*. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar cada gen al grupo Control. Se grafican valores medios \pm error estándar. ** $p < 0.01$.

Sin embargo, la exposición por un periodo más prolongado al EA tuvo efectos sobre uno de los componentes de la O-manosilación: luego de 15 días del alojamiento en enriquecimiento ambiental se observó un aumento significativo en los niveles de mRNA para Pomt2 en el hipocampo de ratas del grupo Enriquecido ($p < 0.01$, Figura 24 B). Las restantes glicosiltransferasas de la O-manosilación no mostraron diferencias con respecto al Control (datos no mostrados).

Por otra parte, el alojamiento en condiciones de aislamiento social y baja estimulación (grupo Aislado) afectó la expresión génica de las glicosiltransferasas de la O-manosilación: se observó una disminución significativa en los niveles de transcripto para Pomt1, Pomt2 y Pomgnt1 en el hipocampo de ratas del grupo Aislado en comparación con el grupo Enriquecido (Figura 25 A, $p < 0.01$). No hubo diferencias con respecto al Control para ningún componente de la O-manosilación estudiado (Figura 25 B, $p > 0.05$).

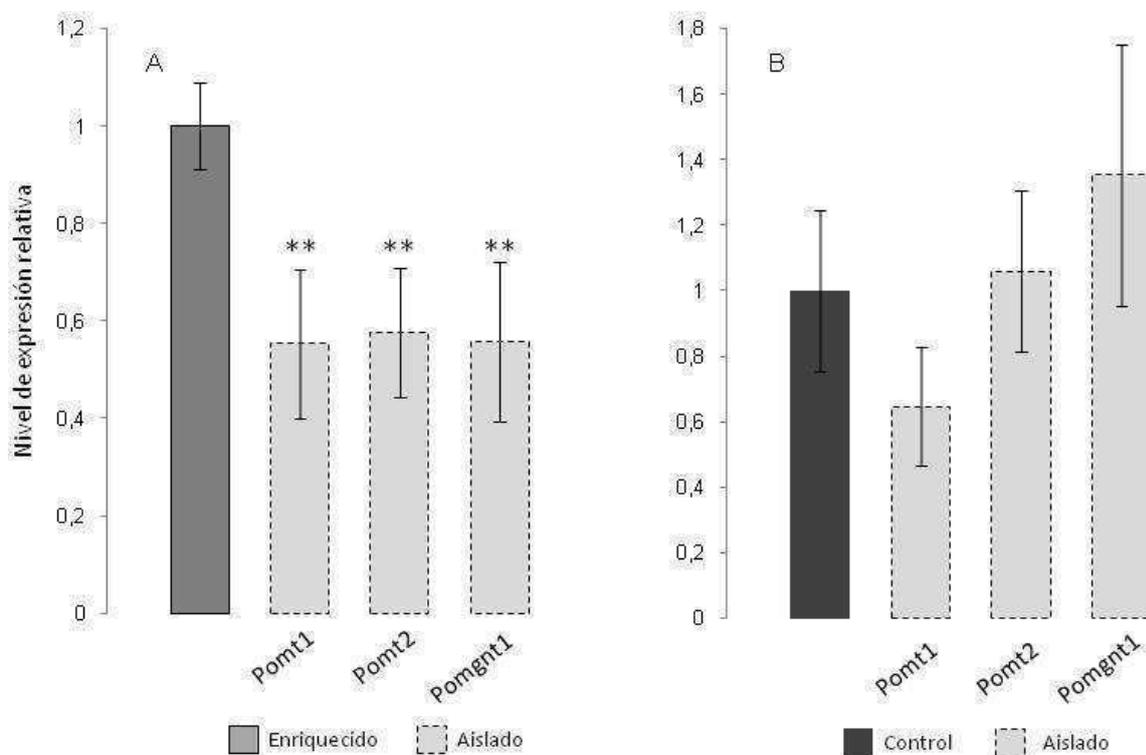


Figura 25. Expresión hipocampal de las glicosiltransferasas de la O-manosilación luego de condiciones de aislamiento social. La expresión de cada gen se determinó mediante *real-time PCR*. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar al grupo Enriquecido (A) y Control (B). Se grafican valores medios \pm error estándar. Enriquecidos $n=12$, Aislado $n=10$. ** $p < 0.01$.

2. 2. 3. 4. O-manosilación. Efectos sobre la corteza

A diferencia del hipocampo, en la corteza de ratas expuestas al EA se observaron cambios en los niveles de transcripto para dos glicosiltransferasas de la O-manosilación: los niveles de transcriptos para Pomt1 y Pomgnt1 disminuyeron de manera significativa en la corteza de ratas del grupo Enriquecido (Figura 26, $p < 0.01$). Es de destacar la naturaleza de la respuesta del gen Pomgnt1 en el hipocampo y la corteza luego del EA: una tendencia al aumento (no estadísticamente significativo) en el hipocampo (ver Figura 24 A) y una disminución marcada en la corteza (Figura 26).

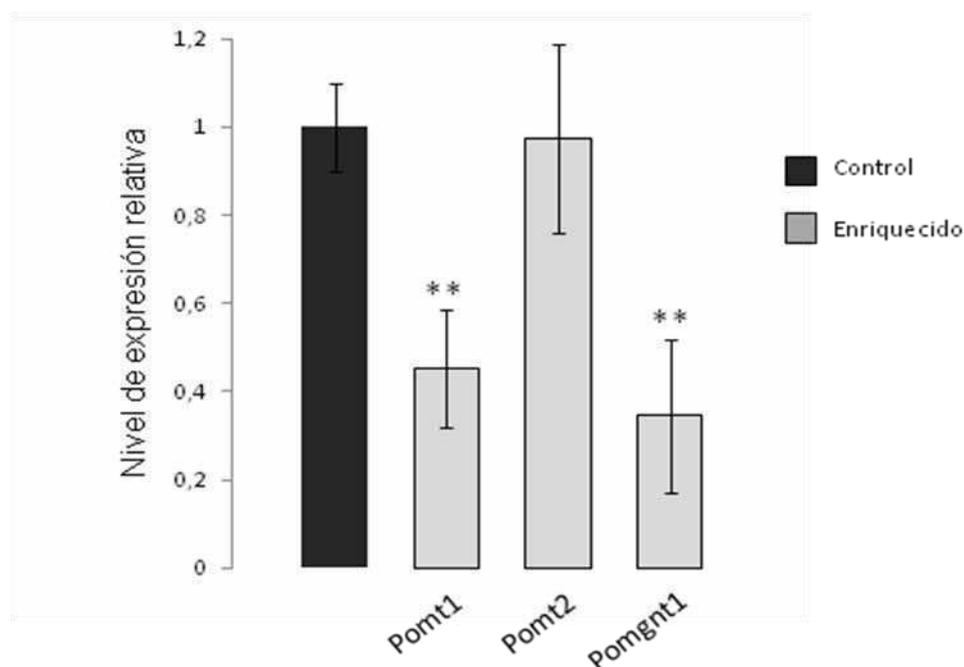


Figura 26. Expresión en corteza de glicosiltransferasas de la O-manosilación luego del Enriquecimiento Ambiental. La expresión de los genes se determinó mediante *real-time PCR*. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar cada gen al grupo Control. Se grafican valores medios \pm error estándar. Control $n=10$, Enriquecidos $n=12$. ** $p < 0.01$.

2. 2. 3. 5. O-fucosilación. Efectos sobre el hipocampo.

En la siguiente figura se muestra de manera esquemática las glicosiltransferasas que participan en los primeros pasos de la O-fucosilación de glicoproteínas: Pofut1, Pofut2 y *Fringe*.

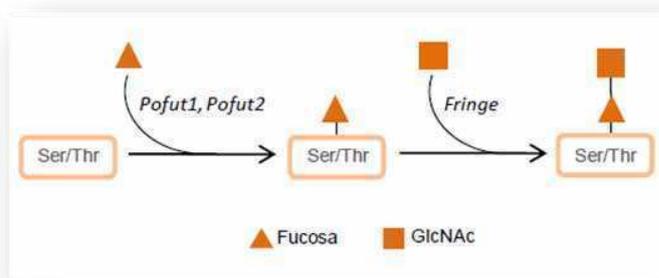


Figura 27. Esquema de los componentes iniciales de la O-fucosilación

Ninguna glicosiltransferasa de los pasos iniciales de la O-fucosilación evidenció cambios significativos de expresión génica en el hipocampo de los grupos experimentales (Figura 28, $p > 0.05$).

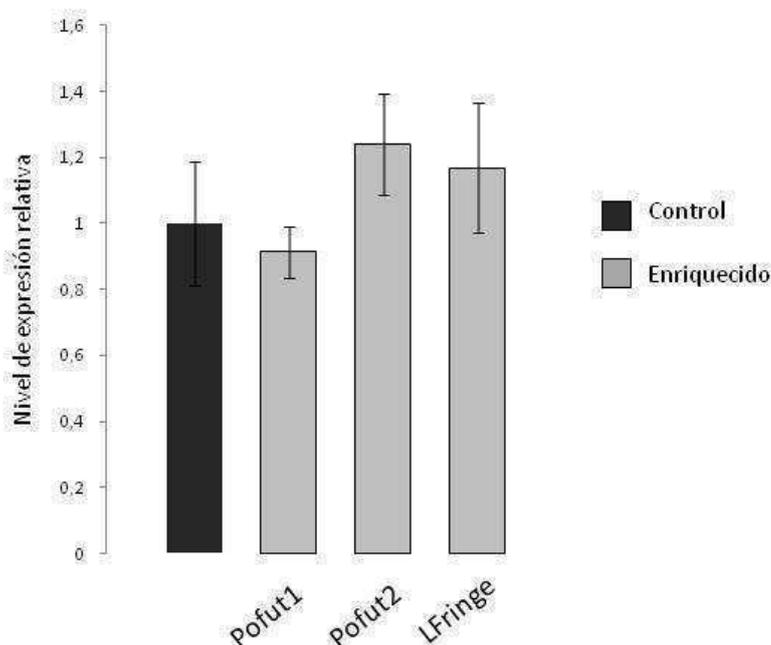


Figura 28. Expresión hipocampal de glicosiltransferasas de la O-fucosilación luego del Enriquecimiento Ambiental. La expresión de los genes se determinó mediante *real-time PCR*. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar cada gen al grupo Control. Se grafican valores medios \pm error estándar. Control n=10, Enriquecidos n=12.

2. 2. 3. 6. O-fucosilación. Efectos sobre la corteza.

Sin embargo, en la corteza de los animales expuestos al EA se observó una expresión diferencial para uno de los componentes de esta vía de O-glicosilación: los niveles de transcripto para Pofut1 disminuyeron de manera significativa en la corteza de ratas del grupo Enriquecido en comparación con el Control (Figura 29, $p < 0.01$).

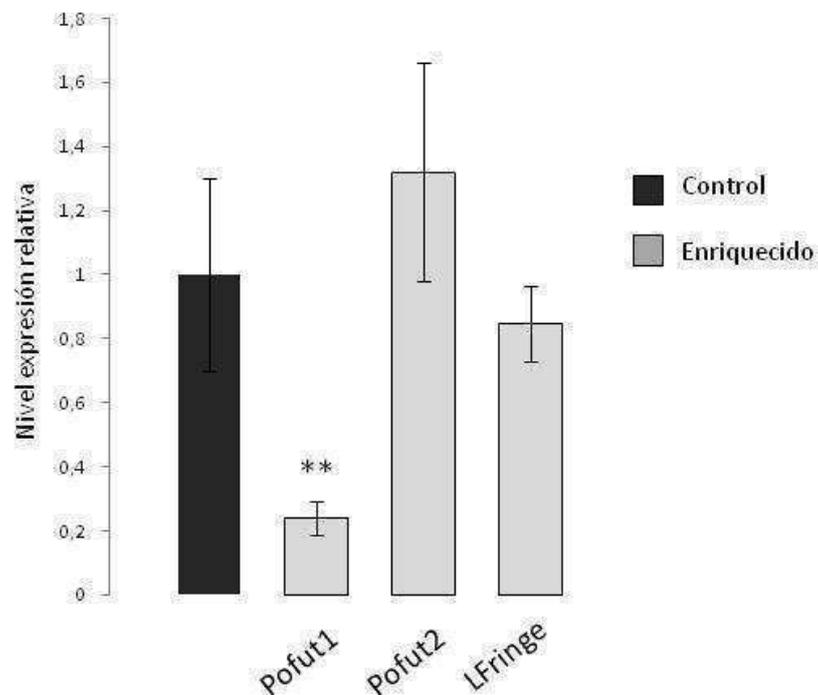


Figura 29. Expresión en corteza de glicosiltransferasas de la O-fucosilación luego del Enriquecimiento Ambiental. La expresión de los genes se determinó mediante *real-time PCR*. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar cada gen al grupo Control. Se grafican valores medios \pm error estándar. Control $n=10$, Enriquecidos $n=12$. ** $p < 0.01$.

2. 2. 3. 7. O-GlcNAc. Efectos sobre el hipocampo.

La figura 30 muestra de manera esquemática la participación de la glicosiltransferasa Ogt encargada de transferir GlcNAc mediante un enlace O-glicosídico a Ser/Thr.

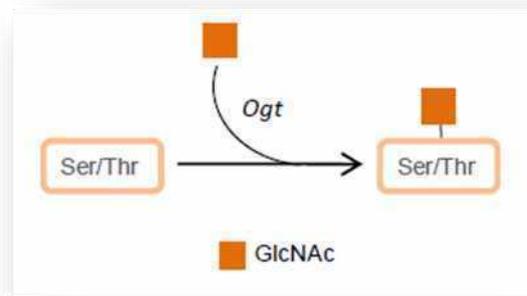


Figura 30. Adición de O-GlcNAc mediante la Ogt

No se observaron diferencias significativas en el nivel de transcritos de Ogt en el hipocampo de los grupos experimentales (Figura 31, $p > 0.05$).

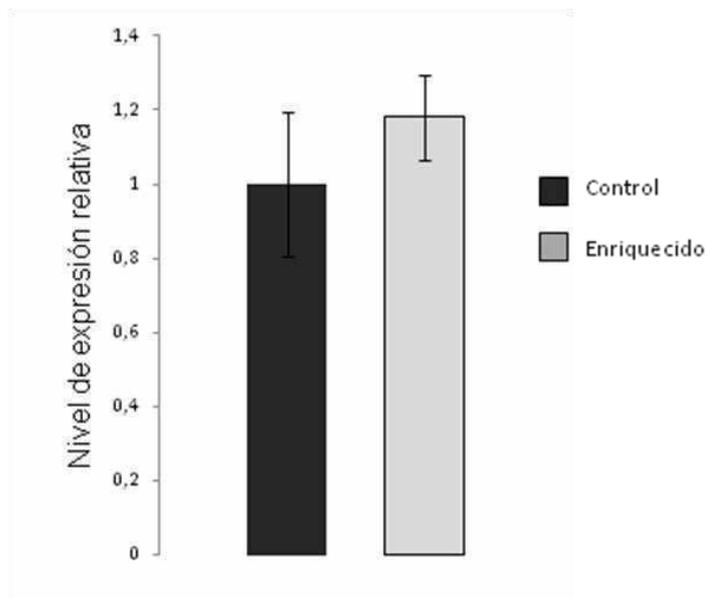


Figura 31. Expresión hipocampal de O-GlcNAc transferasa (Ogt) luego del Enriquecimiento Ambiental. La expresión del gen se determinó mediante *real-time PCR*. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar con el grupo Control. Se grafican valores medios \pm error estándar. Control $n=10$, Enriquecidos $n=12$.

El nivel de transcritos para *Ogt* tampoco fue alterado en la condición experimental de aislamiento en el hipocampo (Enriquecidos: 1 ± 0.09 vs Aislado: 0.74 ± 0.15 , $p > 0.05$; Control: 1 ± 0.19 vs Aislado: 0.93 ± 0.19 , $p > 0.05$).

2. 2. 3. 8. O-GlcNAc. Efectos sobre la corteza.

Si bien en la corteza de ratas expuestas al EA se observó una tendencia al aumento en los niveles de transcritos para *Ogt*, esta no fue estadísticamente significativa (Figura 32, $p > 0.05$).

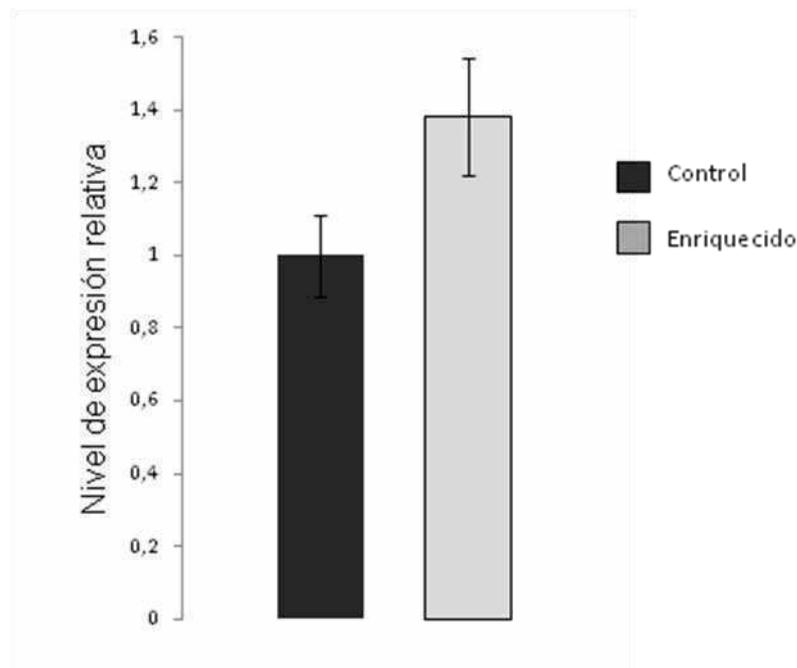


Figura 32. Expresión en corteza de O-GlcNAc transferasa (*Ogt*) luego del Enriquecimiento Ambiental. La expresión del gen se determinó mediante *real-time PCR*. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar con el grupo Control. Se grafican valores medios \pm error estándar. Control $n=10$, Enriquecidos $n=12$.

A manera de resumen, la siguiente tabla indica los aumentos o disminuciones en la expresión génica de las O-glicosiltransferasas en el hipocampo o corteza de ratas expuestas al Enriquecimiento Ambiental:

| | HIPOCAMPO | CORTEZA |
|-------------------------------------|---------------------------------|--|
| <i>O</i> -glicosilación tipo mucina | ↓ <i>B3Gnt6</i> ↑ <i>SiaT4A</i> | ↓ <i>Galnt2</i> ↑ <i>Galnt7</i> ↑ <i>Gcnt1</i> ↓ <i>SiaT4A</i> ↑ <i>SiaT4B</i> |
| <i>O</i> -manosilación | ↑ <i>Pomt2</i> (15 días) | ↓ <i>Pomt1</i> ↓ <i>Pomgnt1</i> |
| <i>O</i> -fucosilación | ND | ↓ <i>Pofut1</i> |
| <i>O</i> -GlcNAc | ND | ND |

Tabla 3. Diferencias de expresión génica para las O-glicosiltransferasas indicadas. Los resultados están referidos al grupo Enriquecido con respecto al Control. Las flechas indican aumento o disminución. ND= no diferencias.

Como una manera de controlar que estos cambios en los niveles de transcritos son específicos de la condición experimental de enriquecimiento ambiental, se estudió también el comportamiento del gen BDNF, factor neurotrófico involucrado en la modulación de varios procesos de plasticidad neuronal (Tyler et al, 2002; Rex et al, 2007).

Los resultados indicaron que el nivel de transcritos de BDNF aumentó de manera significativa en el hipocampo de ratas del grupo Enriquecido (Figura 33, $p < 0.01$) mientras que en el hipocampo del grupo Aislado se observó una disminución en los niveles del mismo (Figura 33, $p < 0.05$).

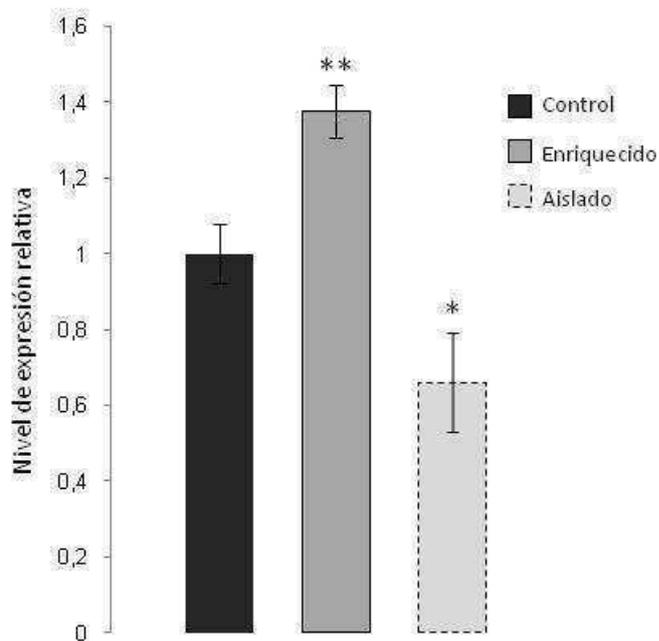


Figura 33. Expresión hipocámpal de BDNF en el hipocampo de ratas en condiciones de enriquecimiento ambiental y aislamiento social. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar con el grupo Control. La expresión del gen se determinó mediante *real-time PCR*. Se grafican valores medios \pm error estándar. Control n= 10, Enriquecidos n=12, Aislado n=10. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

El incremento del mRNA de BDNF en el hipocampo de ratas expuestas al enriquecimiento ambiental está de acuerdo con datos previos que indican que este factor neurotrófico es afectado por la exposición a ambientes con complejidad y estimulación (Falkenberg et al, 1992; Kuzumaki et al, 2011).

Asimismo, la disminución del nivel de mRNA de BDNF en la condición experimental de aislamiento social también fue reportada previamente por otros grupos (Barrientos et al, 2003; Bjørnebekk et al, 2007)

2. 2. 4. Expresión proteica de O-glicosiltransferasas

Luego del análisis de la expresión génica de O-glicosiltransferasas en el hipocampo y la corteza de ratas expuestas al EA, el siguiente objetivo de esta tesis fue estudiar si el producto de algunos genes de O-glicosiltransferasas estudiadas también podría ser influenciado por las condiciones experimentales.

Los resultados indicaron que los niveles de proteínas de dos componentes de la O-manosilación, Pomt1 y Pomgnt1, fueron similares en los tres grupos experimentales (Control, Enriquecidos y Aislados), tanto en el hipocampo (Figura 34 A y B) como en la corteza (Figura 34 C y D).

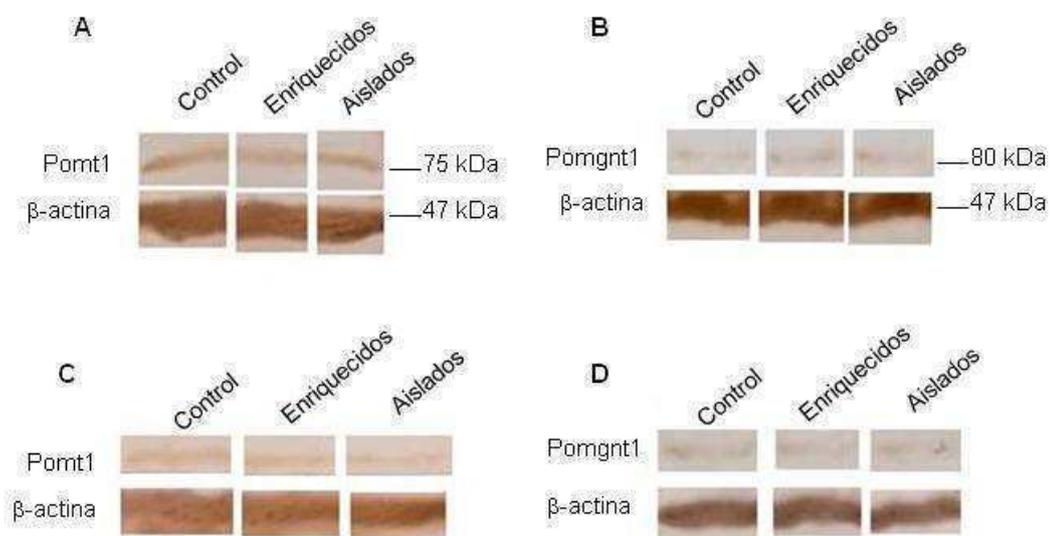


Figura 34. Expresión proteica de Pomt1 y Pomgnt1 en el hipocampo (A y B) y la corteza (C y D) de ratas sometidas a condiciones de EA, aislamiento y condiciones estándar.

DISCUSIÓN

2. 3. Discusión

El paradigma de Enriquecimiento Ambiental (EA) fue inicialmente puesto a punto en el laboratorio a fin de poder asegurar posteriormente que las modificaciones en los niveles de glicosilación fueran específicos de la condición experimental. Para ello, primero se estudió el funcionamiento cognitivo de las ratas expuestas al EA mediante varias tareas comportamentales conocidas en la bibliografía por evaluar la memoria espacial, condicionada por el miedo y de reconocimiento de objetos.

Los resultados indicaron que solamente en la tarea de reconocimiento de objetos (NOR, ver Figura 11) las ratas del grupo Enriquecido tuvieron un desempeño significativamente superior al Control. En cambio, en el Laberinto Acuático de Morris (MWM) y la Evitación Inhibitoria (EI), no hubo diferencias en el desempeño entre los grupos experimentales. Estos resultados al principio resultaron desalentadores dado que existe numerosa bibliografía que indica que el EA afecta de manera positiva las funciones cognitivas en mamíferos, incluyendo la memoria espacial en el MWM (Falkenberg et al, 1992), en una tarea de evitación inhibitoria (Kazlauckas et al, 2011), y otros.

La exposición al EA provee al sujeto de herramientas para el aprendizaje informal (Rosenzweig & Bennett, 1996) el cual puede manifestarse en una tarea que evalúe la memoria episódica, tal como el NOR. Dado que el EA representa para el animal una exposición a experiencias o episodios de mayor complejidad con respecto a las condiciones normales, cobran importancia los resultados obtenidos sobre el mejor desempeño de las ratas del grupo Enriquecido en la tarea del NOR (ver Figura 11), ya que indicarían que los eventos episódicos del EA se reflejan en las habilidades cognitivas.

La duración de la exposición al EA es claramente una variable importante que debe ser tomada en cuenta al investigar los cambios comportamentales en este paradigma. Se han descrito cambios moleculares, morfológicos y comportamentales en un amplio rango de duración del enriquecimiento ambiental: desde la exposición diaria por 40 minutos hasta varios meses (Ferchmin & Eterovic, 1986; van Praag et al, 2000; Kobayashi et al, 2002). Es posible que aquí no se observaron efectos positivos del EA en el desempeño del MWM y EI porque tal vez estos cambios comportamentales requieran mayor tiempo de la condición de enriquecimiento para ser evidentes. Otras variables a tener en cuenta son la calidad del EA (el uso o no de una rueda de ejercicio [*running wheel*], tipos de elementos, etc), la edad de los animales al comienzo del procedimiento de enriquecimiento y el número de animales usados en las curvas de comportamiento. Basta con explorar las bases de datos para saber que no existe un único procedimiento estándar sobre el uso del EA en ratas y ratones. Sin embargo, con cualquier variante de metodología usada, es suficiente para empezar a evidenciar los efectos positivos del EA a nivel molecular, celular y comportamental.

En el sistema nervioso, el estudio de la distribución de oligosacáridos asociados a glicoconjugados en superficies celulares cobra relevancia al considerarlos como marcadores bioquímicos útiles en varias condiciones, normales y patológicas: en algunos tumores cerebrales pediátricos se ha demostrado, mediante histoquímica de lectinas, una expresión prominente de la estructura $\beta 1,4\text{GlcNAc}$, para la cual se ha sido sugerido un rol de marcador de diagnóstico y/o pronóstico en ciertos tumores (Rebbaa et al, 1999). Además, en cerebros *post mortem* de pacientes con desórdenes mentales como esquizofrenia y Alzheimer, se ha revelado una distribución diferencial de lectinas para varios oligosacáridos, la cual parece estar específicamente asociada a la condición patológica (Nishimura et al, 2000). Los resultados presentados en esta tesis indican que luego de la exposición a condiciones de EA, solamente se observaron cambios en el patrón de expresión del glicoepitope $\text{Gal}\beta 1,3\text{GalNAc}$ (Figura 14 B). Esta estructura

corresponde al *core 1* de la vía de O-glicosilación tipo mucina, un antígeno carbohidrato cuya expresión está asociada a cáncer y metástasis. A fin de establecer el significado de la expresión de este glicoeptope en el SNC, se necesita esclarecer en estudios futuros las glicoproteínas portadoras de esta modificación.

Uno de los puntos cruciales de regulación en la biosíntesis de glicoconjugados es la regulación de la transcripción de genes que codifican para glicosiltransferasas (Zeng & Yu, 2008). En la corteza de ratones se ha demostrado previamente que la exposición a condiciones de EA afecta los niveles de expresión de genes involucrados en la estructura neuronal, señalización y plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria (Rampon et al, 2000). En vista de los resultados obtenidos, es evidente que la influencia del EA en el cerebro se manifiesta también en la regulación transcripcional de algunos componentes de la maquinaria de O-glicosilación.

De todas las vías de O-glicosilación estudiadas a nivel de la expresión de mRNA en el hipocampo, la única que fue afectada por el EA fue la de O-glicosilación tipo mucina. En particular, en las sustituciones posteriores sobre el O-GalNAc inicial (ver Figura 18 para un mayor seguimiento). Uno de ellas fue la expresión diferencial de la *core 3 sintasa*, B3Gnt6 (ver Figura 19 A). En órganos digestivos como estómago, intestino delgado y colon, la principal estructura central de O-mucinas es el *core 3* (GlcNAc β 1,3GalNAc α 1-Ser/Thr). La expresión de B3Gnt6 parece estar inversamente relacionada con fenómenos de proliferación celular: en líneas celulares y células de cáncer de colon, se ha reportado una disminución en la expresión génica de B3Gnt6 (Brockhausen, 1999). Además, la transfección de la glicosiltransferasa B3Gnt6 en células de cáncer de próstata resultó en la supresión de la formación del tumor y disminución en la metástasis (Lee et al, 2009). En cuanto a la participación de B3Gnt6 en el SNC, solamente existe un trabajo en la bibliografía en el cual los niveles de expresión del transcripto para este gen son casi indetectables en el cerebro (Iwai et al, 2002), por lo cual el resultado presentado en esta tesis es el primer reporte sobre cambios en el SNC de los niveles del

transcripto para un componente asociado a tumores (B3Gnt6) en respuesta a modificaciones en el ambiente.

Otra de las glicosiltransferasas cuyo nivel de transcripto se alteró en el hipocampo luego de la exposición al EA fue la sialiltransferasa SiaT4A. Esta enzima es una de las isoformas responsables de la modificación con Ácido Siálico del *core 1*, punto de bifurcación importante en la biosíntesis de O-glicanos tipo mucina (NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc α 1-Ser/Thr). SiaT4A pertenece a una familia de sialiltransferasas, de la cual algunos miembros se expresan abundantemente en el cerebro y están involucrados en procesos neurales (Okabe et al, 2001). Numerosos estudios han indicado la importante contribución de los ácidos siálicos de los glicoconjugados de superficie celular a la plasticidad neural en el cerebro (Rutishauser & Landmesser, 1996). Por ejemplo, la adición de Ácido Polisiálico (PSA, por sus siglas en inglés) sobre la Molécula de Adhesión Neural (NCAM) está mediada por la polisialiltransferasa ST8Sia II (Franceschini et al, 2001), cuya ausencia de expresión resulta en defectos en la localización de axones en el hipocampo (Angata et al, 2004). En relación a SiaT4A, un trabajo previo demostró que en ratas sometidas a la inducción de epilepsia (un modelo de plasticidad neural patológico) los niveles hipocampales de expresión del gen SiaT4A disminuyeron de manera significativa (Okabe et al, 2001). Por el contrario, en el modelo de plasticidad neural representado aquí a través del EA, se observó un aumento en el nivel de mRNA de SiaT4A. Aunque el cerebro epiléptico representa un modelo de plasticidad neural bastante utilizado (cambios en los niveles de neurotrofinas, neuropéptidos, morfológicos y aumento en la neurogenesis) (Scharfman 2002), sigue siendo una condición patológica, la cual se manifiesta en general en disturbios comportamentales (Jones et al, 2008). De todos modos, esos resultados y los obtenidos en esta tesis sugieren una participación diferencial de la sialiltransferasa SiaT4A en eventos de plasticidad neural, cuya modulación depende específicamente de las condiciones de cada experiencia. Los resultados presentados aquí contribuyen al estudio de gran familia de las sialiltransferasas y su participación en funciones neurales.

En corteza, la vía de O-glicosilación tipo mucina fue la que mayormente tuvo un perfil de expresión de mRNA de O-GTs distinto asociado a la exposición al EA. La formación inicial del epítopo O-GalNAc, primera estructura en esta biosíntesis, está controlada por varias enzimas de la familia GalNAc-T, entre las cuales existe redundancia en la especificidad del sustrato y jerarquía en la actividad. Solamente algunos miembros de esta gran familia han sido asociados al SNC, como por ejemplo Galnt1, Galnt2 y Galnt10 durante el neurodesarrollo del ratón (Kingsley et al, 2000; Nelson et al, 2002). Aquí, se mostró que la expresión de los mRNA de Galnt2 y Galnt7 está diferencialmente modulada por las modificaciones en el ambiente, resultados que no han sido reportados previamente en la literatura para ningún miembro de la familia de GalNAc-T en el SNC.

Es de destacar la dinámica por parte de algunas glicosiltransferasas de la O-manosilación ante distintas duraciones de exposición al EA evaluados aquí para algunos genes: luego de 7 días de exposición al EA, los niveles de transcripto para Pomt2 no se alteraron. Sin embargo, luego de 15 días de exposición al ambiente enriquecido, el nivel de expresión génica para Pomt2 aumentó de manera significativa.

Los componentes regulados de manera distinta ante cada condición (enriquecimiento ambiental de 7 o 15 días y aislamiento) están involucrados en la glicosilación de glicoproteínas importantes en el SN. Una de ellas es *α -dystroglycan* (α -DG) y la otra es *J1/Tenascin*. Ambas son glicoproteínas modificadas con O-manosas que participan en la comunicación intraneuronal con el espacio extracelular (en el caso de α -DG) y en procesos de adhesión neurona-astrocito (*J1/Tenascin*). Que algunos componentes de la O-manosilación muestren una dinámica de expresión génica diferente ante situaciones de plasticidad neural distintas (EA y aislamiento), resalta la importancia de esta forma de glicosilación en

el SNC y su participación en condiciones no sólo patológicas (como distrofias musculares y anormalidades en el cerebro, ver Introducción) sino también en condiciones fisiológicas normales.

El enriquecimiento ambiental es un paradigma ampliamente usado para evaluar principalmente los efectos de experiencias más complejas y estimulantes que las condiciones normales de laboratorio en animales de experimentación, a varios niveles: molecular, celular y comportamental, tanto en condiciones normales como patológicas. Desde las etapas tempranas del desarrollo cerebral hasta la adultez, la estimulación sensorial, motora y cognitiva que ocurre mediante la interacción con el entorno representa un papel importante en la modulación y el refinamiento de la circuitería neuronal requerida para las funciones neurales. Las modificaciones introducidas en el ambiente claramente indicaron una influencia en la expresión de la maquinaria de glicosilación del cerebro. A nivel de la expresión de genes de O-glicosiltransferasas, el enriquecimiento ambiental produjo cambios en el patrón de expresión de algunas glicosiltransferasas del camino de la O-glicosilación tipo mucina, los cuales se manifestaron de manera diferencial en el hipocampo y en la corteza de ratas. Al no existir antecedentes previos sobre ningún componente de esta forma de O-glicosilación y su relación con el cerebro, la relevancia de los cambios mostrados cobra importancia.

Finalmente, se destaca que en la presente tesis doctoral se verificó la hipótesis planteada de que la glicobiología del hipocampo y de la corteza de cerebros de rata podría ser influenciada por un modelo de potencial inducción de plasticidad neural como es el Enriquecimiento Ambiental. En particular, los efectos se manifestaron a nivel de uno de los principales puntos de regulación de la biosíntesis de glicanos: la expresión transcripcional de los genes de O-glicosiltransferasas. Quedará a futuro elucidar la importancia funcional y patológica de estos cambios.

Capítulo III

Evitación inhibitoria

3. 1. Introducción

La adaptación de un animal al ambiente que lo rodea depende de su habilidad para adquirir una amplia variedad de comportamientos (además de los innatos) útiles para su supervivencia. Uno de los aspectos más destacables del comportamiento de un animal es su habilidad para modificar el mismo mediante el **aprendizaje** (Kandel, 2001). Una consecuencia directa del aprendizaje es la **memoria**, la cual preserva la información adquirida en el pasado para el uso inmediato o posterior. La memoria puede ser definida como una representación interna dependiente de una experiencia comportamental, codificada de manera espacio-temporal en circuitos neuronales mediante cambios en las propiedades reactivas de las neuronas, que pueden guiar el comportamiento. En este sentido, podemos comprender al aprendizaje como la adquisición o la reorganización de información que resulta en nuevo conocimiento (Dudai, 2002).

3. 1. 1. Fases de la memoria

Luego de la generación de la memoria producto del aprendizaje, una serie de distintos estadios en tiempo y espacio siguen para la formación de la misma. El primer paso del proceso es la **adquisición**, en la cual la nueva información empieza a ser codificada en una traza de memoria.

Durante el periodo inmediatamente después de la adquisición, la memoria nueva es lábil y particularmente propensa a interferencias con agentes disruptores, como injurias, drogas u otros estímulos distractores. Este periodo inicial lábil corresponde con una memoria de corto término (MCT). Luego, la traza de memoria entra en una forma estable e insensible a los mismos factores disruptores (MLT, memoria de largo término) (McGaugh, 2000). Se refiere a la **consolidación** como el proceso de estabilización de la memoria inicial lábil hacia una forma estable y duradera, la cual es almacenada como traza de memoria (engrama). La **consolidación sináptica** es la estabilización de la información en las sinapsis y en

el circuito neuronal que codifica la memoria. Una extensa secuencia de eventos moleculares como la activación de cascadas de señalización intracelular culminan en la modulación de la expresión génica neuronal y en la síntesis de nuevas proteínas, las cuales participarían finalmente en las modificaciones a largo término de las propiedades funcionales de la sinapsis. Finaliza dentro de las pocas horas luego del entrenamiento.

En circuitos más complejos, como en el cerebro de mamíferos, operan además otros procesos de **consolidación sistémica**. Estos involucran una reorganización gradual y continua de circuitos neuronales y áreas cerebrales. En algunos sistemas ocurre en tiempos tan largos como semanas, meses y años (Dudai, 2000).

La fase de **evocación** se refiere al acceso o reactivación de las representaciones internas almacenadas mediante un recordatorio, a través de la cual se puede evidenciar la existencia de la memoria. Varios estudios indican que, una vez evocada la memoria, es poco probable que el engrama permanezca exactamente igual. Por lo tanto, la evocación representa también una experiencia (revisado en Sara, 2000).

El concepto de que la memoria consolidada queda fija y no puede ser modificada ni interferida cambió después de que varios trabajos demostraran lo contrario: luego de la presentación de un recordatorio, una memoria consolidada atraviesa un periodo de vulnerabilidad a interferencia por agentes perturbadores seguido de un periodo de reestabilización. Ante la ausencia de interferencia, durante un cierto tiempo luego de la reactivación, la traza de memoria reactivada vuelve a pasar por un proceso de consolidación, al cual se lo denomina **reconsolidación** (Przybylawski & Sara, 1997; Nader et al, 2000).

3. 1. 2. Evitación inhibitoria

Como ya se ha mencionado, en la supervivencia de un individuo a su entorno la habilidad de predecir estímulos que representan una amenaza y la respuesta adecuada ante estas situaciones cobran una gran importancia. De esta manera, los animales aprenden a anticipar el peligro mediante la asociación de estímulos ambientales con eventos aversivos. Es decir, representa un **aprendizaje asociativo**, la formación de nuevos enlaces mentales entre eventos (Dudai, 2002).

El miedo es considerado como un mecanismo de defensa, el cual fue favorecido en la evolución por brindar protección a los animales en situaciones de peligro. En el laboratorio, el miedo también puede ser adquirido rápidamente a través de un tipo de aprendizaje asociativo, el **condicionamiento operante**, en el cual el sujeto experimental aprende las consecuencias de su comportamiento: la presentación de un estímulo aversivo está condicionada al comportamiento del animal.

Un procedimiento ampliamente utilizado en roedores es la tarea de **Evitación Inhibitoria** (EI), en la cual la respuesta del animal (por ejemplo, bajar desde una plataforma a un piso de rejilla) es seguida por un suave choque eléctrico en las patas. De esta manera, el animal aprende a evitar realizar la respuesta que fue seguida por la experiencia aversiva.

La tarea de evitación inhibitoria (EI) usada en esta tesis representa un tipo de condicionamiento por miedo al contexto (*contextual fear conditioning*) (Figura 35). Mediante el uso del choque eléctrico, la tarea de EI involucra la represión específica de la tendencia natural de la rata a explorar más allá de una plataforma, sin alterar el comportamiento exploratorio del animal mientras permanece sobre la misma. En una sola sesión de entrenamiento, el animal aprende a temer un contexto debido a su asociación con un estímulo aversivo. Tal como Izquierdo y colaboradores ejemplifican, el aprendizaje de EI corresponde a muchos ejemplos importantes de aprendizaje en humanos, como no poner los dedos en un enchufe o mirar a la

derecha antes de cruzar una calle en Londres, por citar sólo algunos (Izquierdo et al, 2006).

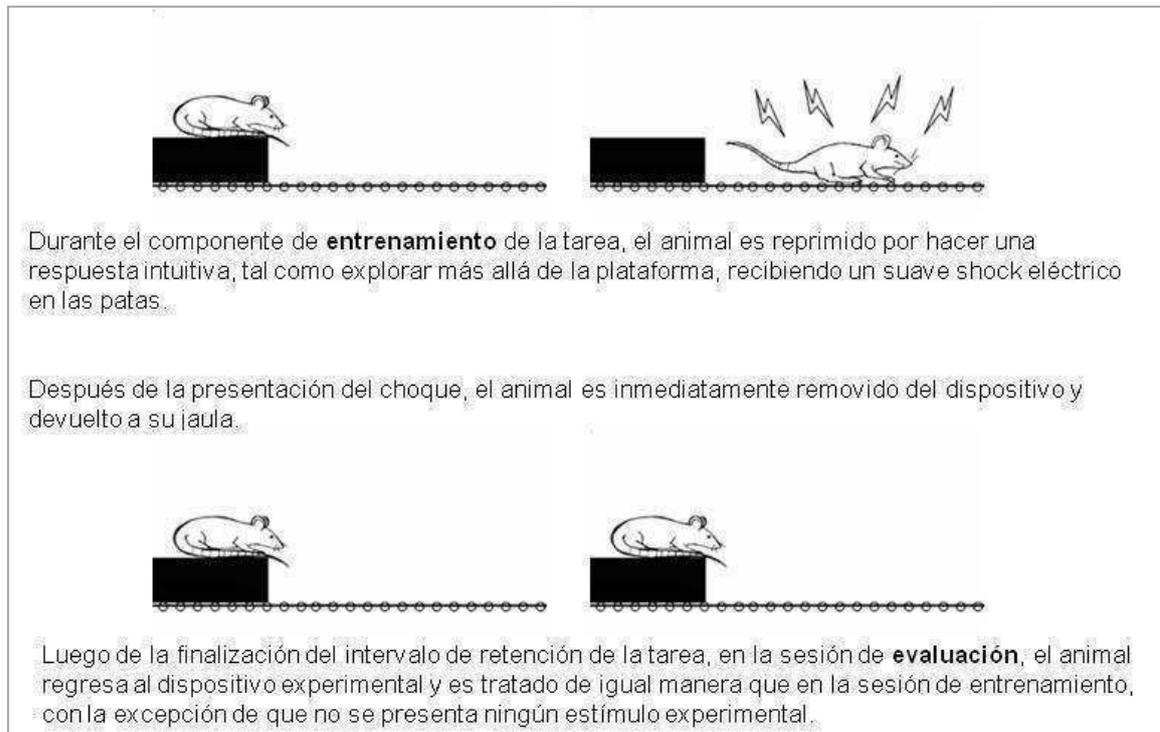


Figura 35. Esquema de entrenamiento y evaluación en el paradigma de evitación inhibitoria. Adaptado de Beckinschtein et al, 2008a.

El sujeto experimental condicionado muestra una variedad de respuestas condicionadas por el miedo, como respuesta de congelamiento (*freezing*) y permanencia en la plataforma a fin de evitar la respuesta asociada al estímulo aversivo. Se considera a la latencia de evitar la respuesta asociada al choque eléctrico como un índice de memoria.

RESULTADOS

3. 2. Resultados

Dentro de los objetivos de esta tesis doctoral, sobre el estudio de la glicobiología del aprendizaje, se utilizó un modelo de plasticidad dependiente de actividad ampliamente utilizado en la investigación del aprendizaje y la memoria: la Evitación Inhibitoria (EI). Para ello, se utilizaron ratas machos adultas y se las entrenó en el EI como ya está descrito en la sección de Materiales y Métodos. Brevemente, en la sesión de entrenamiento se ubicó una rata sobre una plataforma ubicada en el dispositivo de EI. Se dejó explorar al animal por unos segundos y luego de bajar hacia la grilla, recibió un choque eléctrico suave en las patas (0.5 mA, 3 seg). Posteriormente, en la sesión de evaluación, se determinó la retención de la memoria como el tiempo que el animal pasó sobre la plataforma antes de bajar.

Un grupo de ratas fueron entrenadas en el EI y el ensayo de retención se llevó a cabo a las 5 horas posteriores. A través de la prueba U Mann-Whitney se reveló la existencia de diferencias significativas en la latencia del animal en permanecer en la plataforma entre ambas sesiones ($U = 0$, $p < 0.001$, Figura 36). Se decidió estudiar este punto temporal de 5 horas post-entrenamiento dada la existencia de dos periodos críticos de síntesis de proteínas y glicoproteínas en la consolidación de la memoria en una tarea de EI: uno alrededor del momento de entrenamiento y otro de 4 a 6 horas subsecuentes (Tiunova et al, 1998; Igaz et al, 2002).

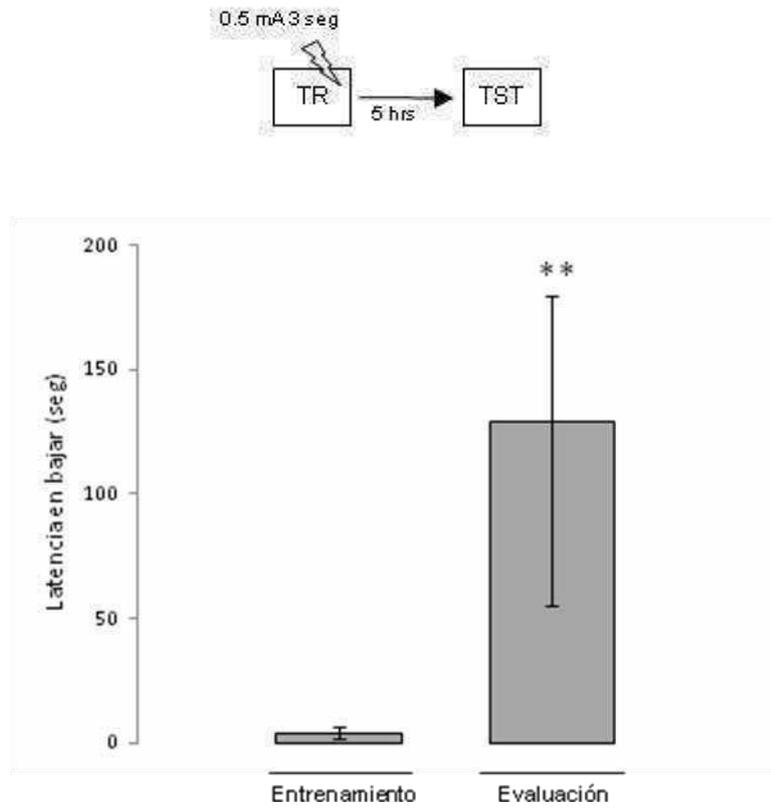


Figura 36. Desempeño de ratas en la sesión de entrenamiento y evaluación del EI. Las barras representan medianas y sus respectivos rangos intercuartiles. N=12, **p < 0.01

3. 2. 1. Caracterización de la distribución de glicanos mediante histoquímica de lectinas

Habiendo establecido que los animales entrenados en el EI muestran una retención significativa de la tarea a las 5 hs después del ensayo inicial, el siguiente experimento se realizó para responder uno de los objetivos de esta tesis: determinar si el aprendizaje conlleva asociado cambios en el patrón de expresión de estructuras oligosacáridas. Para ello, se determinó la distribución de receptores para diferentes estructuras oligosacáridas mediante histoquímica de lectinas en el hipocampo de tres grupos de ratas: Naive, Choque y Entrenadas (cada una descrita previamente en Materiales y Métodos).

Las marcaciones fueron evaluadas en un corte de cerebro representativo como se indica en la Figura 37:

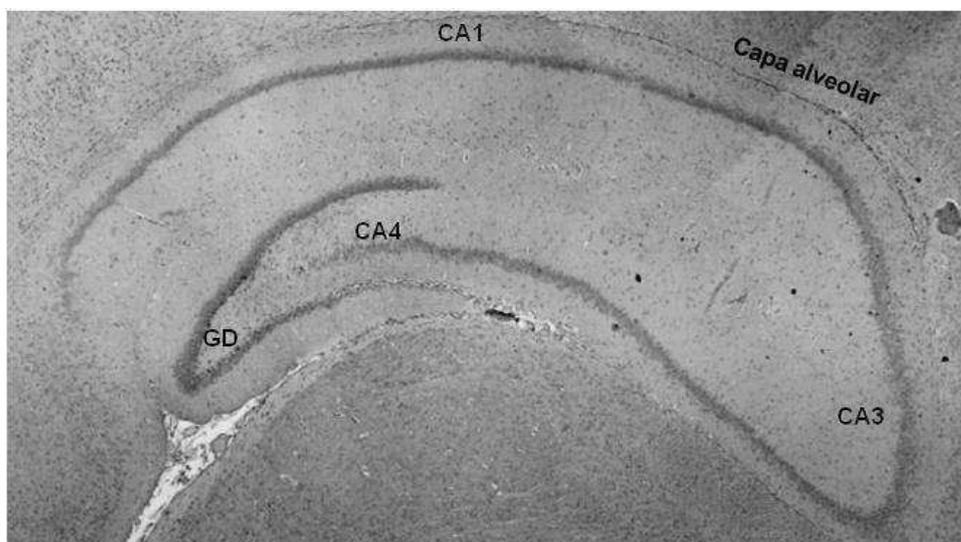


Figura 37. Sección frontal de cerebro de rata adulta, teñida con hematoxilina-eosina. Magnificación 40X. Bregma: - 4.8 mm. Adaptado de Paxinos & Watson, 1998.

A continuación se indican los resultados obtenidos para algunas lectinas:

VVL → α/β *GalNAc*. Esta lectina reconoce de manera específica al epitope O-GalNAc, estructura inicial de la vía de O-glicosilación tipo mucina (conocido también como antígeno T, ver Figura 4A). *VVL* mostró una intensa marca pericelular en algunas células piramidales aisladas en CA1, CA2 Y CA3 (Figura 38), sin reactividad en el citoplasma, pero sin diferencias entre los grupos experimentales. El neuropilo de las zonas estudiadas tampoco evidenció positividad para *VVL*.

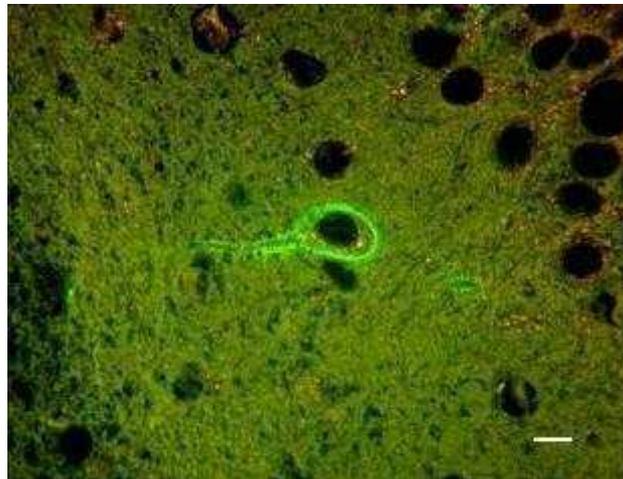


Figura 38. Histoquímica para *VVL*, específica para α/β *GalNAc* en el hipocampo de ratas Naive (marca verde). La barra corresponde 19 μ m. Magnificación 40X.

PNA → *Gal* β 1,3*GalNAc*. Siguiendo con la biosíntesis de la O-glicosilación tipo mucina, esta lectina reconoce el glicoepitope *Gal* β 1,3*GalNAc* que corresponde al *core 1* o antígeno T (ver Figura 4A en Introducción).

Los resultados indicaron que en el hipocampo del grupo Naive, la capa alveolar (la región más superficial del hipocampo compuesta por fibras mielinizadas de células piramidales) evidenció una marcación intensa para *PNA* (Figura 39 A), sin diferencias con los grupos Entrenados y Choque (Figura 39 D y G).

En el Giro Dentado (GD) de las ratas Naive y Choque, el neuropilo de la capa polimórfica evidenció una marcación intensa (Figura 39 B y H). En cambio, en el grupo Entrenado se observó una disminución en la marca para los receptores PNA en la capa polimórfica del GD (Figura 39 E). Esta disminución en marcación para PNA también se evidenció en el % de animales positivos para la lectina (Figura 40).

En las células piramidales del hipocampo, los receptores de PNA se evidenciaron alrededor del soma, sin diferencias notorias entre los grupos (Figura 39 C, F e I).

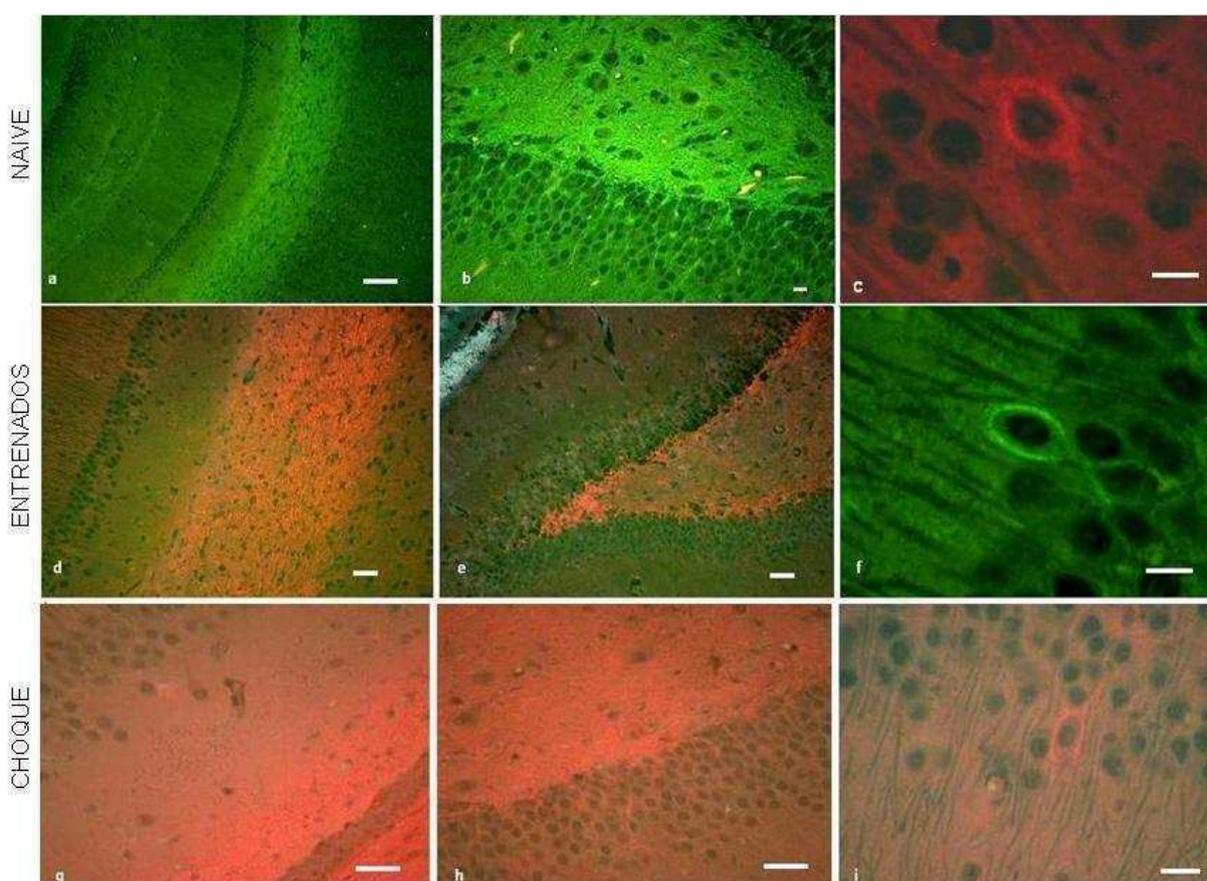


Figura 39. Histoquímica para PNA, específica de Gal β 1,3GalNAc, en el hipocampo de ratas Naive (a, b y c), Entrenadas (d, e y f) y Choque (g, h e i). Las barras corresponden a: a) 196 μ m, b) y c) 18 μ m, d) y e) 57 μ m, f) 18 μ m, g) y h) 54 μ m, i) 36 μ m. Magnificación 40X.

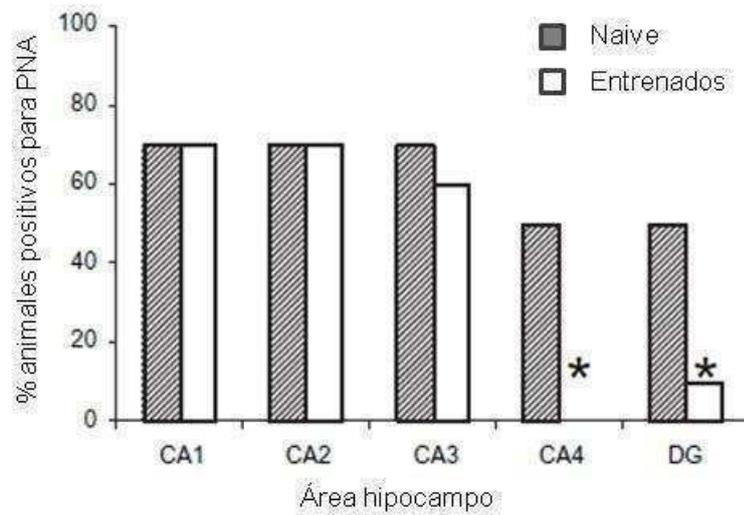


Figura 40. Expresión de receptores para PNA, específica de Gal β 1,3GalNAc, en el hipocampo. Los datos están expresados como el porcentaje (%) de animales positivos para PNA. * $p < 0.05$, Z test, Control n=9, Entrenados n=9.

GNL \rightarrow *Manosa* α 1,3 *terminal*. Aunque esta tesis está enfocada principalmente en el estudio de los O-glicanos, se eligió estudiar también el patrón de distribución de una lectina de N-glicanos, como GNL, específica de estructuras oligomanosídicas y de alta manosa (Fouquaert et al, 2009).

Los resultados indicaron un alto contenido de receptores para Man α 1,3 terminal en el citoplasma de células piramidales en el grupo Naive (Figura 41 A). Al comparar las marcaciones entre los tres grupos experimentales, se observó un mayor número de células piramidales positivas para GNL en el grupo Entrenado (Figura 41 B). El aumento en la marca para GNL en el grupo Entrenado también se evidenció en el % de animales positivos para la lectina en varias áreas del hipocampo (Figura 42).

Por otra parte, el citoplasma de las células granulares del Giro Dentado mostró una marcación intensa para los receptores de GNL, sin diferencias entre los grupos (Figura 41 D, E y F). Las fibras (de la capa alveolar) no mostraron positividad para GNL (datos no mostrados).

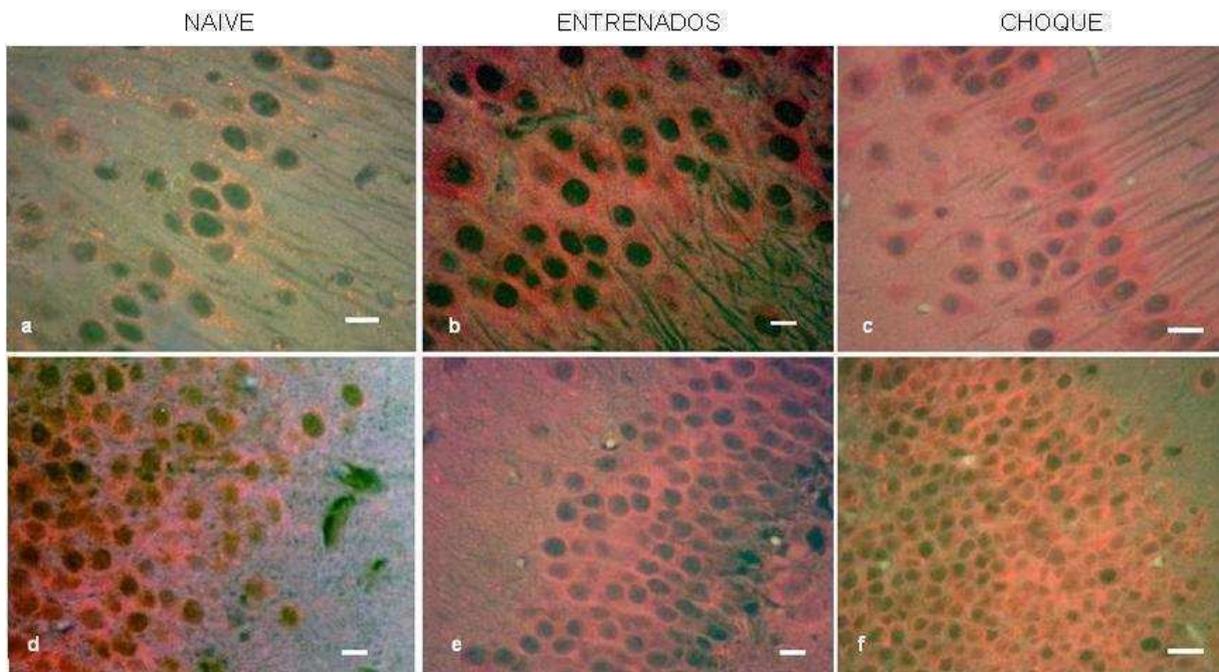


Figura 41. Histoquímica para GNL, específica de $\text{Man}\alpha 1,3$ terminal, en el hipocampo de ratas Entrenadas (b y e), Naive (a y d) y Choque (c y f). Las barras corresponden a: a) $19\ \mu\text{m}$, b) $18\ \mu\text{m}$ c) $36\ \mu\text{m}$, d) $11\ \mu\text{m}$, e) $18\ \mu\text{m}$, f) $36\ \mu\text{m}$, g) $18\ \mu\text{m}$, h) $38\ \mu\text{m}$ e i) $0,19\ \mu\text{m}$. Magnificación 40X.

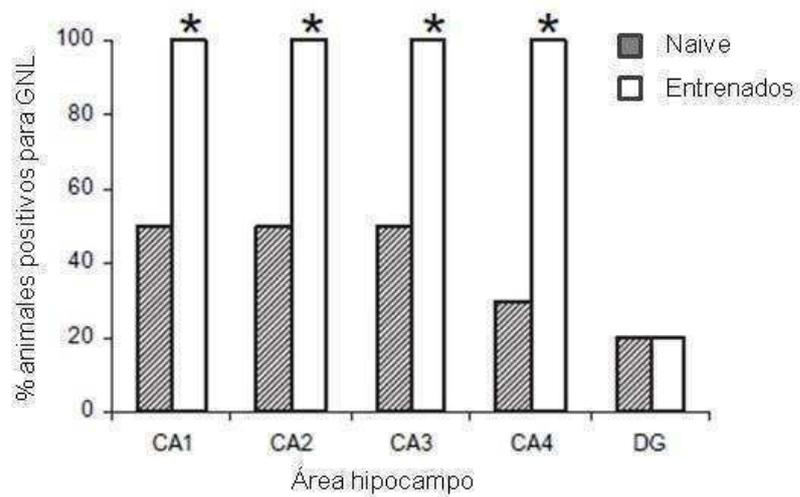


Figura 42. Expresión de receptores para GNL, específica de $\text{Man}\alpha 1,3$ terminal, en el hipocampo. Los datos están expresados como el porcentaje (%) de animales positivos para GNL. * $p < 0.05$, *Z test*, Control $n=9$, Entrenados $n=9$.

LTL → *Fucosa* α 1,2. La relevancia del estudio de distribución de los receptores para LTL en el cerebro radica en que el glicopeptope $Fuc\alpha$ 1,2Gal existe en posiciones terminales en N- y O- glicoproteínas y ha sido asociado con un rol modulador importante en procesos cognitivos, como aprendizaje y memoria (Murrey et al, 2006).

La Figura 43 indica que en varias áreas del hipocampo en ratas Naive hubo una marcación clara de receptores para LTL: en la capa subgranular del Giro Dentado (Figura 43D), en la capa polimófica (Figura 43 E) y en la capa alveolar (Figura 43 F). Los ratas del grupo Entrenados no evidenciaron diferencias de expresión de la estructura $Fuc\alpha$ 1,2Gal con respecto al Naive (Figura 43 A, B y C). Esta distribución similar de marcación para LTL también se reflejó en el número de animales positivos para esta lectina (Figura 44).

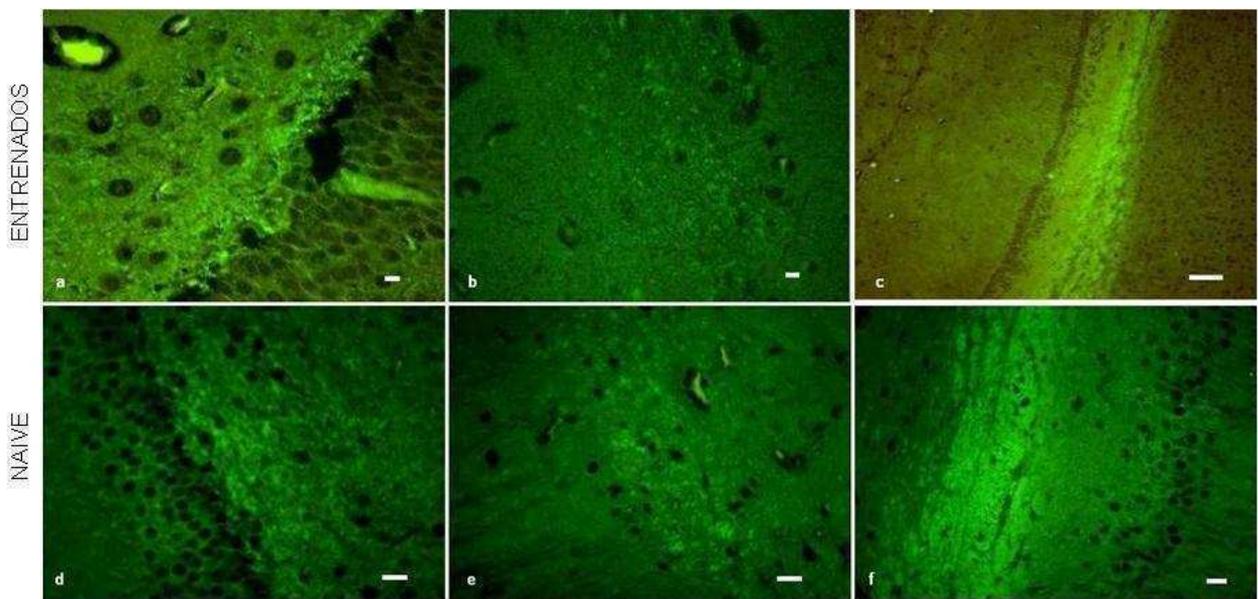


Figura 43. Histoquímica para LTL, específica para $Fuc\alpha$ 1,2 en el hipocampo de ratas Entrenadas (a, b y c), Naive (d, e y f) y Choque (g). Las barras corresponden a: a) a), b) d) y e) 18 μ m, c) 196 μ m, f) y g) 36 μ m. Magnificación 40X.

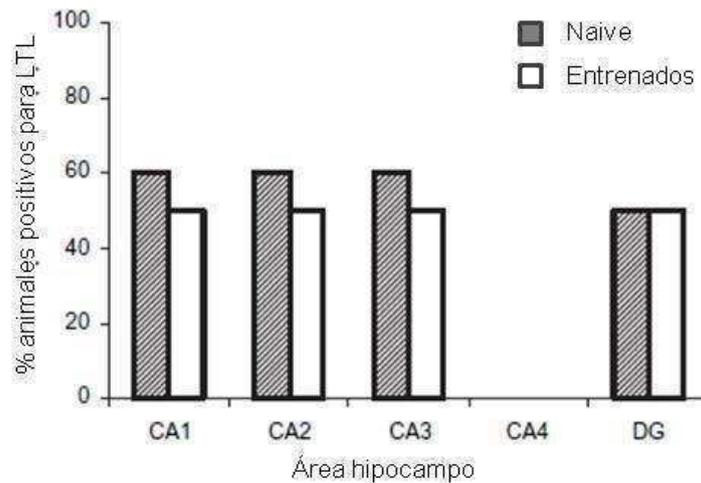


Figura 44. Expresión de receptores para LTL, específica de $Fuc\alpha1,2Gal$, en el hipocampo. Los datos están expresados como el porcentaje (%) de animales positivos para LTL. * $p < 0.05$, Z test, Control $n=9$, Entrenados $n=9$.

WGA \rightarrow *GlcNAc*. Siguiendo con el estudio de O-glicanos, esta lectina ha sido utilizada extensamente en el aislamiento e identificación de glicoproteínas modificadas con O-GlcNAc (Lefebvre et al, 2001).

Se observó una distribución homogénea para los receptores de *WGA* en todo el neuropilo del hipocampo. El citoplasma de las neuronas piramidales fue negativo. No hubo diferencias de marcación para *WGA* entre los grupos experimentales (Figura 45 A, B y C).



Figura 45. Histoquímica para *WGA* en el hipocampo de ratas Naive (a), Entrenadas (b) y Choque (c). Las barras corresponden a: a) y b) $19\ \mu\text{m}$ y c) $54\ \mu\text{m}$. Magnificación 40X.

A continuación, se indica de manera gráfica el patrón de distribución hipocampal de las lectinas estudiadas (Figura 46):

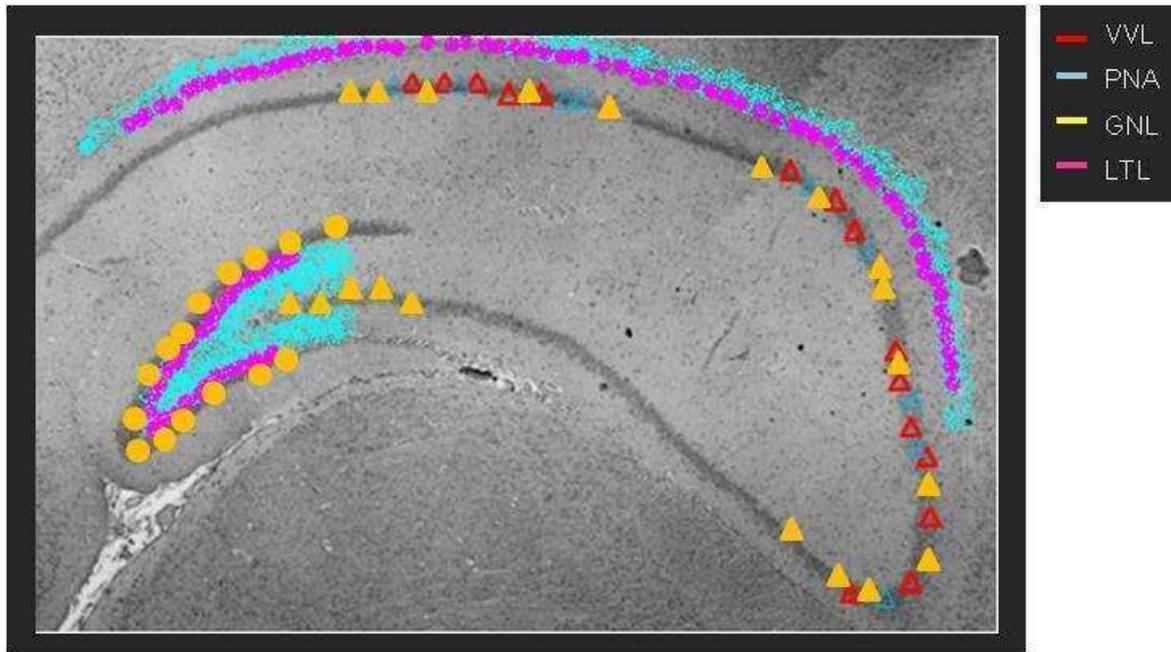


Figura 46. Patrón de distribución en el hipocampo de las lectinas estudiadas. Magnificación 40X.

3. 2. 2. Expresión de genes de O-glicosiltransferasas en el hipocampo y corteza de ratas entrenadas

Luego de caracterizar la distribución de receptores de lectinas en el hipocampo de ratas Entrenadas y Naive, y dado que los resultados indicaron algunas modificaciones en la estructura de oligosacáridos en la fase de formación de la memoria a las 5 hs luego del entrenamiento, el siguiente objetivo de esta tesis fue estudiar qué sucede con la maquinaria de glicosilación a nivel molecular como consecuencia del aprendizaje y la memoria.

Por lo tanto, el siguiente experimento fue realizado a fin de estudiar los niveles de mRNA de O-glicosiltransferasas en el hipocampo y la corteza de ratas en dos puntos temporales de la formación de la memoria para la tarea de EI, la consolidación y la reconsolidación (indicado en la Figura 47):

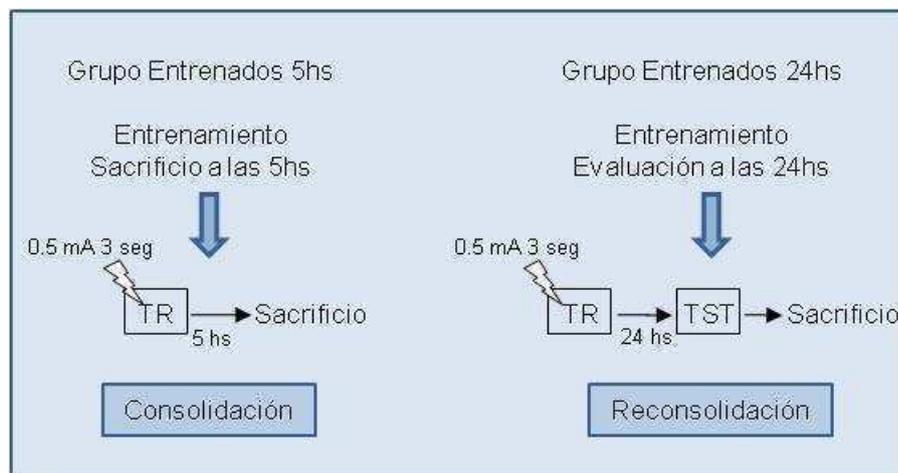


Figura 47. Esquema del diseño experimental usado.

Luego de haber determinado que las ratas entrenadas retienen la memoria para el EI a las 5 hs (ver Figura 36), se evaluó a otro grupo de animales a las 24 horas posteriores al entrenamiento en el EI. A través de la prueba U Mann-Whitney se reveló la existencia de diferencias significativas en la latencia de los animales en permanecer en la plataforma entre ambas sesiones ($U = 3$, $p < 0.001$, Figura 48), lo cual indica que los animales entrenados muestran retención de la memoria para la tarea aprendida.

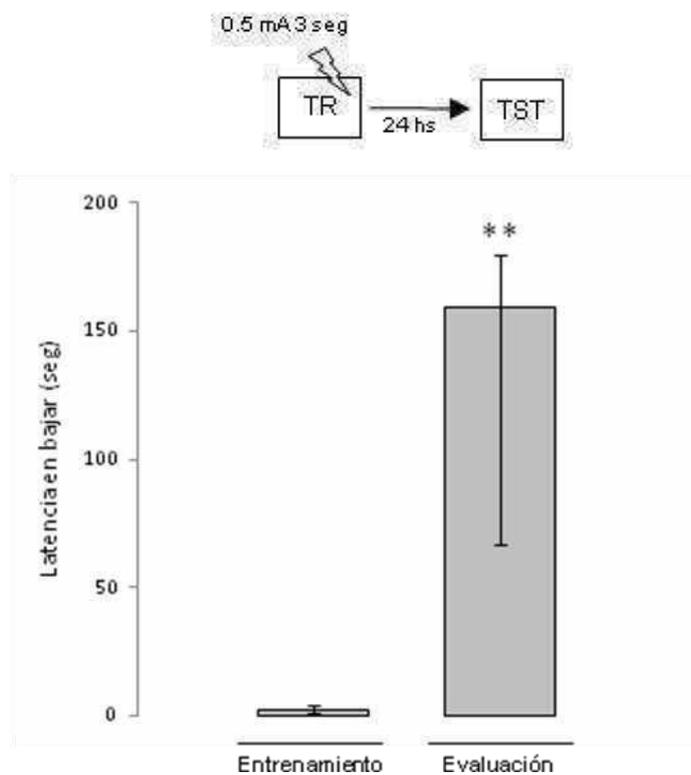


Figura 48. Desempeño de ratas en la fase de entrenamiento y evaluación del EI. Las barras representan medianas y sus respectivos rangos intercuartiles. $N = 16$. ** $p < 0.01$

A continuación, se describen los resultados obtenidos para cada O-glicosiltransferasa estudiada en el hipocampo y la corteza asociados a las fases de consolidación y reconsolidación de la memoria para el EI.

3. 2. 2. 1. O-glicosilación tipo mucina. Efectos en el hipocampo.

La Figura 49 representa de manera esquemática los pasos y las glicosiltransferasas estudiadas y que participan en la biosíntesis del O-GalNAc inicial (antígeno Tn) y sus posteriores modificaciones con azúcares.

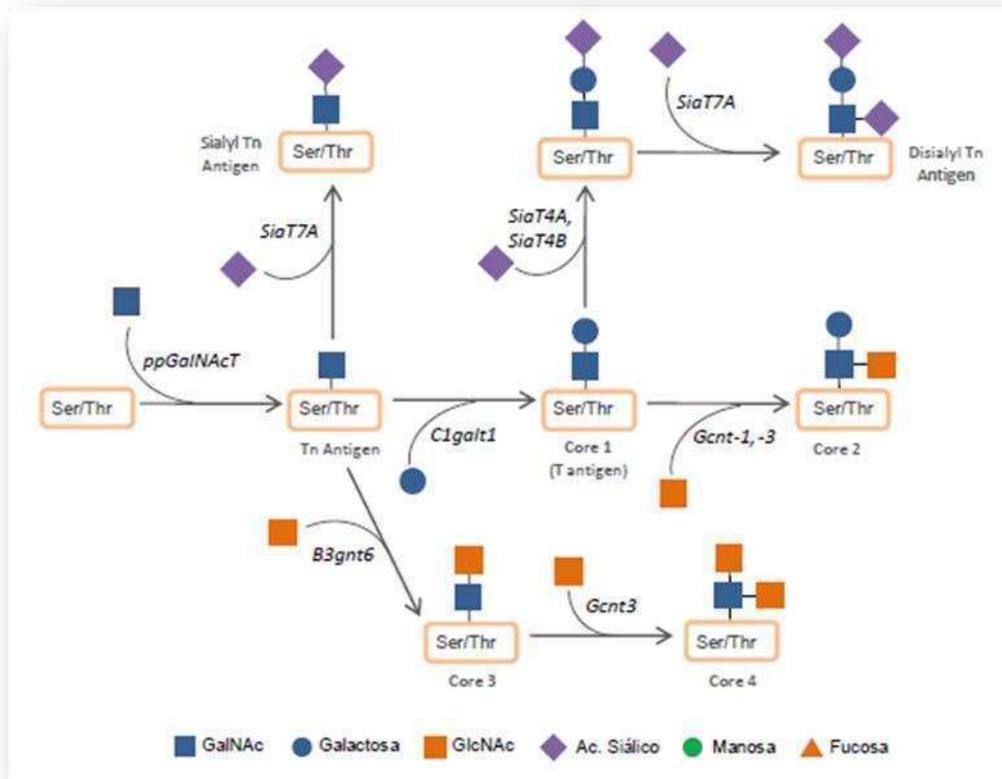


Figura 49. O-glicosilación tipo mucina. Formación del O-GalNAc inicial y modificaciones posteriores. Resaltado en **negrita** se indican las glicosiltransferasas responsables en cada paso de biosíntesis.

Formación del O-GalNAc inicial

Con respecto al inicio del camino de la O-glicosilación tipo mucina, se observó que algunos componentes de la familia GalNAc-T tuvieron perfiles de expresión génica diferentes dependiendo de qué fase de la formación de la memoria estaba siendo estudiada: A las 5 hs luego del ensayo de adquisición, los niveles de transcripto para la glicosiltransferasa Galnt10 disminuyeron de manera significativa

en el hipocampo de ratas del grupo Entrenado con respecto al control (Entren.5hs, Figura 50 A, $p < 0.05$), pero no hubo diferencias luego de la evocación de la memoria a las 24hs posteriores (Entren.24hs, Figura 50 B, $p > 0.05$).

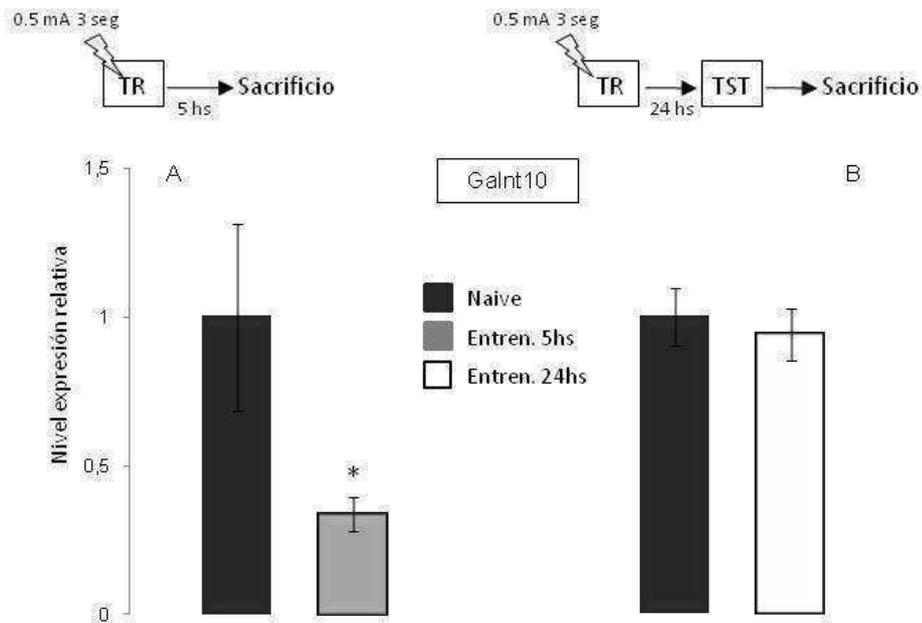


Figura 50. Expresión hipocampal de Galnt10 asociada a una tarea de Evitación Inhibitoria. (A) 5 horas luego del entrenamiento o (B) luego de la evocación, 24 hs luego del entrenamiento. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar al grupo Naive. Los valores están expresados en media \pm error estándar. Naive n=8, Entren.5hs n=8, Entren.24hs n = 10. * $p < 0.05$. El esquema superior indica el procedimiento experimental para cada grupo.

Por el contrario, luego del ensayo de retención 24 hs posteriores al entrenamiento, se observaron aumentos significativos en los niveles de mRNA para otros miembros de la familia GalNAc-T: Galnt1, Galnt5, Galnt7, Galnt11 y Galnt13 (Entren.24hs, Figura 51 A-E, $p < 0.01$).

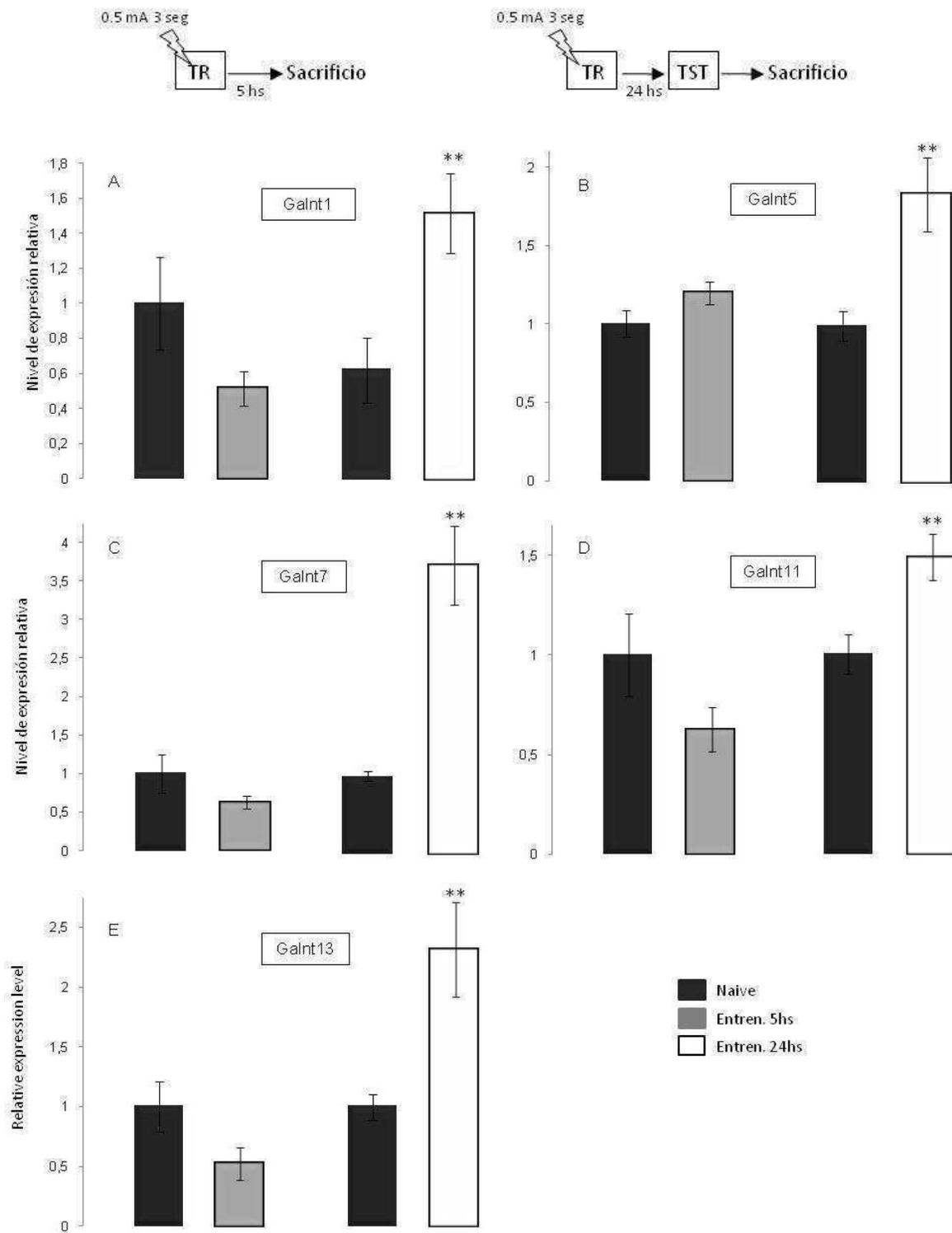


Figura 51. Expresión hipocampal de varios miembros de la familia GalNac-T asociados a una tarea de Evitación Inhibitoria. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar al grupo Naive. Los valores se expresan en media \pm error estándar. Naive n=8, Entren.5hs n=8, Entren.24hs n = 10. **p < 0.01. El esquema superior indica el procedimiento experimental usado.

Los resultados indicados en la Figura 51 parecen indicar que el aumento en los niveles de transcritos para las GalNAc-Ts está específicamente asociado a la condición experimental de este grupo, es decir, a la evocación de la memoria 24 hs luego del entrenamiento.

Una manera de controlar esto es mediante el estudio del comportamiento de los genes en el grupo No Choque 24 hs (descrito en Materiales y Métodos). Brevemente, un grupo de ratas fueron expuestas al dispositivo experimental como en el entrenamiento, pero omitiendo el choque eléctrico y 24 hs después, expuestas a un ensayo de evocación. Los resultados indicaron que el nivel de transcritos para Galnt11 disminuyó de manera significativa en el hipocampo de ratas No Choque 24 hs con respecto a los animales entrenados y evaluados (Entren.24hs: 1 ± 0.06 vs No Choque 24hs: 0.41 ± 0.21 , $p < 0.05$), sin mostrar diferencias con respecto al grupo Naive (Naive: 1 ± 0.08 vs No Choque 24hs $0.56 \pm 0,25$, $p > 0.05$). Del mismo modo, el nivel de transcritos para Galnt13 fue menor en el hipocampo de animales del grupo No Choque 24hs comparados con los animales entrenados (Entren.24hs: 1 ± 0.09 vs No Choque 24hs: 0.55 ± 0.06 , $p < 0.05$) y sin mostrar diferencias con el grupo Naive (Naive: 1 ± 0.08 vs No Choque 24 hs: $0.6 \pm 0,28$, $p > 0.05$).

Substituciones posteriores sobre O-GalNAc.

Continuando en los siguientes pasos de la biosíntesis de O-glicanos tipo mucina, se observa en la Figura 49 que la adición posterior de azúcares al epítipo O-GalNAc resulta en estructuras más complejas (como distintas estructuras centrales o *core*).

La conversión del *core 1* ($\text{Gal}\beta 1,3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-Ser/Thr}$) al *core 2* ($\text{Gal}\beta 1,3[\text{GlcNAc}\beta 1,6]\text{GalNAc}\alpha 1\text{-Ser/Thr}$) es catalizada por la enzima *core 2* sintasa (Gcnt1),

la cual es importante porque define un punto de ramificación en el camino de biosíntesis de O-glicanos.

De manera similar a los componentes de la familia GalNAc-T descrita, se observó un incremento significativo en el nivel de mRNA de Gcnt1 luego de la evocación de la memoria en el hipocampo de ratas entrenadas (Entren.24hs, Figura 52 B, $p < 0.05$), aunque no se observaron diferencias de expresión 5 horas después de la sesión de entrenamiento (Entren.5hs, Figura 52 A, $p > 0.05$).

De manera alternativa, el *core 1* ($\text{Gal}\beta 1,3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-Ser/Thr}$) puede ser modificado con Ácido Siálico (formando la estructura $\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-Ser/Thr}$) mediante la acción de las sialiltransferasas SiaT4A y SiaT4B. Luego de la reactivación de la memoria 24 hs posteriores al entrenamiento, se observaron aumentos significativos en los niveles de transcritos para SiaT4A y SiaT4B en el hipocampo de ratas entrenadas con respecto al grupo Naive (Entren.24hs, Figura 52 D y F, $p < 0.01$).

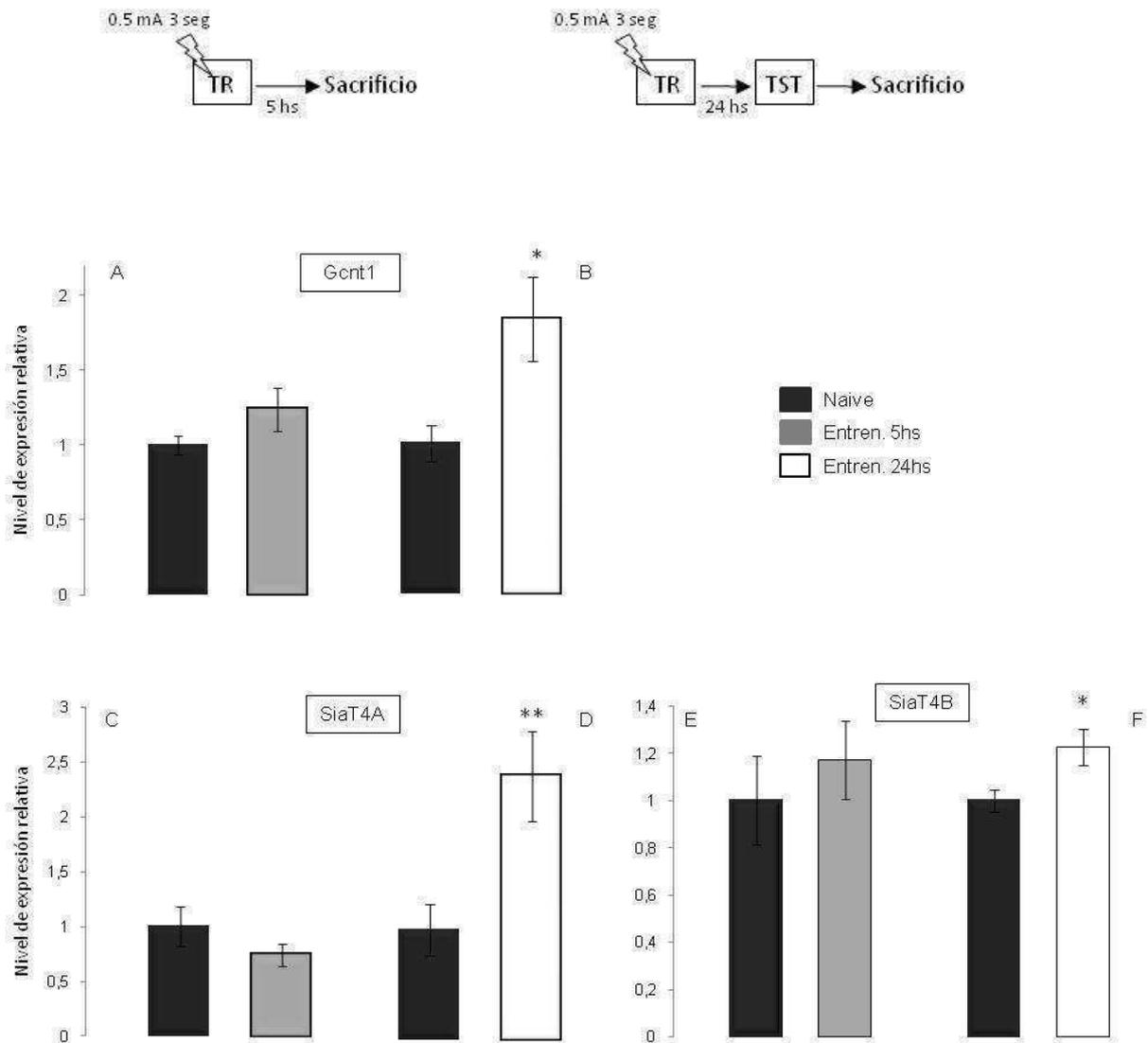


Figura 52. Expresión hipocámpal de glicosiltransferasas que modifican el *core 1* de la vía de O-glicosilación tipo mucina luego de una tarea de Evitación Inhibitoria. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar al grupo Naive. Los valores se expresan en media \pm error estándar. Naive n=8, Entren.5hs n=8, Entren.24hs n = 10. *p < 0.05, **p \leq 0.01. El esquema superior indica el procedimiento experimental usado.

3. 2. 2. 2. O-glicosilación tipo mucina. Efectos en la corteza

En la corteza de ratas entrenadas, solamente se observó modificación para un solo componente de la familia GalNAc-T luego de la evocación de la memoria para el EI 24 hs posteriores al entrenamiento: al igual que en el hipocampo, el nivel de transcritto de Galnt13 aumentó de manera significativa en la corteza de ratas entrenadas en comparación con el grupo control (Figura 53 B, $p < 0.01$).

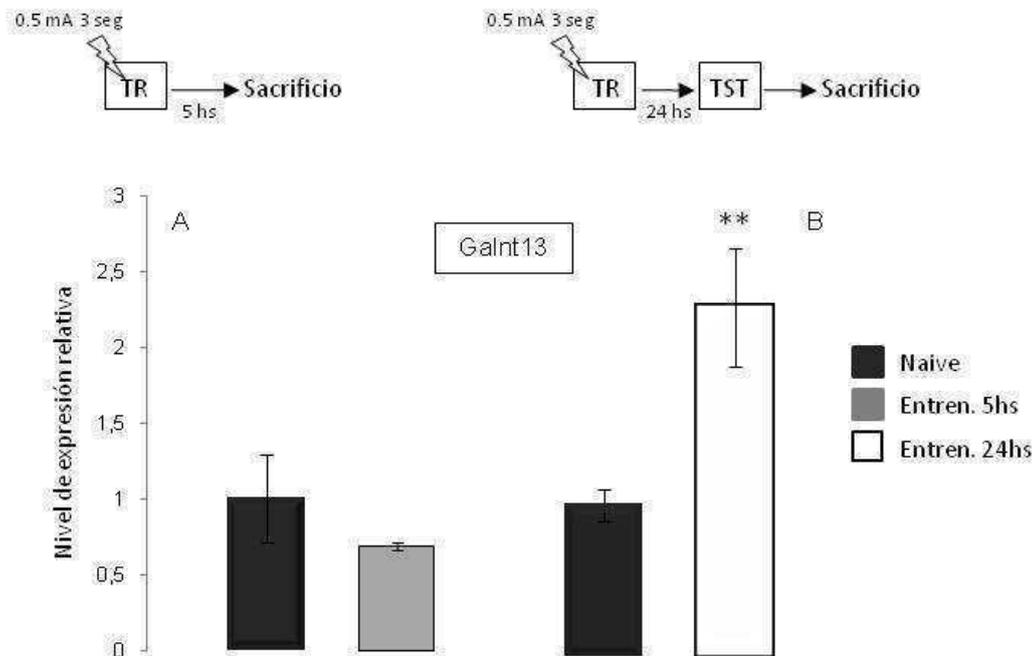


Figura 53. Expresión en corteza de Galnt13 luego de una tarea de Evitación Inhibitoria. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar al grupo Naive. Los valores se expresan en media \pm error estándar. Naive $n=8$, Entren.5hs $n=8$, Entren.24hs $n = 10$. ** $p < 0.01$. El esquema superior indica el procedimiento experimental para cada grupo.

3. 2. 2. 3. O-manosilación. Efectos en el hipocampo.

La modificación de residuos de Ser o Thr mediante el enlace O-glicosídico del azúcar Manosa es controlada por dos glicosiltransferasas, Pomt1 y Pomt2. Como se indica en la Figura 54, la modificación siguiente sobre O-manosa es la adición de GlcNAc por parte de la glicosiltransferasa Pomgnt1:

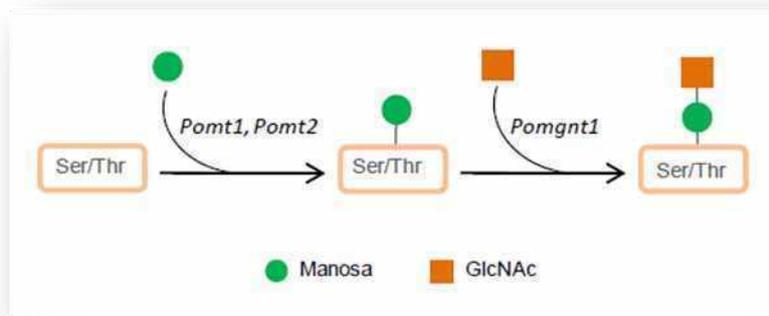


Figura 54. Esquema indicando los genes responsables de los pasos iniciales de O-manosilación

Los resultados indicaron que, a las 5 hs posteriores al entrenamiento en el EI, los niveles de mRNA de Pomt1 y Pomt2 disminuyeron de manera significativa en el hipocampo de ratas entrenadas (Entren.5hs, Figura 55 A y C, $p < 0.05$).

Por el contrario, luego de la evocación de la memoria, dos componentes de la O-manosilación aumentaron sus niveles de transcritos en el hipocampo: Pomt1 y Pomgnt1 (grupo Entren.24hs, Figura 55 B y F, $p < 0.05$).

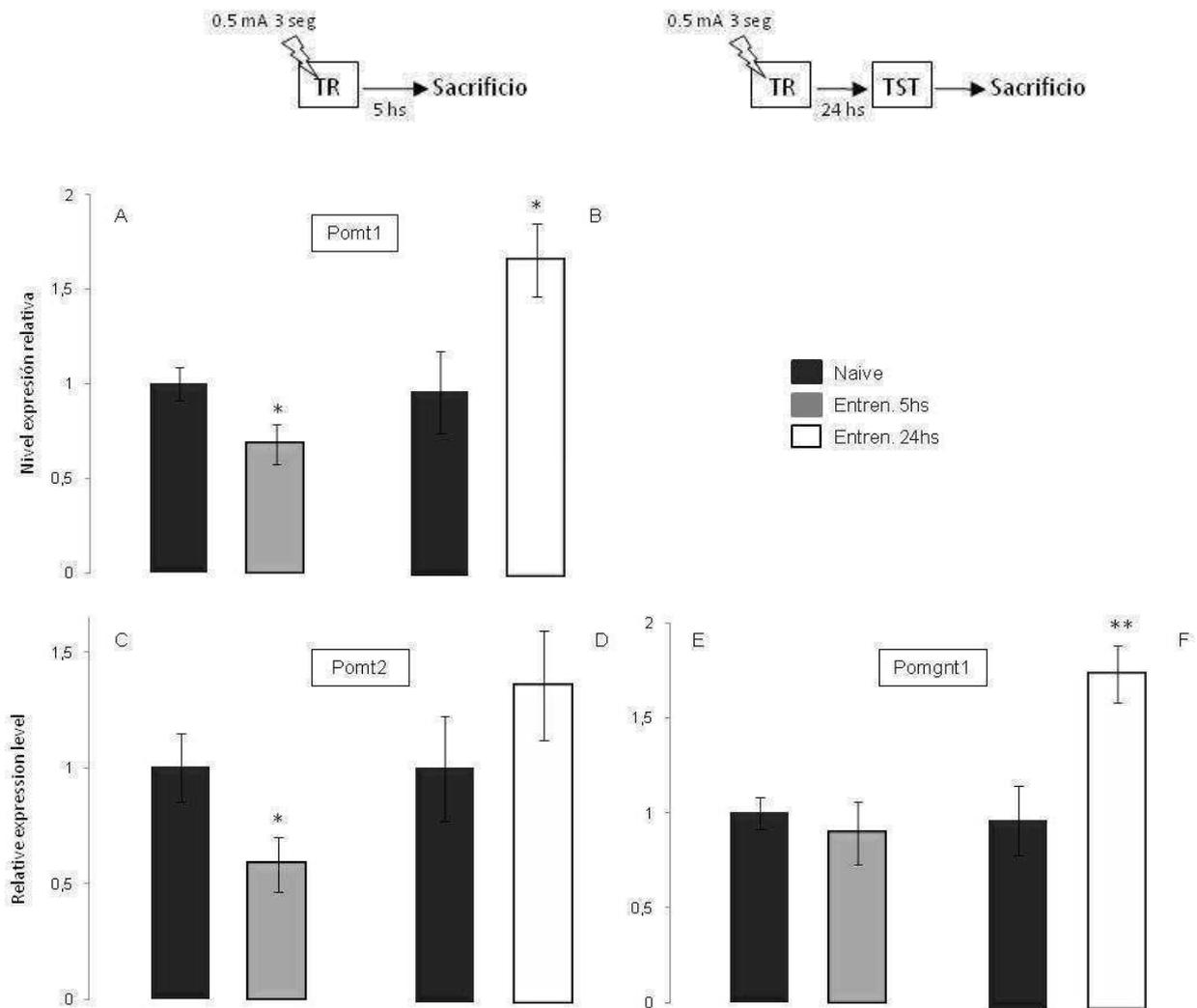


Figura 55. Expresión hipocámpal de componentes de la O-manosilación luego de una tarea de Evitación Inhibitoria. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar al grupo Naive. Los valores se expresan en media \pm error estándar. Naive $n=8$, Entren.5hs $n=8$, Entren.24hs $n = 10$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. El esquema superior indica el procedimiento experimental para cada grupo.

Los resultados hasta ahora indican que el punto temporal de 5hs post-entrenamiento está asociado a una disminución en los niveles de mRNA para algunas O-GTs. A fin de controlar que estos resultados no sean inespecíficos y resulten de la experiencia del choque eléctrico *per se* o de la exposición al dispositivo, se usaron los grupos Choque y No Choque 5hs (descritos en Materiales y Métodos). Brevemente, un grupo de ratas fueron puestas directamente

a la grilla con el estímulo eléctrico, sin la posibilidad de aprender la tarea de evitación ni hacer ningún tipo de asociaciones, (grupo Choque). Y otro grupo de ratas fueron expuestas al dispositivo experimental como en el entrenamiento, pero omitiendo el choque eléctrico y fueron sacrificadas a las 5 hs (grupo No Choque 5hs).

En particular, se estudió el comportamiento del gen de Pomt1 en el hipocampo de los grupos Choque y No Choque 5hs, como indica la Tabla 4:

| Pomt1 | |
|----------------|---------------|
| Naive | 1.00 ± 0.15 |
| Entrenados 5hs | 0.67 ± 0.01 * |
| Choque | 2.20 ± 0.70 |
| No Choque 5hs | 1.10 ± 0.10 |

Tabla 4. Expresión hipocampal del gen Pomt1 luego de una tarea de EI. Los cambios relativos de expresión génica fueron normalizados al grupo Naive. Los valores para el gen están expresados en media ± error estándar. * p < 0.05 con respecto al grupo Naive.

La tabla 4 indica que la disminución en el nivel de mRNA de Pomt1 es específica del aprendizaje y formación de memoria del grupo Entrenados 5hs: el choque eléctrico por sí mismo no generó ningún tipo de efecto en los niveles de Pomt1 (ver grupo Choque) y la exposición al dispositivo *per se* no tuvo ningún efecto sobre los niveles del gen Pomt1 en el hipocampo (ver No Choque 5hs).

Con el mismo argumento, a fin de controlar que el aumento en los niveles de mRNA de Pomt1 y Pomgnt1 luego de la evocación de la memoria son específicos de esa condición experimental, se midieron los niveles de transcripto en los grupos No Choque 24 hs y Entrenados-No Evaluados 24 hs, descriptos en Materiales y Métodos. Brevemente, un grupo de ratas fueron expuestas al dispositivo experimental como en el entrenamiento, pero omitiendo el choque eléctrico y 24 hs

después, expuestas a un ensayo de evocación (No Choque 24 hs). Y otro grupo de ratas fueron entrenadas en las condiciones descritas, y a las 24 hs fueron sacrificadas directamente, sin ser expuestas a la fase de evocación de la memoria (Entrenado-No Evaluado 24hs). La tabla 5 indica los resultados obtenidos:

| Pomt1 | | Pomgnt1 | |
|----------------------------|---------------|----------------------------|----------------|
| Naive | 1.00 ± 0.22 | Naive | 1.00 ± 0.18 |
| Entrenados 24hs | 1.72 ± 0.20 * | Entrenados 24hs | 1.78 ± 0.14 ** |
| No Choque 24hs | 0.87 ± 0.16 | No Choque 24hs | 0.85 ± 0.15 |
| Entrenado-No Evaluado 24hs | 0.90 ± 0.20 | Entrenado-No Evaluado 24hs | 1.56 ± 0.29 |

Tabla 5. Expresión hipocampal de los genes Pomt1 y Pomgnt1 luego de una tarea de EI. Los valores para cada gen están expresados en media ± error estándar. *p < 0.05, ** p < 0.01 con respecto al grupo Naive.

La exposición al dispositivo de entrenamiento por sí mismo no tuvo efecto sobre la expresión de los mARN de Pomt1 y Pomgnt1 (ver No Choque 24hs, p = NS). Además, a las 24hs luego del entrenamiento tampoco se observaron cambios en los niveles de transcritos para estos genes en el hipocampo (ver Entrenado-No Evaluado 24hs, p = NS). Estos resultados indican entonces que la inducción en el aumento de mARN para Pomt1 y Pomgnt1 luego de la evocación de la memoria (ver Figura 55 A y F) son específicos de esta condición experimental, en la cual subyacen mecanismos del proceso de reconsolidación.

3. 2. 2. 4. Adición de O-GlcNAc. Efectos en el hipocampo.

La figura 56 muestra de manera esquemática la participación de la enzima O-GlcNAc transferasa (Ogt) en la modificación de glicoproteínas con este azúcar.

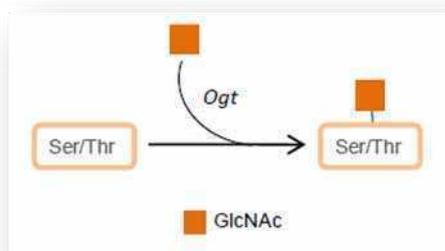


Figura 56. Adición de O-GlcNAc mediante la glicosiltransferasa Ogt

A las 5 hs después de la sesión inicial de entrenamiento, el nivel de transcripto de Ogt disminuyó de manera significativa en el hipocampo de ratas entrenadas con respecto al Naive (Entren.5hs, Figura 57 A, $p < 0.01$). Por el contrario, en ratas entrenadas que fueron sometidas a la fase de evocación de la memoria 24 hs después, hubo una inducción al aumento en el nivel de mRNA de Ogt (Entren.24hs, Figura 57 B, $p < 0.05$).

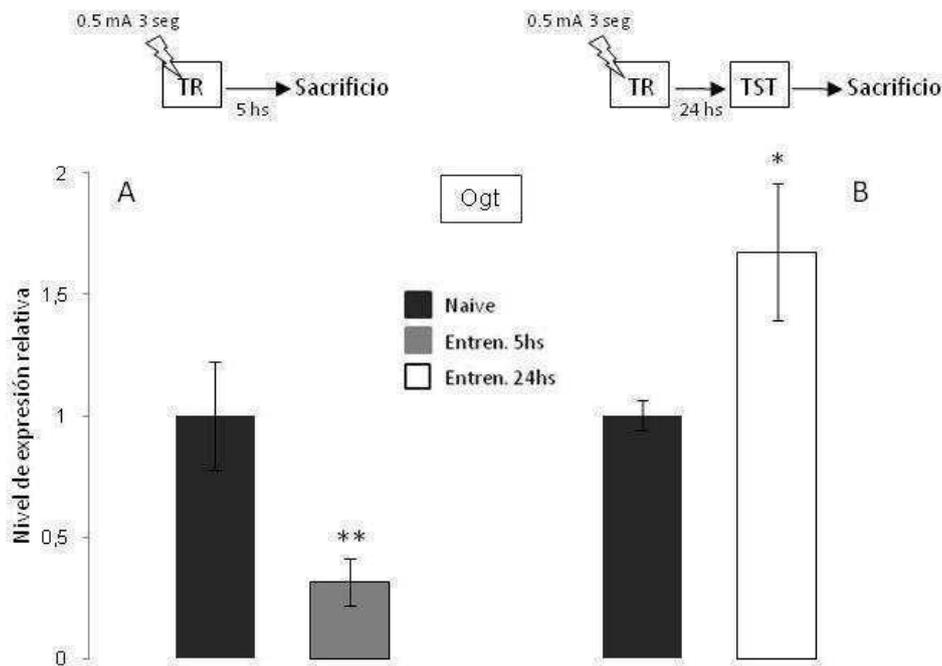


Figura 57. Expresión hipocampal de la O-GlcNAc transferasa (Ogt) luego de una tarea de Evitación Inhibitoria. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar al grupo Naive. Los valores se expresan en media \pm error estándar. Naive n=8, Entren.5hs n=8, Entren.24hs n = 10. *p < 0.05, **p < 0.01. El esquema superior indica el procedimiento experimental para cada grupo.

La disminución en el nivel de mRNA de Ogt observado en el hipocampo de ratas luego de 5 hs post-entrenamiento parece ser específico del aprendizaje y formación de la memoria de este grupo, ya que cuando se evaluó la expresión de mRNA de Ogt en el grupo Choque (ratas expuestas directamente sobre la grilla con choque eléctrico, sin posibilidad de hacer ninguna asociación de aprendizaje), no hubo diferencias con respecto al Naive, es decir, el choque eléctrico por sí mismo no generó ningún tipo de efecto en los niveles de Ogt ($p = \text{NS}$, Tabla 6 A). Además, la exposición al dispositivo de entrenamiento no influyó en el nivel de mRNA de Ogt en el hipocampo de ratas entrenadas pero con omisión del choque eléctrico (grupo No Choque 5 hs, $p = \text{NS}$, Tabla 6 A).

El aumento en el nivel de mRNA de Ogt observado en el hipocampo de ratas luego de la evocación de la memoria 24 hs del entrenamiento (ver Figura 57 B) parece indicar que es específico de esa condición experimental, ya que cuando se

evaluó la expresión de mARN de Ogt en el hipocampo del grupo No Choque 24 hs (animales expuestos al dispositivo experimental como en el entrenamiento, pero omitiendo el choque eléctrico y 24 hs después, presentados a un ensayo de evocación) no se observaron diferencias con respecto al Naive (No Choque 24 hs, p = NS, Tabla 6 B).

Es interesante notar el nivel significativamente menor de mARN de Ogt en el hipocampo de ratas del grupo Entrenados-No Evaluados 24 hs (entrenadas en las condiciones ya descritas, y a las 24 hs fueron sacrificadas directamente, sin ser expuestas a la fase de evocación de la memoria) con respecto al Naive (Tabla 6 B). Esto podría estar indicando que los mecanismos desencadenados por la evocación de una memoria de EI a las 24 hs luego del entrenamiento (grupo Entrenados 24 hs) modulan la expresión del mARN de Ogt.

| A | | B | |
|----------------|----------------|----------------------------|----------------|
| Ogt | | Ogt | |
| Naive | 1.00 ± 0.22 | Naive | 1 ± 0.06 |
| Entrenados 5hs | 0.32 ± 0.09 ** | Entrenados 24hs | 1.67 ± 0.28 * |
| Choque | 1.54 ± 0.33 | No Choque 24hs | 1.52 ± 0.36 |
| No Choque 5hs | 1.48 ± 0.31 | Entrenado-No Evaluado 24hs | 0.16 ± 0.01 ** |

Tabla 6. Expresión hipocampal de Ogt en una tarea de EI. (A) A las 5 hs post-entrenamiento y (B) Luego de la fase de evocación 24 hs después del entrenamiento. Los valores para el gen están expresados en media ± error estándar. * p < 0.05 y ** p < 0.01 con respecto al grupo Naive.

3. 2. 2. 5. O-fucosilación. Efectos en el hipocampo

La siguiente figura muestra de manera esquemática las fucosiltransferasas que participan en los primeros pasos de la O-fucosilación de glicoproteínas: Pofut1, Pofut2 y *Fringe*.

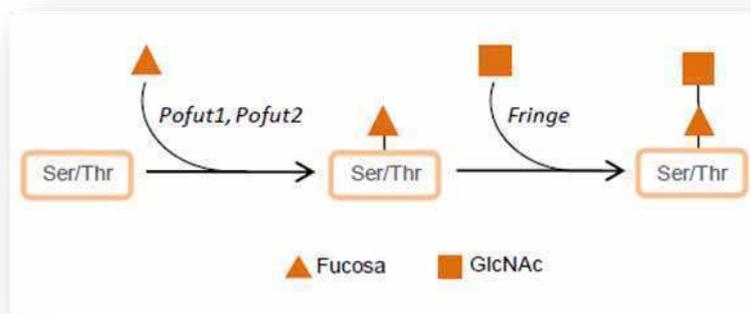


Figura 58. Esquema de los componentes iniciales de la O-fucosilación

La figura 59 indica que el nivel de mRNA de Pofut1 aumentó de manera significativa en ambos grupos de ratas entrenadas en el EI: estos cambios se observaron a las 5 hs luego del ensayo inicial de aprendizaje (Entren. 5h, Figura 59 A, $p < 0.05$) y luego de la evocación de la memoria para el EI (Entren. 24h, Figura 59 B, $p < 0.05$). Para los restantes componentes de la O-fucosilación, no hubo cambios en el nivel de expresión génica en ninguno de los grupos experimentales (datos no mostrados).

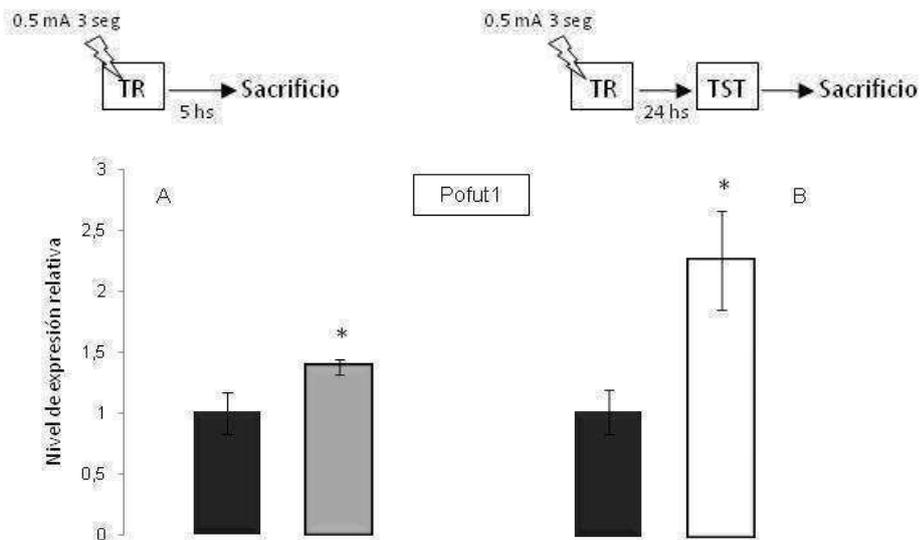


Figura 59. Expresión hipocampal de Pofut1 luego de una tarea de Evitación Inhibitoria. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar al grupo Naive. Los valores se expresan en media \pm error estándar. Naive n=8, Entren.5hs n=8, Entren.24hs n = 10. *p < 0.05. El esquema superior indica el procedimiento experimental para cada grupo.

La tabla 7A indica que el aumento en el nivel de mRNA de Pofut1 observado en el hipocampo de ratas luego de 5 hs post-entrenamiento parece ser específico del aprendizaje y formación de la memoria de este grupo, ya que cuando se evaluó la expresión del mRNA de Pofut1 en el grupo Choque (ratas expuestas directamente sobre la grilla con choque eléctrico, sin posibilidad de hacer ninguna asociación de aprendizaje), no hubo diferencias con respecto al Naive, es decir, el choque eléctrico por sí mismo no generó ningún tipo de efecto en los niveles de Pofut1 (p = NS, Tabla 7 A). Además, la exposición al dispositivo de entrenamiento *per se* no tuvo influencia en el nivel de mRNA de Pofut1 en el hipocampo de ratas entrenadas pero con omisión del choque eléctrico (grupo No Choque 5 hs, p = NS, Tabla 7 A).

Por otra parte, el aumento en el nivel de mRNA de Pofut1 observado en el hipocampo de ratas luego de la evocación de la memoria 24 hs del entrenamiento parece indicar que es específico de esa condición experimental, ya que cuando se evaluó el nivel de expresión del transcripto en el grupo No Choque 24 hs (animales

expuestos al dispositivo experimental como en el entrenamiento, pero omitiendo el choque eléctrico y 24 hs después, presentados a un ensayo de evocación) no se observó diferencias con respecto al Naive (No Choque 24 hs, $p = \text{NS}$, Tabla 7 B), lo cual indica que el aumento observado no depende de la exposición al contexto por sí solo.

Además, es interesante notar el nivel significativamente menor de mARN de Pofut1 en el hipocampo de ratas del grupo Entrenados-No Evaluados 24 hs (entrenadas en las condiciones ya descritas, y a las 24 hs fueron sacrificadas directamente, sin ser expuestas a la fase de evocación de la memoria) con respecto al Naive (Tabla 7 B). Este resultado podría estar indicando que los mecanismos desencadenados por la evocación de una memoria de EI a las 24 hs luego del entrenamiento (grupo Entrenados 24 hs) modulan la expresión del mARN de Pofut1 induciendo un aumento en su expresión.

| A | | B | |
|----------------|-------------------|----------------------------|-----------------------|
| Pofut1 | | Pofut1 | |
| Naive | 1.00 ± 0.17 | Naive | 1.00 ± 0.17 |
| Entrenados 5hs | $1.37 \pm 0.05^*$ | Entrenados 24hs | $2.21 \pm 0.39^*$ |
| Choque | 0.54 ± 0.07 | No Choque 24hs | 1.01 ± 0.17 |
| No Choque 5hs | 1.22 ± 0.20 | Entrenado-No Evaluado 24hs | $0.08 \pm 0.009^{**}$ |

Tabla 7. Expresión hipocampal de Pofut1 en una tarea de EI. (A) A las 5 hs post-entrenamiento y (B) Luego de la fase de evocación 24 hs después del entrenamiento. Los valores para el gen están expresados en media \pm error estándar. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ con respecto al grupo Naive.

3. 2. 2. 6. O-fucosilación. Efectos en corteza.

En la corteza de ratas entrenadas se observó que, luego de 5 hs post-entrenamiento, el nivel de mARN de Pofut2 disminuyó de manera significativa con respecto al grupo Naive ($p < 0.01$, Figura 60 A). No se observaron cambios luego de

la evocación de la memoria para el EI a las 24 hs posteriores al entrenamiento ($p = \text{NS}$, Figura 60 B)

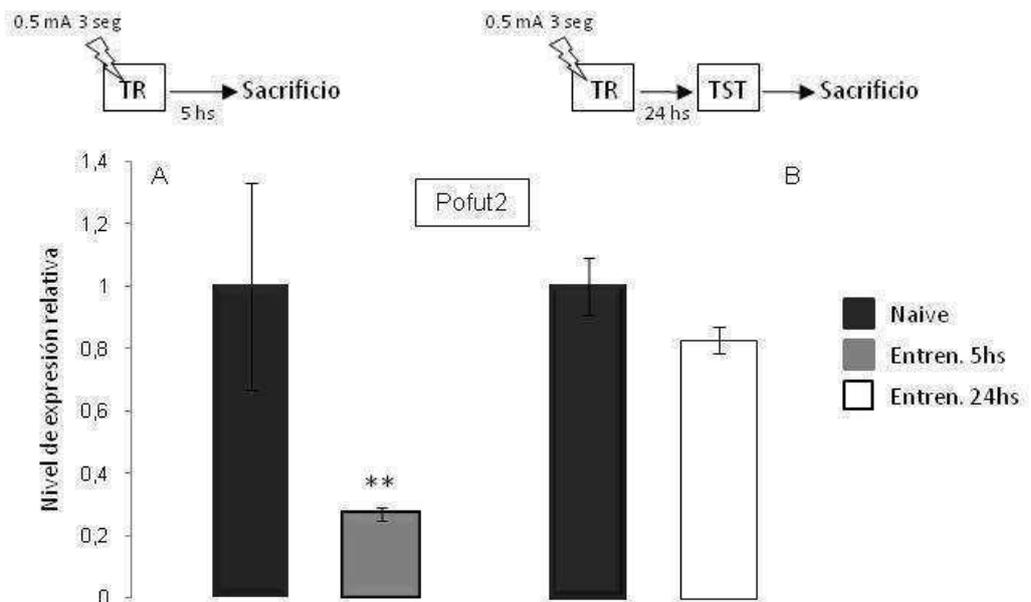


Figura 60. Expresión en corteza de Pofut2 luego de una tarea de Evitación Inhibitoria. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar al grupo Naive. Los valores se expresan en media \pm error estándar. Naive $n=8$, Entren.5hs $n=8$, Entren.24hs $n = 10$. ** $p < 0.01$. El esquema superior indica el procedimiento experimental para cada grupo.

La mayoría de las O-glicosiltransferasas, cuyos niveles de mRNA parecieron ser modulados por la consolidación de la memoria a las 5 hs post-entrenamiento, presentaron en general una disminución en su expresión génica (salvo el mRNA de Pofut1). Por el contrario, en el hipocampo de ratas entrenadas y expuestas a la evocación de la memoria, los cambios en los niveles de mRNA para las O-GTs parecieron expresarse en un aumento en la expresión de los transcritos.

Como una manera de descartar que estas variaciones (disminución y aumento) en los niveles de transcripto no se deban a artefactos técnicos y que sean específicas de cada condición experimental, se decidió estudiar el comportamiento de otros genes conocidos en la bibliografía por su participación en el procesamiento de la memoria en este modelo de aprendizaje: la subunidad α de la kinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina (CaMKII α) y la neurotrofina BDNF (*Brain-derived Neurotrophic Factor*) (Igaz et al, 2004; Bekinschtein et al, 2008b).

La Figura 61 A indica que el nivel de transcripto para la subunidad α de CaMKII fue significativamente menor en el hipocampo de ratas entrenadas y sacrificadas a las 5hs (Entren. 5hs, $p < 0.05$). En cambio, luego de la evocación de la memoria, no se observaron diferencias con respecto al grupo control (Entren. 24hs, $p = \text{NS}$, Figura 61 A). Los resultados obtenidos aquí, en parte, se ajustan a trabajos previos sobre la participación de CaMKII en la consolidación de la memoria del EI (Igaz et al, 2004), pero que serán revisados en la sección de Discusión.

Por otra parte, la evocación de la memoria 24 hs después del entrenamiento en el EI indujo un aumento en el nivel de mARN de BDNF en el hipocampo de ratas entrenadas con respecto al grupo Naive (Entren. 24hs, $p < 0.01$), aunque no hubo modificaciones luego de 5hs (Entren. 5hs, $p = \text{NS}$, Figura 61 B). Estos resultados encajan, en parte, con estudios previos sobre el comportamiento del mARN de BDNF para la misma tarea en ratas: la formación de la memoria para el EI está asociado con un aumento rápido y transitorio del mARN de BDNF (aumenta 1 hs luego del entrenamiento y luego vuelve a niveles basales no diferentes al control) (Alonso et al, 2002). Sin embargo, la inducción en el aumento del mARN de BDNF en el grupo Entren.24hs no coincide con resultados previos hasta ahora y este punto será discutido más adelante (ver Discusión).

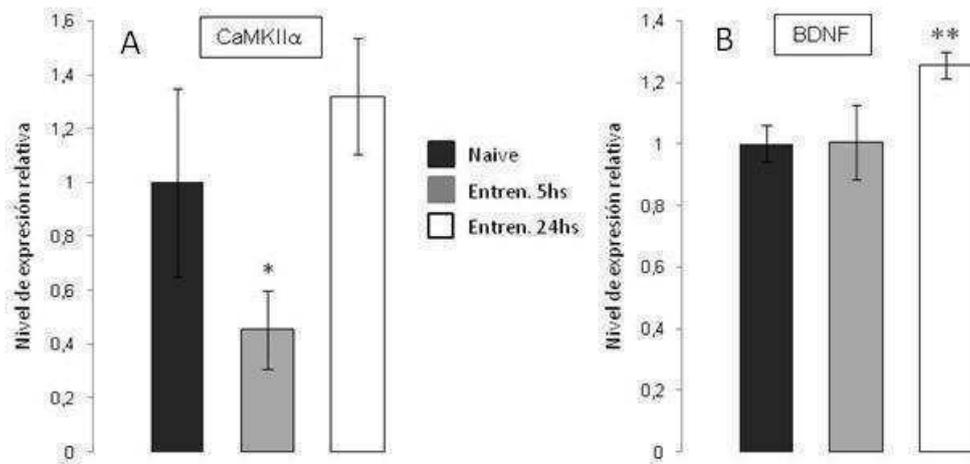


Figura 61. Expresión hipocampal de (A) CaMKII α y (B) BDNF luego de una tarea de Evitación Inhibitoria. Los cambios relativos de expresión génica fueron obtenidos al normalizar al grupo Naive. Los valores se expresan en media \pm error estándar. Naive n=8, Entren.5hs n=8, Entren.24hs n = 10. *p < 0.05, **p < 0.01

DISCUSIÓN

3. 3. Discusión

La tarea de Evitación Inhibitoria (EI) es un modelo ampliamente seleccionado para el estudio de la memoria en ratas y otros sujetos experimentales (Izquierdo et al, 2006; Rose S, 1991).

Los resultados obtenidos sobre el perfil de expresión de mRNA de O-glicosiltransferasas sugieren que distintas fases de la memoria parecieron tener una influencia diferencial sobre los genes de varias O-glicosiltransferasas. Así se pudo observar en el caso de la *O-glicosilación tipo mucina*. Los resultados mostraron que algunas glicosiltransferasas de la familia de GalNAc-T, encargadas de la formación del glicopeptido O-GalNAc (el paso inicial en esta vía de biosíntesis), tuvieron diferentes perfiles de expresión de transcritos en el hipocampo dependiendo de qué fase de la formación de la memoria estaba siendo estudiada. En el grupo experimental que fue expuesto a un ensayo de evaluación de la tarea 24 hs luego del entrenamiento (grupo Entrenados 24hs) están presentes los diferentes mecanismos moleculares desencadenados por la evocación de la memoria del contexto asociado a un estímulo aversivo, descrito ampliamente en la bibliografía (Suzuki et al, 2004). Dentro de estos mecanismos moleculares, las glicosiltransferasas iniciadoras de la O-glicosilación tipo mucina también parecen tener algún tipo de participación, ya que los resultados indicaron incrementos significativos en la expresión de transcritos de Galnt1, Galnt5, Galnt7, Galnt11 y Galnt13 en el hipocampo de ratas Entrenadas con respecto al Naive (ver Figura 51).

El otro grupo experimental estudiado en esta tesis fue entrenado en el EI y sacrificado 5 hs después (grupo Entrenados 5hs). El mismo representa los mecanismos moleculares característicos de la etapa de consolidación de la memoria para el EI, descrito extensamente en la bibliografía (Izquierdo et al, 2006). En el hipocampo de estos animales, en cambio, hubo diferencias de expresión para solamente uno de los componentes de la familia GalNAcT; Galnt10 (ver Figura 50).

De acuerdo al esquema de la formación de O-glicanos tipo mucina (ver Figura 49 para un mejor seguimiento), la formación del *core 1* (Gal β 1,3GalNAc α 1-Ser/Thr) depende del paso previo que es la adición de GalNAc a Ser/Thr por algún miembro de la familia GalNAc-T. Si se tiene en consideración los resultados de histoquímica para lectinas, se observa que la marcación con PNA (lectina específica para el *core 1*) disminuyó en el Giro Dentado de animales entrenados y sacrificados a las 5hs (ver Figura 39 E). Dado que en este grupo solamente Galnt10 fue alterado por el aprendizaje, y disminuyó la expresión del transcripto en el hipocampo (del cual, el Giro Dentado forma parte), es posible pensar que la disminución del glicopeptido Gal β 1,3GalNAc α 1-Ser/Thr (receptor de PNA) esté relacionada con los menores niveles de transcripto de Galnt10. No hubo diferencias de marcación para ninguna otra lectina estudiada. Esto genera un interrogante: Cuál es la dinámica temporal de la remodelación del árbol oligosacárido en un glicoconjugado (glicoproteína, glicolípido, etc) en el SNC? Una posibilidad es que los cambios en la estructura oligosacárida requieren mayor tiempo en remodelar sus componentes, y que por lo tanto, lo observado aquí a las 5hs post-entrenamiento no es representativo del fenómeno dinámico de la glicosilación.

Estas glicosiltransferasas sintetizadoras de O-glicanos tipo mucinas están muy bien caracterizadas en tejidos con funciones de secreción y también en cáncer. Sin embargo, en el SNC solamente unos pocos miembros de la gran familia GalNAc-T han sido identificados. Por ejemplo, la isoforma Galnt13 se expresa de manera abundante y específica en el cerebro y cultivos primarios de neuronas (Zhang et al, 2003). En cuanto a la expresión génica, se ha reportado que el nivel de transcripto de Galnt13 aumenta en oligodendrogliomas (Ducray et al, 2008) y en neuroblastomas, estando en este último caso asociado a un aumento conjunto de genes involucrados en remodelación neuronal (Berois et al, 2006). En células en cultivo, el aumento en la expresión génica de Galnt13 está regulada por Pax7b, un factor de transcripción importante durante el desarrollo y funcionamiento del SNC (White R & Ziman, 2008).

En cuanto a estudios sobre la expresión de componentes de la familia GalNAc-T y modelos de plasticidad neural, existe en la bibliografía solamente un trabajo que involucra la alteración del estímulo visual y su efecto sobre el desarrollo de la circuitería neuronal en corteza: este modelo produjo varios cambios de expresión de genes en la corteza de ratones con oclusión monocular, entre los cuales, Galnt13 y Galnt1 aumentaron su expresión en los animales con oclusión con respecto al control (Tropea et al, 2006). La enzima Galnt1 es otra de las glicosiltransferasas de esta familia descrita en el SNC: los niveles de transcripto son elevados durante el neurodesarrollo del ratón (Kingsley et al, 2000).

Aquí se mostró que la expresión de los mRNA de Galnt1, Galnt5, Galnt7, Galnt10, Galnt11 y Galnt13 parece estar diferencialmente moduladas por una experiencia de aprendizaje y formación de memoria.

Vale la pena mencionar que los grupos experimentales usados en esta parte de la tesis representan diferentes estadios de la formación de la memoria para el EI. Al proceso por el cual las memorias nuevas y lábiles (MCT por Memoria de Corto Término) son estabilizadas hacia memorias duraderas y estables (MLT por Memoria de Largo Término) se refiere como consolidación (McGaugh, 2000). Además, la reactivación o recuperación de una memoria consolidada y estable volvería la misma a un estado lábil, sensible a agentes perturbadores (Nader et al, 2000b). Una memoria reactivada requiere entonces un proceso activo para transformarse en estable otra vez, un proceso referido como reconsolidación. Numerosos trabajos indican que tanto en la consolidación de un aprendizaje inicial como en la reconsolidación de una memoria reactivada parecen participar las mismas moléculas y mecanismos, cada uno con características distintivas como diferentes requerimientos temporales (revisado en Alberini, 2005).

El estudio de los posibles cambios de glicosilación se enfocó en el punto temporal de 5 hs luego del entrenamiento dado que se han reportado dos periodos críticos de síntesis de proteínas y glicoproteínas durante la consolidación de la memoria en una tarea de EI: uno alrededor del momento de entrenamiento y otro de 4 a 6 horas subsecuentes (Tiunova et al, 1998; Igaz et al, 2002). En cambio, no

existen trabajos que asocian a la glicobiología y la reconsolidación de una memoria. Para algunos componentes de la O-glicosilación tipo mucina, los resultados presentados aquí indican que ambos fenómenos biológicos (consolidación y reconsolidación) parecen involucrar diferentes patrones de glicosilación.

En cuanto a la O-manosilación, se observaron variaciones en la expresión de mARN de componentes de esta vía dependiendo de qué fase de formación de la memoria estaba siendo analizada. En mamíferos, la biosíntesis de la O-manosilación es iniciada por un complejo de O-manosiltransferasas mutuamente indispensables para su actividad y expresión; Pomt1 y Pomt2 (Manya et al, 2004). Es interesante destacar el comportamiento de la expresión de los mARN de Pomt1 y Pomt2 en el hipocampo de ratas entrenadas y sacrificadas a las 5hs (ver Figura 55): ambos disminuyen sus niveles de transcritos del mismo modo. Esta regulación sobre componentes de la O-manosilación asociados a un evento de aprendizaje y memoria no ha sido reportada previamente en la bibliografía, lo cual destaca la importancia de este tipo de glicosilación en el SNC.

Un comportamiento similar en el nivel de mARN de Ogt, la glicosiltransferasa encargada de transferir O-GlcNAc, se observó en el hipocampo de ratas a las 5 hs y luego de la evocación 24hs después del entrenamiento: disminución y aumento en los niveles de transcritos Ogt, respectivamente (ver Figura 57). Este resultado cobra significancia si se tiene en cuenta la relación que existe entre la modificación con O-GlcNAc y el almacenamiento de la memoria. Tal es el caso del factor de transcripción CREB, involucrado en varios procesos, entre ellos, la formación de memorias (revisado en Silva et al, 1998). Diferentes MPT regulan las funciones de CREB, y la glicosilación por O-GlcNAc tiene un papel muy importante. Numerosos trabajos indican que la modificación de CREB con O-GlcNAc afecta su actividad transcripcional (Lamarre-Vincent & Hsieh-Wilson, 2003; Kaleem et al, 2011). Además, se ha reportado que varias glicoproteínas del sinaptosoma implicadas en enfermedades neurodegenerativas están abundantemente modificadas con O-GlcNAc (Cole & Hart, 2001). Los resultados de histoquímica de lectinas para WGA (que reconoce O-GlcNAc) no indicaron diferencias de marcación en el hipocampo de ratas entrenadas y control (ver Figura 45). Es probable que la dinámica de la

glicosilación a nivel estructural requiera mayor tiempo que 5 hs luego del entrenamiento para hacer evidentes cambios en la composición de glicanos.

El hipocampo, en comparación con la corteza, presentó un mayor número de variaciones de mRNA de O-GT en respuesta a ambas fases de la formación de la memoria. Esta respuesta estuvo representada, al menos en lo que respecta a los genes estudiados en esta tesis, por una disminución en la expresión de transcritos a las 5 hs post-entrenamiento. Por el contrario, en el hipocampo de ratas entrenadas y expuestas a la evocación de la memoria, los cambios en los niveles de mRNA para las O-GTs parecieron expresarse en un aumento en el nivel de los transcritos. Para evaluar si estos cambios (disminuciones y aumentos) eran selectivos de cada condición experimental, se estudió la expresión de mRNA de dos moléculas con una participación reconocida en el procesamiento de la memoria del EI: CaMKII α y BDNF. Existe un solo reporte sobre el perfil de expresión del mRNA de CaMKII α y su modificación ante el procesamiento de la memoria para el EI: a las 3 hs post-entrenamiento se observó un aumento en el nivel de transcritos de CaMKII α en el hipocampo de ratas entrenadas (Igaz et al, 2004). En esta tesis, en cambio, se observó una disminución para esta molécula a las 5 hs posteriores al ensayo de entrenamiento. Aunque estos resultados involucran puntos temporales distintos en la curva temporal de consolidación de la memoria, es sabido que la actividad de CaMKII α es máxima luego de 1 hs y por un periodo de no más de 3 hs post-entrenamiento, luego del cual vuelve a niveles basales (revisado en Izquierdo et al, 2006).

Por otra parte, los estudios sobre la expresión del mRNA de BDNF en el hipocampo asociada a la formación de la memoria de corto y largo término indican un incremento rápido y transitorio en el nivel de transcritos, cuya expresión vuelve a niveles basales luego de 1 hs post-entrenamiento (Alonso et al, 2002). Los resultados obtenidos en esta tesis a las 5 hs posteriores al entrenamiento se ajustan a lo reportado. Sin embargo, existe un único trabajo sobre la asociación del mRNA de BDNF y la reactivación de la memoria 24 hs después del entrenamiento, en el cual se indica que no existen diferencias de expresión del transcritos en el

hipocampo de ratas entrenadas con respecto al control (Ma et al, 1998). Mientras que en esta tesis se observó un aumento significativo del mRNA de BDNF para el mismo punto temporal. Esta discrepancia puede ser explicada por varios factores: la intensidad del estímulo eléctrico usado (1 mA en comparación con 0.5 mA en esta tesis) o por el tipo de isoforma de BDNF en estudio (se ha reportado que el aprendizaje contextual por miedo induce una regulación diferencial de los mRNA de las isoformas de BDNF en el hipocampo de ratas) (Lubin et al, 2008).

La glicosilación es la forma más compleja de modificación post-traducciona y se sabe que participa en la regulación de numerosos aspectos de las funciones proteicas (Rudd & Dwek, 1997). Aunque existe bastante bibliografía que sugiere que la maquinaria de glicosilación es regulada a nivel de expresión génica, poco se sabe acerca de los posibles mecanismos de la regulación de las glicosiltransferasas en el SNC, en particular, cambios asociados al aprendizaje.

En vista de los resultados presentados, se puede concluir que: (a) las expresiones de los mRNA de O-glicosiltransferasas parecen ser reguladas de manera diferencial en respuesta al aprendizaje y la formación de la memoria de EI y (b) los perfiles de transcritos de algunas O-GTs parecen estar reguladas diferencialmente dependiendo de qué fase de la formación de la memoria está siendo estudiada. Los resultados están de acuerdo con trabajos previos que indican requerimientos moleculares distintos para dos procesos similares pero no idénticos, la consolidación y la reconsolidación de la memoria de EI (Taubenfeld et al, 2001; Lee et al, 2004; Baratti et al, 2009).

Algunos de estos genes han sido previamente asociados a desórdenes neurales pero este es el primer reporte de cambios dependientes, al menos en parte, del aprendizaje para la expresión génica de O-GTs en el cerebro.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

4. 1 Comentarios Finales

En los dos modelos de plasticidad dependiente de la experiencia estudiados en esta tesis, el Enriquecimiento Ambiental y la Evitación Inhibitoria, se ha demostrado que la maquinaria de glicosilación es afectada hasta cierto punto a nivel celular (alteración en el patrón de distribución de oligosacáridos), y génico (cambios en el perfil de expresión génica de O-glicosiltransferasas).

La glicosilación de proteínas y lípidos representa una de las modificaciones postraduccionales más importantes en lo que se refiere a la diversidad estructural y funcional que confiere a los glicoconjugados. No sólo por la complejidad que otorga, sino porque se estima que es $10\text{-}10^4$ veces mayor en contenido de información que el proteoma, dependiendo de la especie. En el SNC, el rol de los oligosacáridos ha sido cada vez más reconocido en importancia en varios eventos de interacciones celulares (Kleene & Schachner, 2004).

Una de las vías de O-glicosilación estudiadas a nivel génico en esta tesis es la de la O-manosilación. Las glicosiltransferasas que participan en la biosíntesis de de O-manosas (Pomt1, Pomt2 y Pomgnt1) han sido asociadas a un grupo de enfermedades neuromusculares en humanos, agrupadas dentro de Distrofias Musculares Congénitas (CMD, por sus siglas en inglés), caracterizadas por una migración anormal de precursores neuronales fuera de la corteza, entre otras. El Síndrome de Walker-Warburg (WWS) es un tipo de CMD con anomalías muy severas en músculos, cerebro y ojos. Se ha determinado que alteraciones genéticas que producen mutaciones de cambio del marco de lectura en la protein O-manosiltransferasa 1 (POMT1) humana causan la aparición de WWS (Beltrán-Valero de Bernabé et al, 2002). Los pacientes con la enfermedad *Muscle-Eye-Brain* (MEB) también presentan CMD y malformación cerebral, pero algunos pueden sobrevivir hasta la adultez. El gen causante para la aparición de MEB fue identificado como POMGnT1, enzima que modifica O-Man con GlcNAc β 1,2 (Yoshida et al, 2001).

Los resultados indicaron que el aislamiento social, acompañado de la falta de estimulación sensorial y motora (representado en el grupo Aislado) se manifestó en una disminución de la expresión génica de los componentes de la O-manosilación en el hipocampo: Pomt1, Pomt2 y Pomgnt1. En cambio, en la condición Enriquecida, los niveles fueron similares a los basales (comparados con el grupo Naive). O sea, las glicosiltransferasas participes de los primeros pasos en la biosíntesis de O-manosas están implicadas en enfermedades neurológicas (como las ya mencionadas) y son respondedoras a estímulos ambientales y relacionados con la memoria, siendo este último un rol hasta el presente no conocido.

Aun cuando los resultados de la estimulación ofrecida por el enriquecimiento ambiental sobre el desarrollo del cerebro y el comportamiento surgen de la investigación básica en animales de experimentación, resultan de interés para estudios en humanos ya que sugieren que la modificación del ambiente de un individuo se expresa en beneficios medibles. Sobre todo esto tiene importancia en condiciones de estrés (Yang et al, 2006; Ilin & Richter-Levin, 2009), envejecimiento y en la protección del cerebro de enfermedades neurodegenerativas (Nithianantharajah & Hannan, 2006). Más recientemente, se ha demostrado los beneficios del EA en modelos de adicción a drogas (Solinas et al, 2008; Chauvet et al, 2009).

Se ha propuesto que el entendimiento de las bases moleculares y celulares de los efectos del EA podría fomentar el desarrollo de una nueva clase de agentes terapéuticos que imiten o aumenten los efectos beneficiosos de la estimulación ambiental (Hannan, 2004; McOmish & Hannan, 2007). Esto queda en evidencia si se tiene en cuenta que algunos componentes de la O-glicosilación tipo mucina y de la O-manosilación han sido identificados como genes candidatos que subyacen a desórdenes congénitos complejos, como en el desorden del espectro autista (van der Zwaag et al, 2009).

En cuanto a los efectos en el cerebro, las diferencias entre el EA y el EI son amplias: mientras el Enriquecimiento Ambiental implica por parte del sujeto experimental realizar una acción voluntaria para interactuar con el contexto

(rampas, juguetes, entre otros), la manifestación del aprendizaje de la Evitación Inhibitoria está asociada a una inhibición por parte del animal (no explorar más allá de la plataforma en la sesión de evaluación de la tarea).

En el modelo de EI, el sujeto experimental aprende la tarea de evitar un contexto asociado a un estímulo aversivo inmediatamente en un solo ensayo. Existen varias razones por las cuales el uso del EI es tan difundido: un aprendizaje robusto puede ser desencadenado con solamente una única sesión de entrenamiento. El condicionamiento por miedo al contexto ha sido usado para estudiar procesos temporalmente distintos de la memoria de corto y largo plazo. Además, el paradigma de EI involucra a los campos de aprendizaje emocional y desórdenes emocionales de manera directa. Provee un acercamiento simple y reduccionista para la búsqueda de mecanismos neurobiológicos de aprendizaje y memoria, y tal entendimiento es necesario para avances específicos en el tratamiento de desórdenes emocionales.

Ahora bien, la expresión diferencial de genes observada para ciertas O-glicosiltransferasas en esta tesis puede no necesariamente estar involucrada de manera directa en los mecanismos moleculares que subyacen a la formación de memoria para el EI. Sino más bien pueden estar reflejando procesos asociados a los mismos, como por ejemplo, modificación postraducciona de proteínas conocidas por su participación directa en estos procesos: el factor de transcripción CREB reconoce y se une a promotores de genes inducibles que contienen elementos de respuesta a cAMP. CREB regula la formación de la memoria (Sekeris et al, 2010) y se ha reportado que la glicosilación con O-GlcNAc (reacción catalizada por la glicosiltransferasa Ogt) disminuye la unión con la maquinaria de inicio de la transcripción, afectando en consecuencia su actividad transcripcional (Lamarre-Vincent & Hsieh-Wilson, 2003).

Dentro de los objetivos de esta tesis doctoral, hay que tener en consideración que el estudio sobre el comportamiento de la expresión génica de los genes de O-glicosiltransferasas se realizó sobre niveles de transcripto (mARN) a partir de ARN

total (ver Materiales y Métodos para mayor detalle). Los niveles de mARN en las células están determinados por un equilibrio entre la tasas de síntesis y degradación del mARN (Elkon et al, 2010). El estudio del comportamiento de los genes de O-GTs hecho en esta tesis doctoral provee una medida de la abundancia de los mARN pero no puede discriminar si los cambios se deben a alteraciones en la transcripción del gen o a una mayor/menor tasa de degradación del mARN. Un planteo a responder a futuro es qué sucede con la estabilidad de los transcritos de las O-glicosiltransferasas estudiadas aquí en ambos paradigmas de aprendizaje. Sin embargo, los resultados no dejan de tener validez ya que demuestran que como consecuencia de la modificación del ambiente por una parte y del aprendizaje asociativo por otro, existe una modulación sobre la glicosilación en el cerebro y revela redes de genes de O-GTs respondedores.

Esta tesis doctoral se ha enfocado principalmente en la O-glicosilación del SNC y se han observado resultados interesantes sobre el comportamiento de genes asociados previamente a patologías y enfermedades en humanos. El interés por la O-glicosilación se basa en que inicialmente el estudio de las glicoproteínas y su rol en enfermedades congénitas humanas ha estado enfocada en los N-glicanos (agrupadas en CDG, por sus siglas en inglés, *Congenital Disorders of Glycosylation*) y recién en los últimos años la O-glicosilación ha empezado a adquirir mayor dimensión en este aspecto. Los resultados presentados en esta tesis doctoral representan un aporte al conocimiento de las bases moleculares del aprendizaje y la memoria en dos paradigmas ampliamente reconocidos y a la glicobiología del cerebro.

CAPITULO V MATERIALES Y MÉTODOS

5. 1 *Enriquecimiento ambiental*

5. 1. 1. *Sujetos experimentales.* Se utilizaron ratas macho Wistar (de nuestro propio bioterio) que al momento del destete (30 días de edad) fueron asignados al azar a cada grupo experimental. Todos los animales fueron mantenidos bajo un ciclo de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad, temperatura ambiental de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, y con libre acceso a agua y alimento balanceado (Gepsa Ganave, Buenos Aires, Argentina). El diseño experimental constó de 3 grupos:

Grupo Control: las ratas (en grupos de 5 a 6 ratas) fueron mantenidas en condiciones estándar de alojamiento hasta el fin del experimento (jaulas de plástico transparente (59.5 x 38 x 20 cm, Tecniplast) con viruta como piso y reja de metal (ver Figura 63).

Grupo Enriquecido: en jaulas de enriquecimiento ambiental fueron alojadas en grupos de 5-6 ratas hasta el final del experimento. Las jaulas están formadas por una estructura soporte de metal y paredes alambradas (40x50x100 cm).

Grupo Aislado: en jaulas de plástico transparente (42.5 x 26.6 x 15.5 cm, Tecniplast), con viruta como piso y reja de metal, fueron mantenidas una rata por jaula durante el transcurso del experimento.

5. 1. 2. *Procedimiento.* La exposición al ambiente enriquecido comenzó en el momento del destete de los animales (alrededor de P30). Las jaulas enriquecidas tenían en su interior varias plataformas de madera para saltar y trepar, túneles, juguetes de plástico, piso con viruta (Ver Figura 62). Los animales tenían libre acceso a agua y alimento balanceado común, además de alimento adicional como galletas, cereales, etc. La localización de los alimentos iba cambiando cada 2 días: se ponían recipientes en el interior de la jaula o suspendidos en la pared de alambre, de tal manera que las ratas debían treparse para alcanzarlo. La exploración de los objetos y del ambiente fue libre. Se realizaron cambios en la

organización espacial de las jaulas (sacar o poner nuevas rampas, introducir objetos nuevos, limpieza de la viruta del piso, etc.) cada 2 días.

Los grupos experimentales fueron mantenidos en cada condición por un periodo de 7 días, luego del cual fueron inmediatamente sacrificados.

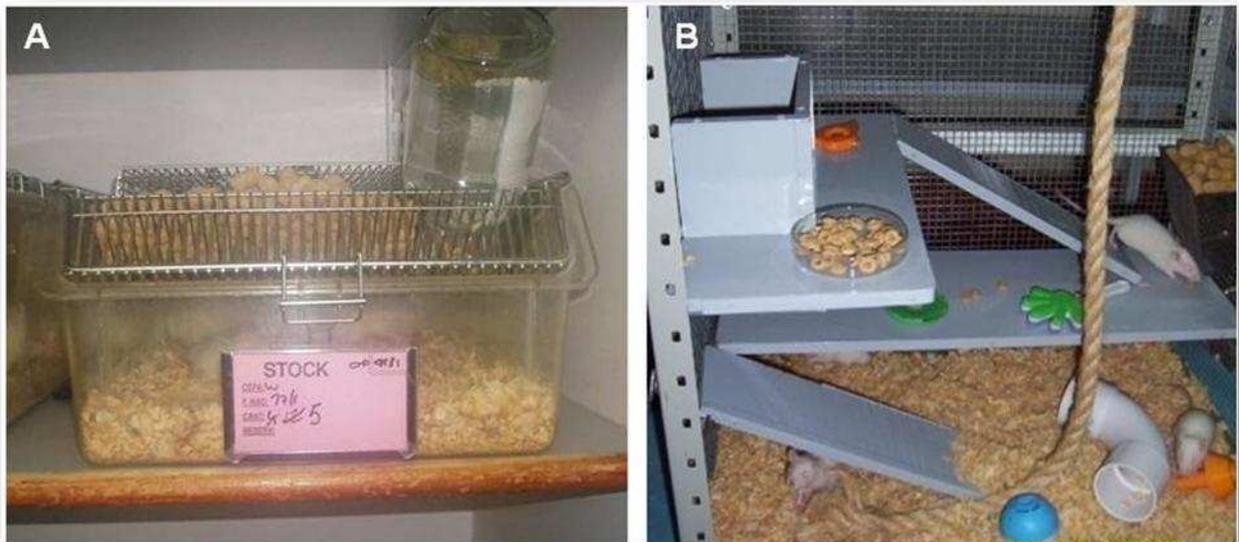


Figura 62. (A) Jaulas de alojamiento estándar. (B) Condiciones de enriquecimiento ambiental.

5. 2. Pruebas conductuales

5. 2. 1. Reconocimiento de objetos

5. 2. 1. 1. *Dispositivo*. Esta prueba, también conocida como NOR (por sus siglas en inglés, *Novel Object Recognition*) consiste en una fase de habituación seguida por una fase de exploración de los objetos. El NOR utiliza una caja de madera (Figura 63).

5. 2. 1. 2. *Procedimiento*. Durante la fase de habituación, cada animal exploró libremente durante 5 minutos por día durante 3 días consecutivos la arena de evaluación sin objetos. La arena del NOR fue limpiada con Etanol 70% entre animales para remover marcas olfativas.

La fase de exploración de objetos consistía en un ensayo de familiarización y uno de evaluación. Durante el ensayo de familiarización, una rata fue ubicada en la arena que contenía dos objetos idénticos, ubicados en extremos opuestos de la caja, y se le permitió explorarlos libremente durante 5 minutos, luego de los cuales fue devuelta a su jaula.

El ensayo de evaluación fue llevado a cabo 24 hs luego de la exposición inicial a los objetos. En la arena se ubicaron dos objetos: uno idéntico al que los animales habían estado expuestos (familiar) y el otro un objeto al que no habían sido expuestos antes (novedoso). La posición de los objetos fue intercambiada entre animal y animal. Se permitió a cada rata explorar libremente cada objeto durante 3 minutos, luego de los cuales fueron devueltas a sus jaulas. Los objetos a explorar en el NOR eran de materiales fáciles de limpiar (plástico y madera con pintura al aceite). Cada comportamiento fue grabado con una cámara (Nikon CoolpixS51). En el análisis de los videos se consideró que un animal estaba explorando un objeto cuando su hocico o bigotes apuntaban y estaban a menos de 1 cm del objeto. El reconocimiento se evidenció si el animal exploraba el objeto novedoso en mayor medida que el objeto familiar.



Figura 63. Caja de entrenamiento en el reconocimiento de objetos.

5. 2. 2. Laberinto acuático de Morris

5. 2. 2. 1. *Dispositivo*. El laberinto (también conocido como MWM por sus siglas en inglés, *Morris Water Maze*) utiliza una pileta circular (diámetro 1,80m, altura 60 cm) pintada de blanco y con agua (26 – 28 °C). El agua es opaca luego de la dilución de pintura ténpera no toxica de color blanco. Una plataforma circular (15 cm diámetro) blanca fue ubicada en uno de los cuadrantes imaginarios en los cuales se subdividió el diámetro de la pileta (ver Figura 64), sumergida 2 cm por debajo del nivel del agua. La pileta estaba rodeada de cortinas blancas que colgaban del techo y sobre las cuales se pegaron diversas imágenes contrastantes (indicando tres de los cuatro cuadrantes imaginarios) que servían como claves espaciales fuera de la pileta.

5. 2. 2. 2. *Procedimiento*. Para el entrenamiento en la tarea de plataforma sumergida, la misma fue mantenida en un mismo cuadrante durante todo el experimento. Las ratas recibieron 4 ensayos por día durante 4 días consecutivos. En el primer ensayo se ubicó a cada animal directamente sobre la plataforma durante 1 minuto, de tal manera de indicar la existencia de un “escape” (representado por la plataforma) del agua. En cada ensayo de entrenamiento, las ratas fueron introducidas suavemente al agua apuntando hacia la pared de la pileta, de manera

aleatoria se elegía cada vez el cuadrante de comienzo (NO, NE, SO o SE) y se dejaba nadar libremente al animal hasta que alcanzaran la plataforma de escape. Si durante el lapso de 60 segundos la rata no había alcanzado la plataforma sumergida, se la asistía agarrándola suavemente de la cola hasta ubicarla sobre la superficie. Una vez que estaba sobre la plataforma, se dejaba permanecer al animal durante 20 segundos antes de ser removidos por un intervalo entre ensayos de 60 segundos.

El índice de aprendizaje espacial del animal se determina por el aumento en exactitud para encontrar la plataforma en un dado número de ensayos. En la versión con claves internas a la pileta, se marcó la posición de la plataforma sumergida mediante un banderín que sobresalía de la superficie del agua. De esta manera, se registran las latencias de las ratas para alcanzar la plataforma.

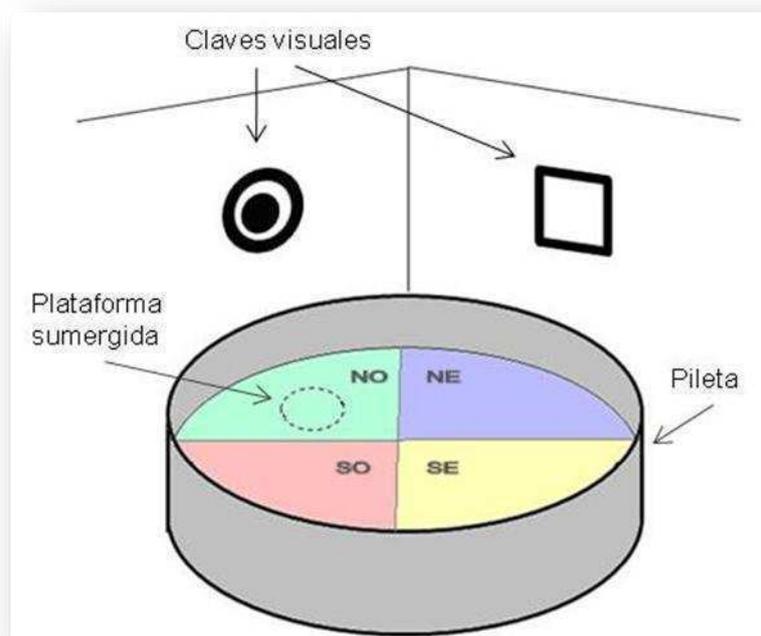


Figura 64. Esquema del Laberinto Acuático de Morris. Los colores son sólo de carácter ilustrativo para indicar los cuadrantes imaginarios en los cuales el investigador subdivide la pileta: NE (Noreste), NO (Noroeste), SE (Sudeste) y SO (Sudoeste).

5. 2. 3. Evitación inhibitoria

El dispositivo y el procedimiento son explicados en detalle en la próxima sección (Ver 5.3. Evitación inhibitoria).

5. 3 Evitación inhibitoria

5. 3. 1. *Sujetos experimentales.* Se utilizaron ratas macho Wistar (de nuestro propio bioterio) de 1.5 – 2 meses de edad. Todos los animales fueron mantenidos bajo un ciclo de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad, temperatura ambiental de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, y con libre acceso a agua y alimento balanceado (Gepsa Ganave, Buenos Aires, Argentina). Las ratas no tuvieron ninguna experiencia previa con el aparato experimental.

5. 3. 2. *Dispositivo.* El aparato de entrenamiento es una caja construida en madera, la pared frontal es de vidrio y tiene una tapa de madera que cierra la caja (Figura 65). El piso de la misma consta de una grilla formada por barras de bronce en serie (0.1 cm de calibre) espaciadas 1 cm entre sí y una plataforma deslizable de madera. En todos los ensayos, la plataforma fue deslizada hasta permitir una superficie de 30 cm y dejar así acceso a la grilla de barras.



Figura 65. Aparato de evitación inhibitoria.

5. 3. 3. Procedimiento. En la sesión de entrenamiento, cada rata fue colocada sobre la plataforma de madera y se le permitió explorar libremente la misma. Inmediatamente después de que el animal bajó desde la plataforma hacia la grilla, recibió una descarga eléctrica suave en las patas (0.5 mA, 3 segundos). Este estímulo fue elegido en base a resultados previos los cuales indican que con estas condiciones se genera en los animales un desempeño intermedio (Cammarota et al, 2003). Se midió la latencia del animal (en segundos) al bajar con sus cuatro patas desde la plataforma hacia la grilla de barras. Inmediatamente después de esto, la rata fue devuelta a su jaula. El aparato de EI se limpió con Etanol 70% entre animales para remover marcas olfativas.

La sesión de evaluación fue llevada a cabo a las 5 hs y a las 24 hs luego de la sesión de entrenamiento. Cada rata fue colocada nuevamente sobre la plataforma, pero omitiendo esta vez la descarga eléctrica, y se registró la latencia del animal en bajar hacia la grilla. Durante el ensayo de retención, se impuso una determinación máxima de 180 segundos, con lo cual cada animal tiene una posible latencia máxima de ese valor. Tanto la sesión de entrenamiento como la de evaluación fueron llevadas a cabo entre las 8hs y las 12hs en la franja diurna.

5. 3. 4. Grupos. El diseño experimental utilizó los siguientes grupos:

Naive: son los animales que nunca fueron expuestos al aparato de entrenamiento.

Entrenado 5 hs: los animales fueron entrenados en el dispositivo mencionado (es decir, recibieron el estímulo eléctrico y son probables de hacer asociaciones) y sacrificados a las 5 horas luego de la sesión de entrenamiento.

Entrenado 24 hs: son los animales entrenados y evaluados para retención a las 24 horas luego del entrenamiento.

Choque: los animales fueron ubicados directamente sobre la grilla electrificada, sin pasar por la plataforma, y recibieron la descarga eléctrica en las patas.

No choque 5 hs: son las ratas que fueron expuestas al aparato como si fueran entrenadas, pero no recibieron estímulo eléctrico, y fueron sacrificadas 5 horas después.

No choque 24 hs: idem grupo anterior, sacrificadas 24 horas después.

Entrenado-No evaluado 24 hs: son ratas entrenadas pero no evaluadas. Sacrificadas 24 horas después.

Todos los procedimientos experimentales con animales usados en esta tesis han sido aprobados por el Comité de Ética de Protocolos de Investigación (CEPI) del Hospital Italiano de Buenos Aires.

5. 4. Análisis histológico

5. 4. 1. Preparación del tejido. Los animales fueron profundamente anestesiados con una mezcla de ketamina y xilazina (Rompun®, Bayer), y perfundidos transcardialmente con Paraformaldehído (PFA) 4% en PBS pH 7.2. Los cerebros fueron extraídos, post-fijados por inmersión toda la noche en PFA 4% a 4°C, crioprotectados en soluciones crecientes de sacarosa en PBS pH 7.2 (5%, 25%) y mantenidos a -70°C hasta su uso.

5. 4. 2. Histoquímica de lectinas. En criostato se cortaron secciones transversales del cerebro (10 µm) hasta visualizar en un mismo corte el hipocampo y la corteza. Para marcar diferentes oligosacáridos terminales, los cortes fueron incubados con un panel de lectinas biotiniladas (Vector Laboratories, CA, USA) (ver Tabla 8) durante 2 horas a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C. Luego de lavado en PBS pH 8.2 por 15min, los cortes fueron incubados con Streptavidina-FITC o

Streptavidina-Texas Red (Vector Laboratories) durante 60min, lavados por 15min en PBS pH 7.2. Como control de la técnica, se incubaron algunos cortes con la lectina preincubada con su inhibidor respectivo (0.5 μ l lectina/200 μ l inhibidor) en buffer de lectinas (10mM HEPES pH 7.5, 0.15 M NaCl). Se usaron las siguientes soluciones de azúcares inhibidores: α -methyl manosido (inhibidor de GNL), GalNAc (inhibidor de VVL). La sustitución de la lectina por PBS pH 7.2 fue tomado como control negativo.

| Nombre | Siglas | Especificidad |
|--------------------------------|--------|---|
| <i>Arachis hypogaea</i> | PNA | Gal β 1,3GalNAc |
| <i>Vicia villosa</i> | VVL | α , β GalNAc |
| <i>Artocarpus integrifolia</i> | JAC | Gal β 1,3GalNAc con/sin NeuAc |
| <i>Aleuria aurantia</i> | AAL | Fuc α 1,6 |
| <i>Lotus tetragonolobus</i> | LTL | Fuc α 1,2 |
| <i>Griffonia simplicifolia</i> | GSL II | α , β GlcNAc |
| <i>Triticum vulgare</i> | WGA | GlcNAc(β 1,4GlcNAc) ₁₋₂ con/sin NeuAc |
| <i>Triticum vulgare</i> | sWGA | GlcNAc(β 1,4GlcNAc) ₁₋₂ |
| <i>Galanthus nivalis</i> | GNL | α 1,3 Man |
| <i>Erythrina cristagalli</i> | ECL | Gal β 1,4GlcNAc |
| <i>Sambucus nigra</i> | SNA | NeuAc α 2,6Gal |
| <i>Maackia amurensis</i> | MAL II | NeuAc α 2,3Gal |

Tabla 8. Listado de lectinas usadas en estudios histoquímicos.

5. 5. Biología Molecular

Las ratas de los grupos experimentales fueron anestesiadas completamente por inhalación de isoflurano (Sevorane[®]), decapitadas y se extrajo rápidamente el cerebro. El hipocampo y la corteza fueron extraídos manualmente sobre hielo, y procesados para los análisis mencionados abajo.

5. 5. 1. *Extracción de ARN total de regiones de cerebro de rata.* Para la extracción de ARN total (ARNt), el tejido fue homogenizado completamente en Trizol® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el homogenato fue centrifugado a 12000g por 10min 4°C, el sobrenadante fue incubado con cloroformo (0.2ml/ml Trizol), y luego de la centrifugación se tomó la fase acuosa, la cual contiene el ARNt. Para precipitar el ARNt, se agregó Alcohol Isopropílico (0.5ml/ml Trizol) a -20°C por 45 minutos, luego se centrifugó a 12000g por 15 minutos 4°C y se hicieron varios lavados con Etanol 75% y centrifugaciones de 12000g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se dejó secar el pellet y se resuspendió el ARNt en agua destilada estéril libre de RNAsas. La calidad del estado del ARNt se controló en una corrida electroforética en gel de agarosa 1%.

5. 5. 2. *Preparación de cADN de hipocampo y corteza.* Previamente se eliminó del ARNt cualquier ADN contaminante con DNAsa RQ1 RNase-free DNase (Promega). Luego, se incubó 1 µg ARNt templado en 1 µl de *primer* Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) a 70°C durante 5 minutos y en hielo 1 minuto. A los tubos de reacción luego se agregó: ImProm-II® 5X Reaction Buffer (Promega), 0.1M dTT, 10mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), inhibidor de ribonucleasas Ribolock RNase inhibitor (Fermentas) e ImProm-II Reverse Transcriptase® (Promega) durante 5 minutos a 25 °C, 1 hora a 42°C y 15 minutos a 70°C.

5. 5. 3. *Diseño de primers de glicosiltransferasas para Real-Time PCR.* Se diseñaron *primers* para varias glicosiltransferasas de la vía de la O-glicosilación y para genes de expresión constitutiva (*housekeeping genes*) usando un set restringido de condiciones. La secuencia codificante para un gen específico fue analizada en el programa de diseño de primers público *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) con los siguientes parámetros: rango del tamaño del producto, 75-150 pares de base (pb); tamaño del primer, 18-20 pb; porcentaje de bases GC, 49-51%; T_m del primer, 58-60 °C. Todos los otros parámetros son valores *default*. Los primers fueron sintetizados por Eurofins MWG/Operon (ver Tabla 9).

5. 5. 4. *Real-Time PCR*. La mezcla de reacción contenía Platinum® *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 10X PCR Buffer, 10 mM mix de dNTPs, 50 mM MgCl₂, mix de primers (10 μM de cada uno), agua destilada estéril, y *SYBR Green I nucleic acid stain* (Invitrogen). Todos los ensayos se realizaron con el siguiente protocolo de amplificación: Desnaturalización, 10 minutos a 94 °C; Ciclado, 45 ciclos de 10 segundos a 94 °C, 10 segundos a la T_m respectiva para cada gen y 10 segundos a 72 °C. Las curvas de *melting* de todas las muestras se realizaron siempre como control de especificidad.

| Nombre del gen | Símbolo | # Acceso | Secuencia de primers |
|--|---------|--------------|---|
| <i>O-glicosilación tipo mucina</i> | | | |
| Polipeptido GalNAc transferasa-1 | Galnt1 | NM_024373 | Fwd: ACGAAGGTCTGGAGAAATG Rev: TCTCACTCGCCATTAGGTTG |
| Polipeptido GalNAc transferasa-2 | Galnt2 | NM_001106196 | Fwd: TTTCTGCTTCTGCTCACAC Rev: AGTGGAGATTGGCGAGTTCT |
| Polipeptido GalNAc transferasa-5 | Galnt5 | NM_031796 | Fwd: CTGCTGGTGGATGATTTTCAG Rev: TCAAGCCATGTCTCTCCTTG |
| Polipeptido GalNAc transferasa-7 | Galnt7 | NM_022926 | Fwd: TTCAAGCGTCGTCATCGT Rev: ACTTCTGGGTGTCCTTTTG |
| Polipeptido GalNAc transferasa-10 | Galnt10 | NM_130742 | Fwd: CACGAAGCATGGCACATT Rev: TGGTATGTTGAGGGTCTCCA |
| Polipeptido GalNAc transferasa-11 | Galnt11 | NM_199393 | Fwd: TGACACACAACCTCGCTGAGA Rev: TTC AACACGCTCGCTGAT |
| Polipeptido GalNAc transferasa-13 | Galnt13 | NM_199106 | Fwd: TCCA AACACAAGCGTCGT Rev: GTAGTGCGGTGAGCGATTTA |
| <i>Modificaciones posteriores sobre O-GalNAc</i> | | | |
| Core 1 sintasa, GalNAc β1,3-galactosyltransferasa-1 | C1galt1 | NM_022950 | Fwd: CTGCCCTTCATTGACTTGAG Rev: TGCTGATCCACAGAGGAAAG |
| Core 3 sintasa β-Galβ1,3 N-acetilglucosaminiltransferasa-6 | B3Gnt6 | NM_001106211 | Fwd: TCTCCACTGTTTGCTCCACT Rev: CTGCCAGACACCCCTTTATT |
| ST3 β-galactosido α2,3 sialiltransferasa-1 | SiaT4A | NM_001013219 | Fwd: GACAGCCATGACTTTGTGCT Rev: CCAGGACCATGTTGACATTC |
| ST3 β-galactosido α2,3 sialiltransferasa-2 | SiaT4B | NM_031695 | Fwd: TAAAGGGCTGGTGAGTCAAG Rev: TGTGGACACTGAAGGGAAGT |
| ST6 N-acetilgalactosaminido α2,6-sialyltransferase-1 | St6 | NM_001105859 | Fwd: GGGTGTAAAGGTTCTCAA Rev: AGAGCCTGTGGTGATTTTCC |
| Core 2 sintasa β1,6-GlcNAc transferase | Gcnt1 | NM_022276 | Fwd: GCTTCTGGCTTCTGCTTTCT Rev: AGCGGCTTACCCAAATGA |
| Glucosaminil (N-acetil) transferasa-3 | Gcnt3 | NM_173312 | Fwd: GCTCTGCTGAATAACCTGGA Rev: TTCCTCTGGGTCTTGAAGTG |

| | | | |
|---|-----------------|----------------|---|
| <i>O-fucosilación</i> | | | |
| Protein O-fucosyltransferasa-1 | Pofut1 | NM_001002278 | Fwd: ATGTAGACCGACCTGGCATC Rev: ATGTTGAAGGATGGGACTGC |
| Protein O-fucosyltransferasa-2 | Pofut2 | NM_001107621 | Fwd: AAGACGCTGCTGAAGACAGA Rev: GAGACTCGGAGGTCAAAAA |
| O-fucosilpeptido β 3GlcNAc transferasa | LFringe | NM_133393 | Fwd: ATGTCTTCATCGCCGTC Rev: TCGTACTCCACAGCCATCTT |
| <i>O-manosilación</i> | | | |
| Protein O-mannosyltransferasa-1 | Pomt1 | NM_053406.2 | Fwd: CGAGAGCATGGTATGGAATG Rev: TCTTCAGCGTCAGCATCTTC |
| Protein O-mannosyltransferasa-2 | Pomt2 | NM_001047114.1 | Fwd: AACGCACCTTTTTCTTCG Rev: AACCTCTCATCCCATGTA |
| Protein O- manosa β 1,2- N-acetylglucosaminytransferasa | Pomgnt1 | NM_001007747 | Fwd: CCGTGTGTCTCAGCACTA Rev: CAGGTCCTCTCCAGAAC |
| <i>O-GlcNAcilación</i> | | | |
| O- GlcNAc transferase | Ogt | NM_017107 | Fwd: GATCTGTCCAGCCTTCGAC Rev: GCACATCGGAATATCAGG |
| Brain-derived neurotrophic factor | BDNF | EF125690.1 | Fwd: GGACATATCCATGACCAGAAA Rev: GCAACAAACCACAACATTATC |
| Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent proteinkinase II subunidad α | α CaMKII | NM_012920 | Fwd: CGATTACGGAAGAGTACCA Rev: CGATATTGGGGTGCTTCA |
| β -actina | β -actina | NM_031144 | Fwd: TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA Rev: CTGCTTGCTGATCCACATCTG |

Tabla 9. Listado de secuencias de *primers* usados.

5. 6. SDS-PAGE y Western blot

5. 6. 1. *Extracción de glicoproteínas de hipocampo y corteza.* Todas las soluciones usadas para obtener los extractos proteicos contenían una mezcla de inhibidores de proteasas: AEBSF [4-(2-aminoetil) benzenosulfonil fluoruro hidrocloreuro] 104 mM, aprotinina 0.085 mM, Bestatina 4mM, E-64 1.4 mM, leupeptina 2 mM, Pepstaina A 1.5 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para obtener los extractos totales, el hipocampo y la corteza fueron disecados del cerebro y homogeneizados en Buffer de Lisis (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8, 100 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100 y 0.1% SDS). Luego de 15 minutos a 4°C, los lisados fueron centrifugados a 10000 x g durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante fue usado como extracto proteico total.

Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford utilizando el reactivo *Protein Assay* (Bio-Rad) en un espectrofotómetro Genesys 10S (*Thermo Scientific*).

5. 6. 2. *SDS-PAGE*. Las proteínas del extracto total fueron separadas en electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes utilizando una celda *Miniprotean II System* (Bio-Rad). Luego del armado del gel de corrida (8% acrilamida) y del gel separador, se sembraron 15-20 μg de proteínas (diluídas en 1% DTT y Buffer de muestra) previamente hervidas en agua por 5 minutos. Como marcador de peso molecular, se utilizó el *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas). La electroforesis se desarrolló a 130 V durante los primeros 15 minutos (hasta que el frente de corrida atravesara el gel separador) y luego a 100 V durante 1,5 hs, en Buffer de electroforesis (Tris-Base 0.125M, Glicina 0.96M, SDS 0.05 p/v, pH 8,3). Las proteínas separadas de esta manera fueron transferidas a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore Corporation) en Buffer de Transferencia (Tris-Base 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20% v/v, pH 8.6) durante 2 horas. Se controló la transferencia de proteínas a la membrana luego de la tinción reversible con Ponceau-S, observándose las bandas características. Las membranas fueron mantenidas a 4 °C hasta el momento de uso.

5. 6. 3. *Western-blot*. Las membranas fueron activadas mediante incubación por 1 minuto en Metanol 100% y luego fueron bloqueadas en Leche 5% en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos utilizados están indicados en Tabla 10.

| Anticuerpo 1° | Empresa | Anticuerpo 2° | Empresa |
|-----------------|--|---|---------|
| Pomt1 | Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, California, USA) | Policlonal de conejo anti-cabra Igs/HRP | Dako |
| Pomgnt1 | | Policlonal de cabra anti-conejo Igs/HRP | |
| β -actina | Dako (Glostrup, Dinamarca) | Policlonal de cabra anti-ratón Igs/HRP | |

Tabla 10. Listado de anticuerpos usados en *Western blot*.

Las diluciones de uso para β -actina fue 1:1000, y para los restantes 1:200. Se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios a 4°C durante toda la noche. Luego, se hicieron 3 lavados en TBS y se incubó con el respectivo anticuerpo secundario (dilución 1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces las membranas, las bandas fueron reveladas luego de la incubación con el sustrato para la peroxidasa de rabanito (HRP) DAB del *Liquid DAB+ Substrate Chromogen System* (Dako). Se cuantificaron las intensidades y áreas de las bandas obtenidas mediante densitometría usando el programa público de procesamiento de imágenes *Image J* (NIH, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) y los resultados fueron expresados como densidad óptica relativa (Intensidad/ Área).

5. 7. Mediciones de resultados y variables explicatorias

5. 7.1. *Análisis digital de marcaciones histoquímicas.* Las imágenes fueron generadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400-Y-FL-EPI Fluorescence) y capturadas con cámara digital (Coolpix 4500, Nikon). En el estudio de Evitación Inhibitoria e histoquímica con lectinas, se determinó como marca positiva a una tinción clara y homogénea con respecto al control negativo con PBS (sin lectina). En el estudio de Ambiente Enriquecido y lectinas, se utilizó el programa de procesamiento de imágenes *Image J* para el análisis. La inmunofluorescencia fue semicuantificada usando este programa mediante el cálculo de la densidad de

marca fluorescente en relación al fondo. En cada corte examinado se tomaron 5 regiones representativas y se tuvo cuidado para que coincidan al mismo nivel las regiones del cerebro analizadas valiéndose de marcas anatómicas, manteniendo también el mismo aumento y filtro.

5. 7. 2. Análisis de Real-time PCR. Método de curvas estándar para cuantificación relativa. Los valores de fluorescencia son registrados durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en ese punto en la reacción de amplificación. A mayor cantidad de molde presente al comienzo de la reacción, menor es el número de ciclos que lleva alcanzar el punto en el cual la señal de fluorescencia registrada sobrepasa la línea umbral. Este punto es definido como el *Ct (threshold cycle)*, cuyos valores son centrales en la cuantificación de *real-time PCR*. La cantidad de cada muestra experimental se determina primero en relación a una curva estándar (Wong & Medrano, 2005; Larionov et al, 2005), la cual se genera a partir de una serie de diluciones de cDNA molde, que en este caso correspondía a un *pool* de todas las muestras evaluadas.

Debido a que el material de uso es obtenido a partir de diferentes individuos, es necesario primero normalizar los datos de expresión génica para corregir variaciones entre muestras. La normalización a un gen de expresión estable (*housekeeping*) es actualmente el mejor método. En esta tesis se utilizó a β -actina como el gen de referencia debido a su estabilidad en muchas condiciones fisiológicas y patológicas.

Luego, los valores normalizados se expresaron en relación a una muestra de referencia o calibrador. El calibrador es designado como 1x, y todas las muestras son expresadas como la diferencia en n-veces en relación al calibrador. Por ejemplo, en los experimentos de ambiente enriquecido, el calibrador correspondía al grupo Control.

5. 8. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron hechos utilizando el programa SPSS 17.0 (Chicago, IL, USA).

5. 8. 1. Expresión de genes de glicosiltransferasas. La expresión de genes en cada grupo se analizó a través de ANOVA de un factor considerando significativo un valor de $p < 0.05$. Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar.

5. 8. 2. Evitación inhibitoria. Los datos comportamentales están expresados como las medianas y rangos intercuartiles de las latencias en bajar de la plataforma, durante la sesión de evaluación, y la significancia se evaluó con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis cuando se evaluaban más de dos grupos. Las diferencias de grupos de a pares se estimó por el test U Mann-Whitney. Valores de $p < 0.05$ son considerados estadísticamente significativos.

5. 8. 3. Reconocimiento de objetos. Se utilizó una prueba de ANOVA de un factor, considerando a valores de $p \leq 0.05$ como significativos. Los resultados son presentados como la exploración del objeto novedoso en relación al objeto familiar: [exploración objeto novedoso/ (exploración objeto novedoso + exploración objeto familiar)] x100.

5. 8. 4. Laberinto acuático de Morris. Se determinó el tiempo (seg) que emplea el animal en encontrar la plataforma sumergida en función de los días de entrenamiento. Debido a que esta tarea involucra múltiples ensayos/día/animal, se utilizó la prueba de ANOVA de medidas repetidas, tomando a Tiempo (días) y Ensayo como factores intra-sujetos y Grupo como factor inter-sujetos. Los resultados fueron expresados como el tiempo en encontrar la plataforma como función del tiempo (medias marginales).

BIBLIOGRAFÍA

Alberini C (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* **28**:51-56.

Alonso M, Vianna M, Depino A, Mello e Souza T et al (2002). BDNF–Triggered Events in the Rat Hippocampus Are Required for Both Short- and Long-Term Memory Formation. *Hippocampus* **12**:551-560.

Angata K, Long JM, Bukalo O, Lee W et al (2004). Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior. *J Biol Chem* **279**:32603-32613.

Apweiler R, Hermjakob H & Sharon N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* **1473**:4-8.

Baratti C, Boccia M & Blake M (2009). Pharmacological effects and behavioral interventions on memory consolidation and reconsolidation. *Braz J Med Biol Res* **42**:148-154.

Barrientos R, Sprunger D, Campeau S, Higgins E et al (2003). Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neurosci* **121**:847-853.

Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I & Medina J (2008a). BDNF and Memory Formation and Storage. *Neuroscientist* **14**:147–156.

Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L et al (2008b). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:2711-2716.

Beltrán-Valero de Bernabé D, Currier S, Steinbrecher A, Celli J et al (2002). Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet* **71**:1033-1043.

Berois N, Blanc E, Ripoche H, Mergui X et al (2006). ppGalNAc-T13: a new molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma. *Clin Chem* **52**:1701-1712.

Bjørnebekk A, Mathé A, Gruber S & Brené S (2007). Social isolation increases number of newly proliferated cells in hippocampus in female flinders sensitive line rats. *Hippocampus* **17**:1193-1200.

Black J & Greenough W (1998). Developmental approaches to the memory process. Capítulo 2. En: Martinez J & Kesner R. *Neurobiology of Learning and Memory*, Academic Press, San Diego, USA.

Bogoch S (1968). *The Biochemistry of Memory: with an inquiry into the function of the brain mucoids.* Oxford University Press.

Brockhausen I (1999). Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1473**:67-95.

Brown R & Milner P (2003). The legacy of Donald O. Hebb: more than the Hebb synapse. *Nat Rev Neurosci* **4**:1013-1019

Cammarota M, Bevilaqua L, Kerr D, Medina J & Izquierdo I (2003). Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *J Neurosci* **23**:737-741.

Chauvet C, Lardeux V, Goldberg S, Jaber M & Solinas M (2009). Environmental enrichment reduces cocaine seeking and reinstatement induced by cues and stress but not by cocaine. *Neuropsychopharmacol* **34**:2767-2778

Cole R & Hart G (2001). Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals. *J Neurochem* **79**:1080-1089.

Cui M, Yang Y, Yang J, Zhang J et al (2006). Enriched environment experience overcomes the memory deficits and depressive-like behavior induced by early life stress. *Neurosci Lett* **404**:208-212

Dalziel M, Whitehouse C, McFarlane I, Brockhausen I et al (2001). The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1. *J Biol Chem* **276**:11007-15.

Davis H & Squire L (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* **96**:518-559

Diamond M, Krech D & Rosenzweig M (1964). The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* **123**:111-119

Döbrössy M & Dunnett S (2001). The influence of environment and experience on neural grafts. *Nat Rev Neurosci* **2**: 871-879.

Doherty P, Cohen J & Walsh F (1990). Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid. *Neuron* **5**: 209-219.

Dudai Y (2002). *Memory from A to Z. Keywords, concepts and beyond*, Oxford University Press, Oxford, UK.

Ducray F, Idbaih A, de Reyniès A, Bièche I et al (2008). Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Molec Cancer* **7**:41.

Elkon R, Zlotorynski E, Zeller K & Agami R (2010). Major role for mRNA stability in shaping the kinetics of gene induction. *BMC Genomics* **11**:259.

Endo T (1999). O-mannosyl glycans in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**:237-246.

Ennaceur A & Delacour J (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* **31**:47-59.

Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H et al (1992). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett* **138**: 153-156.

Ferchmin P & Eterovic (1986). Forty minutes of experience increase the weight and RNA content of cerebral cortex in periadolescent rats. *Dev Psychobiol* **19**:511-519;

Fouquaert E, Smith D, Peumans W, Prosst P et al (2009). Related lectins from snowdrop and maize differ in their carbohydrate-binding specificity. *Biochem Biophys Res Commun* **380**:260-265.

Franceschini I, Angata K, Ong E, Hong A et al (2001). Polysialyltransferase ST8Sia II (STX) polysialylates all of the major isoforms of NCAM and facilitates neurite outgrowth. *Glycobiology* **11**:231-239.

Freeze H (2006). Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genetics* **7**:537-551.

Greenough W & Volkmar F (1973). Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Experim Neurol* **40**:491-504

Haltiwanger R & Lowe J (2004). Role of glycosylation in development. *Ann Rev Biochem* **73**:491-537.

Hanish F (2001). O-glycosylation of the mucine type. *Biol Chem* **382**:143-149.

Hannan A (2004). Molecular mediators, environmental modulators and experience-dependent synaptic dysfunction in Huntington's disease. *Acta Biochim Pol* **51**:415-430.

Harris R & Spellman M (1993). O-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology* **3**:219:224

Hebb D (1949). The organization of behavior. A neuropsychological theory. John Wiley & Sons (NY), USA.

Hofsteenge J, Huwiler KG, Macek B, Hess D et al (2001). C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *J Biol Chem* **276**:6485-.6498

Huang E & Reichardt L (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* **24**:677-736

Hubbard S (1988). Regulation of glycosylation. The influence of protein structure on N-linked oligosaccharide processing. *J Biol Chem* **263**:19303-19317.

Igaz L, Vianna M, Medina J & Izquierdo I (2002). Two Time Periods of Hippocampal mRNA Synthesis Are Required for Memory Consolidation of Fear-Motivated Learning. *J Neurosci* **15**:6781–6789.

Igaz L, Bekinschtein P, Izquierdo I & Medina J (2004). One-trial aversive learning induces late changes in hippocampal CaMKIIalpha, Homer 1a, Syntaxin 1a and ERK2 protein levels. *Brain Res Mol Brain Res* **132**:1-12

Ilin Y & Richter-Levin G (2009). Enriched environment experience overcomes learning deficits and depressive-like behavior induced by juvenile stress. *PLoS One* **4**:e4329

Iwai T, Inaba N, Naundorf A, Zhang Y et al (2002). Molecular cloning and characterization of a novel UDP-GlcNAc:GalNAc-peptide beta1,3-N-

acetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T6), an enzyme synthesizing the core 3 structure of O-glycans. *J Biol Chem* **277**:12802-12809.

Izquierdo I, Bevilaqua L, Rossato J, Bonini J, Medina J & Cammarota M (2006). Trends Neurosci **29**:496-505.

Johansson B (1996). Functional outcome in rats transferred to an enriched environment 15 days after focal brain ischemia. *Stroke* **27**:324-326.

Kaleem A, Hoessli D, Haq I, Walker-Nasir E, Butt A, Iqbal Z, Zamani Z, Shakoori A & Nasir-ud-Din (2011). CREB in long-term potentiation in hippocampus: role of post-translational modifications-studies In silico. *J Cell Biochem* **112**:138-146.

Kalovidouris S, Gama C, Lee L & Hsieh-Wilson L (2005). A role for fucose alpha(1-2) galactose carbohydrates in neuronal growth. *J Am Chem Soc* **127**:1340-1341.

Kandel E, Schwartz J & Jessell T (1995). Essentials of Neural Science and Behavior. McGraw-Hill.

Kandel E (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**:1030-1038

Kang R, Saito H, Ihara Y, Miyoshi E, Koyama N, Sheng Y & Taniguchi N (1996). Transcriptional regulation of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene in human bile duct carcinoma cells (HuCC-T1) is mediated by Ets-1. *J Biol Chem* **271**:26706-26712.

Kazlauckas V, Pagnussat N, Mioranza S, Kalinine E et al (2011). Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. *Physiol Behav* **102**:475-80.

Kempermann G, Kuhn H & Gage F (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386**:493-495

Kim Y, Gum J Jr & Brockhausen I (1996). Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj J* **13**:693-707.

Kim M, Chandrasekharan K, Glass M, Shi S, Stahl M, Kaspar B, Stanley P & Martin P (2008). O-fucosylation of muscle agrin determines its ability to cluster acetylcholine receptors. *Mol Cell Neurosci* **39**:452-464

Kingsley P, Hagen K, Maltby K, Zara J & Tabak L (2000). Diverse spatial expression patterns of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase family member mRNAs during mouse development. *Glycobiology* **10**:1317-1323.

Kleene R & Schachner M (2004). Glycans and neural cell interactions. *Nat Rev Neurosci* **5**:195-208.

Kobayashi S, Ohashi Y & Ando S (2002). Effects of enriched environments with different durations and starting times on learning capacity during aging in rats assessed by a refined procedure of the Hebb-Williams maze task. *J Neurosci Res* **70**:340-346

Kovesdi E, Gyorgy A, Kwon S, Wingo D, Kamnaksh A et al (2011). The effect of enriched environment on the outcome of traumatic brain injury; a behavioral, proteomics, and histological study. *Front Neurosci* **5**:42

Koyama N, Miyoshi E, Ihara Y, Kang R et al (1996). Human N-acetylglucosaminyltransferase III gene is transcribed from multiple promoters. *Eur J Biochem* **238**:853-861.

Kozorovitskiy Y, Gross G, Kopil C, Battaglia L et al (2005). Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 17478–17482

Krech D, Rosenzweig M & Bennett E (1962). Relations between chemistry and problem-solving among rats raised in enriched and impoverished environments. *J Comp Physiol Psychol* **55**:801-807

Kroes R, Dawson G & Moskal J (2007). Focused microarray analysis of glyco-gene expression in human glioblastomas. *J Neurochem* **103**:14-24

Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Hareyama N et al (2011). Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. *Hippocampus* **21**:127-132.

Laine R (1994). A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology* **4**:759-67.

Lamarre-Vincent N & Hsieh-Wilson L (2003). Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB: a potential role in gene regulation. *J Am Chem Soc* **125**:6212-6213.

Larionov A, Krause A & Miller W (2005). A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* **6**:62.

Lee J, Everitt B & Thomas K (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* **304**:839-843.

Lee S, Hatakeyama S, Yu SY, Bao X et al (2009). Core3 O-glycan synthase suppresses tumor formation and metastasis of prostate carcinoma PC3 and LNCaP cells through down-regulation of alpha2beta1 integrin complex. *J Biol Chem* **284**:17157-17169.

Lefebvre T, Cieniewski C, Lemoine J, Guerardel Y et al (2001). Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem J* **360**:179-188.

Lommel M & Strahl S (2009). Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* **19**:816-828.

López-Fernández M, Montaron M, Varea E, Rougon G et al (2007). Upregulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the dorsal hippocampus after contextual fear conditioning is involved in long-term memory formation. *J Neurosci* **27**:4552-4561.

Lubas W, Frank D, Krause M & Hanover J (1997). O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* **272**:9316-9324.

Lubin F, Roth T & Sweatt J (2008). Epigenetic Regulation of bdnf Gene Transcription in the Consolidation of Fear Memory. *J Neurosci* **28**:10576 –10586.

Luo Y, Nita-Lazar A & Haltiwanger R (2006). Two distinct pathways for O-fucosylation of epidermal growth factor-like or thrombospondin type 1 repeats. *J Biol Chem* **281**:9385-9392.

Ma Y, Wang H, Wu H, Wei C et al (1998). Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. *Neurosci* **82**:957-967.

Manya H, Chiba A, Yoshida A, Wang X et al (2004). Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:500-505.

Martin P (2002). Glycobiology of the synapse. *Glycobiology* **12**:1R-7R.

McGaugh J (2000). Memory – a century of consolidation. *Science* **287**:248-251

McOmish C & Hannan A (2007). Enviromimetics: exploring gene environment interactions to identify therapeutic targets for brain disorders. *Expert Opin Ther Targets* **11**:899-913.

Ming G & Song H (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* **70**:687-702

Morris R (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat *J Neurosci Methods* **11**:47-60.

Murphy K & Regan C (1998). Contributions of cell adhesion molecules to altered synaptic weightings during memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* **70**:73-81

Murrey H, Gama C, Kalovidouris S, Luo W et al (2006). Protein fucosylation regulates synapsin Ia/Ib expression and neuronal morphology in primary hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:21-26

Nader K, Schafe G & LeDoux J (2000a). The labile nature of the consolidation theory. *Nat Neurosci Rev* **1**:216-219

Nader K, Schafe G & LeDoux J (2000b). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**:722-726.

Nelson P, Sutcliffe J & Thomas E (2002). A new UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase mRNA exhibits predominant expression in the hypothalamus, thalamus and amygdala of mouse forebrain. *Brain Res Gene Expr Patterns* **1**:95-99.

Nishimura A, Ikemoto K, Satoh K, Yamamoto Y et al (2000). The carbohydrate deposits detected by histochemical methods in the molecular layer of the dentate gyrus in the hippocampal formation of patients with schizophrenia, Down's syndrome and dementia, and aged person. *Glycoconj J* **17**:815-822.

Nithianantharajah J, Levis H & Murphy M (2004). Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiol Learn Mem* **81**:200-210

Nithianantharajah J & Hannan A (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **7**: 697-709.

Okabe A, Tawara Y, Masa T, Oka T et al (2001). Differential expression of mRNAs for sialyltransferase isoenzymes induced in the hippocampus of mouse following kindled seizures. *J Neurochem* **77**:1185-1197.

Paulson J & Colley K (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* **264**:17615-17618.

Paxinos G & Watson C (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. Academic Press, San Diego, USA.

Pedersen L, Darden T & Negishi M (2002). Crystal structure of beta 1,3-glucuronyltransferase I in complex with active donor substrate UDP-GlcUA. *J Biol Chem* **277**:21869-21873.

Pham T, Ickes B, Albeck D, Söderström S, Granholm A & Mohammed A (1999). Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neurosci* **94**:279-286.

Przybylski J & Sara S (1997). Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* **84**:241-246.

Rambourg A, Neutra M & Leblond C (1966). Presence of a "cell coat" rich in carbohydrate at the surface of cells in the rat. *Anat Rec* **154**:41-71.

Rampon C, Jiang C, Dong H, Tang Y, Lockhart D, Schultz P, Tsien J & Hu Y (2000). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:12880-12884

Rebbaa A, Chou PM, Vucic I, Mirkin B et al (1999). Expression of bisecting GlcNAc in pediatric brain tumors and its association with tumor cell response to vinblastine. *Clin Cancer Res* **5**:3661-3668

Rex CS, Lin CY, Kramár EA, Chen L et al (2007). Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J Neurosci* **27**:3017-3029.

Rini J, Esko J & Varki A (2009). Glycosyltransferases and glycan-processing enzymes. Capítulo 5. En: Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Stanley P, Bertozzi C, Hart G & Etzler M. *Essentials of Glycobiology*. CSH Laboratory Press. Cold Spring Harbor (NY), USA.

Rose S (1989). Glycoprotein synthesis and postsynaptic remodelling in long-term memory. *Neurochem Int* **14**:299-307

Rose S (1991). How chicks make memories: the cellular cascade from c-fos to dendritic remodelling. *Trends Neurosci* **14**:390-397.

Rose S & Jork R (1987). Long-term memory formation in chicks is blocked by 2-deoxygalactose, a fucose analog. *Behav Neural Biol* **48**: 246-58

Rosenzweig M & Bennett E (1986). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res* **78**: 57-65.

Routtenberg A, George K, Davis L & Brunngraber E (1974). Memory consolidation and fucosylation of crude synaptosomal glycoproteins resolved by gel electrophoresis: a regional study. *Behav Biol* **12**:461-475

Rudd P & Dwek R (1997). Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **32**:1-100.

Rutishauser U & Landmesser L (1996). Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci* **19**: 422–427.

Saito H, Gu J, Nishikawa A, Ihara Y, Fujii J, Kohgo Y & Taniguchi N (1995). Organization of the human N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *Eur J Biochem* **233**:18-26.

Sara S (2000). Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* **7**:73–84

Sekeres M, Neve RL, Frankland PW & Josselyn S (2010). Dorsal hippocampal CREB is both necessary and sufficient for spatial memory. *Learning and Memory* **17**:280-283.

Shapiro L, Love J & Colman D (2007). Adhesion Molecules in the Nervous System *Annu Rev Neurosci* **30**:451-474.

Shin J, Oh J, Kim Y, Jung J & Chung J (2011). Transcriptional regulation of proteoglycans and glycosaminoglycan chain-synthesizing glycosyltransferases by UV irradiation in cultured human dermal fibroblasts. *J Korean Med Sci* **26**: 417-424.

Silva A, Kogan J, Frankland P & Kida S (1998). CREB and memory. *Ann Rev Neurosci* **21**:127-148.

Siwak-Tapp C, Head E, Muggenburg B, Milgram N & Cotman C (2008). Region specific neuron loss in the aged canine hippocampus is reduced by enrichment. *Neurobiol Aging* **29**:39-50

Slawson C, Housley M & Hart G (2006). O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks. *J Cell Biochem* **97**:71-83.

Solinas M, Chauvet C, Thiriet N, El Rawas R & Jaber M (2008). Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:17145-17150

Strahl-Bolsinger S, Gentzsch M & Tanner W (1999). Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* **1426**:297-307.

Sukumar R, Rose S & Burgoyne R (1980). Increased incorporation of [³H]fucose into chick brain glycoproteins following training on a passive avoidance task. *J Neurochem* **34**:1000-1006

Suzuki A, Josselyn S, Frankland P, Masushige et al (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* **24**:4787-4795.

Tallent M, Varghis N, Skorobogatko Y, Hernandez-Cuebas L et al (2009). In vivo modulation of O-GlcNAc levels regulates hippocampal synaptic plasticity through interplay with phosphorylation. *J Biol Chem* **284**:174:181.

Taniguchi N, Honke K & Fukuda M (2002). Handbook of glycosyltransferases and related genes. Springer-Verlag, Tokyo, Japan.

Taubenfeld S, Milekic M, Monti B & Alberini CM (2001). The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* **4**:813-818.

Tian E & Ten Hagen K (2009). Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation. *Glycoconj J* **26**:325-334.

Tiunova A, Anokhin K & Rose S (1998). Two critical periods of protein and glycoprotein synthesis in memory consolidation for visual categorization learning in chicks. *Learn Mem* **4**:401-410.

Tropea D, Kreiman G, Lyckman A, Mukherjee S et al (2006). Gene expression changes and molecular pathways mediating activity-dependent plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci* **9**:660-668.

Tsoory M, Cohen H & Richter-Levin G (2007). Juvenile stress induces a predisposition to either anxiety or depressive-like symptoms following stress in adulthood. *Eur Neuropsychopharmacol* **17**:245–256

Tyler W, Alonso M, Bramham C & Pozo-Miller L (2002). From acquisition to consolidation: On the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem* **9**, 224-237.

van Damme E, Peumans W, Pusztaj A & Bardocz S (1998). Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. Willey & sons Ltd, Chichester, UK.

van der Zwaag B, Franke L, Poot M, Hochstenbach R et al (2009). Gene-network analysis identifies susceptibility genes related to glycobiology in autism. *Plos One* **4**:e5324.

van Praag H, Kempermann G & Gage F (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* **1**:191-198.

van Praag H, Schinder A, Christie B, Toni N et al (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* **415**:1030-1034

van Reeuwijk J, Janssen M, van den Elzen C, Beltran-Valero de Bernabé D et al (2005). POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* **42**: 907-912.

Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H et al (1999). Essentials of Glycobiology. CSH Laboratory Press. Cold Spring Harbor (NY), USA.

Venter J et al (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**:1304-1351.

Wang Y, Shao L, Shi S, Harris R et al (2001). Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J Biol Chem* **276**:40338-40345

Warden D (2006). Military TBI during the Iraq and Afghanistan wars. *J Head Trauma Rehabil* **21**:398-402

White R & Ziman N (2008). Genome-wide discovery of Pax7 target genes during development. *Physiol Genomics* **33**:41-49.

Wong M & Medrano F (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* **39**:75-85.

Xia L, Ju T, Westmuckett A, An G et al (2004). Defective angiogenesis and fatal embryonic hemorrhage in mice lacking core 1-derived O-glycans. *J Cell Biol* **164**:451–459.

Yamaguchi Y (2002). Glycobiology of the synapse: the role of glycans in the formation, maturation, and modulation of synapses. *Biochim Biophys Acta* **1573**: 369-376.

Yang J, Li W, Liu X, Li Z, Li H, Yang G, Xu L & Li L (2006). Enriched environment treatment counteracts enhanced addictive and depressive-like behavior induced by prenatal chronic stress. *Brain Res* **1125**:132-137.

Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K et al (2001). Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* **1**:717-724.

Yoshihara T, Sugihara K, Kizuka Y, Oka S & Asano M (2009). Learning/memory impairment and reduced expression of the HNK-1 carbohydrate in beta4-galactosyltransferase-II-deficient mice. *J Biol Chem* **284**:12550-12561.

Yu R, Bieberich E, Xia T & Zeng G (2004). Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system. *J Lipid Res* **45**:783-793.

Zeng G & Yu R (2008). Cloning and transcriptional regulation of genes responsible for synthesis of gangliosides. *Curr Drug Targets* **9**:317-324.

Zhang Y, Iwasaki H, Wang H, Kudo T et al (2003). Cloning and characterization of a new human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, designated pp-GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc alpha-serine/threonine antigen. *J Biol Chem* **278**:573-584.