



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

COORDINACIÓN DE PSICOFISIOLOGÍA

**Alteraciones en la generación de los patrones oscilatorios hipocampales
producidos por la proteína beta amiloide**

T E S I S:

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A:

RAMÓN BERNAL PEDRAZA

DIRECTOR DE LA TESIS: Dr. José Fernando Peña Ortega

REVISOR: Dr. César Casasola Castro

JURADO:

Dra. Irma Yolanda del Rio Portilla

Dr. Octavio César García González

Lic. Karina Simón Arceo

México, D.F., 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Why should not the physician improve his competence
by enlarging scientific knowledge of psychiatry
besides doing his daily clinical practice?”

A. Alzheimer

Se agradece especialmente el apoyo del CONACYT a través de los proyectos 059087 y 151261, a la Secretaría de Educación Pública, al CINVESTAV y al grupo farmacéutico ROCHE, por el financiamiento y reconocimiento al presente trabajo.

Agradezco al universo por permitirme llegar a este momento,

A mis padres por darme la vida,

A mi hermano Luis por estar conmigo en los momentos cruciales,

A la Universidad Nacional Autonomía de México por ser desde el despertar mental mi máxima Casa,

A Ileana Torres por brindarme su compañía, apoyo y consejo durante los procesos más complicados y bellos de mi vida hasta este momento,

A mi familia, fuente de la que derivan no sólo mis apellidos, sino mi cariño, mis fuerzas y mis más poderosos principios,

Al Dr. Fernando Peña por su confianza, guía, apoyo, regaño y trabas constructivas, fundamentales para que hoy pueda considerarme un verdadero profesionalista,

A César Casasola, Octavio César, Karina Simón, Irma Yolanda, Benito Ordaz y Liliana Aparicio por sus correcciones, recomendaciones, enseñanza y ayuda invaluable,

A todos mis compañeros del labo de las diversas generaciones, que durante este tiempo me brindaron su compañía, apoyo y paciencia, y con quienes tuve la oportunidad de compartir tantos tragos dulces y amargos, a todos ustedes les dedico un especial abrazo!!!!

A todos los amigos y compañeros de mi etapa universitaria (y postuniversitaria) por ser parte y cómplices de este largo camino,

A mi tía Cheba, a él Diego y a Rafita por abrirme las puertas de su cariño y su casa en momentos trascendentales,

Y a todos los que mi pésima memoria omitió pero contribuyeron significativamente y a los que apoyaron con su compañía durante la elaboración de este trabajo,

A Otto, Poncho y Omar por ser los RUMEEEEIS

¡¡¡¡Muchas gracias a TODOS, TODAS!!!! **“Gracias TOTALES”**

RESUMEN

Marco teórico: La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad altamente incapacitante, que tendrá una mayor incidencia debido al aumento en la expectativa de vida. Esta enfermedad se manifiesta por afectaciones cognitivas asociadas a alteraciones anatomopatológicas que incluyen la presencia de marañas neurofibrilares y placas seniles. Estas placas seniles están compuestas mayoritariamente por un péptido de 42 aminoácidos conocido como la proteína beta amiloide (P β A). En los últimos años se ha determinado que los niveles extracelulares de los oligómeros solubles de la P β A correlacionan muy bien con las afectaciones cognitivas de los pacientes con EA. En vista de que el tipo de actividad electroencefalográfica que presenta el hipocampo tiene relevancia funcional y que los oligómeros de la P β A pueden alterar dicha actividad, se ha propuesto que estas formas solubles de la P β A producen los síntomas cognoscitivos tempranos de la EA a través de alterar las oscilaciones hipocampales, que constituyen una actividad electroencefalográfica indispensable para los procesos de aprendizaje y memoria. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la administración intracisternal de la P β A oligomerizada sobre los ritmos hipocampales de ratas anestesiadas.

Métodos: Se utilizaron ratas Wistar macho (de 300 a 330 gr), a las que se les asignó aleatoriamente a un tratamiento: A) Administración intracisternal del vehículo (n=9); B) Administración intracisternal de 5 picomolas de solución oligomerizada de la P β A (n=5) y C) Administración intracisternal de 50 picomolas de solución oligomerizada de la P β A (n=5). Posteriormente, se les anestesió con uretano y se colocaron electrodos para registro de campo en la fisura hipocampal. En todos los casos, después de evaluar la actividad electrofisiológica espontánea del hipocampo durante una hora, se registró el cambio en la actividad oscilatoria durante 2 min de estimulación nociceptiva. Los registros de campo obtenidos fueron analizados con la Transformada Rápida de Fourier para obtener la potencia de las frecuencias entre 0.1 y 12.2 Hz (con resolución de 0.6 Hz), tanto de los registros de actividad espontánea como durante la estimulación nociceptiva. Con la finalidad de analizar el efecto de la P β A sobre la actividad “inducida” por la estimulación nociceptiva, para cada frecuencia se calculó la proporción de la potencia inducida por la estimulación nociceptiva respecto el registro espontáneo y se evaluó la diferencia entre grupos a través de un análisis estadístico no paramétrico.

Resultados: Tal como hemos reportado previamente, la estimulación nociceptiva en el grupo control induce una actividad oscilatoria con frecuencias entre 3.7 y 4.9 Hz. Como fue hipotetizado en esta Tesis, la administración intracisternal de alguna de las soluciones de P β A oligomerizada produce una alteración en los patrones oscilatorios del hipocampo. La administración de 5

picomolas de oligómeros de la P β A produjo un aumento significativo de las frecuencias dentro del rango Delta, mientras que la administración de 50 picomolas de oligómeros de la P β A produce el mismo efecto pero además disminuye significativamente la potencia de la actividad oscilatoria inducida, particularmente en la frecuencia de 4.3 Hz.

Discusión y conclusiones: Se demostró que la administración intracisternal de oligómeros de la P β A afecta la funcionalidad del hipocampo, ya que modifican los patrones de oscilación que este presenta durante la estimulación nociceptiva. Esta alteración podría simular el enlentecimiento del EEG que presentan los enfermos de la EA en las etapas tempranas. Se propone continuar con ésta línea de investigación, al analizar la relación de estos efectos con la conducta.

INDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. ANTECEDENTES | 1 |
| 1.1 Características de la Enfermedad de Alzheimer. | 3 |
| 1.2 Marcadores de la Enfermedad de Alzheimer. | 6 |
| 1.3 Patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer. | 10 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 16 |
| 3. OBJETIVO | 16 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| 4.1 Sujetos. | 17 |
| 4.2 Materiales. | 17 |
| 4.3 Sustancias químicas. | 17 |
| 4.4 Aparatos. | 17 |
| 4.5 Programas de cómputo. | 18 |
| 4.6 Métodos. | 18 |
| a) Preparación de materiales para registro (electrodos). | 19 |
| b) Preparación de los fármacos y sustancias. | 19 |
| c) Preparación de los sistemas de registro. | 19 |
| d) Asignación de los grupos. | 19 |
| e) Administración intracisternal de una de las tres dosis de la PβA o el vehículo. | 20 |
| f) Anestesia con uretano. | 21 |
| g) Cirugía estereotáxica e introducción del electrodo de profundidad. | 21 |
| h) Registro de la actividad eléctrica del hipocampo. | 21 |
| i) Verificación de los sitios de registro. | 21 |
| j) Análisis de los registros off line. | 22 |
| k) Análisis estadístico. | 23 |
| 5. RESULTADOS | 24 |
| 5.1 Cambios en la actividad espontánea hipocampal producidos por la estimulación nociceptiva en el hipocampo. | 24 |
| 5.2 Efecto de administración de la PβA oligomerizada sobre la actividad oscilatoria inducida en el hipocampo por estimulación nociceptiva. | 27 |
| 6. DISCUSIÓN | 31 |
| 6.1 El modelo de registro hipocampal bajo anestesia con uretano. | 31 |
| 6. 2 Posibles efectos de la vía de administración intracisternal. | 34 |
| 6. 3 Posibles efectos de los oligómeros solubles de la PβA (1-42). | 37 |
| 6.4 Consideraciones finales. | 39 |
| 6.5 Perspectivas. | 41 |
| 7. CONCLUSIONES | 43 |
| 8. REFERENCIAS | 44 |

1. ANTECEDENTES

La población de adultos mayores va en aumento en el mundo y en México (Zúñiga y Vega, 2005). La transición demográfica que vive nuestro país, se verá reflejada en una inversión de la pirámide poblacional (Fig. 1). Datos avalados por el Consejo Nacional de Población (Zúñiga y Vega, 2005), pronostican que para el año 2050 la población de adultos mayores de 60 años, que representa actualmente el 7% de la población total, aumentará hasta llegar al 28% (36 millones; Fig. 2). Por lo anterior, el estudio de las problemáticas de salud de este grupo de población resulta de gran interés.

Pirámides de población de México, 1970-2050

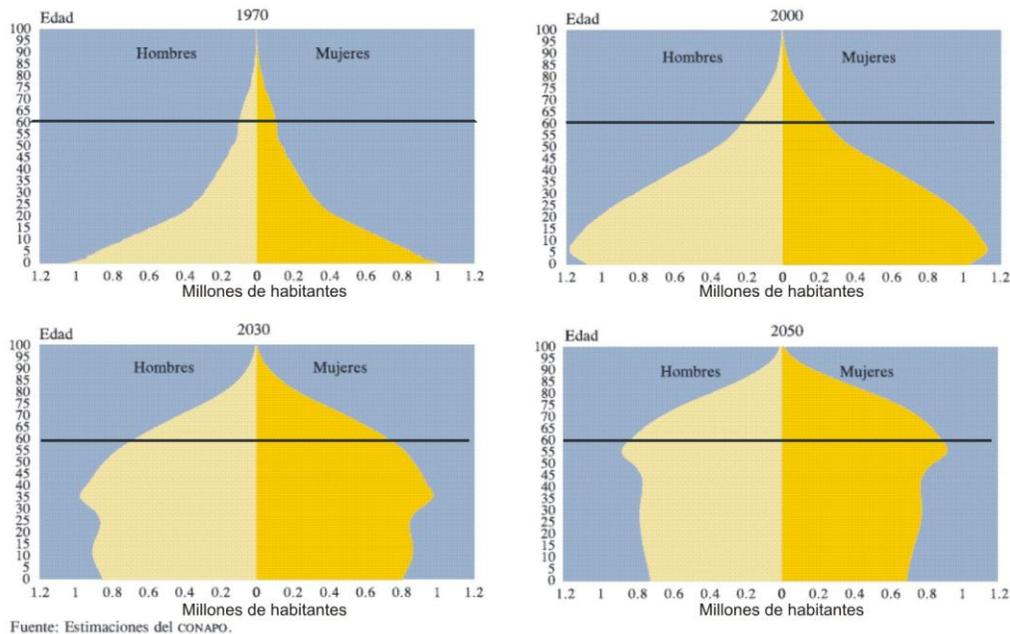
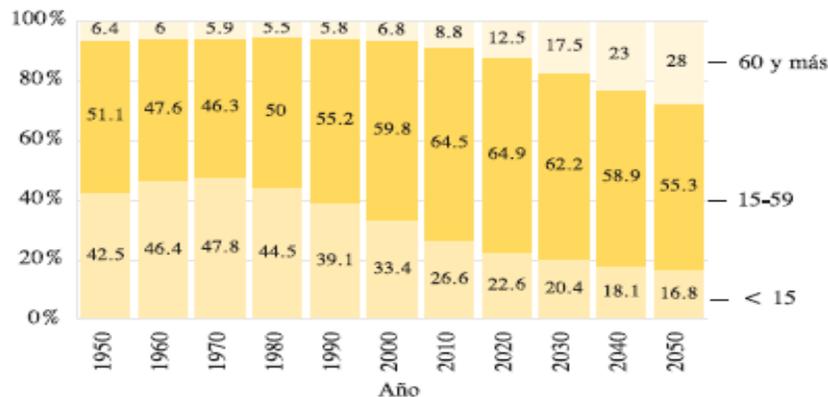


Figura 1 La pirámide poblacional en México se está invirtiendo (1970-2050). En la figura se muestran las pirámides poblacionales que se registraron en 1970 y 2000. Con base en los estimadores poblacionales, se proyecta que para los años 2030 y 2050 la proporción de adultos mayores a 60 años (línea de corte) aumente drásticamente tanto en el grupo de hombres como en mujeres. Tomado de Zúñiga y Vega, 2005.

Dentro de los problemas de salud más comunes de los adultos mayores se encuentran las demencias. Un meta-análisis realizado por Lopes y Bottino (2002), revela que, en todo el mundo, la prevalencia de demencia va en aumento en relación al grupo etario; presentándose una prevalencia de cerca de 3% entre los 70-75 años, 16% entre 80-

84, de 38 % entre 90-94 y del 55% para mayores de 95. En prácticamente todos los estudios analizados por estos investigadores, la enfermedad de Alzheimer (EA), es la causa mayor de demencia en adultos mayores, llegando incluso a encontrarse en una proporción de 5 a 1 comparada con otros tipos de demencias (Lopes y Bottino, 2002).

Distribución de la población de México por grandes grupos de edad, 1950-2050



Fuente: Estimaciones del CONAPO.

Figura 2 El porcentaje de adultos mayores de 60 años está aumentando. Se estima que para el 2050 la población de adultos mayores de 60 años se incremente del 7% que ocupa actualmente a casi el 30 % en 2050 por lo que el estudio de las problemáticas en este grupo de población resulta de gran interés. Tomado de Zúñiga y Vega, 2005.

Diversos trabajos muestran que la EA tiene una etiología multifactorial (Tyas et al., 2001; Sandbrick et al., 1996; Pericak-Vance et al., 1997), que se ve influenciada por variables genéticas y ambientales diversas, aunque la edad se ha establecido sólidamente como el factor de riesgo principal (Muñoz y Feldman, 2000; Tyas et al., 2001). Por ejemplo, una estimación realizada para la población norteamericana muestra que la prevalencia de la EA es de 3% en personas de 65 a 74 años, 18.7% en personas de 75 a 85 años y 47.2% para aquellas mayores a 85 años (Hebert et al., 2003).

Para México, es muy difícil encontrar datos duros acerca de la prevalencia de la EA. Las cifras oficiales no parecen reflejar las cifras esperadas para nuestra distribución de población. Existe un solo estudio publicado, que fue realizado en Tepatitán Jalisco, donde

se encontró una prevalencia cercana al 2% en los adultos mayores de 65 años (Cruz-Alcalá y Vázquez –Castellanos, 2002). Por otro lado, la Secretaría de Salud en un boletín especial sobre Alzheimer, estima que la EA tiene una prevalencia en México del 5% entre los individuos mayores de 60 años (Gutiérrez, 2002).

Aunque la EA es más común conforme envejecemos, hay variaciones amplias respecto a la edad en la que inicia. En este sentido, la EA puede clasificarse clínicamente en la de inicio temprano (antes de los 65 años) y la de inicio tardío (después de los 65 años) (Wang, 2003). También, dependiendo de si se ha encontrado un factor genético causal, puede ser dividida en casos familiares y esporádicos (Wang, 2003). La EA de inicio temprano se observa más a menudo en los casos familiares y la de inicio tardío es más común en los casos esporádicos (Wang, 2003). Es importante mencionar que si bien la edad es un factor de riesgo importante no es el factor causal, pues la EA no es parte del envejecimiento normal (Morrison y Hof, 1997; West et al., 1994).

1.1 Características de la Enfermedad de Alzheimer.

Si bien durante el envejecimiento normal los cambios en el cerebro causan cierta pérdida de memoria, especialmente la de hechos recientes y un deterioro en la capacidad de aprendizaje, estas alteraciones no afectan al funcionamiento general del individuo (Morrison y Hof, 1997). La falta de memoria en las personas mayores se denomina pérdida de memoria senil benigna y no es necesariamente un signo de demencia o un síntoma precoz de la EA (Morrison y Hof, 1997).

La demencia es un síndrome debido a una enfermedad del cerebro, generalmente de naturaleza crónica o progresiva, en la que hay deficiencias de múltiples funciones corticales superiores, entre ellas la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2002). El deterioro cognoscitivo se acompaña, y es precedido, de un deterioro en el control emocional, del comportamiento social o de la motivación (OMS, 2002). La demencia produce un deterioro intelectual apreciable que repercute en la actividad cotidiana del enfermo, por ejemplo, en el aseo personal, en el vestirse, en el comer o en las funciones excretoras (OMS, 2002).

En el caso particular de la demencia de tipo Alzheimer, los principales síntomas clínicos incluyen una pérdida profunda de la memoria, disminución de la capacidad para realizar tareas cotidianas, deficiencias en la capacidad de juicio, desorientación, cambios de personalidad, dificultad para aprender y finalmente la pérdida de la capacidad para comunicarse y hacerse cargo del cuidado personal (Wang, 2003; Alzheimer, 1906, 1907, 1911). Aunque estos síntomas clínicos son característicos de la EA, la demencia evoluciona de modo progresivo a través de los años, por lo que se han descrito distintas etapas en el desarrollo de la misma (Aveleyra et al., 1998). En general, se diferencian tres etapas de la EA de acuerdo a sus características clínicas:

La primera etapa, denominada “*amnésica*”, se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria, desorientación espacial e ineficiencia para desarrollar actividades de la vida diaria, además de alteraciones frecuentes del estado de ánimo, agitación, hiperactividad, apatía, depresión y perplejidad (Forstl y Kurz, 1999).

La segunda etapa es la fase “*confusional*” que se caracteriza por un deterioro rápido y progresivo de las funciones intelectuales que se asocian a síntomas focales como apraxia (pérdida de la capacidad de llevar a cabo movimientos de propósito, aprendidos y familiares, a pesar de tener la capacidad física y el deseo de realizarlos), afasia (afectación de la capacidad de comunicarse mediante el lenguaje, conservando la inteligencia y los órganos fonatorios), agnosia (interrupción en la capacidad para reconocer objetos conocidos o aprender nuevos, sin haber deficiencia en la alteración de la percepción, lenguaje o intelecto) y discalculia (incapacidad de realizar operaciones matemáticas o aritméticas) (Forstl y Kurz, 1999). La mayor deficiencia en esta segunda etapa se observa en la memoria de hechos recientes y en la evocación de recuerdos; también se presentan alteraciones en la postura y en la marcha, y pueden aparecer algunos síntomas psicóticos como alucinaciones o delirios (Forstl y Kurz, 1999).

Por último, la etapa “*demencial*” que se caracteriza por un deterioro claro en toda la conducta intelectual y motora, incluso aparece incontinencia urinaria y fecal entre otros signos y síntomas neurológicos severos (Forstl y Kurz, 1999). El paciente pierde toda capacidad para caminar o comunicarse y se vuelve incapaz de cuidarse a sí mismo; la

muerte sobreviene entre 5 y 10 años después de iniciada la enfermedad, principalmente a causa de enfermedades infecciosas (Bianchetti y Trabucchi, 2001).

Éstas manifestaciones clínicas fueron originalmente descritas por Alois Alzheimer en 1906, respecto al caso clínico de una paciente denominada Auguste D, en una ponencia impartida en un congreso en Tübingen Alemania. Dicha presentación fue publicada a modo de resumen ese mismo año (Alzheimer, 1906) y un año después la versión completa de su exposición (Alzheimer, 1907). En los años siguientes fueron reportados otros casos similares (Bonfiglio, 1908; Perusini, 1909) y en 1910 Emil Kraepelin, en la octava edición de su libro “Psiquiatría Clínica”, identificó el trastorno como una entidad nosológica particular y usó por primera vez el término “Enfermedad de Alzheimer” (Kraepelin, 1910). Alzheimer publicó, en 1911, un trabajo más extenso y completo donde incorpora los hallazgos encontrados en un segundo paciente: “Johann F” (Alzheimer, 1911). En los trabajos de Alzheimer se describe una demencia con características observables en distintos niveles: los problemas de memoria ya antes mencionados; marcadores anatómicos que incluyen “atrofia cerebral, hidrocefalia, arteriosclerosis en los pequeños vasos sanguíneos cerebrales”, así como también marcadores histopatológicos definitorios que, hoy en día, adquieren relevancia diagnóstica: las marañas neurofibrilares y las placas seniles (Figs. 1.3, 1.4; Alzheimer, 1906, 1907, 1911; Braak et al., 2006; Im et al., 2008).

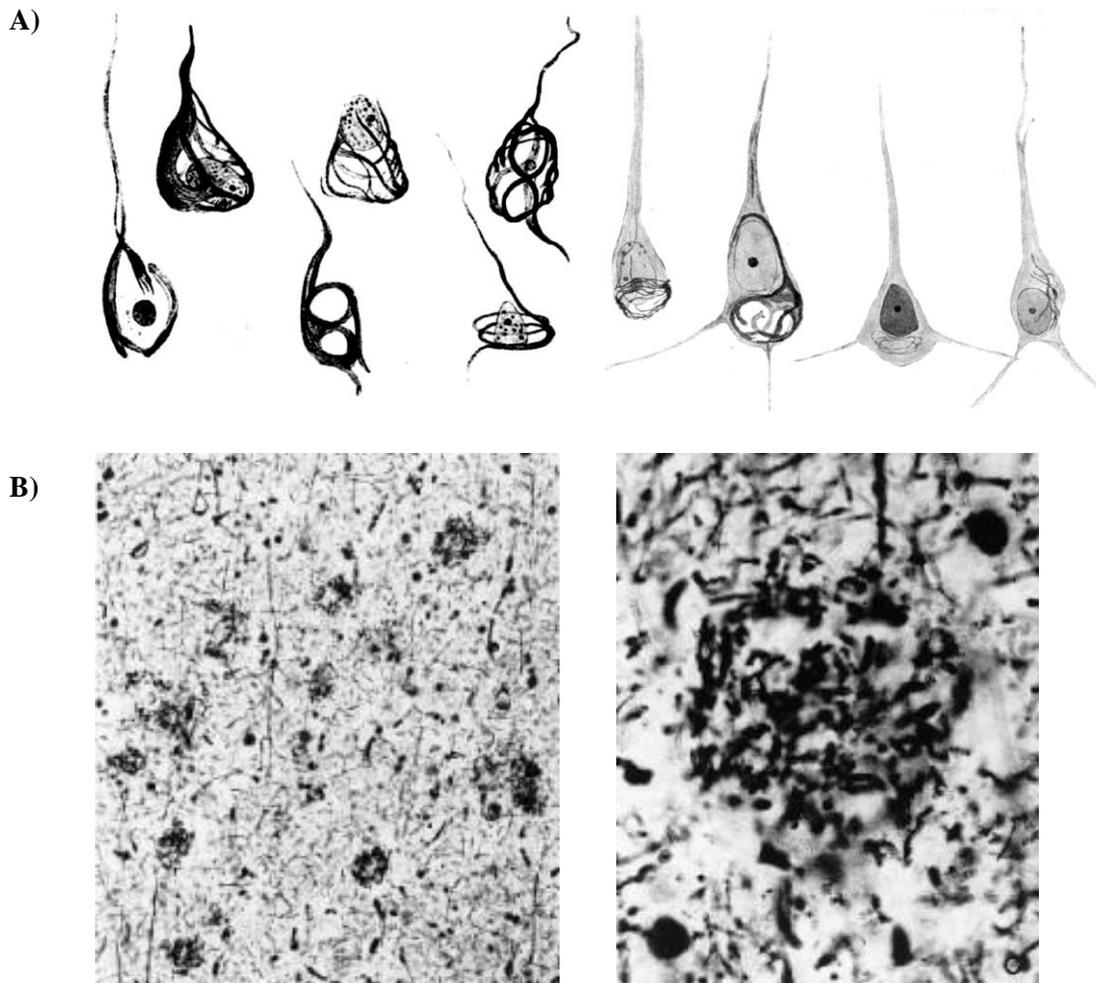


Figura 3 Marañas neurofibrilares y placas seniles en Auguste D. A) En los dibujos realizados por Alzheimer (1911) se muestran las marañas u *ovillos* neurofibrilares que se encuentran como franjas oscuras en el interior de las neuronas. Las fotomicrografías mostradas en B) fueron obtenidas por Graeber et al., (1998) y muestran las placas seniles del mismo paciente. Se aprecian como agregados densos de neuritas distróficas (a la derecha se muestra una ampliación).

1.2 Marcadores de la Enfermedad de Alzheimer.

Las marañas u *ovillos* neurofibrilares están constituidos de filamentos helicoidales que se encuentran dentro del cuerpo de las neuronas y en sus dendritas proximales (Fig. 3). Las marañas están formadas por la isoforma no soluble de la proteína asociada a microtúbulos TAU (Iqbal et al., 1974; Grundke-Iqbal et al., 1986a). La proteína TAU deja su conformación soluble al encontrarse hiperfosforilada (Grundke-Iqbal et al., 1986b), lo que compromete su función estructural en el citoesqueleto (Iqbal et al., 1986) y en el transporte axonal. La agregación de la proteína TAU eventualmente mata a las neuronas

que dejan a los restos de sus cuerpos y a las marañas neurofibrilares en el líquido intersticial, donde interactúan con agregados de la proteína beta amiloide (P β A) para formar las placas seniles (Figs. 4 y 5) (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008). Estos marcadores histopatológicos de la EA se pueden observar en un primer momento en la corteza entorrinal y luego las anormalidades se extienden también a la neocorteza y al hipocampo (Braak et al., 2006).

Las placas seniles están formadas principalmente por la agregación de la P β A (Glennner y Wong, 1984) y de éstas, se han clasificado al menos dos tipos principales en los cerebros de los enfermos con EA: las placas neuríticas y las placas difusas. Las placas neuríticas contienen agregados densos de fibrillas de amiloide o placas amiloideas, que están rodeadas por axones y dendritas (neuritas) distróficas, así como de astrocitos y microglía (Morris 1995 citado en Wang, 2003). Las placas difusas contienen amiloide no estructurado que no está rodeado por restos neuronales (Wang, 2003). Las placas seniles se encuentran en zonas cerebrales específicas: En la etapa temprana de la EA aparecen en las estructuras mediales del lóbulo temporal, la corteza entorrinal y el hipocampo, mientras que en la fase tardía de la enfermedad las placas aparecen en las áreas asociativas temporales y en la corteza parietal (Braak et al., 2006).

La P β A es un péptido de entre 39 a 43 aminoácidos, producto del catabolismo de una glico-proteína transmembranal denominada proteína precursora del amiloide (PPA o APP por sus siglas en inglés), cuyo gen está localizado en el cromosoma 21 (St George-Hyslop et al., 1987). La PPA puede ser degradada por dos vías enzimáticas que son mutuamente excluyentes, la no-amiloidogénica y la amiloidogénica. La degradación de la PPA que no produce beta amiloide (no-amiloidogénica) ocurre cuando la enzima alfa secretasa degrada a la PPA en un sitio intermedio de la secuencia que constituye a la P β A (Allinson et al., 2003), previniendo así su formación (Octave, 1995). Se ha atribuido la actividad de la alfa secretasa a dos miembros de la súper familia de las metaloproteasas dependientes de zinc, las enzimas ADAM-10 y ADAM-17 (Kojro y Fahrenholz, 2005). Esta última, también es conocida como TACE (por otro de sus sustratos –el factor de necrosis tumoral alfa: *tumor necrosis factor α converting enzyme*–) (Kojro y Fahrenholz, 2005).

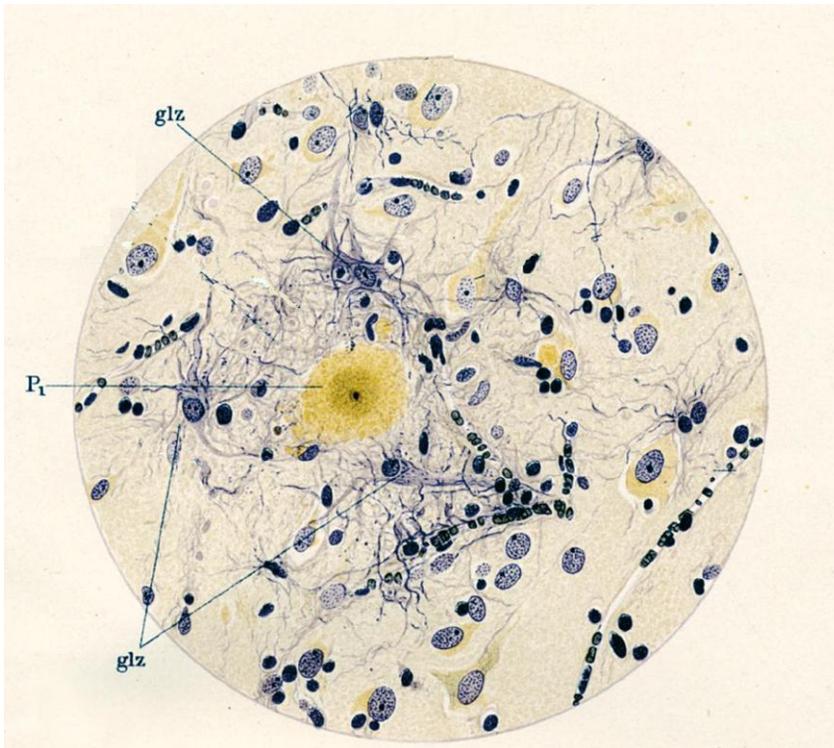
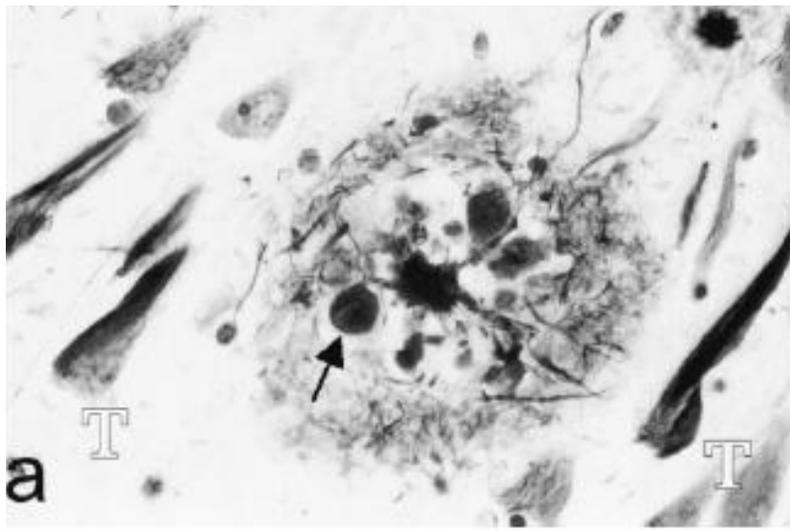


Figura 4 Marcadores histopatológicos de la EA.

Superior. En este dibujo de Alois Alzheimer se muestran las principales características histopatológicas presentes en los pacientes con EA. Las marañas u *ovillos neurofibrilares* se ven como manchas oscuras dentro de los cuerpos neuronales (glz) y estos últimos se aglomeran alrededor de densos agregados amiloideos (P₁) formando las *placas seniles*. Modificado de Alzheimer (1911) citado en Dham, (2006).



Inferior. En esta fotomicrografía obtenida de la corteza cerebral de un enfermo con EA, es posible observar a las marañas neurofibrilares como manchas oscuras en forma de flama (T) y en el centro de la imagen una placa senil formada por un centro de amiloide rodeado por neuronas distróficas, una de las cuales (flecha) claramente da origen a un delgado axón. Tintura de plata 600x. Tomado de Muñoz y Feldman, (2000).

Como consecuencia de la vía no-amiloidogénica la hidrólisis de la PPA genera el fragmento sPPA alfa (Fisher, 2008). Éste fragmento ha mostrado actividad como factor neurotrófico (Bell et al., 2008) y parece funcionar como neuroprotector (Furukawa et al.,

1996) y facilitador de la memoria (Meziane et al., 1998). En cambio, la vía amiloidogénica genera como producto metabólico a la P β A. En ésta vía la PPA es cortada en uno de sus extremos (el amino-terminal), por una enzima denominada originalmente beta-secretasa (que luego se identificó como BACE “*beta-site APP-cleaving enzyme*”) y en el otro extremo (el carboxilo terminal), por una enzima tetramérica denominada gama-secretasa (constituida por proteínas que incluyen a las presenilinas 1 y 2) (Fig. 5). Se ha demostrado que alteraciones en la vía amiloidogénica, que tiene como consecuencia un aumento en la producción de la P β A, juegan un papel muy importante en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer (Goate et al., 1991; Sherrington et al., 1995; Levy-Lahad et al., 1995; Rogae et al., 2002).

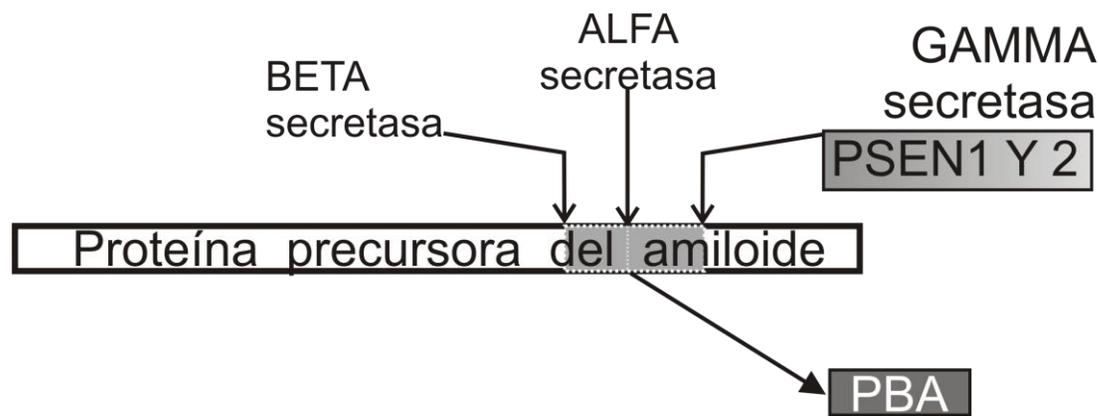


Figura 5 Vías de degradación de la PPA y formación de la P β A. Existen dos vías metabólicas de degradación de la PPA. En la denominada vía *amiloidogénica* la PPA es cortada inicialmente por la beta secretasa y luego por la gamma secretasa (conformada en parte por las presenilina 1 y la 2 [PSEN 1 y 2] lo que genera la P β A. La otra vía de degradación de la PPA involucra a la alfa secretasa, que degrada a la PPA en una sección que está por en medio de la secuencia perteneciente a la P β A, lo que impide la formación de esta última.

En las últimas décadas, se ha tratado de relacionar la presencia de los marcadores histopatológicos y el deterioro cognoscitivo en la EA (Lue et al., 1999; Walsh et al., 2002). Sin embargo, de estos esfuerzos se ha concluido que ni el daño anatómico, ni la cantidad de placas seniles o de marañas neurofibrilares presentan una correlación directa con el nivel de deterioro cognoscitivo en la fase temprana de la enfermedad (Peña et al., 2006). Por otra parte, las deficiencias cognoscitivas correlacionan muy bien con cambios en la actividad electroencefalográfica (Valladares-Neto et al., 1995) y con la presencia de agregados

solubles de la P β A (Lue et al., 1999; Walsh et al., 2002; Wang, 2003). Estos datos han reforzado la propuesta de que los oligómeros solubles de la P β A juegan un papel crucial en la patogénesis de la enfermedad. De hecho, asociada a la sobreproducción de la P β A soluble, se ha observado una hipofuncionalidad metabólica temprana que sigue el mismo patrón del daño tisular que se presenta en las fases posteriores de la enfermedad (Fig. 6) (Fazekas et al., 1989).

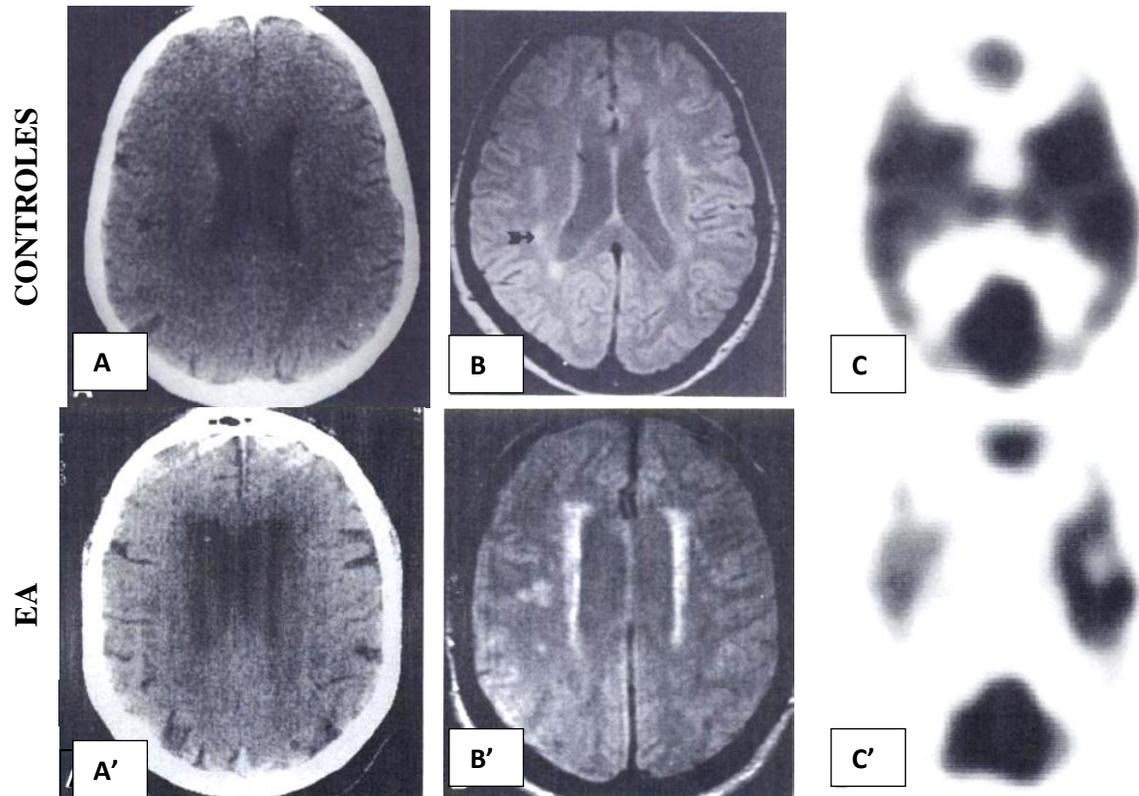


Figura 6 Diferencias entre los cerebros de enfermos de EA (inferiores) y controles sanos de la misma edad (superiores). En imágenes de Tomografía Computarizada (A), se muestra atrofia cortical y aumento en el tamaño de los ventrículos en los enfermos de EA. En imágenes de Resonancia Magnética (B), se puede ver aumento en el tamaño de los ventrículos y un “halo” de señal de alta intensidad a su alrededor. En imágenes de Tomografía por Emisión de Positrones (C), se observa una disminución del metabolismo que es más pronunciada en el hemisferio izquierdo, mientras que las cortezas sensoriales casi no se ven afectadas. Tomado de Fazekas et al. (1989).

1.3 Patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer.

En la actualidad, la propuesta más ampliamente aceptada acerca de la patogénesis de la EA supone que el evento que la precede y desencadena es un desequilibrio entre la

producción y la degradación de la P β A (Hardy y Selkoe, 2002). La P β A se genera en todas las personas y parece tener una función fisiológica reguladora de la actividad neuronal (Cirrito et al., 2005; Priller et al., 2006). Sin embargo la PBA puede acumularse y alcanzar niveles tóxicos que favorecen la agregación en oligómeros solubles (Gandy, 2005). Esto ocurre como consecuencia de alteraciones en la cadena metabólica que produce la proteína (Goate et al., 1991; Sherrington et al., 1995; Rogaev et al., 2002; Levy-Lahad et al., 1995) o por afectaciones de su proceso de degradación (Leissring et al., 2003). Dichas alteraciones pueden ser generadas ya sea por causas genéticas (St George-Hyslop, 2000a) o por factores relacionados con las condiciones de vida y salud de los individuos (Fazekas et al., 1989; McGeer et al., 1996; Blasko et al., 2001; Jellinger et al., 2001; Tyas et al., 2001; Uryu et al., 2002; Mayeux, 2003), o por la interacción de ambos tipos de factores (Ott et al., 1998; Merchant et al., 1999). Una vez que la P β A se encuentra en solución tiende a desarrollar un proceso de agregación que lleva a la formación secuencial de oligómeros solubles, fibrillas solubles y eventualmente fibrillas insolubles (Peña et al., 2006).

En los últimos años, se ha acumulado evidencia que sugiere que las formas solubles de la P β A son responsables de la generación de muchos de los síntomas tempranos de la EA, independientemente de la formación de las placas seniles y la concomitante neurodegeneración (Walsh et al., 2002; Peña et al., 2006). Por ejemplo, los pacientes presentan deterioro cognoscitivo temprano mucho antes de que se formen las placas seniles (Naslund et al., 2000), del mismo modo que ocurre con los modelos transgénicos de la EA (Hsia et al., 1999; Moechars et al., 1999; Giacchino et al., 2000; Mucke et al., 2000; Stephan et al., 2001; Wang et al., 2004; Wang et al., 2004). Además, como se mencionó anteriormente, la severidad de la demencia temprana sólo correlaciona con la cantidad de oligómeros solubles de la P β A (Lue et al., 1999; Gong et al., 2003).

Debido a que los oligómeros solubles de la P β A pueden afectar las funciones cerebrales mucho antes de producir muerte neuronal (Fazekas et al., 1989), se han estudiado los efectos de ésta proteína sobre dos mecanismos celulares ampliamente relacionados con la cognición y la memoria (Peña et al., 2006). El primero es el fenómeno plástico denominado potenciación de largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) y el segundo es la generación de patrones de oscilación poblacional en los circuitos neuronales (Peña et al., 2006).

En cuanto a la LTP, aunque existen múltiples reportes que sugieren que éste fenómeno plástico es afectado por la P β A (Stephan et al., 2001; Walsh et al., 2002; Wang et al., 2004; Wang et al., 2004), aunque otros autores no han corroborado estos resultados (Hsia et al., 1999; Fitzjohn et al., 2001; Sun y Alkon, 2002), e incluso existen estudios en los que la P β A aumenta la inducción de la LTP tanto *in vitro* (Wu et al., 1995; Koudinov y Berezov, 2004) como en ratones transgénicos *in vivo* (Parent et al., 1999; Jolas et al., 2002).

En vista de que la PBA provoca efectos contradictorios sobre la LTP y que estos no se asocian necesariamente con el deterioro cognoscitivo que ésta produce (Peña et al., 2006), nosotros hemos estudiado el efecto de la P β A sobre los ritmos cerebrales (Peña et al., 2010; Balleza-Tapia et al., 2010). Esta línea de trabajo se ve apoyada por observaciones directas en pacientes con EA en las que se ha reportado consistentemente un "enlentecimiento" en la actividad electroencefalográfica, que se caracteriza por una disminución en la potencia y la coherencia de los patrones de oscilación de frecuencias rápidas y un aumento de ambos parámetros en las frecuencias lentas dentro del rango delta (menores a 3 Hz); de modo relevante, el "enlentecimiento" del electro encefalograma (EEG) correlaciona muy bien con la severidad de la demencia en etapas tempranas de la enfermedad (Hughes et al., 1989; Schreiter-Gasser et al., 1994; Nobili et al., 1999; Ihl et al., 1996; Kowalski et al., 2001).

Se ha propuesto que la P β A afecta de modo particular a los patrones de oscilación dependientes de acetilcolina (Sun y Alkon, 2002), pues además de que estos son de gran relevancia para la memoria, las estructuras que forman parte de este sistema de neurotransmisión, como es el caso del hipocampo y del septum, se ven seriamente afectadas en la EA (Francis et al., 1993). En estudios preliminares de nuestro laboratorio, se ha demostrado que la P β A es capaz de alterar la generación de los patrones de oscilación colinérgicos y no-colinérgicos, en rebanadas hipocampales de rata. Dichos hallazgos han sido corroborados con animales transgénicos que presentan una patología tipo EA (Driver et al., 2007).

Uno de los patrones oscilatorios relacionado con diversos procesos cognoscitivos es el ritmo theta hipocampal (3-8 Hz) (Shin et al., 2005; McNaughton et al., 2006). Este ritmo, que es objeto de estudio en el presente trabajo, puede ser registrado, en su mayor amplitud,

en la fisura hipocampal de ratas anestesiadas con uretano en respuesta a una estimulación nociceptiva (Shin et al., 2005). Datos clínicos y experimentales muestran que el ritmo theta hipocampal es fundamental para diversos procesos cognoscitivos como las conductas de exploración y el sueño con movimientos oculares rápidos (REM) en roedores (McNaughton et al., 2006) y, en el caso de los humanos, para las funciones relacionadas con la navegación espacial, la memoria, y la cognición (Kahana et al., 2001). Se ha propuesto que la sincronización de las neuronas individuales con el ritmo theta, es crítica para la codificación y la decodificación de la actividad de los ensambles neuronales, así como para los fenómenos de plasticidad sináptica y el funcionamiento de la memoria de trabajo (Kahana et al., 2001; Buzsaki, 2002; O'Keefe y Recce, 1993; Bragin et al., 1999). En base a lo anterior, se ha propuesto que dichas oscilaciones pueden ser la base operacional del hipocampo que proporciona una ventana temporal que recluta coherentemente múltiples ensambles neuronales para la representación, procesamiento, almacenaje y evocación de la información (Engel et al., 2001; Buzsaki y Draguhn, 2004). De hecho, fármacos que aumentan o reducen la memoria, incrementan o inhiben respectivamente al ritmo theta (Leung y Desborough, 1988; Kinney et al., 1999).

La evidencia anterior nos permite especular que la P β A podría desencadenar deterioro cognoscitivo a través de afectar la generación de patrones oscilatorios hipocampales (Peña et al., 2006; Peña et al., 2010).

En un estudio previo de nuestro laboratorio, se determinó que la administración intracerebroventricular del fragmento 25-35 de la P β A provoca cambios en los ritmos registrados en la fisura hipocampal de ratas anestesiadas con uretano durante estimulación nociceptiva. Estos cambios consisten en una disminución de la actividad dentro del rango de frecuencia de entre 1 y 60 Hz con respecto a los valores obtenidos antes de la administración (Fig. 7) (Peña et al., 2010).

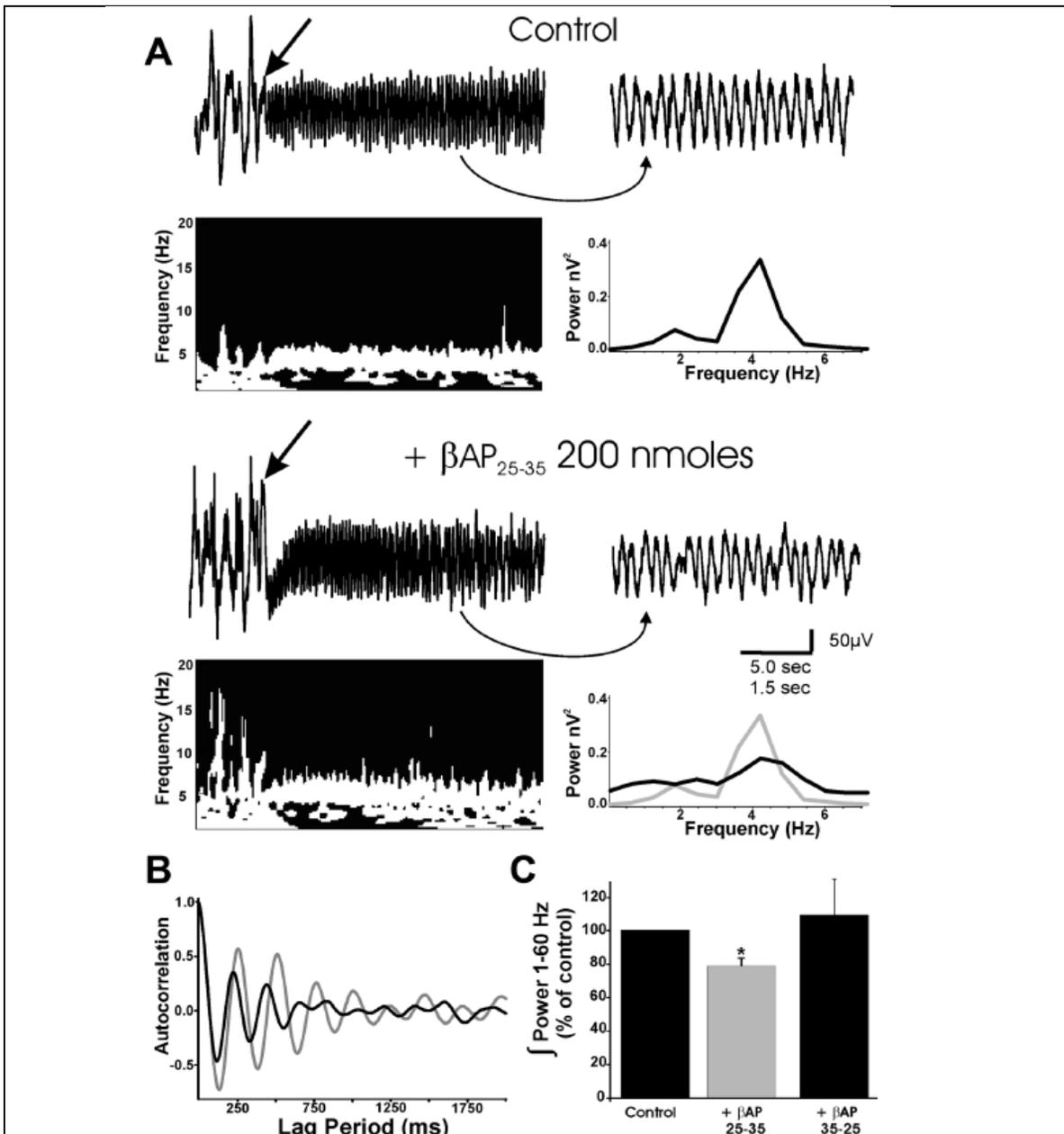


Fig.7 La administración del fragmento 25-35 de la P β A afecta las oscilaciones hipocámpales inducidas por la estimulación nociceptiva en ratas anestesiadas con uretano. **A) Izquierda.** Se muestra el cambio provocado por la estimulación (flecha) en la actividad electrofisiológica espontánea. **Derecha** ampliación durante de la fase estable de la estimulación. Inferior al segmento de registro de la izquierda se puede observar en el espectrograma que las frecuencias predominantes son lentas y durante la estimulación se definen dentro de un rango de entre 3 y 5 Hz. Inferior al trazo ampliado, el espectro de potencia correspondiente muestra un pico de frecuencia definido (3-5 Hz.). Este patrón de actividad disminuyó cuando se administraron 200 nanomoles del fragmento 25-35 de la P β A (ambos registros comparten la escala). **B)** El cambio de actividad se manifiesta también por una disminución en la regularidad del registro mostrado en la gráfica de autocorrelación. **C)** Al cuantificar la actividad total se observa una disminución significativa con respecto a la condición control después de la administración intracerebroventricular del fragmento 25-35 de la P β A, que no es producida por la secuencia inversa (fragmento inocuo 35-25). Tomado de Peña et al., (2010).

En este antecedente quedaron diversas cuestiones pendientes como, por ejemplo, determinar el posible efecto de otras especies de P β A fisiológicamente más significativas en los enfermos (Pike et al., 1995; Selkoe, 2008) y además buscar otras opciones de administración del péptido, pues las implantaciones crónicas consumen mucho tiempo e implican diversas manipulaciones de los animales (p.e. la anestesia repetida), que podrían contribuir a modificar los efectos observados.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de la EA adquiere gran relevancia por el aumento de su prevalencia en los próximos años. Debido a esto, es necesario contar con modelos experimentales que exploren aspectos específicos de la enfermedad y puedan representar rasgos particulares de los casos esporádicos y las fases tempranas. En un trabajo previo de nuestro laboratorio se demostró que la administración intracerebroventricular de los monómeros de una secuencia truncada de la P β A (el fragmento 25-35) afecta los ritmos hipocampales que están asociados a múltiples procesos cognoscitivos. Dado que los oligómeros de la secuencia completa de la P β A (1-42) son la forma que se ha asociado con el deterioro temprano de la cognición en los pacientes con EA, en el presente trabajo se utilizó esta secuencia completa para evaluar su efecto sobre la actividad electrofisiológica hipocampal inducida por estimulación nociceptiva *in vivo*. Además, exploramos una metodología más sencilla: la administración intracisternal.

3. OBJETIVO

Estudiar el efecto de la administración intracisternal de la P β A oligomerizada (1-42), sobre los patrones oscilatorios hipocampales inducidos por estimulación nociceptiva en ratas anestesiadas con uretano.

Con relación al objetivo anterior se plantea la siguiente hipótesis:

Si la administración intracisternal de los oligómeros de la P β A (1-42) afecta el funcionamiento del circuito hipocampal, entonces producirá diferencias en la actividad oscilatoria poblacional inducida por la estimulación nociceptiva.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Sujetos.

Se utilizaron 30 ratas Wistar de 300-330 gr de peso, criadas en cajas contenedoras de 5 a 8 ratas con acceso libre a agua y comida. Todos los animales fueron proporcionados por el bioterio del CINVESTAV- Sede Sur y se utilizaron de acuerdo a los lineamientos establecidos por dicho Centro.

4.2 Materiales.

Para la inyección intracisternal: Jeringas dentales calibre 30 G, como inyectores, unidas a un catéter plástico. Una caja de acrílico de 20 cm x 20 cm x 20 cm con tapa. Torundas de algodón. Una jeringa de 25 microlitros (Hamilton).

Para las cirugías: Jeringas para inyección de insulina. Frascos cilíndricos de cristal con tapa plástica de 2 cm de alto y de 1 cm de diámetro. Material de cirugía (torundas, hojas de bisturí, material de disección etc.).

Para la elaboración de los electrodos. Conectores tipo pin de una línea. Alambre aislado de dos hilos para los electrodos de registro, compuesto de acero inoxidable No. 304 en aleación HFV NAT HFV nylon Bond. Numero 3669/06 (California Fine Wire Company, California). Alambre de un hilo aislado tipo “*wire wrap*”. Acrílico dental y solvente.

Para la verificación del lugar de implantación del electrodo. Portaobjetos.

4.3 Sustancias químicas.

Para la inyección intracisternal: Líquido Cefalorraquídeo Artificial, azul de metileno, éter etílico (FERMONT), Proteína Beta Amiloide 1-42 (SIGMA) y medio de cultivo F12 (SIGMA) como medio de oligomerización y vehículo.

Para la elaboración de electrodos. Ácido muriático.

Para las cirugías: Uretano (SIGMA), propilenglicol (SIGMA), pentobarbital sódico. “Anestésal” (PFIZER), y cloruro de benzalconio.

4.4 Aparatos.

Para la inyección: Una bomba de perfusión dual (HARVARD APRATUS COMPANY Mod. 942).

Para las cirugías: Plancha de acero, (SYBRON mod. termoline 1000); estereotáxico con una torre (DAVID KOPF).

Para los registros. Tres amplificadores (GRASS) 7p511 para registro de EEG; una computadora de escritorio con tarjeta digitalizadora para adquisición de datos; una lámpara con foco incandescente de 75 W.

Para la verificación del lugar de implantación del electrodo. Un estimulador (GRASS modelo S 5); un vibratomo 1000 plus (BIVRATOME). Un escáner (HP F380).

4.5 Programas de cómputo.

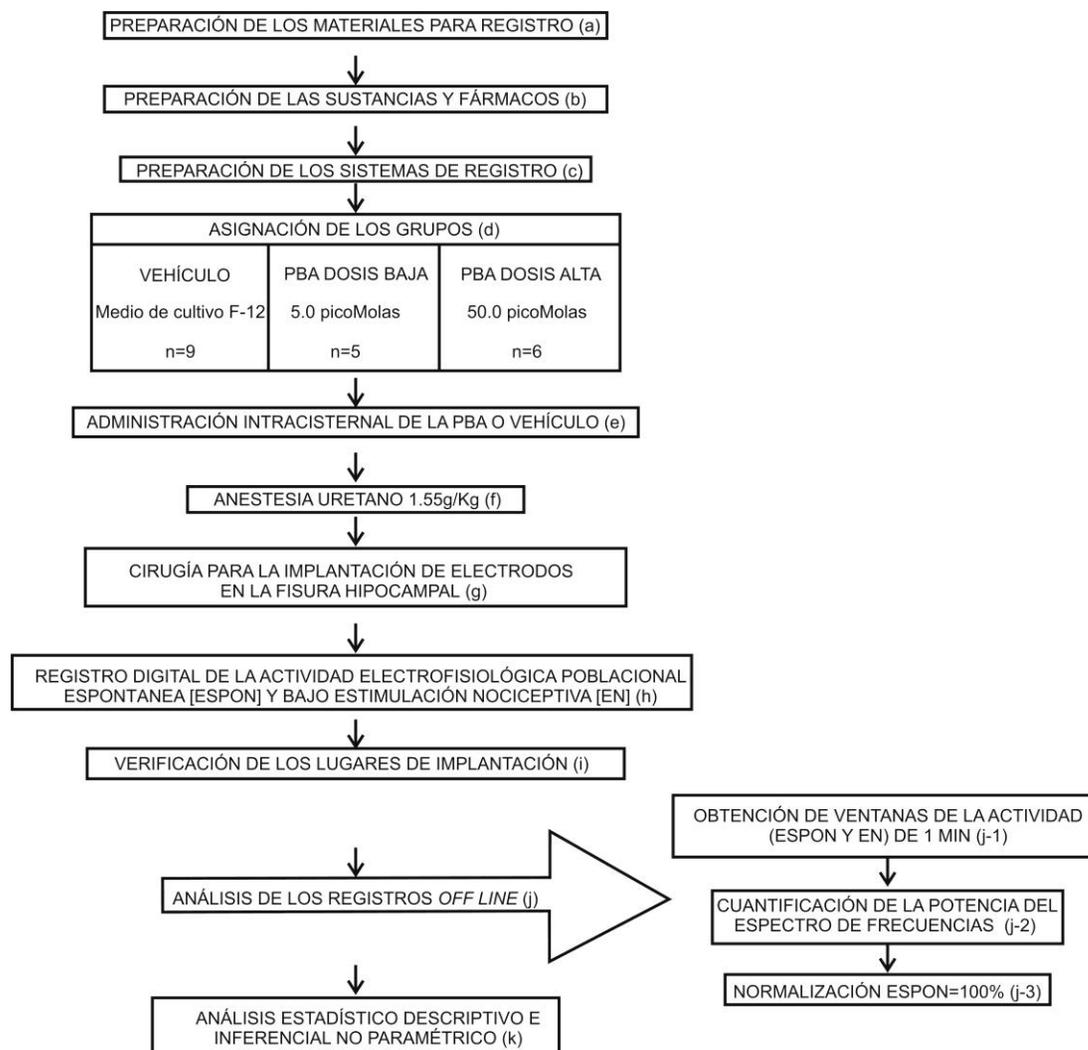
Para la adquisición de datos: Axotape.

Para la verificación del lugar de implantación del electrodo. HP Solution center.

Para el análisis de los datos: Clampfit versión 10.0, Prisma Stat y paquetería OFFICE.

4.6 Métodos.

Se siguió la metodología experimental que se resume en el Cuadro 1 y que se explica a continuación.



Cuadro 1 Procedimiento experimental. Se presenta, en orden descendente, el procedimiento principal en la columna izquierda. La letra entre paréntesis representa la sección del presente apartado donde se describe el procedimiento.

a) Preparación de materiales para registro (electrodos).

Para hacer los electrodos de registro se cortaron alambres de acero en tramos de 3 cm. Las puntas de un extremo fueron separadas 0.5 cm con una navaja y se removió el aislante de esta sección. Posteriormente, las dos puntas fueron dobladas a modo de ojal para soldarles dos secciones de 2 cm de alambre *wire wrap* a las que previamente se les retiró el aislante. Esta unión se realizó en un ángulo de 90° con la ayuda de una gota de ácido muriático. Posteriormente, los extremos libres de las dos secciones de *wire wrap* fueron cortados a 0.5 cm de la unión y soldados a dos de los tres polos de un pin macho. A continuación se soldó otra sección de 5 cm de *wire wrap* al tercer pin y este cable se utilizó para aterrizar el sistema de registro.

Después de comprobar la conductibilidad de los electrodos, se recubrieron con acrílico dental para evitar desoldaduras y como aislante. Como un mismo electrodo se utilizó en diversos experimentos, antes de usarlos se comprobó la funcionalidad de cada uno y posteriormente, se corto su punta con un ángulo de 45° para que los dos alambres que la componen se separaran y además para que no quedaran residuos del experimento anterior.

b) Preparación de los fármacos y sustancias.

Para preparar los oligómeros del fragmento 1-42 de la P β A, se utilizó el protocolo de oligomerización descrito anteriormente y con el que se obtienen principalmente oligómeros hexaméricos de la proteína (Balleza-Tapia et al., 2010). Se administró 5 μ l de esta solución a cada uno de los grupos: para la dosis alta a una concentración de 10 μ M (equivalente a una administración de 50 pMolas); para la dosis baja a una concentración de 1 μ M (equivalente a una administración de 5 pMolas); como vehículo para el grupo control se utilizó el mismo medio en el que se diluyeron los oligómeros de la P β A (medio de cultivo F12). Se decidió utilizar esta forma de la P β A porque es la más abundante en las placas seniles que presentan los enfermos de EA (Pike et al., 1995) y además, los oligómeros afectan con mayor potencia diversos procesos fisiológicos (Selkoe, 2008; Sandberg et al., 2010; Adaya-Villanueva et. al. 2010; Pan et al., 2011).

c) Preparación de los sistemas de registro.

El electrodo fue sostenido durante el registro por el brazo del aparato estereotáxico; este último se mantuvo sobre una base de madera, dentro de una caja metálica de 60 x 63 x 31 (que cumplió la función de jaula de Faraday al aislar la radiación). Todos los componentes del sistema de registro (el estereotáxico y la tierra de los amplificadores), se conectaron en un mismo circuito hacia la tierra del enchufe eléctrico por un lado y hacia el cuerpo del animal y a la tierra del registro por el otro (esto para eliminar el ruido eléctrico). La señal proveniente del electrodo y de la tierra, se amplificó (10 a 30 microV/mm), se filtró (pasa-bajas 30 KHz y pasa-altas 0.3 Hz) y se transmitió por una interfase para enviar la señal a la tarjeta convertidora analógico digital instalada en la PC para su grabación y posterior análisis.

d) Asignación de los grupos

Los 30 sujetos se asignaron aleatoriamente a los 3 grupos. Se consideró para el análisis solamente a los sujetos en los que se verificó una correcta administración del fármaco o del vehículo, un lugar de registro adecuado y que sobrevivieron durante todo el experimento (ver secciones correspondientes). 19 experimentos cumplieron con los criterios de inclusión quedando 9 para el grupo control, 5 para el grupo al que se le administró la dosis de 5 pMolas y 5 en el grupo

al que se les administró 50 picoMolas de los oligómeros de la P β A. El resto de los sujetos no se incluyeron en el análisis debido a que no sobrevivieron a la anestesia (5 sujetos) o debido a una posición del electrodo fuera del hipocampo (6 sujetos).

e) Administración intracisternal de una de las tres dosis de la P β A o el vehículo.

Cada animal fue transportado del bioterio al laboratorio donde se ambientó dentro de una caja de transporte por más de media hora. Para realizar la inyección intracisternal se sedó con éter a casa rata dentro de la caja de acrílico e inmediatamente con ayuda de la bomba de perfusión se realizó la inyección intracisternal de 5 μ l de solución (2 μ l/min), de una de las distintas dosis de la P β A o del vehículo (ver figura 8).

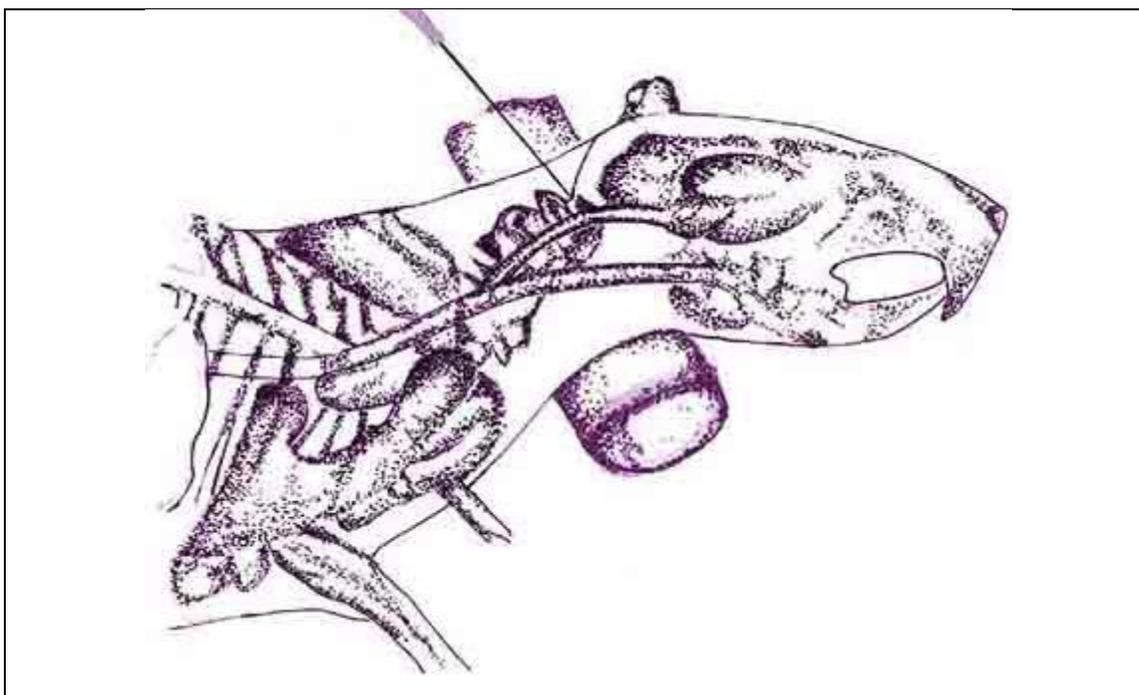


Figura 8 Técnica de inyección intracisternal en rata. Con cuidado de no asfixiar al animal una vez que este ha sido anestesiado, se le sujetó con una mano apoyada cómodamente sobre alguna superficie fija, colocando el dedo medio bajo la tráquea y empujando sutilmente con el índice al área del bulbo olfatorio hacia abajo (de modo que la membrana sobre la cisterna cuadrigémina cerebral magna - cisterna magna- fuera más accesible), se realiza la punción con la otra mano. A modo de tope se colocó un recubrimiento plástico a la aguja para controlar la profundidad de la punción, dejando libre solamente 1.5mm de la punta. Como es una técnica que requiere de pericia, se realizaron antes varias punciones de práctica en otras ratas: primero extracciones de líquido cefaloraquídeo y posteriormente administración de colorantes con verificación *postmortem*. Todas estas pruebas se realizaron cumpliendo con los lineamientos establecidos por el CINVESTAV para el manejo de los animales de laboratorio (Adaptado de Patwardhan et al., 2005).

Se decidió utilizar la administración intracisternal ya que no requiere de implantación crónica de canulas de inyección (Patwardhan et al., 2005). Para verificar la administración de la cantidad correcta, se marco sobre el catéter la distancia que debía de recorrer una burbuja de aire al inyectar 5 μ l y posteriormente se dejó el inyector en la misma posición durante 30 segundos; en los casos en lo que se presentó algún problema durante la administración se detuvo el experimento.

f) Anestesia con uretano.

Una hora después de la inyección de la P β A o el vehículo, se preparó a los animales para la cirugía anestesiándolos con intraperitonealmente con una mezcla de uretano en propilenglicol (6:1); El uretano fue utilizado porque permite registrar la respuesta electrofisiológica del hipocampo ante estimulación en condiciones controladas de anestesia general (Kinney et al. 1999), ya que a nivel central no altera los sistemas colinérgico y GABAérgico (Maggi y Meli, 1986). Se utilizó una dosis de 1.55gr de uretano por Kg de peso. Se eligió esta dosis con base a pruebas en las que con dosis menores a 1.45gr/Kg la mayoría de las ratas (70 %, n= 10), no se mantienen debidamente anestesiadas durante el tiempo que duraron los registros) y necesitan dosis de mantenimiento que alteran las características de los ritmos generados; y con dosis de 1.8gr/Kg no es posible registrar ritmos en respuesta a la estimulación nociceptiva pues en algunos casos se registra en la fisura hipocampal actividad electrofisiológica en forma de ráfagas (60 % de los casos, n=10) o en otros las ratas mueren en un periodo breve (20 %, n=10). No se muestran estos registros.

g) Cirugía estereotáxica e introducción del electrodo de profundidad.

Después de anestesiarse a los animales con uretano se colocaron en el aparato estereotáxico para realizar la cirugía. Una vez fijados se realizó la disección de la piel superior al cráneo, se separó la piel con ganchos, se removió todo el tejido restante y después de realizar un trepano con el taladro en el lugar indicado, se removió con la punta de una aguja delgada las meninges; posteriormente se introdujo el electrodo para quedar colocado en las coordenadas estereotáxicas deseadas: AP +3.6, L. +3.6 y DV -3.5 a -3.7 respecto a Bregma (Paxinos y Watson, 1982). Con estas coordenadas la punta del electrodo se localiza en la fisura hipocampal (Peña et al., 2010; Buzsaki, 2002).

h) Registro de la actividad eléctrica del hipocampo.

Una vez colocado el electrodo en el lugar deseado, se inició el registro de la actividad electrofisiológica de la fisura hipocampal; después de media hora (tiempo necesario para que la actividad registrada se regularice después de la introducción del electrodo), se calibró y equalizó la señal del modo más adecuado al caso (señal de calibración de 50 o 500 μ V.); una hora después de haber iniciado el registro, se aplicó estimulación nociceptiva (EN) a la rata colocando una pinza plástica en su cola (a 2 cm de la base) durante dos minutos. El periodo de estimulación fue registrado en la bitácora y marcado con una etiqueta en el programa de adquisición de datos para su posterior análisis.

i) Verificación de los sitios de registro.

Para verificar el sitio de registro, al finalizar el experimento se conectaron los electrodos a un aparato de estimulación y se aplicó un tren de pulsos rectangulares durante 30 s, con una duración de 3 ms, a una frecuencia de 30 Hz y una magnitud de 30 V (produciendo una corriente estimada de 1.5 microA), lo anterior para producir una lesión y así localizar *post mortem* la punta del electrodo de registro. Posteriormente se extrajo el electrodo, se retiró a cada animal del estereotáxico y se les administró una sobredosis de pentobarbital sódico (1ml por 1Kg de peso), antes de sacrificarlos. Finalmente se les extrajo el cerebro para fijarlo en el vibratomo y mientras el tejido era bañado en líquido cefalorraquídeo artificial, se obtuvieron rebanadas frontales de 200 micrómetros de grosor del hipocampo. Una vez que se obtuvo una rebanada donde se pudiera observar claramente la lesión por cauterización, se colocó en un cubreobjetos y se escaneó contra un fondo negro a una resolución de 3600 ppp (Figura 9).

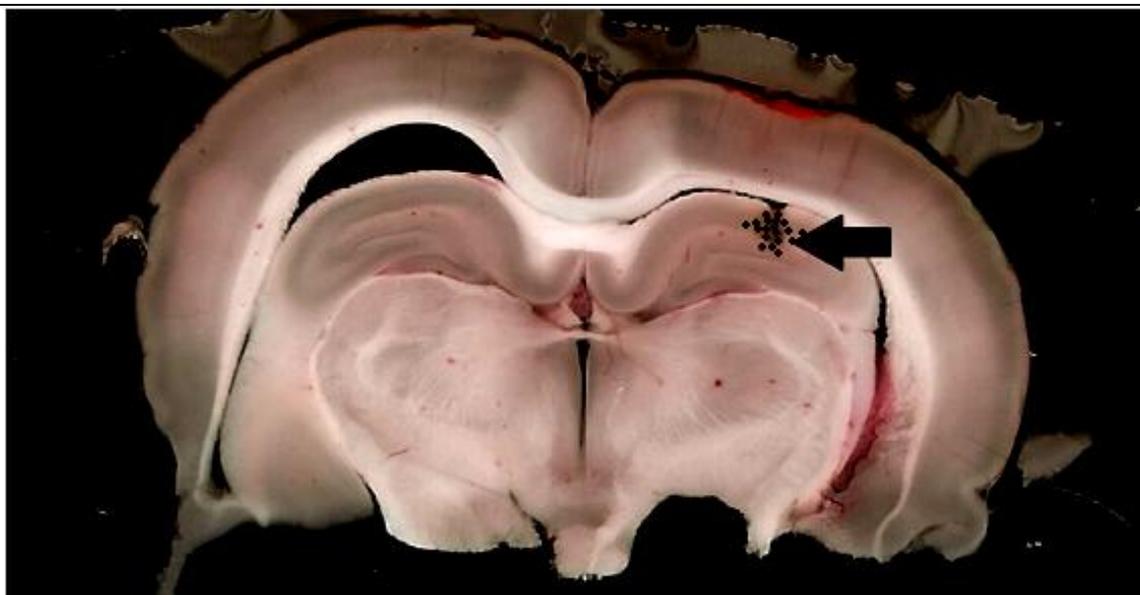


Figura 9 Localización de los sitios de registro. Para cada experimento se colocó la punta del electrodo de registro en las coordenadas estereotáxicas: AP +3.6, L. +3.6 y DV -3.5 a -3.7 respecto a Bregma (Paxinos y Watson, 1982). Para verificar el sitio de registro se cauterizó con corriente el tejido alrededor de la punta del electrodo, se obtuvieron rebanadas de 200 micrómetros y finalmente se digitalizó su imagen. Se muestran como puntos negros alrededor de la flecha, los lugares de registro de los experimentos que cumplieron con los criterios de inclusión. Notesé que, de este modo, es posible verificar que el registro se realizó correctamente en el hipocampo.

j) Análisis de los registros *off line*.

1.- Del registro de cada experimento se tomaron 2 ventanas de 30 s, que se utilizaron para los diversos análisis, la primera durante la actividad espontánea que antecedió a cada estimulación (ESPON), y otra de la actividad registrada durante la estimulación nociceptiva (EN). Las ventanas de la actividad espontánea se empezaron a tomar 1.5 min antes de la estimulación, y las de la estimulación 30 s después del inicio de ésta. En los casos en los que se llegó a presentar “ruido” de gran amplitud en el registro se tomaba una región anterior (ESPON) o siguiente (EN), procurando siempre tener la señal más cercana posible a lo establecido.

2.- El análisis de potencia espectral es un método para cuantificar el contenido en frecuencias de una señal, así como la potencia de cada una de ellas (Sánchez, 1993), para realizarlo se ajustó la línea base del registro al promedio de cada ventana y posteriormente se descompuso la señal en su espectro de frecuencia, obteniendo la potencia (contribución), de intervalos de ~0.6 Hz. Esto se realizó con la función que para ese fin dispone el software Clamfit, con una ventana tipo “hamming”, a una resolución espectral de 0.6 Hz y considerando los rangos entre 0.1 y 12.8 Hz; se consideró este rango de frecuencias debido a que son aquellas modificadas en los pacientes con EA (Babiloni et al. 2007).

3.- Posteriormente, para cada rango de frecuencia, se normalizó la potencia obtenida durante la estimulación, considerando como 100 % los valores del registro espontáneo; la potencia generada por la estimulación así normalizada se utilizó para realizar todos los análisis estadísticos. Esta normalización anula las variables extrañas que pueden diferir entre sujetos pero se mantienen constantes entre ambas condiciones (ESPON-TP), como son la resistencia del electrodo de registro,

el ruido eléctrico, la amplificación o alguna otra que pudiera actuar sobre la amplitud (Sánchez, 1993).

k) Análisis estadístico: Se utilizó el paquete estadístico Prisma y R para realizar las gráficas y para obtener las estadísticas descriptivas e inferenciales con pruebas no paramétricas. Para analizar si existió un aumento en la potencia producido por la estimulación nociceptiva sobre la potencia espontánea, la potencia bruta de cada frecuencia se comparó en ambas condiciones con un prueba de “Wilcoxon para datos pareados” y para realizar las comparaciones entre los grupos experimentales y el grupo control la “U de Mann-Whitney para muestras independientes”. Se consideraron pruebas significativas en las que se obtuviera un alfa < 0.05 . En todos los casos y en cada una de las gráficas se reporta la media \pm error estándar (EE).

5. RESULTADOS

5.1 Cambios en la actividad espontánea hipocampal producidos por la estimulación nociceptiva en el hipocampo

El registro de la actividad espontánea (ESPON), en la fisura hipocampal de las ratas anestesiadas con uretano del grupo control (Fig. 10), presenta un patrón irregular de actividad caracterizado por oscilaciones de baja frecuencia que ya se han reportado en otros trabajos (Moroni et al., 1981; Buzsaki, 2002; Shin et al., 2005, Wolansky et al., 2006; Peña et al., 2010).

El análisis de potencia espectral mostró que la actividad electrofisiológica irregular espontánea está constituida principalmente por oscilaciones con frecuencias menores a 1.8 Hz (Fig. 11, superior), y que al aplicar estimulación nociceptiva hay un cambio en el patrón oscilatorio denotado por un “pico” de actividad en el espectro entre 2.4 y 4.9 Hz (Peña et al., 2010).

Posteriormente, con base en estos dos registros, se calculó el porcentaje de cambio inducido por la estimulación nociceptiva en cada frecuencia como lo describe Sánchez (1993). Es decir, la potencia obtenida durante la estimulación se dividió entre la potencia obtenida durante el registro espontáneo (EN/ESPON), frecuencia por frecuencia, y se expresó como porcentaje para cada una de las frecuencias obtenidas (de este modo se considera como el 100 % la potencia espontánea). Para el caso del espectro representativo, la potencia relativa así normalizada se muestra en la Figura 11 inferior. En esta representación de potencia normalizada se observa que la estimulación induce un aumento de la potencia en el rango theta (3.1 y 4.9 Hz).

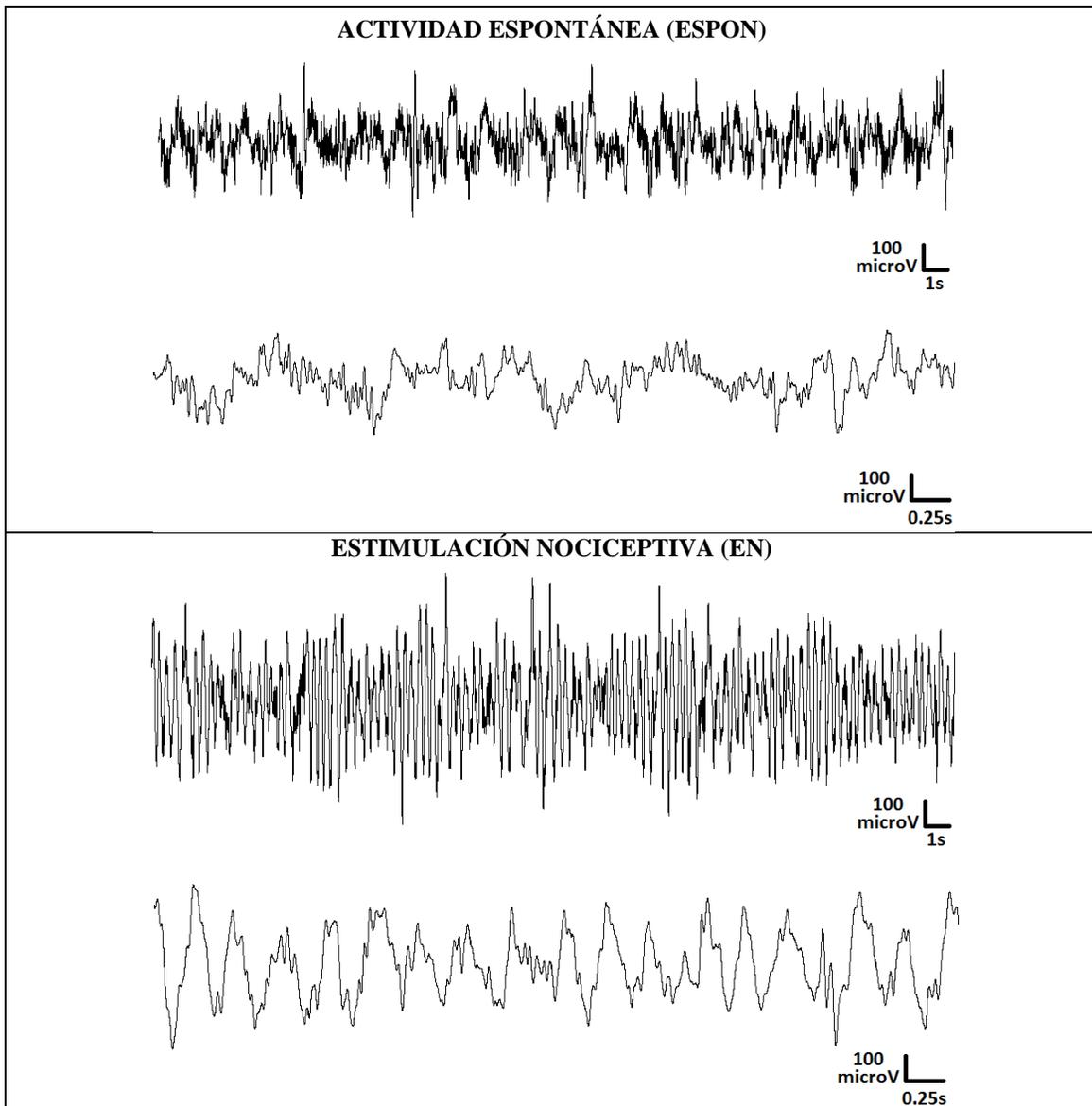


FIGURA 10 Registros representativos de la actividad del hipocampo en el grupo control. En el grupo al que se le administró el vehículo, el registro electrofisiológico del hipocampo presenta actividad irregular de forma espontánea (ESPON). Este patrón cambia a una actividad rítmica durante la estimulación nociceptiva (EN). Tanto para la actividad espontánea como para la estimulación se muestran las ventanas de 30 s que se utilizaron para el análisis así como una ampliación de 5 s de estos mismos trazos.

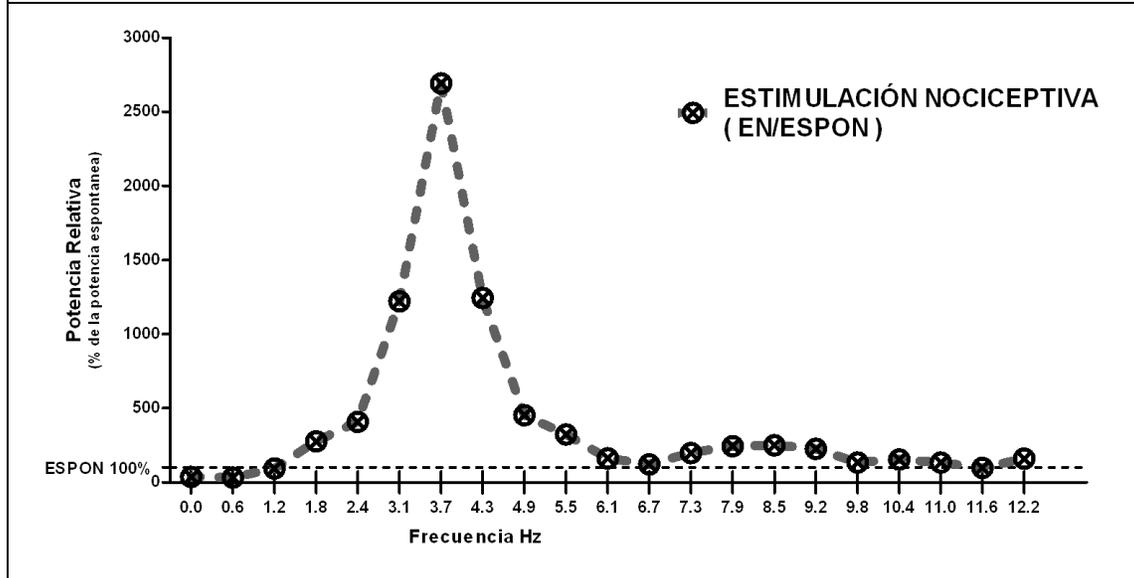
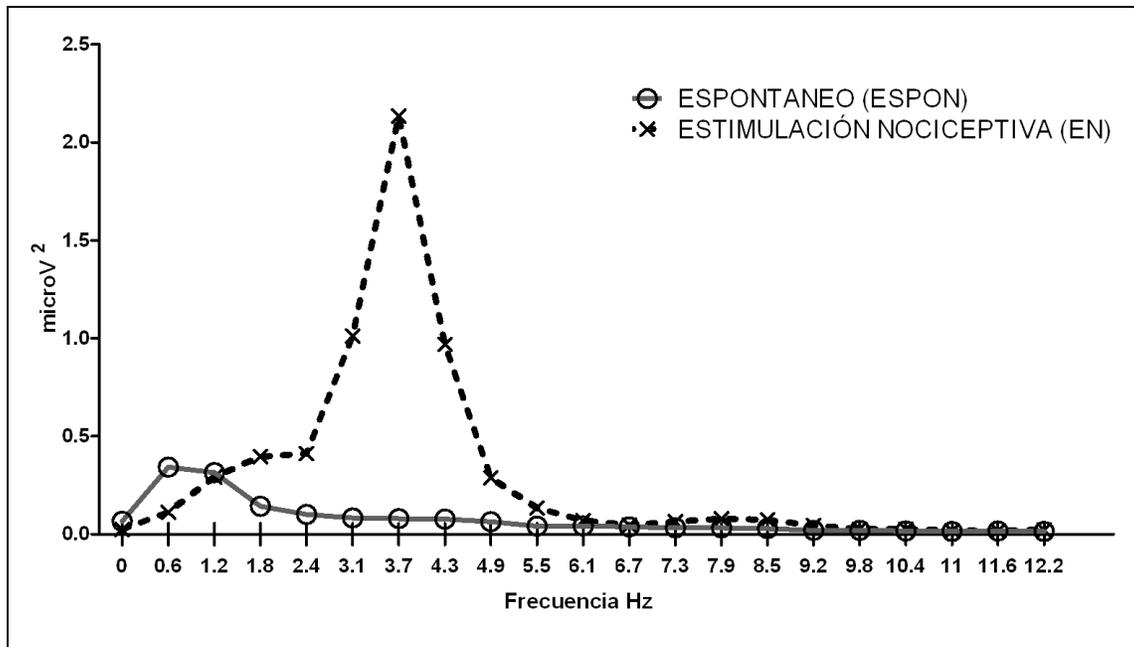


Figura 11 Espectros de potencia representativos de la actividad del hipocampo en el grupo control. Se ejemplifica el procesamiento de los espectros de los trazos representativos del grupo control. **Espectro superior**, se realizó un análisis de potencia espectral de los registros tanto ESPON como durante la EN. En este caso, la actividad electrofisiológica espontánea está constituida por oscilaciones menores a 1.8 Hz, mientras que el espectro durante la estimulación nociceptiva denota un pico de actividad entre 2.4 y 4.9 Hz. **Espectro inferior**, en este ejemplo representativo se obtuvo el porcentaje de cambio producido para cada frecuencia por la estimulación tomando como 100 % los valores de potencia del espectro de la actividad espontánea (EN/ESPON). Con éste análisis se observa que la estimulación nociceptiva induce un aumento en la actividad entre 2.4 y 4.9 Hz y una disminución en las frecuencias menores a 1.2 Hz. Los porcentajes así obtenidos de todos los sujetos se utilizaron para realizar las comparaciones entre los tratamientos.

5.2 Efecto de administración de la P β A oligomerizada sobre la actividad oscilatoria inducida en el hipocampo por estimulación nociceptiva

El análisis del cambio producido por la estimulación mostró que en el grupo control se induce un aumento de las frecuencias de 3.7, 4.3 y 4.9 Hz, lo que representó un aumento significativo (alrededor de 400%, 300%, 200% respectivamente) con respecto a la potencia registrada espontáneamente (Fig. 12).

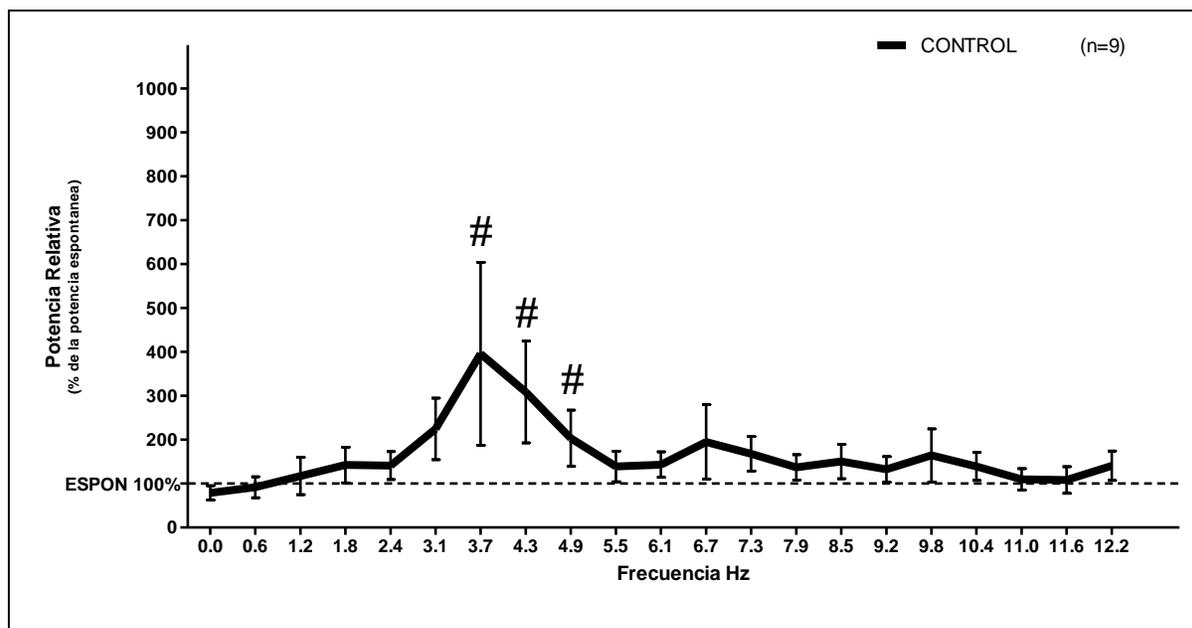


FIGURA 12 Promedio de la actividad electrofisiológica inducida en el grupo control. Se presenta el promedio de la potencia relativa inducida por estimulación nociceptiva en el grupo control, se observa que la actividad electrofisiológica inducida está dominada por componentes de frecuencia entre 3.1 y 4.9 Hz. # representa un aumento significativo con respecto a la potencia espontánea ($p < 0.05$).

Al analizar la actividad inducida en el grupo al que se le administraron 5 picoMolas de oligómeros de la proteína beta amiloide (P β A), se observa que existió un aumento en la potencia relativa de prácticamente todas las frecuencias, pero este aumento fue mayor en las frecuencias menores a 3.1 Hz que presentaron aumentos mayores al 300 % con respecto a la potencia espontánea y que incluso aumentaron un 600 % en la frecuencia de 1.83 Hz (Fig. 13); de modo aislado la frecuencia de 10.4 Hz también presentó un aumento significativo.

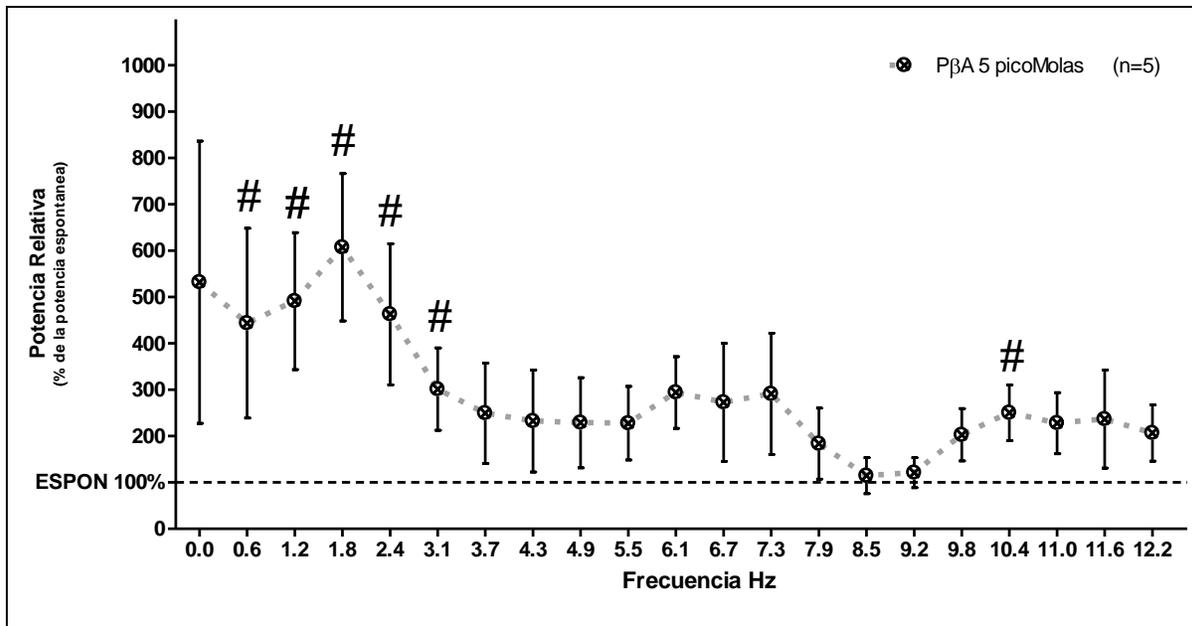


FIGURA 13 Efecto de la administración de PβA (5 picoMolas) sobre la actividad electrofisiológica inducida en el hipocampo. Se presenta el promedio de la potencia relativa inducida por estimulación nociceptiva en el grupo al que se administró 5 picoMolas de oligómeros de la PβA. La actividad electrofisiológica inducida está dominada principalmente por componentes de frecuencia menores a 3.1 Hz. # representa un aumento significativo con respecto a la potencia espontánea ($p < 0.05$).

En el grupo al que se le administraron 50 picoMolas de oligómeros de la PβA (Fig. 14), aumentó significativamente la potencia relativa correspondiente a las frecuencias menores a 3.1 Hz (mayor a 330% lo registrado espontáneamente en promedio). Es de resaltar que la potencia relativa inducida se presenta principalmente en este rango de frecuencias y que la de 0.6 Hz presentó un incremento cercano al 700% (Fig. 14), con respecto a la potencia de la actividad espontánea. Además, esta dosis de PβA elimina el pico de ritmo theta producido por la estimulación nociceptiva; de modo aislado las frecuencias de 6.1 y 6.7 Hz también presentaron aumentos significativos en la potencia después de la estimulación.

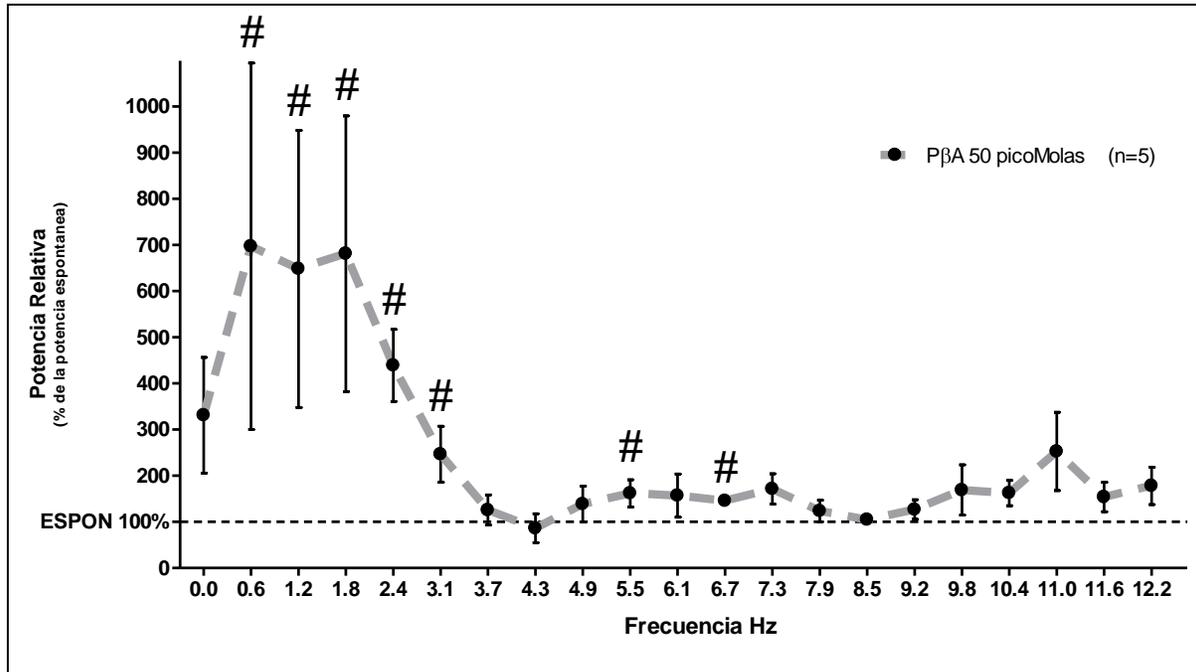


FIGURA 14 Efecto de la administración de PβA (50 picoMolas) sobre la actividad electrofisiológica inducida en el hipocampo. Se presenta el promedio de la potencia relativa inducida por estimulación nociceptiva en el grupo al que se administró 50 picoMolas de oligómeros de la PβA. La actividad electrofisiológica inducida está dominada principalmente por componentes de frecuencia menores a 3.1 Hz. # representa un aumento significativo con respecto a la potencia espontánea ($p < 0.05$).

Al comparar, con una prueba estadística no paramétrica, la potencia relativa inducida en los grupos experimentales con respecto al control, se encontró que el grupo que recibió la administración de 5 picoMolas presenta un aumento significativo ($p < 0.05$) en las frecuencias dentro del rango Delta (Fig. 15, superior). El grupo que recibió la dosis alta de 50 picoMolas mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) en las frecuencias dentro del rango Delta y presentó una disminución significativa en la frecuencia de 4.3 Hz (Fig. 15, inferior).

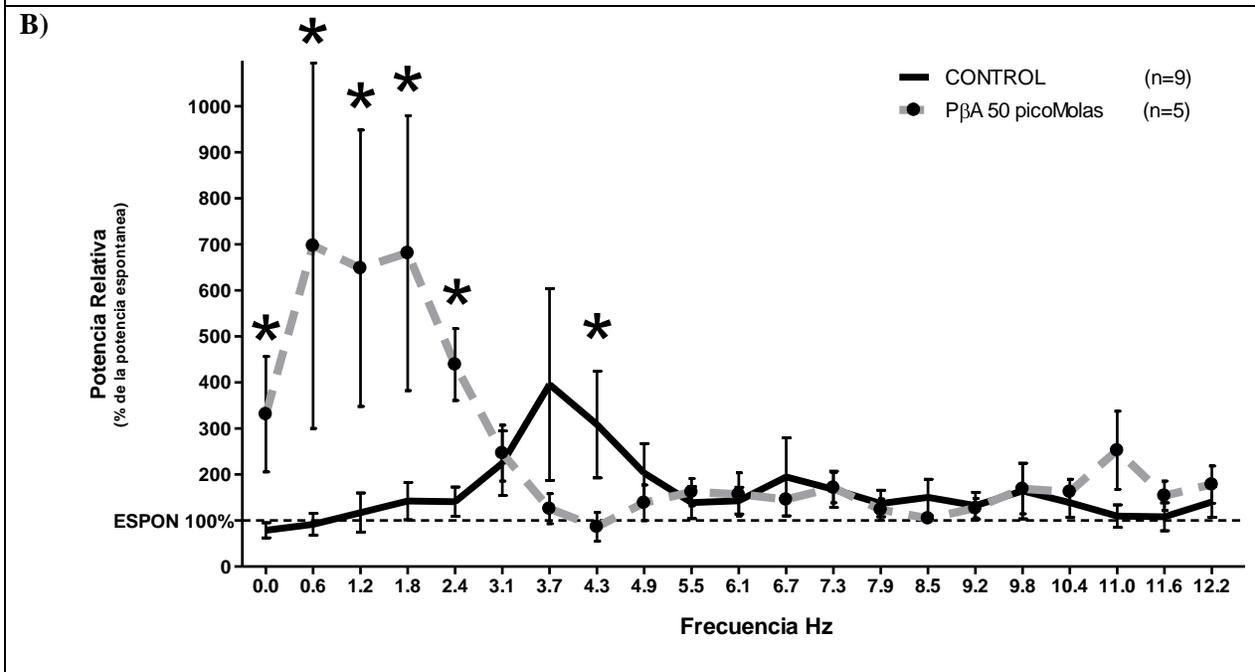
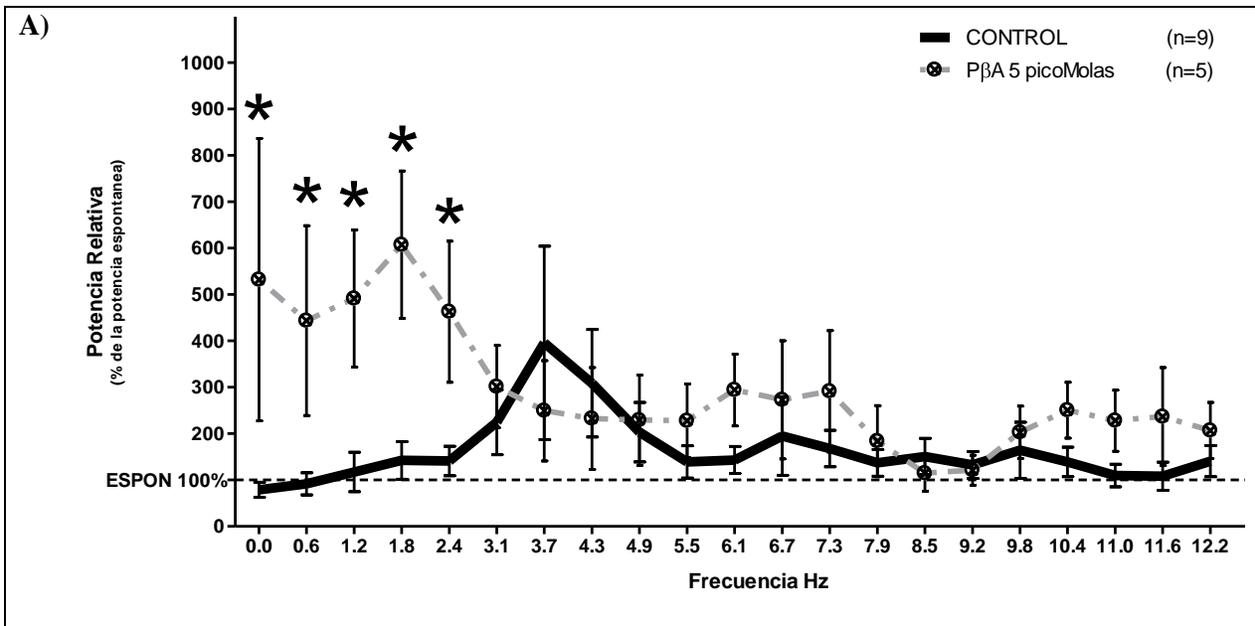


FIGURA 15 Comparaciones de la actividad electrofisiológica inducida en el hipocampo entre los grupos experimentales con el control. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con los experimentales. **A)** al comparar el grupo al que se le administraron 5 picoMolas de la PβA, se observa que presenta un aumento de potencia relativa correspondiente a las frecuencias dentro del rango Delta respecto al grupo control; **B)** la administración de 50 picoMolas también produce un aumento de potencia relativa correspondiente a las frecuencias dentro del rango Delta que se acompaña de una disminución significativa en 4.3 Hz respecto el grupo control. * representa una diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

6. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que la administración intracisternal de los oligómeros de la proteína beta amiloide (P β A) produce un cambio en el patrón de la actividad eléctrica hipocampal inducida por estimulación nociceptiva en ratas anestesiadas con uretano. Éste efecto es diferente para las dosis usadas ya que la concentración de 5 picoMolas produce un aumento dentro de las ondas dentro del rango Delta, mientras que la concentración de 50 picoMolas, además de presentar este mismo enlentecimiento, muestra una abolición del pico de frecuencia en 4.3 Hz que se indujo en el grupo control al que se le administró únicamente el vehículo.

Para discutir estos resultados se ha dividido este apartado en cinco secciones, en el primero se analiza la relación que tiene el modelo de registro electrofisiológico hipocampal en rata anestesiada con uretano con las funciones cognitivas de memoria y aprendizaje; el segundo y tercero versan sobre aspectos de la metodología experimental: la vía de administración intracisternal y el uso de oligómeros solubles de la secuencia completa 1-42 de la P β A respectivamente; se continua con las consideraciones finales y la integración de los resultados con la teorías acerca de la fisiopatología de la EA y finalmente perspectivas para futuras investigaciones.

6.1 El modelo de registro hipocampal bajo anestesia con uretano.

La actividad electrofisiológica hipocampal que registramos con el modelo de rata anestesiada con uretano, tanto la espontánea como la inducida por estimulación nociceptiva, ya ha sido ampliamente caracterizada con anterioridad por diversos grupos de trabajo además del nuestro (Moroni et al., 1981, Buzsaki, 2002; Shin et al., 2005, Wolansky et al., 2006; Peña et al., 2010); es importante mencionar que la actividad electrofisiológica reportada en esta tesis, concuerda con los trabajos mencionados en tanto que, durante la anestesia con uretano se presentó de modo espontáneo un registro irregular de gran amplitud dominado por frecuencias “lentas” dentro del rango Delta (menores a 3 Hz.) . Esta actividad electrofisiológica se modificó significativamente durante la estimulación nociceptiva presentándose un patrón de oscilaciones rítmicas bien definidas en la frecuencia de 3.7 Hz y 4.3 Hz, mismo que está dentro de la banda de frecuencia

denominada theta (3-10 Hz) en estos mismos trabajos (Moroni et al., 1981, Buzsaki, 2002; Shin et al., 2005, Wolansky et al., 2006; Peña et al., 2010).

La actividad electrofisiológica que aquí reportamos, aunque se registra bajo anestesia es relevante funcionalmente, pues ambos patrones se han relacionado ampliamente a estados que se presentan en el hipocampo en condiciones fisiológicas normales (Moroni et al., 1981, Buzsaki, 2002; Shin et al., 2005, Wolansky et al., 2006; Peña et al., 2010). Además, la anestesia con uretano mantiene las funciones neuroquímicas en niveles no muy alejados de los “niveles normales”, pues este fármaco produce anestesia general disminuyendo ligeramente la transmisión glutamatérgica (Moroni et al., 1981). De modo que, a nivel central, la actividad de otros sistemas de neurotransmisión como el colinérgico y el GABAérgico prácticamente no se alteran (Maggi y Meli, 1986), lo que es relevante porque estos sistemas son el sustento de la actividad electrofisiológica registrada (Lang y Henke, 1983; Henke y Lang, 1983).

Diversos autores consideran que la actividad irregular que registramos durante la anestesia con uretano es similar a la “Amplia Actividad Irregular” (*Large Irregular Activity* o LIA) que se presenta de modo fisiológico en el hipocampo de los roedores durante estados de reposo, alimentación y durante el sueño de ondas lentas (Buzsaki, 2002; Wolansky et al., 2006; Hahn et al., 2006; Peña et al., 2010). Por esta razón, consideramos que al igual que la LIA, la actividad que nosotros registramos espontáneamente corresponde a un estado de desactivación, que es producto de la sincronización lenta de una gran cantidad de neuronas, que se presenta comúnmente cuando disminuye la transmisión colinérgica (Wolansky et al., 2006) y que se ha relacionado con la consolidación de la memoria (Buzsaki, 2002; Wolansky et al., 2006; Hahn et al., 2006).

Por otro lado, la actividad eléctrica hipocampal que registramos durante la estimulación nociceptiva, también tiene relevancia funcional, ya que es muy similar al ritmo theta que se registra en condiciones fisiológicas normales (3-12 Hz), mientras se realizan actividades cognoscitivas relacionadas con la percepción de diversos estímulos o distintos tipos de aprendizaje visoespacial (Moroni et al., 1981, Buzsaki, 2002; Shin, Kim, Bianchi, Wong y Shin, 2005). Por esta razón, consideramos que el ritmo registrado durante la estimulación, al igual que el ritmo theta (Moroni et al., 1981, Buzsaki, 2002; Shin et al.,

2005), se presenta como consecuencia de la activación de una cantidad relativamente pequeña de neuronas (en comparación con el LIA) pero que disparan potenciales de acción de manera extraordinariamente sincronizada (Buzsaki, 2002).

Es muy importante señalar que el ritmo que registramos durante la estimulación nociceptiva, al corresponder al ritmo theta hipocampal (Moroni et al., 1981, Buzsaki, 2002; Shin et al., 2005), adquiere gran importancia para la EA al considerarse un ritmo indispensable para la consolidación de la memoria episódica (McNaughton et al., 2006). Como se profundizará más adelante, creemos que el enlentecimiento de esta actividad oscilatoria, producto de la administración de los oligómeros de la PBA, podría subyacer a las alteraciones de la memoria que presentan los enfermos con Alzheimer. Esta propuesta se apoya también en que la administración de los oligómeros de la PBA produjo, en nuestro modelo, un enlentecimiento del EEG similar a los que presentan estos mismos pacientes (Hughes et al., 1989; Kowalski et al., 2001; Schreiter-Gasser et al., 1994; Nobili et al., 1999; Ihl et al., 1996) y que en el caso de los enfermos de EA correlaciona muy bien con las deficiencias cognitivas que presentan (Hughes et al., 1989; Schreiter-Gasser, et al., 1994; Valladares-Neto et al., 1995; Ihl et al., 1996; Nobili et al., 1999; Kowalski et al., 2001).

Por las razones descritas en este apartado se considera que el modelo de registro electrofisiológico hipocampal en ratas anestesiadas con uretano aquí utilizado simula los patrones oscilatorios asociados al aprendizaje (actividad tipo theta) (Moroni et al., 1981, Buzsaki, 2002; Shin et al., 2005) y a la consolidación de la memoria (actividad tipo LIA), que se registran bajo condiciones fisiológicas normales (Buzsaki, 2002; Wolansky et al., 2006; Hahn et al., 2006; Peña et al., 2010). Por esta razón lo consideramos un modelo válido y confiable que nos permite contestar las hipótesis planteadas en esta tesis. Los efectos producidos por la PBA sobre la actividad eléctrica antes descrita coinciden con los cambios electrofisiológicos que se presentan en los enfermos de Alzheimer (Hughes et al., 1989; Kowalski et al., 2001; Schreiter-Gasser et al., 1994; Nobili et al., 1999; Ihl et al., 1996), así como con modelos experimentales donde se ha administrado oligómeros de la PBA tanto *in vitro* (Balleza-Tapia et al., 2010) como *in vivo* (Colom et al., 2010; Villette et al., 2010).

6. 2 Posibles efectos de la vía de administración intracisternal.

Dado que, a mediano plazo, estamos interesados en evaluar las consecuencias conductuales que pudiera tener la afectación de los ritmos cerebrales producida por la P β A, Además de que nos planteamos en el futuro evaluar estrategias terapéuticas para revertir las alteraciones inducidas por la P β A, en esta tesis nos propusimos no solo caracterizar los efectos de los oligómeros solubles de la P β A sobre la actividad eléctrica del hipocampo, sino también averiguar si la vía de administración de la P β A influía en su efecto sobre los patrones oscilatorios hipocampales (Peña et al., 2010).

En la presente Tesis probamos la administración en la cisterna magna (cisterna cerebral cuadrigémina de la vena cerebral magna) de la P β A, a diferencia de un trabajo anterior de nuestro laboratorio donde fue administrada intracerebroventricularmente (Peña et al., 2010) o de dos trabajos previos en los que se administró intraseptalmente (Colom et al., 2010) o intrahipocampalmente (Villette et al., 2010). Explorar otra vía de administración es relevante porque existe la opinión de que los efectos de la administración de la P β A dependen del sitio donde se inyecte (Duyckaerts et al., 2008).

Para estudiar los efectos de la administración de la P β A *in vivo*, se han realizado dos tipos de aplicaciones: inyecciones en el LCR que tienen por objetivo estudiar efectos sobre el sistema nervioso central en general (Nakamura et al., 2001) o se ha administrado en áreas cerebrales definidas buscando determinar efectos sobre poblaciones neuronales específicas (Giovannellia et al., 1995; Gonzalo-Ruiz et al., 2003; Gonzalo-Ruiz et al., 2006; Arévalo-Serrano et al., 2007). Con la intención de estudiar el resultado que sobre las oscilaciones hipocampales pudiese tener la administración de la P β A en todo el sistema nerviosos central, en este trabajo la P β A fue administrada intracisternalmente y los resultados indican que se alteró la frecuencia de los ritmos inducidos por estimulación nociceptiva.

Dado que con la administración de la P β A produjimos un enlentecimiento de la actividad electrofisiológica del hipocampo, nuestros resultados contrastan con otros trabajos *in vivo* donde la administración local de la P β A afecta la potencia del ritmo theta hipocampal pero no su frecuencia. Por ejemplo, se ha reportado que administraciones directas de los fragmentos 1-40 y 1-42 (a una proporción 1:2), en el hipocampo, provocan una disminución de la potencia del ritmo theta registrado durante la exploración de objetos

novedosos pero sin alterar su frecuencia (Villette et al., 2010). En otro reporte inyecciones locales de la P β A (fragmento 1-40) en el septum medial se mostró que éstas disminuyen la potencia del ritmo theta hipocampal registrado espontáneamente bajo anestesia con uretano e igualmente no se encontraron afectaciones en la frecuencia del ritmo (Colom et al., 2010). Finalmente, resultados de nuestro laboratorio mostraron que, bajo condiciones de registro muy similares, la administración intracerebroventricular del fragmento 25-35 de la P β A provocó una disminución de la potencia del registro bajo estimulación nociceptiva pero, nuevamente, sin alterar el pico de la frecuencia (Peña et al., 2010).

Se considera que la principal diferencia entre los resultados aquí obtenidos y los trabajos citados la constituye la vía de administración. En el trabajo de Villette (2010) y en el de Colom (2010), aunque se evaluaron los efectos después de varios días posteriores a la inyección de la P β A, ésta se realizó localmente (sobre una sola estructura cerebral; Colom et al., 2010; Villette et al., 2010). Finalmente, especulamos que en este trabajo previo se observó una alteración en la potencia únicamente, debido a que los efectos de la P β A podría también deberse a una afectación “local”; lo anterior en vista de que los efectos de la P β A fueron evaluados casi inmediatamente después a la administración intracerebroventricular (Peña et al., 2010) y el hipocampo está muy próximo a las paredes de los ventrículos (Paxinos y Watson, 1982).

La vía de administración intracisternal aquí usada, a diferencia de otros trabajos, produjo la diseminación de los oligómeros de la P β A en sentido contrario a la circulación del líquido cefalorraquídeo, que como describe Netter (2002) se produce en los ventrículos y fluye con dirección a la médula espinal; creemos que lo anterior permitió que se diseminaran en diversas estructuras cerebrales. Proponemos que esta podría ser la causa de las diferencias encontradas con nuestro modelo experimental. Esta posibilidad también se apoya en que existen diversas estructuras del sistema nervioso central que modulan los ritmos hipocampales, como es el caso de la corteza prefrontal durante la ejecución de tareas de aprendizaje y memoria (McNaughton et al., 2006), y las corteza entorrinal medial y lateral que presentan un ritmo que modula de modo importante las características y ritmicidad del theta en el hipocampo. (Deshmukh et al., 2010). Por otro lado, en la bibliografía referente a las bases anatomofisiológicas del ritmo theta hipocampal se resalta la influencia rítmica proveniente del complejo septum medial-banda diagonal de Broca

(Bland et al., 1999), que junto con la corteza entorrinal constituyen las principales aferencias del hipocampo (Buzsaki, 2002; Deshmukh et al., 2010). Estas dos aferencias principales influyen sobre las neuronas piramidales del hipocampo y sobre las “interneuronas en forma de canasta” que inhiben a estas células principales (Buzsaki, 2002). El complejo del septum medial ejerce una doble influencia, por un lado colinérgica excitadora sobre ambos tipos de neuronas y una GABAérgica inhibitoria sobre las neuronas en forma de canasta (Bland et al., 1999; Buzsaki, 2002). Esta influencia que clásicamente se considera el marcapasos del ritmo, se combina con la excitación proveniente de la corteza entorrinal y que inerva las dendritas distales de las células piramidales (Buzsaki, 2002; Deshmukh et al., 2010). En este modelo, la sola excitación no produce cambios en la frecuencia de la actividad oscilatoria del hipocampo, sino que es necesario combinarse con la inhibición, de modo que la gran mayoría de las neuronas se mantienen inhibidas la mayor parte del tiempo y sólo unas pocas, las que reciben mayor excitación desde la corteza entorrinal, disparan durante los picos de actividad (Buzsaki, 2002). De este modo, se ha afirmado que la amplitud del ritmo theta hipocampal depende del número de neuronas septales envueltas en procesos rítmicos, mientras que la frecuencia en registros de campo como los que aquí realizamos está determinada por la frecuencia de disparo de un grupo de neuronas septales denominadas “theta burst” (Bland y Colom, 1993; Vinogradova, 1995; Bland, et al., 1999).

Con base en estas consideraciones, se propone que el efecto producido por la P β A sobre un circuito en específico puede producir una disminución de la amplitud del ritmo (Villette et al., 2010; Colom et al., 2010; Peña et al., 2010) mientras que cuando la P β A llega a varias estructuras como creemos que ocurrió en nuestro modelo experimental, es posible que se produzcan además alteraciones en la frecuencia de los ritmos. Son necesarias otras investigaciones para discernir cuáles otras estructuras podrían estar implicadas en el enlentecimiento del ritmo hipocampal reportado en esta Tesis. Muy probablemente, estas estructuras serían el septum medial y la corteza entorrinal (Fitch et al., 2006; Shirvalkar et al., 2010)

6.3 Posibles efectos de los oligómeros solubles de la P β A (1-42).

El otro objetivo de este trabajo consistió en averiguar si la administración de oligómeros solubles de la P β A originarían efectos consistentes con los producidos por el fragmento 25-35 sobre el ritmo theta hipocampal (Peña et al., 2010), ya que existen algunos reportes *in vitro* que indican que diversas especies o fragmentos de la P β A pueden producir diferentes efectos sobre diversas funciones celulares (Korotzer et al., 1995; Rovira et al., 2002; Röncke et al., 2008; Hiruma et al., 2003; Adaya-Villanueva et al., 2010).

Estos reportes motivaron el interés de que en este trabajo se administraran los oligómeros solubles del fragmento 1-42 de la P β A, con la intención de comprobar la validez externa de su uso en el modelo de registro de campo hipocampal bajo anestesia con uretano. Anteriormente, con el uso de este mismo modelo, la administración intracerebroventricular del fragmento 25-35 produjo una disminución de la amplitud del ritmo en el hipocampo (Peña et al., 2010). Esta validación se fortalece al considerar que en diversos estudios *in vitro*, ambos péptidos (1-35 y 1-42) producen efectos similares sobre el circuito del hipocampo (Freir y Herron, 2003; Freir et al., 2003; Holscher et al., 2007; Adaya-Villanueva et al., 2010). Sin embargo, los fragmentos 1-42 y el 1-40 son los más abundantes en las placas seniles que presentan los enfermos de la EA con relación al 25-35 (Pike et al., 1995) y parecen ser más potentes que otras especies de PBA en lo que respecta a sus efectos sobre la plasticidad sináptica (Selkoe, 2008), la generación de apoptosis (Sandberg et al., 2010), la promoción de respuestas inflamatorias (Pan et al., 2011) y la afectación de los ritmos hipocampales *in vitro* (Adaya-Villanueva et al., 2010). Por estas razones decidimos probar el efecto de los oligómeros de la secuencia completa 1-42 en nuestro modelo experimental de rata anestesiada con uretano para intentar reproducir algunas de las características de la EA.

El análisis de los trabajos en los que se reportan diferencias entre la acción de ambos péptidos (25-35 vs 1-42), muestra que las condiciones en la que se aplican son distintas a las del presente trabajo, por lo que no contradicen la posibilidad de que los oligómeros del fragmento 1-42 produzcan afectaciones similares a las del fragmento 25-35. Por ejemplo, se ha observado que los oligómeros del fragmento 1-40 reducen la potenciación a largo plazo (LTP), mientras que el 25-35 no lo hace, pero esto ocurre con

afectaciones que se producen en periodos crónicos (3-6 días en el baño) (Rönicke et al., 2008). De hecho se ha observado que en células de neuroblastoma (Földi et al., 2011) y en cultivos de neuronas colinérgicas (Du et al., 2011), el tiempo de exposición a la P β A es un factor que determina los tipos de procesos metabólicos que se desencadenan e incluso también si existirán o no afectaciones morfológicas y de la viabilidad celular.

En lo que respecta a las neuronas hipocampales, se ha encontrado que agregar el fragmento 25-35 recién disuelto al baño a cultivos organotípicos hipocampales afecta el transporte axonal, mientras que el 1-42 recién disuelto no lo hace (Hiruma et al., 2003). Sin embargo, en apoyo a la idea de que el fragmento 1-42 en su forma oligomerizada tiene los mismos efectos sobre la actividad hipocampal que el fragmento 25-35 recién disuelto, es muy interesante hacer notar que en este mismo reporte el 1-42 oligomerizado sí reproduce las afectaciones sobre el transporte axonal que produce el 25-35 recién disuelto (Hiruma et al., 2003). Por otro lado, en registros de campo de la actividad electrofisiológica del hipocampo *in vitro*, se ha reportado que el fragmento 25-35 afecta las oscilaciones inducidas inespecíficamente por un aumento en el potasio extracelular, mientras que el péptido 1-42 no lo hace (Adaya-Villanueva et al., 2010). Es importante mencionar que en este mismo reporte, bajo condiciones de registro idénticas, ambos péptidos producen la misma disminución cuando la actividad es inducida por el agonista glutamatérgico kainato (Adaya-Villanueva et al., 2010). Con base en la revisión de estos reportes, se concluye que para deducir si ambos péptidos producen las mismas afectaciones es necesario analizar el efecto de las distintas formas de la P β A sobre los mecanismos celulares envueltos en cierto tipo de función o actividad oscilatoria en particular (Adaya-Villanueva et al., 2010).

En contraposición a los trabajos donde se reportan efectos diferentes producidos por los péptidos 25-35 y 1-42, existe un importante cúmulo de evidencia donde se ha encontrado que ambos producen afectaciones similares. Este es el caso de muerte celular (Yanker et al., 1990; Pike et al., 1995; Nakamura et al., 2001), la atrofia de neuritas (Grace et al., 2002; Tohda et al., 2004), la pérdida sináptica (Grace et al., 2002; Tohda et al., 2004), así como la afectación de la transmisión sináptica y su plasticidad (Freir y Herron, 2003; Freir et al., 2003; Holscher et al., 2007; Nimmrich et al., 2008; Xing et al., 2005). Finalmente, a nivel conductual, ambos péptidos afectan el desempeño en tareas relacionadas a la memoria y al aprendizaje (Maurice et al., 1996; Delobette et al., 1997;

Sun y Alkon, 2002; Nakamura et al., 2001; Yamaguchi y Kawashima, 2002; Stepanichev et al., 2004; Tohda et al., 2004; Holscher et al., 2007). Esta igualdad de efecto entre ambos péptidos se ve apoyada por nuestros resultados. Sin embargo, hay que mantener en mente que la administración del 25-35 disminuyó la amplitud de la actividad, mientras que 1-42 modificó la amplitud y la frecuencia de los ritmos hipocampales.

6.4 Consideraciones finales.

Considerando que la afectación de la actividad tipo theta en el registro de campo hipocampal se encontró con concentraciones cerebrales estimadas de 2.5 y 25 nanoMolar, nuestros resultados son consistentes con trabajos previos. Por ejemplo con una investigación *in vitro* en la que los oligómeros solubles del fragmento 1-42 de la P β A afectan la actividad espontánea de una rebanada hipocampal al ser agregados al baño, con una IC₅₀ de 0.4 nanoMolar y una dosis para producir el efecto máximo alrededor de 10 nanoMolar (Balleza-Tapia et al., 2010). Es muy relevante mencionar que en dicha investigación las afectaciones son producidas agudamente a partir de los 15 minutos, sin provocar muerte neuronal e incluso son reversibles después de 30 minutos de lavado. Esto sugiere que los efectos de la P β A sobre el hipocampo, a estas concentraciones, se deben a cambios “funcionales” dentro del circuito y no a procesos relacionados con la neurodegeneración (Balleza-Tapia et al., 2010). El presente trabajo representa una validación *in vivo* de este antecedente, en tanto que las concentraciones en que los oligómeros solubles de la P β A producen una afectación sobre los ritmos hipocampales son similares y además los periodos de acción también son breves, en nuestro caso menores a un par de horas.

Es importante señalar nuevamente que nuestros resultados también validan otros trabajos *in vivo* en los que la administración de la P β A produce efectos muy similares sobre la actividad oscilatoria hipocampal (Colom et al., 2010; Villette et al., 2010); además de que las afectaciones encontradas concuerdan con diversas investigaciones donde se ha descrito que los niveles cerebrales de la P β A soluble se mantienen en un rango nanoMolar tanto en pacientes (Kuo et al., 1996; Desai et al., 2005; Ikonovic et al., 2008; Steiner et al., 2008), así como en modelos de la EA en animales transgénicos (Dewachter et al., 2000; Praticò et al., 2002; Lee et al., 2004; Jankowsky et al., 2007).

Las alteraciones encontradas en esta tesis, producidas con bajas concentraciones cerebrales en el rango nanomolar (concentraciones cerebrales estimadas de 2.5 y 25 nanomolar), correlacionan con las encontradas en pacientes con EA que presentan deterioro cognoscitivo leve (Lue et al., 1999; Naslund et al., 2000). Además, en estos pacientes, las alteraciones cognoscitivas se relacionan con un enlentecimiento del EEG (Hughes et al., 1989; Valladares-Neto et al., 1995; Schreiter-Gasser et al., 1994; Ihl et al., 1996; Nobili et al., 1999; Kowalski et al., 2001), que asemeja al producido por la P β A en nuestras condiciones experimentales. Es importante mencionar que el deterioro cognoscitivo leve se presenta en las primeras etapas de la EA cuando aún no se ha producido pérdida neuronal (Morrison y Hof, 1997). La corroboración de estos antecedentes con nuestros resultados contrasta con anteriores modelos sobre la patogénesis de la enfermedad, en los que se consideraba que las deficiencias cognoscitivas de los pacientes eran causadas por la atrofia y pérdida neuronal (Bergeron, 1990; Khachaturian, 1991; Mattson et al., 1993).

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de la “cascada del amiloide”, en la que se propone que los oligómeros solubles causan la afectación de las funciones cognoscitivas que se presentan en los enfermos de la EA (Selkoe, 1993; Peña et al., 2006). Considerando la hipótesis de la cascada del amiloide y en vista de que diversas funciones cognoscitivas correlacionan con la presencia de actividad oscilatoria en el hipocampo como ocurre con el aprendizaje y la memoria (Jensen y Lisman, 1998; Mormann et al., 2008; Benchenane et al., 2010), nuestros resultados sugieren que la P β A puede producir afectaciones en la memoria a través de modificar los ritmos hipocampales como los que nosotros registramos, lo que a su vez concuerda con un nuevo modelo teórico de esta enfermedad que propone que la afectación sináptica producida por los oligómeros solubles de la PBA es la causante de los síntomas clínicos que presentan los enfermos de la EA (Lambert et al., 1998; Hsia et al., 1999; Klein et al., 2001; Hardy y Selkoe, 2002; Klein, 2002; Kamenetz et al., 2003; Walsh y Selkoe 2004; Venkitaramani et al., 2007).

Este nuevo modelo de afectación sináptica junto con los resultados de esta tesis aportan información sobre las etapas tempranas de la enfermedad, lo que es muy valioso clínicamente ya que la comprensión de las alteraciones celulares asociadas a estas etapas tempranas posibilitaría mejorar el pronóstico de rehabilitación o incluso revertir los síntomas de los pacientes antes de que se instaure por completo la EA (Robles et al., 2002;

Rabinovici y Jagust, 2009). El enfoque de investigación de las etapas tempranas de la EA ha permitido que se prueben clínicamente nuevos medicamentos para detener los síntomas amnésicos como es el caso de la melatonina (Cardinali et al., 2010), el litio que además ha mostrado utilidad en disminuir los biomarcadores de la EA en el líquido cefalorraquídeo y mejorar el desempeño en pruebas funcionales (Forlenza et al., 2011) o incluso la administración intranasal de insulina, con la que recientemente se han reportado resultados prometedores, pues parece mejorar los indicadores de memoria y la habilidad para realizar las actividades diarias sin producir efectos secundarios (Craft et al., 2011). Incluso, se han demostrado efectos terapéuticos en pacientes en etapas tempranas de la EA cuando se modifican el estilo de vida y la alimentación (PBA en LCR) (Bayer-Carter et al., 2011; Tsolaki et al., 2010). Todos estos reportes requieren mayor investigación, pero indican claramente que la comprensión de las etapas tempranas de la EA donde aún no se presenta daño neuronal, es fundamental para encontrar mejores tratamientos. Por esta razón, comprender de qué modo la alteración de los ritmos hipocampales producidas por los oligómeros de la P β A se relaciona con los síntomas de la enfermedad es muy importante. Nosotros proponemos que nuestra aproximación experimental puede contribuir al entendimiento de las etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer, aunque estamos concientes de que esta posibilidad requiere nuevas investigaciones, como las que se proponen a continuación.

6.5 Perspectivas.

En futuras investigaciones hay tres puntos que nos parecería muy importante investigar:

a) Realizar mediciones de viabilidad celular en nuestro modelo experimental, para comprobar si efectivamente *in vivo* no se presenta muerte neuronal dentro del periodo del registro. Esto, a diferencia de lo que se ha encontrado en otras investigaciones en las que la administración por vía intracerebroventricular de cantidades mil veces mayores de PBA (5 o 15 nanoMolas) producen muerte neuronal (Yamaguchi y Kawashima, 2002; Stepanichev et al., 2004).

b) Investigar en otros modelos experimentales (distintos a la administración intracisternal), si la elevación de los niveles de P β A en el cerebro induce cambios eléctricos

y conductuales que simulen las etapas tempranas de la EA (Hardy y Selkoe, 2002). En este sentido, se ha reportado que la P β A puede incrementarse por los traumatismos craneoencefálicos (Jellinger et al., 2001; Uryu et al., 2002), el estrés oxidativo (Behl et al., 1994), diversas causas genéticas (St George-Hyslop, 2000b) e incluso la interacción entre estos factores con las condiciones de vida y salud particulares de los individuos (Fazekas et al., 1989; McGeer et al., 1996; Blasko et al., 2001; Jellinger et al., 2001; Tyas et al., 2001; Uryu et al., 2002; Mayeux, 2003). Con estos posibles modelos también sería interesante realizar recolección de líquido cefalorraquídeo para medir directamente los verdaderos niveles de PBA que se alcanzarían cerebralmente (Liu y Duff, 2008) y poderlos comparar con las concentraciones en los enfermos de la EA (Naslund et al., 2000).

c) Cuantificaciones del desempeño en tareas relacionadas con la memoria en sujetos en los que se elevan los niveles de P β A de manera prolongada. En este sentido, con experimentos no publicados por nuestro grupo de trabajo ya se han evaluado los posibles efectos crónicos de los oligómeros de la P β A en pruebas conductuales como la evitación pasiva o el reconocimiento de objetos.

7. CONCLUSIONES

Se comprobó la hipótesis de este trabajo, pues se observó un efecto de la administración de los oligómeros de la P β A sobre los ritmos hipocampales inducidos por estimulación nociceptiva. La administración de 5 picoMolas de los oligómeros de la P β A produjo un aumento en las oscilaciones lentas dentro del rango Delta, en la actividad inducida por la estimulación nociceptiva y la administración de 50 picoMolas además de reproducir este enlentecimiento eliminó el pico de frecuencia tipo theta que aparece durante la estimulación nociceptiva. Estos resultados son consistentes con otros trabajos y en conjunto sugieren que los oligómeros solubles de la P β A alteran la actividad electrofisiológica del hipocampo y que esta alteración puede estar causalmente relacionada con las afectaciones tempranas en la memoria y aprendizaje que sufren los pacientes con EA.

8. REFERENCIAS CONSULTADAS

- Adaya-Villanueva, A., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., Marquez-Ramos, A. y Pena-Ortega, F. (2010). "Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides." *Peptides*, 31, (9):1761-1766.
- Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J. y Hooper, N. M. (2003). "ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases." *J Neurosci Res*, 74, (3):342-352.
- Alzheimer A, (1906). Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt*, 23, 1129–36.
- Alzheimer A, (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*, 64. Traducido en Strassnig M y Ganguli M, (2005). *Psychiatry (Edgmont)*, 2(9), 30–33.
- Alzheimer A, (1911). Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. Reeditado en *History of Psychiatry*, 2(5), 74.
- Arévalo-Serrano, J., Sanz-Anquela, J. M. y Gonzalo-Ruiz, A. (2008). "Beta-amyloid peptide-induced modifications in alpha7 nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity in the hippocampus of the rat: relationship with GABAergic and calcium-binding proteins perikarya." *Brain Res Bull*, 75, (5):533-544.
- Aveleyra E, Gómez M, y Ostrosky-Solís F, (1998). Características neuropsicológicas y genéticas de la Enfermedad de Alzheimer. Una entidad heterogénea. *Salud Mental*, 21(1), 64-71.
- Babiloni C, Cassetta E, Binetti G, Tombini M, Del Percio C, Ferreri F, Ferri R, Frisoni G, Lanuzza B et al., (2007). Resting EEG sources correlate with attentional span in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci*. 25, 3742-3757.
- Balleza-Tapia, H., Huanosta-Gutierrez, A., Marquez-Ramos, A., Arias, N. y Pena, F. (2010). "Amyloid beta oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner." *Curr Alzheimer Res*, 7, (5):453-462.
- Bayer-Carter, J. L., Green, P. S., Montine, T. J., VanFossen, B., Baker, L. D., et al. (2011). "Diet intervention and cerebrospinal fluid biomarkers in amnesic mild cognitive impairment." *Arch Neurol*, 68, (6):743-752.
- Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R. y Schubert, D. (1994). "Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity." *Cell*, 77, (6):817-827.
- Bell, K. F., Zheng, L., Fahrenholz, F. y Cuello, A. C. (2008). "ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis." *Neurobiol Aging*, 29, (4):554-565.
- Benchenane, K., Peyrache, A., Khamassi, M., Tierney, P. L., Gioanni, Y., Battaglia, F. P. y Wiener, S. I. (2010). "Coherent theta oscillations and reorganization of spike timing in the hippocampal- prefrontal network upon learning." *Neuron*, 66, (6):921-936.
- Bergeron, C. (1990). "Alzheimer's disease--neuropathological aspects." *Can J Vet Res*, 54, (1):58-64.

- Bianchetti, A. y Trabucchi, M. (2001). "Clinical aspects of Alzheimer's disease." *Aging (Milano)*, 13, (3):221-230.
- Bland, B. H. y Colom, L. V. (1993). "Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex." *Prog Neurobiol*, 41, (2):157-208.
- Bland, B. H., Oddie, S. D. y Colom, L. V. (1999). "Mechanisms of neural synchrony in the septohippocampal pathways underlying hippocampal theta generation." *J Neurosci*, 19, (8):3223-3237.
- Blasko, I., Apochal, A., Boeck, G., Hartmann, T., Grubeck-Loebenstien, B. y Ransmayr, G. (2001). "Ibuprofen decreases cytokine-induced amyloid beta production in neuronal cells." *Neurobiol Dis*, 8, (6):1094-1101.
- Bonfiglio F, (1908). Di speciali reperti in uno caso di probabile sifilide cerebrale. *Riv Sper Freniatr*, 34. Citado en Goedert M y Guetti B, (2007). Alois Alzheimer: His Life and Times. *Brain Pathol*, 17(1), 57-62.
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H. y Del Tredici, K. (2006). "Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry." *Acta Neuropathol*, 112, (4):389-404.
- Bragin, A., Jando, G., Nadasdy, Z., Hetke, J., Wise, K. y Buzsaki, G. (1995). "Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat." *J Neurosci*, 15, (1 Pt 1):47-60.
- Buzsaki, G. (2002). "Theta oscillations in the hippocampus." *Neuron*, 33, (3):325-340.
- Buzsaki, G. y Draguhn, A. (2004). "Neuronal oscillations in cortical networks." *Science*, 304, (5679):1926-1929.
- Cardinali, D. P., Furio, A. M. y Brusco, L. I. (2010). "Clinical aspects of melatonin intervention in Alzheimer's disease progression." *Curr Neuropharmacol*, 8, (3):218-227.
- Cirrito, J. R., Yamada, K. A., Finn, M. B., Sloviter, R. S., Bales, K. R., et al. (2005). "Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo." *Neuron*, 48, (6):913-922.
- Colom, L. V., Castaneda, M. T., Banuelos, C., Puras, G., Garcia-Hernandez, A., Hernandez, S., Mounsey, S., Benavidez, J. y Lehker, C. (2010). "Medial septal beta-amyloid 1-40 injections alter septo-hippocampal anatomy and function." *Neurobiol Aging*, 31, (1):46-57.
- Craft, S., Baker, L. D., Montine, T. J., Minoshima, S., Watson, G. S., et al. (2012). "Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial." *Arch Neurol*, 69, (1):29-38.
- Cruz-Alcalá L y Vázquez-Castellanos J, (2002). Prevalencia de algunas enfermedades neurológicas en la Ciudad de Tepatlán, Jalisco, México. *Rev Mex Neuroci*, 3(2), 71-76.
- Delobette, S., Privat, A. y Maurice, T. (1997). "In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia in the rat." *Eur J Pharmacol*, 319, (1):1-4.

- Desai, P. P., Ikonovic, M. D., Abrahamson, E. E., Hamilton, R. L., Isanski, B. A., Hope, C. E., Klunk, W. E., DeKosky, S. T. y Kamboh, M. I. (2005). "Apolipoprotein D is a component of compact but not diffuse amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease temporal cortex." *Neurobiol Dis*, 20, (2):574-582.
- Deshmukh, S. S., Yoganasimha, D., Voicu, H. y Knierim, J. J. (2010). "Theta modulation in the medial and the lateral entorhinal cortices." *J Neurophysiol*, 104, (2):994-1006.
- Dewachter, I., van Dorpe, J., Spittaels, K., Tesseur, I., Van Den Haute, C., Moechars, D. y Van Leuven, F. (2000). "Modeling Alzheimer's disease in transgenic mice: effect of age and of presenilin1 on amyloid biochemistry and pathology in APP/London mice." *Exp Gerontol*, 35, (6-7):831-841.
- Dham R, (2006). Alzheimer's discovery. *Curr Biol*, 16(21), 906-910.
- Driver, J. E., Racca, C., Cunningham, M. O., Towers, S. K., Davies, C. H., Whittington, M. A. y LeBeau, F. E. (2007). "Impairment of hippocampal gamma-frequency oscillations in vitro in mice overexpressing human amyloid precursor protein (APP)." *Eur J Neurosci*, 26, (5):1280-1288.
- Du, Y. F., Yan, P., Guo, S. G. y Qu, C. Q. (2011). "Effects of fibrillar Abeta(1-40) on the viability of primary cultures of cholinergic neurons and the expression of insulin signaling-related proteins." *Anat Rec (Hoboken)*, 294, (2):287-294.
- Duyckaerts, C., Potier, M. C. y Delatour, B. (2008). "Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences." *Acta Neuropathol*, 115, (1):5-38.
- Engel, A. K., Fries, P. y Singer, W. (2001). "Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing." *Nat Rev Neurosci*, 2, (10):704-716.
- Fazekas, F., Alavi, A., Chawluk, J. B., Zimmerman, R. A., Hackney, D., et al. (1989). "Comparison of CT, MR, and PET in Alzheimer's dementia and normal aging." *J Nucl Med*, 30, (10):1607-1615.
- Fisher, A. (2008). "M1 muscarinic agonists target major hallmarks of Alzheimer's disease--the pivotal role of brain M1 receptors." *Neurodegener Dis*, 5, (3-4):237-240.
- Fitch, T. E., Sahr, R. N., Eastwood, B. J., Zhou, F. C. y Yang, C. R. (2006). "Dopamine D1/5 receptor modulation of firing rate and bidirectional theta burst firing in medial septal/vertical limb of diagonal band neurons in vivo." *J Neurophysiol*, 95, (5):2808-2820.
- Fitzjohn, S. M., Morton, R. A., Kuenzi, F., Rosahl, T. W., Shearman, M., et al. (2001). "Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APP695SWE mutant form of amyloid precursor protein." *J Neurosci*, 21, (13):4691-4698.
- Földi, I., Datki, Z. L., Szabo, Z., Bozso, Z., Penke, B. y Janaky, T. (2011). "Proteomic study of the toxic effect of oligomeric Abeta1-42 in situ prepared from 'iso-Abeta1-42'." *J Neurochem*, 117, (4):691-702.
- Forlenza, O. V., Diniz, B. S., Radanovic, M., Santos, F. S., Talib, L. L. y Gattaz, W. F. (2011). "Disease-modifying properties of long-term lithium treatment for amnesic

- mild cognitive impairment: randomised controlled trial." *Br J Psychiatry*, 198, (5):351-356.
- Forstl, H. y Kurz, A. (1999). "Clinical features of Alzheimer's disease." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 249, (6):288-290.
- Francis, P. T., Webster, M. T., Chessell, I. P., Holmes, C., Stratmann, G. C., Procter, A. W., Cross, A. J., Green, A. R. y Bowen, D. M. (1993). "Neurotransmitters and second messengers in aging and Alzheimer's disease." *Ann N Y Acad Sci*, 695:19-26.
- Freir, D. B., Costello, D. A. y Herron, C. E. (2003). "A beta 25-35-induced depression of long-term potentiation in area CA1 in vivo and in vitro is attenuated by verapamil." *J Neurophysiol*, 89, (6):3061-3069.
- Freir, D. B. y Herron, C. E. (2003). "Nicotine enhances the depressive actions of A beta 1-40 on long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 region in vivo." *J Neurophysiol*, 89, (6):2917-2922.
- Furukawa, K., Sopher, B. L., Rydel, R. E., Begley, J. G., Pham, D. G., Martin, G. M., Fox, M. y Mattson, M. P. (1996). "Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain." *J Neurochem*, 67, (5):1882-1896.
- Gandy, S. (2005). "The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease." *J Clin Invest*, 115, (5):1121-1129.
- Giacchino, J., Criado, J. R., Games, D. y Henriksen, S. (2000). "In vivo synaptic transmission in young and aged amyloid precursor protein transgenic mice." *Brain Res*, 876, (1-2):185-190.
- Giovannelli, L., Casamenti, F., Scali, C., Bartolini, L. y Pepeu, G. (1995). "Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis." *Neuroscience*, 66, (4):781-792.
- Glenner y Wong, (1984). Citado en Iqbal K y Grundke-Iqbal I (2008). Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med*, 12 (1), 38-55.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." *Nature*, 349, (6311):704-706.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, P. N., Lambert, M. P., Finch, C. E., Krafft, G. A. y Klein, W. L. (2003). "Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, (18):10417-10422.
- Gonzalo-Ruiz, A., Gonzalez, I. y Sanz-Anquela, J. M. (2003). "Effects of beta-amyloid protein on serotonergic, noradrenergic, and cholinergic markers in neurons of the pontomesencephalic tegmentum in the rat." *J Chem Neuroanat*, 26, (3):153-169.

- Gonzalo-Ruiz, A., Perez, J. L., Sanz, J. M., Geula, C. y Arevalo, J. (2006). "Effects of lipids and aging on the neurotoxicity and neuronal loss caused by intracerebral injections of the amyloid-beta peptide in the rat." *Exp Neurol*, 197, (1):41-55.
- Grace, E. A., Rabiner, C. A. y Busciglio, J. (2002). "Characterization of neuronal dystrophy induced by fibrillar amyloid beta: implications for Alzheimer's disease." *Neuroscience*, 114, (1):265-273.
- Graeber, M. B., Kosel, S., Grasbon-Frodl, E., Moller, H. J. y Mehraein, P. (1998). "Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D." *Neurogenetics*, 1, (3):223-228.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S. y Wisniewski, H. M. (1986). "Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments." *J Biol Chem*, 261, (13):6084-6089.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M. y Binder, L. I. (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, (13):4913-4917.
- Gutiérrez R, (2002). Alzheimer. Diagnóstico el primer paso hacia la ayuda; Dirección General de Servicios de Salud Mental, Secretaria de Salud, 26 p. Extraído en junio de 2007 desde <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/bolalz.htm>
- Hahn, T. T., Sakmann, B. y Mehta, M. R. (2006). "Phase-locking of hippocampal interneurons' membrane potential to neocortical up-down states." *Nat Neurosci*, 9, (11):1359-1361.
- Hardy, J. y Selkoe, D. J. (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science*, 297, (5580):353-356.
- Hebert, L. E., Scherr, P. A., Bienias, J. L., Bennett, D. A. y Evans, D. A. (2003). "Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census." *Arch Neurol*, 60, (8):1119-1122.
- Henke, H. y Lang, W. (1983). "Cholinergic enzymes in neocortex, hippocampus and basal forebrain of non-neurological and senile dementia of Alzheimer-type patients." *Brain Res*, 267, (2):281-291.
- Hiruma, H., Katakura, T., Takahashi, S., Ichikawa, T. y Kawakami, T. (2003). "Glutamate and amyloid beta-protein rapidly inhibit fast axonal transport in cultured rat hippocampal neurons by different mechanisms." *J Neurosci*, 23, (26):8967-8977.
- Holscher, C., Gengler, S., Gault, V. A., Harriott, P. y Mallot, H. A. (2007). "Soluble beta-amyloid[25-35] reversibly impairs hippocampal synaptic plasticity and spatial learning." *Eur J Pharmacol*, 561, (1-3):85-90.
- Hsia, A. Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G. Q., Tatsuno, G., et al. (1999). "Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, (6):3228-3233.

- Hughes, J. R., Shanmugham, S., Wetzel, L. C., Bellur, S. y Hughes, C. A. (1989). "The relationship between EEG changes and cognitive functions in dementia: a study in a VA population." *Clin Electroencephalogr*, 20, (2):77-85.
- Ihl, R., Dierks, T., Martin, E. M., Froelich, L. y Maurer, K. (1996). "Topography of the maximum of the amplitude of EEG frequency bands in dementia of the Alzheimer type." *Biol Psychiatry*, 39, (5):319-325.
- Ikonomovic, M. D., Abrahamson, E. E., Uz, T., Manev, H. y Dekosky, S. T. (2008). "Increased 5-lipoxygenase immunoreactivity in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease." *J Histochem Cytochem*, 56, (12):1065-1073.
- Im, K., Lee, J. M., Seo, S. W., Yoon, U., Kim, S. T., Kim, Y. H., Kim, S. I. y Na, D. L. (2008). "Variations in cortical thickness with dementia severity in Alzheimer's disease." *Neurosci Lett*, 436, (2):227-231.
- Iqbal, K. y Grundke-Iqbal, I. (2008). "Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention." *J Cell Mol Med*, 12, (1):38-55.
- Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Zaidi, T., Merz, P. A., Wen, G. Y., Shaikh, S. S., Wisniewski, H. M., Alafuzoff, I. y Winblad, B. (1986). "Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease." *Lancet*, 2, (8504):421-426.
- Iqbal, K., Wisniewski, H. M., Shelanski, M. L., Brostoff, S., Liwnicz, B. H. y Terry, R. D. (1974). "Protein changes in senile dementia." *Brain Res*, 77, (2):337-343.
- Jankowsky, J. L., Younkin, L. H., Gonzales, V., Fadale, D. J., Slunt, H. H., Lester, H. A., Younkin, S. G. y Borchelt, D. R. (2007). "Rodent A beta modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice." *J Biol Chem*, 282, (31):22707-22720.
- Jellinger, K. A., Paulus, W., Wrocklage, C. y Litvan, I. (2001). "Effects of closed traumatic brain injury and genetic factors on the development of Alzheimer's disease." *Eur J Neurol*, 8, (6):707-710.
- Jensen, O. y Lisman, J. E. (1998). "An oscillatory short-term memory buffer model can account for data on the Sternberg task." *J Neurosci*, 18, (24):10688-10699.
- Jolas, T., Zhang, X. S., Zhang, Q., Wong, G., Del Vecchio, R., Gold, L. y Priestley, T. (2002). "Long-term potentiation is increased in the CA1 area of the hippocampus of APP(swe/ind) CRND8 mice." *Neurobiol Dis*, 11, (3):394-409.
- Kahana, M. J., Seelig, D. y Madsen, J. R. (2001). "Theta returns." *Curr Opin Neurobiol*, 11, (6):739-744.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S. y Malinow, R. (2003). "APP processing and synaptic function." *Neuron*, 37, (6):925-937.
- Khachaturian, Z. S. (1991). "Overview of basic research on Alzheimer disease: implications for cognition." *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 5 Suppl 1:S1-6.
- Kinney, G. G., Patino, P., Mermet-Bouvier, Y., Starrett, J. E., Jr. y Gribkoff, V. K. (1999). "Cognition-enhancing drugs increase stimulated hippocampal theta rhythm amplitude in the urethane-anesthetized rat." *J Pharmacol Exp Ther*, 291, (1):99-106.

- Klein, W. L. (2002). "Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets." *Neurochem Int*, 41, (5):345-352.
- Klein, W. L., Krafft, G. A. y Finch, C. E. (2001). "Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?" *Trends Neurosci*, 24, (4):219-224.
- Kojro, E. y Fahrenholz, F. (2005). "The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases." *Subcell Biochem*, 38:105-127.
- Korotzer, A. R., Whitemore, E. R. y Cotman, C. W. (1995). "Differential regulation by beta-amyloid peptides of intracellular free Ca²⁺ concentration in cultured rat microglia." *Eur J Pharmacol*, 288, (2):125-130.
- Koudinov, A. R. y Berezov, T. T. (2004). "Alzheimer's amyloid-beta (A beta) is an essential synaptic protein, not neurotoxic junk." *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 64, (1):71-79.
- Kowalski, J. W., Gawel, M., Pfeffer, A. y Barcikowska, M. (2001). "The diagnostic value of EEG in Alzheimer disease: correlation with the severity of mental impairment." *J Clin Neurophysiol*, 18, (6):570-575.
- Kraepelin E (1910). *Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. Leipzig: Barth.* 593–632.
- Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T. C., Kirkpatrick, J. B., Murdoch, G. H., Ball, M. J. y Roher, A. E. (1996). "Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains." *J Biol Chem*, 271, (8):4077-4081.
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., et al. (1998). "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, (11):6448-6453.
- Lang, W. y Henke, H. (1983). "Cholinergic receptor binding and autoradiography in brains of non-neurological and senile dementia of Alzheimer-type patients." *Brain Res*, 267, (2):271-280.
- Lee, J. Y., Friedman, J. E., Angel, I., Kozak, A. y Koh, J. Y. (2004). "The lipophilic metal chelator DP-109 reduces amyloid pathology in brains of human beta-amyloid precursor protein transgenic mice." *Neurobiol Aging*, 25, (10):1315-1321.
- Leissring, M. A., Farris, W., Chang, A. Y., Walsh, D. M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M. P. y Selkoe, D. J. (2003). "Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death." *Neuron*, 40, (6):1087-1093.
- Leung, L. W. y Desborough, K. A. (1988). "APV, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks the hippocampal theta rhythm in behaving rats." *Brain Res*, 463, (1):148-152.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." *Science*, 269, (5226):973-977.

- Liu, L. y Duff, K. (2008). "A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse." *J Vis Exp*, (21).
- Lopes y Bottino, (2002). Prevalencia de demencia em diversas regioes do mundo. Análise dos estudos epidemiológicos de 1994 a 2000. *Arq Neuropsiquiatr*, 60(1), 61-69.
- Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., et al. (1999). "Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease." *Am J Pathol*, 155, (3):853-862.
- Maggi, C. A. y Meli, A. (1986). "Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General considerations." *Experientia*, 42, (2):109-114.
- Mattson, M. P., Barger, S. W., Cheng, B., Lieberburg, I., Smith-Swintosky, V. L. y Rydel, R. E. (1993). "beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease." *Trends Neurosci*, 16, (10):409-414.
- Maurice, T., Lockhart, B. P. y Privat, A. (1996). "Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction." *Brain Res*, 706, (2):181-193.
- Mayeux, R. (2003). "Epidemiology of neurodegeneration." *Annu Rev Neurosci*, 26:81-104.
- McGeer, P. L., Schulzer, M. y McGeer, E. G. (1996). "Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies." *Neurology*, 47, (2):425-432.
- McNaughton, N., Ruan, M. y Woodnorth, M. A. (2006). "Restoring theta-like rhythmicity in rats restores initial learning in the Morris water maze." *Hippocampus*, 16, (12):1102-1110.
- Merchant, C., Tang, M. X., Albert, S., Manly, J., Stern, Y. y Mayeux, R. (1999). "The influence of smoking on the risk of Alzheimer's disease." *Neurology*, 52, (7):1408-1412.
- Meziane, H., Dodart, J. C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M. y Ungerer, A. (1998). "Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, (21):12683-12688.
- Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reverse, D., Baekelandt, V., et al. (1999). "Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain." *J Biol Chem*, 274, (10):6483-6492.
- Mormann, F., Osterhage, H., Andrzejak, R. G., Weber, B., Fernandez, G., Fell, J., Elger, C. E. y Lehnertz, K. (2008). "Independent delta/theta rhythms in the human hippocampus and entorhinal cortex." *Front Hum Neurosci*, 2:3.
- Moroni, F., Corradetti, R., Casamenti, F., Moneti, G. y Pepeu, G. (1981). "The release of endogenous GABA and glutamate from the cerebral cortex in the rat." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 316, (3):235-239.
- Morrison, J. H. y Hof, P. R. (1997). "Life and death of neurons in the aging brain." *Science*, 278, (5337):412-419.

- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., et al. (2000). "High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation." *J Neurosci*, 20, (11):4050-4058.
- Muñoz, D. G. y Feldman, H. (2000). "Causes of Alzheimer's disease." *CMAJ*, 162, (1):65-72.
- Nakamura, S., Murayama, N., Noshita, T., Annoura, H. y Ohno, T. (2001). "Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide." *Brain Res*, 912, (2):128-136.
- Naslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K. L., Davies, P., Greengard, P. y Buxbaum, J. D. (2000). "Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline." *JAMA*, 283, (12):1571-1577.
- Netter, F. H., Brass, A., Murillo, P. L. y Dingle, R. V. (1994). Sistema nervioso. Parte 1, Anatomía y fisiología, Masson.
- Nimmrich, V., Grimm, C., Draguhn, A., Barghorn, S., Lehmann, A., et al. (2008). "Amyloid beta oligomers (A beta(1-42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents." *J Neurosci*, 28, (4):788-797.
- Nobili, F., Copello, F., Vitali, P., Prastaro, T., Carozzo, S., Perego, G. y Rodriguez, G. (1999). "Timing of disease progression by quantitative EEG in Alzheimer' s patients." *J Clin Neurophysiol*, 16, (6):566-573.
- O'Keefe, J. y Recce, M. L. (1993). "Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm." *Hippocampus*, 3, (3):317-330.
- Octave, J. N. (1995). "The amyloid peptide precursor in Alzheimer's disease." *Acta Neurol Belg*, 95, (4):197-209.
- OMS, (2002). Clasificación Internacional de Enfermedades. 10a ed. Extraído en junio de 2007 desde www.who.int/classifications/icd/en/index.html
- Ott A, Slooter A, Hofman A, van Harskamp F, Witterman J, et al., (1998). Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet*. 351, (9119):751-318.
- Pan, X. D., Zhu, Y. G., Lin, N., Zhang, J., Ye, Q. Y., Huang, H. P. y Chen, X. C. (2011). "Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid is attenuated by oligomeric beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease." *Mol Neurodegener*, 6:45.
- Parent A, Linden D, Sisodia S y Borchelt D, (1999). Synaptic transmission and hippocampal long-term potentiation in transgenic mice expressing FAD-linked presenilin 1. *Neurobiol Dis*, 6(1):317-322.
- Patwardhan, R. V., Calvert, J. W., Besio, W., Kusaka, G., Kusaka, I., Zhang, J. y Nanda, A. (2005). "Technical note: preliminary results in development of a novel intracisternal penicillin seizure model in the rat." *Front Biosci*, 10:3009-3012.
- Paxinos, G. y Watson, C. (2005). The rat brain in stereotaxic coordinates, Elsevier Academic Press.

- Peña, F., Gutierrez-Lerma, A., Quiroz-Baez, R. y Arias, C. (2006). "The role of beta-amyloid protein in synaptic function: implications for Alzheimer's disease therapy." *Curr Neuropharmacol*, 4, (2):149-163.
- Peña, F., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., Bernal-Pedraza, R., Marquez-Ramos, A., Carmona-Aparicio, L. y Giordano, M. (2010). "Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase." *Hippocampus*, 20, (1):78-96.
- Pericak-Vance, M. A., Bass, M. P., Yamaoka, L. H., Gaskell, P. C., Scott, W. K., et al. (1997). "Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12." *JAMA*, 278, (15):1237-1241.
- Perusini G, (1909). Über klinisch und histologisch eigenartige psychische Erkrankungen des späteren Lebensalters. Citado en: Histologische und Histopathologische Arbeiten. F Nissl, A Alzheimer (eds). *Fischer Verlag*: Jena 3:297–351. Citado en: Goedert M, Guetti B (1997). Alois Alzheimer: His Life and Times. *Brain Pathol*, 17:57–62.
- Pike, C. J., Walencewicz-Wasserman, A. J., Kosmoski, J., Cribbs, D. H., Glabe, C. G. y Cotman, C. W. (1995). "Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity." *J Neurochem*, 64, (1):253-265.
- Praticò, D., Uryu, K., Sung, S., Tang, S., Trojanowski, J. Q. y Lee, V. M. (2002). "Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice." *FASEB J*, 16, (9):1138-1140.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H. A. y Herms, J. (2006). "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein." *J Neurosci*, 26, (27):7212-7221.
- Rabinovici, G. D. y Jagust, W. J. (2009). "Amyloid imaging in aging and dementia: testing the amyloid hypothesis in vivo." *Behav Neurol*, 21, (1):117-128.
- Robles A, Del Ser T, Alom J, Peña-Casanova J, y Grupo Asesor del Grupo de Neurología de la Conducta y Demencias de la Sociedad Española de Neurología con el refrendo del Comité Científico de la Sociedad Española de Neurología (2002). Propuesta de criterios para el diagnóstico clínico del deterioro cognitivo ligero, la demencia y la enfermedad de Alzheimer. *Neurología*, 17(1),17-32.
- Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., et al. (1995). "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene." *Nature*, 376, (6543):775-778.
- Rönicke, R., Klemm, A., Meinhardt, J., Schroder, U. H., Fandrich, M. y Reymann, K. G. (2008). "Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture?" *PLoS One*, 3, (9):e3236.
- Rovira, C., Arbez, N. y Mariani, J. (2002). "Abeta(25-35) and Abeta(1-40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons." *Biochem Biophys Res Commun*, 296, (5):1317-1321.

- Sánchez J, (1993). Métodos para el procesamiento y análisis estadístico multivariante de señales multicanal: Aplicación al estudio del EEG. Tesis Doctoral: Curso Ciencias y Tecnologías 1992-1993. *Servicio de publicaciones Universidad de la Laguna*, España.
- Sandberg, A., Luheshi, L. M., Sollvander, S., Pereira de Barros, T., Macao, B., et al. (2010). "Stabilization of neurotoxic Alzheimer amyloid-beta oligomers by protein engineering." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, (35):15595-15600.
- Sandbrink, R., Hartmann, T., Masters, C. L. y Beyreuther, K. (1996). "Genes contributing to Alzheimer's disease." *Mol Psychiatry*, 1, (1):27-40.
- Schreiter-Gasser, U., Gasser, T. y Ziegler, P. (1994). "Quantitative EEG analysis in early onset Alzheimer's disease: correlations with severity, clinical characteristics, visual EEG and CCT." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 90, (4):267-272.
- Selkoe, D. J. (1993). "Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease." *Trends Neurosci*, 16, (10):403-409.
- Selkoe, D. J. (2008). "Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior." *Behav Brain Res*, 192, (1):106-113.
- Sherrington, R., Rogae, E. I., Liang, Y., Rogae, E. A., Levesque, G., et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature*, 375, (6534):754-760.
- Shin, J., Kim, D., Bianchi, R., Wong, R. K. y Shin, H. S. (2005). "Genetic dissection of theta rhythm heterogeneity in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, (50):18165-18170.
- Shirvalkar, P. R., Rapp, P. R. y Shapiro, M. L. (2010). "Bidirectional changes to hippocampal theta-gamma comodulation predict memory for recent spatial episodes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, (15):7054-7059.
- St George-Hyslop, P. H. (2000a). "Molecular genetics of Alzheimer's disease." *Biol Psychiatry*, 47, (3):183-199.
- St George-Hyslop, P. H., (2000b). Piecing together Alzheimer's: *Scientific American*, 283; Citado en Sisodia S and George-Hyslop P, (2002). gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci*, 3(4), 281-90.
- St George-Hyslop, P. H., Tanzi, R. E., Polinsky, R. J., Haines, J. L., Nee, L., et al. (1987). "The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21." *Science*, 235, (4791):885-890.
- Steinerman, J. R., Irizarry, M., Scarmeas, N., Raju, S., Brandt, J., Albert, M., Blacker, D., Hyman, B. y Stern, Y. (2008). "Distinct pools of beta-amyloid in Alzheimer disease-affected brain: a clinicopathologic study." *Arch Neurol*, 65, (7):906-912.
- Stepanichev, M. Y., Zdobnova, I. M., Zarubenko, II, Moiseeva, Y. V., Lazareva, N. A., Onufriev, M. V. y Gulyaeva, N. V. (2004). "Amyloid-beta(25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus." *Physiol Behav*, 80, (5):647-655.

- Stephan, A., Laroche, S. y Davis, S. (2001). "Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits." *J Neurosci*, 21, (15):5703-5714.
- Sun, M. K. y Alkon, D. L. (2002). "Impairment of hippocampal CA1 heterosynaptic transformation and spatial memory by beta-amyloid(25-35)." *J Neurophysiol*, 87, (5):2441-2449.
- Tohda, C., Matsumoto, N., Zou, K., Meselhy, M. R. y Komatsu, K. (2004). "Abeta(25-35)-induced memory impairment, axonal atrophy, and synaptic loss are ameliorated by M1, A metabolite of protopanaxadiol-type saponins." *Neuropsychopharmacology*, 29, (5):860-868.
- Tsolaki, M., Kounti, F., Agogiatou, C., Poptsi, E., Bakoglidou, E., et al. (2011). "Effectiveness of nonpharmacological approaches in patients with mild cognitive impairment." *Neurodegener Dis*, 8, (3):138-145.
- Tyas, S. L., Manfreda, J., Strain, L. A. y Montgomery, P. R. (2001). "Risk factors for Alzheimer's disease: a population-based, longitudinal study in Manitoba, Canada." *Int J Epidemiol*, 30, (3):590-597.
- Uryu, K., Laurer, H., McIntosh, T., Pratico, D., Martinez, D., Leight, S., Lee, V. M. y Trojanowski, J. Q. (2002). "Repetitive mild brain trauma accelerates Abeta deposition, lipid peroxidation, and cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer amyloidosis." *J Neurosci*, 22, (2):446-454.
- Valladares-Neto, D. C., Buchsbaum, M. S., Evans, W. J., Nguyen, D., Nguyen, P., et al. (1995). "EEG delta, positron emission tomography, and memory deficit in Alzheimer's disease." *Neuropsychobiology*, 31, (4):173-181.
- Venkitaramani, D. V., Chin, J., Netzer, W. J., Gouras, G. K., Lesne, S., Malinow, R. y Lombroso, P. J. (2007). "Beta-amyloid modulation of synaptic transmission and plasticity." *J Neurosci*, 27, (44):11832-11837.
- Villette, V., Poindessous-Jazat, F., Simon, A., Lena, C., Roullot, E., Bellessort, B., Epelbaum, J., Dutar, P. y Stephan, A. (2010). "Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat." *J Neurosci*, 30, (33):10991-11003.
- Vinogradova, O. S. (1995). "Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm." *Prog Neurobiol*, 45, (6):523-583.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Rowan, M. J. y Selkoe, D. J. (2002). "Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition." *Biochem Soc Trans*, 30, (4):552-557.
- Walsh, D. M. y Selkoe, D. J. (2004). "Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease." *Neuron*, 44, (1):181-193.
- Wang, Q., (2003). The role of Ab-peptide on spatial memory, EEG, Auditory Evoked Potentials and Nicotinic Cholinergic Receptors in A/P Transgenic Mice. Tesis Doctoral: Departamento de Neurología. Universidad de Kuopio, Finlandia.

- Wang, Q., Rowan, M. J. y Anwyl, R. (2004). "Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide." *J Neurosci*, 24, (27):6049-6056.
- Wang, Q., Walsh, D. M., Rowan, M. J., Selkoe, D. J. y Anwyl, R. (2004). "Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5." *J Neurosci*, 24, (13):3370-3378.
- West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G. y Troncoso, J. C. (1994). "Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease." *Lancet*, 344, (8925):769-772.
- Wolansky, T., Clement, E. A., Peters, S. R., Palczak, M. A. y Dickson, C. T. (2006). "Hippocampal slow oscillation: a novel EEG state and its coordination with ongoing neocortical activity." *J Neurosci*, 26, (23):6213-6229.
- Wu, J., Anwyl, R. y Rowan, M. J. (1995). "beta-Amyloid-(1-40) increases long-term potentiation in rat hippocampus in vitro." *Eur J Pharmacol*, 284, (3):R1-3.
- Xing, C., Yin, Y., Chang, R., He, X. y Xie, Z. (2005). "A role of insulin-like growth factor 1 in beta amyloid-induced disinhibition of hippocampal neurons." *Neurosci Lett*, 384, (1-2):93-97.
- Yamaguchi, Y. y Kawashima, S. (2001). "Effects of amyloid-beta-(25-35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat." *Eur J Pharmacol*, 412, (3):265-272.
- Yankner, B. A., Duffy, L. K. y Kirschner, D. A. (1990). "Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides." *Science*, 250, (4978):279-282.
- Zúñiga E y Vega D (2005). Envejecimiento de la Población de México Reto del siglo XXI CONAPO. Extraído en junio de 2007 desde
http://www.conapo.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=340&Itemid=15