



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

LA NEUROTRANSMISIÓN CATECOLAMINÉRGICA Y EL PÉPTIDO β AMILOIDE
FORMAN UN PROCESO DE RETROALIMENTACIÓN POSITIVA EN LA PATOLOGÍA DE
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. PERLA DEL ROCÍO MORENO CASTILLA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
INSITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS.
DRA. MARTHA L. ESCOBAR, FACULTAD DE PSICOLOGÍA.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2016.



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología del aprendizaje y la memoria a cargo del Dr. Federico Bermúdez Rattoni, en el departamento de Neurociencia Cognitiva de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) CB 250870 y por el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN208616.

Agradecimientos

Agradezco a mi tutor, el Dr. Federico Bermúdez por su apoyo constante y en señanzas invaluable.

También agradezco la valiosa intervención, guía y apoyo de mi comité tutor formado por la Dra. Clorinda Arias y la Dra. Martha L. Escobar.

A los integrantes de mi jurado el Dr. Iván Velasco, Dr. Rainer Gutiérrez, Dr. Fernando Peña y a la Dra. Gohar Gevorgyan por su valiosa aportación al trabajo.

Gracias al Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo por todas las discusiones y por su aportación que enriqueció mi doctorado.

Agradezco a la Dra. Leticia Ramírez Lugo y al Dr. Humberto Gutiérrez por su apoyo académico durante el planteamiento y desarrollo de este proyecto.

Agradezco a la Dra. Claudia Rivera, a Héctor Malagón Rivera y al personal del *vivarium*, a los jefes de la unidad de cómputo Ana María Escalante y Gerardo Coello, y a Francisco Pérez, por la ayuda técnica y soporte en las diferentes unidades de servicio del Instituto de Fisiología Celular.

Gracias a los estudiantes con los que he colaborado en el desarrollo de este proyecto: Valeria Violante, Silvia Morales, Alejandro Bárcenas, Lucía Landa, María Fernanda Pérez, Rodrigo Pérez y Eduardo Hernández.

Dedico este trabajo y la felicidad que me ha generado el realizarlo a mi esposo, Luis Tovar, a mis padres Ma. Soledad Castilla y Moisés Moreno, y a mis hermanas Iris y Lucero. Por siempre mi corazón y agradecimiento.

Con todo mi amor para Sofi Feliz.

Tabla de contenido

Abstract.....	7
Resumen.....	8
Organización de la tesis.....	10
1 Introducción	11
1.1 La enfermedad de Alzheimer.....	11
1.2 La enfermedad de Alzheimer como una falla sináptica	19
1.3 La disfunción sináptica y el péptido β A.....	19
1.4 Producción y degradación del péptido β A	22
1.5 Plegamiento patológico y acumulación del péptido β A.....	25
1.6 Las alteraciones en la neurotransmisión como blanco inicial de la patología de la EA.....	27
1.7 Alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica en la EA.....	28
1.8 Efecto de la actividad dopaminérgica en la agregación del β A.....	30
2 Planteamiento del problema	31
3 Hipótesis	32
4 Objetivos	32
5 Materiales y Métodos.....	33
6 Resultados	38
6.1 La disfunción en la neurotransmisión dopaminérgica inducida por β -amiloide transforma la potenciación a largo plazo a depresión a largo plazo cortical y afecta la memoria	38
6.2 Las catecolaminas tienen un efecto protector sobre la acumulación del β A y el progreso de la patología relacionada a la enfermedad de Alzheimer.....	54
6.2.1 La administración aguda de catecol y dopamina disminuye la acumulación del β A en el modelo 3xTg-AD	55
6.2.1 El tratamiento con levodopa restaura la liberación de dopamina y el desempeño cognitivo de los ratones 3xTg-AD.....	57
6.2.2 El incremento sostenido de los niveles de dopamina disminuye la acumulación del β A en el modelo 3xTg-AD.....	60
6.3 La liberación hipocámpal de dopamina y norepinefrina codifican la información contextual nueva en la memoria de reconocimiento	62
7 Discusión.....	77
7.1 La neurotransmisión dopaminérgica y el β A forman un proceso cíclico de retroalimentación positiva en la patología relacionada a la enfermedad de Alzheimer.....	77
7.2 El incremento en los niveles del β A daña las terminales catecolaminérgicas y la liberación de dopamina	79

7.3	Un nuevo vínculo mediado por dopamina entre la enfermedad de Alzheimer y la metaplasticidad.....	79
7.4	Fallas en el procesamiento de la información nueva y agnosia en la enfermedad de Alzheimer.....	81
7.5	El efecto protector de las catecolaminas sobre la acumulación del β A.....	82
8	Conclusiones	86
9	Referencias.....	87
10	Anexo.....	102

Abstract

Increasing evidence suggests that dopaminergic neurotransmission is impaired in Alzheimer's disease but this impairment has mostly been associated to non-cognitive symptoms. Dopamine is a key neuromodulator of synaptic plasticity and it has been shown that the enhancement of its activity improves memory in animal models and Alzheimer's patients. Thus, we aimed to study the function of dopaminergic neurotransmission and its contribution to synaptic plasticity alterations and memory impairment in Alzheimer's disease models. Additionally, evidences have shown that dopamine and dopamine structure-related molecules can interact with amyloid beta ($A\beta$), inhibiting aggregation and disaggregating $A\beta$ *in vitro*. We aimed to evaluate the protective effect of dopamine on $A\beta$ accumulation *in vivo* by hypothesizing that the pathological accumulation of $A\beta$ and the dopaminergic neurotransmission form a cyclical feedback loop in the pathology of AD. The first component in the loop that we studied is the effect of increased $A\beta$ levels on dopaminergic neurotransmission and its consequences in memory, and then, the effect of a damaged dopaminergic neurotransmission in the progress of $A\beta$ accumulation, as the second component in this loop. We established a novel relation between dopaminergic neurotransmission and $A\beta$ -induced alterations in the plasticity of cortical synapses and its relation to memory impairment. We found that early $A\beta$ deposition in a triple transgenic mouse model of AD (3xTg-AD) and also the intracortical administration of $A\beta$ oligomers in WT mice, impaired synaptic plasticity, not only to the point of flattening changes by inhibiting Long-term potentiation (LTP), but by displaying actual long-term depression (LTD). The restoration of cortical dopamine levels by administration of the reuptake inhibitor nomifensine, induced LTP and restored memory. Furthermore, the intracortical administration of 6-hydroxy-dopamine, a selective neurotoxin for catecholaminergic neurons, depleted cortical dopamine levels in WT mice and mimicked the $A\beta$ -induced shift from LTP to LTD. This represents *in vivo* evidence for the dopaminergic control of LTP/LTD induction threshold and its implication in the mechanism of synaptic plasticity and memory formation in healthy and AD brains. Then, we found that intra-cerebral administration of dopamine and its core structure molecule, catechol, significantly decreases $A\beta$ accumulation 24 h after the infusion in the cerebral cortex and hippocampus of 3xT-AD mice. Accordingly, the systemic administration of levodopa, the precursor molecule in the biosynthesis of dopamine, restored dopamine release, improving cognitive performance and lessened $A\beta$ accumulation in 3xTg-AD mice. This suggests that the dopaminergic activity has a protective effect on the accumulation of $A\beta$ that is mediated by its catechol core, which interacts with $A\beta$ aggregates, favoring its degradation. Finally, we extended our project to the hippocampus. For this, we studied the effect of hippocampal dopamine depletion in memory. Our results revealed that dopamine and norepinephrine release in the hippocampus is necessary for the recognition of a novel spatial configuration, as depletion of catecholamines in the hippocampus impaired such novelty detection process and subsequent memory formation. This, in sum with our previous findings showing that cortical dopamine signals gustatory novelty lead us to propose that impaired dopaminergic neurotransmission damage novelty/familiarity recognition that causes agnosia and memory impairment. Together, these results further support the notion that therapy based on dopaminergic stimulation might have beneficial effects on the cognitive function of AD patients and may contribute to slow the progression of this pathology.

Resumen

Evidencias experimentales acumulativas muestran que la neurotransmisión dopaminérgica está alterada de la enfermedad de Alzheimer (EA). Sin embargo dicha alteración, se ha asociado principalmente con síntomas no cognitivos de la enfermedad, a pesar de que la dopamina es un neuromodulador clave de la plasticidad sináptica y de que se ha mostrado que el potenciamiento de su actividad mejora la memoria en animales y pacientes con la EA. Por ello, planteamos el objetivo de estudiar la función de la neurotransmisión dopaminérgica en modelos de la enfermedad de Alzheimer y su contribución en las alteraciones de la plasticidad sináptica y la memoria. Además, otra línea de evidencias muestran que la dopamina y otras moléculas con una estructura relacionada, tiene la capacidad de interactuar directamente con el péptido beta amiloide (β A), inhibiendo así su agregación, o bien disgregando su forma insoluble, en modelos *in vitro*. Por lo que planteamos también estudiar el efecto protector de la dopamina sobre la acumulación del β A *in vivo*. El presente proyecto plantea estudiar la neurotransmisión dopaminérgica y la acumulación del β A como un proceso cíclico de retroalimentación positiva en la patología relacionada a la EA. Como primer componente del ciclo, plantemos estudiar el efecto de los niveles patológicos del β A en la función de la neurotransmisión dopaminérgica y sus consecuencias en la plasticidad sináptica y la memoria, y después estudiamos el efecto del daño en la neurotransmisión dopaminérgica sobre el progreso de la acumulación del β A, como el segundo componente del ciclo. En la primera parte de este trabajo, establecimos una relación nueva entre la neurotransmisión dopaminérgica y las alteraciones inducidas por el β A en la plasticidad de sinapsis corticales y su relación con el deterioro de la memoria. Encontramos que la deposición temprana de $A\beta$ en un modelo triple transgénico de la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD) y después de la administración intracortical de oligómeros del β A en ratones silvestres, deterioró la plasticidad sináptica, no sólo al punto de inhibir la inducción de potenciación a largo plazo (LTP), sino con la presentación de depresión a largo plazo (LTD). También encontramos que el aumento de los niveles corticales de dopamina mediante la administración nomifensina, un inhibidor de su recaptura, permitió la inducción de LTP y restauró la memoria. Más aún, la administración intracortical de 6-hidroxidopamina, una neurotoxina selectiva para neuronas catecolaminérgicas, eliminó los niveles corticales de dopamina en ratones silvestres y mimetizó el cambio de LTP a LTD inducido por el β A. Al estudiar el efecto protector de la dopamina sobre la acumulación del β A, encontramos que la administración de dopamina y de catecol en la corteza cerebral y el hipocampo de ratones 3xTg-AD, disminuye significativamente la acumulación del β A 24 h después del tratamiento. Además la administración sistémica de levodopa, molécula precursora en la biosíntesis de dopamina, durante 16 días disminuyó la acumulación del β A en los ratones 3xTg-AD. Estos resultados sugieren que la actividad dopaminérgica tiene un efecto protector sobre la acumulación del β A que puede ser mediado por la estructura química de la dopamina que interactúa con los agregados del β A, favoreciendo su degradación. Finalmente, planteamos extender nuestros hallazgos al hipocampo, para lo que estudiamos el efecto de la depleción de las catecolaminas en la memoria. Nuestros resultados revelan que la liberación de dopamina y norepinefrina en el hipocampo es necesaria para el reconocimiento de una configuración espacial novedosa. La depleción de las catecolaminas en el hipocampo deterioró este proceso de detección de la novedad y la subsecuente formación de la memoria. Lo anterior, en suma con nuestros hallazgos que muestran que la dopamina cortical señala el procesamiento de la novedad gustativa, nos conduce a proponer que las alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica dañan el reconocimiento de la novedad/familiaridad, lo que causa agnosia y alteraciones en la memoria. Nuestros resultados apoyan fuertemente que una terapia basada

en la estimulación dopaminérgica puede generar beneficios directos sobre la cognición de los pacientes con la EA, además de contribuir a detener o prevenir el progreso de esta patología.

Organización de la tesis

Este trabajo está dividido en seis secciones: Introducción, Planteamiento del problema, Hipótesis, Objetivos, Resultados y Discusión. En la sección de Introducción se presenta un marco teórico general sobre la enfermedad de Alzheimer (EA), donde se revisa las bases genéticas de la enfermedad, el procesamiento aberrante de proteínas, la desregulación del ciclo celular y algunos modelos experimentales empleados en su estudio de la EA. Dicha revisión corresponde a la publicación *La enfermedad de Alzheimer* en el libro "Aspectos moleculares del envejecimiento". Enseguida, se presenta una revisión de la EA como una falla sináptica y se revisa el papel del péptido beta amiloide en las alteraciones sinápticas relacionadas a la EA y los mecanismos de plegamiento patológico y acumulación del péptido. Finalmente en la Introducción se abordan las alteraciones neuroquímicas en la EA y se revisan los antecedentes directos de este trabajo, que estudia las alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica en la EA.

En la primera sección de Resultados se muestra que el incremento patológico de los niveles del βA tiene un efecto tóxico sobre las terminales catecolaminérgicas en la corteza, lo que origina una disminución en la liberación de dopamina y afecta la plasticidad sináptica y la memoria, y que corresponde a la publicación *Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid- β transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment*.

En la segunda sección de Resultados se demuestra el efecto protector *in vivo* de la dopamina, sobre la acumulación del βA y el progreso de la patología relacionada a la enfermedad de Alzheimer, que corresponde a un artículo que se encuentra en preparación para ser publicado con el título tentativo *Catecholamines reduce $A\beta$ accumulation in vivo by preventing misfolding and aggregation*. En la tercer sección de Resultados se presentan los hallazgos de experimentos enfocados a entender el papel de la dopamina en el hipocampo y las consecuencias del daño en la neurotransmisión dopaminérgica hipocampal en la memoria, que corresponden al artículo enviado publicación *Hippocampal release of dopamine and noradrenaline encodes novel contextual information*. Finalmente, se presenta una Discusión integral de los hallazgos del presente trabajo y las conclusiones generales de esta tesis.

1 Introducción

1.1 La enfermedad de Alzheimer

“La enfermedad de Alzheimer”

Moreno-Castila Perla & Tovar-Y-Romo Luis Bernardo. Capítulo del libro “Aspectos moleculares del envejecimiento”. Primera edición, México, 2012. Secretaría de Salud, Instituto de Geriátría. ISBN 978-607-460-281-4.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es un padecimiento neurodegenerativo que se caracteriza principalmente por la pérdida de la memoria y, en sus etapas más avanzadas, incapacita a los individuos afectados para llevar una vida independiente. Ocurre sobre todo en la vejez y, debido al fenómeno de envejecimiento poblacional que está sucediendo en México, constituye un problema de salud pública con impacto creciente. Aunque actualmente existe un avance significativo en el entendimiento de algunos procesos biológicos que subyacen a esta enfermedad, aún no se conocen con precisión los mecanismos responsables de su origen. Sin embargo, se sabe que el procesamiento aberrante de algunas proteínas, incluyendo a la proteína precursora del amiloide y la proteína tau, está involucrado de manera importante en la neuropatología de esta enfermedad. También se han descrito una serie de alteraciones genéticas que incrementan la susceptibilidad a padecer la enfermedad de Alzheimer.

A partir de estos hallazgos se han desarrollado modelos experimentales en los que se estudian los mecanismos celulares y moleculares que posiblemente contribuyen a la generación de las alteraciones neurológicas en este padecimiento. Estos modelos también son útiles para el desarrollo de las estrategias terapéuticas necesarias para brindar a los pacientes un tratamiento efectivo que detenga el progreso de esta enfermedad y que, en el mejor escenario posible, la reviertan. Este capítulo presenta una síntesis de las alteraciones genéticas, el procesamiento aberrante de proteínas y la desregulación del ciclo celular en la enfermedad de Alzheimer y algunos modelos experimentales empleados en su estudio.

INTRODUCCIÓN

A medida que la población mundial envejece, la enfermedad de Alzheimer (EA) cobra importancia como un problema de salud pública al ser la principal causa de demencia en adultos mayores de 65 años. La EA se caracteriza por un fuerte deterioro cognitivo y pérdida de la memoria; durante su progreso los pacientes pierden por completo la capacidad intelectual y la habilidad para desarrollar actividades básicas como vivir de manera independiente. A partir del inicio de la enfermedad, los pacientes sobreviven un promedio de 10-20 años y, por

lo general, mueren debido a complicaciones relacionadas a la EA como reflejos anormales, rigidez muscular, dificultad para mantener una postura adecuada, dificultad para deglutir y pérdida de peso, lo que en conjunto les confiere una mayor susceptibilidad a padecer enfermedades infecciosas como neumonía (Chouinard, 2000; Feinberg, 2003). A pesar de que la EA se describió por primera vez en 1906, actualmente permanece sin cura o tratamiento efectivo y es uno de los trastornos neurológicos que recibe mayor atención en la investigación básica y clínica y en el desarrollo de programas sociales para la atención a pacientes, familiares y cuidadores.

El síntoma predominante y característico de la EA es el declive cognitivo progresivo, principalmente debido a la pérdida de neuronas y sinapsis en el hipocampo (West, 1993). Además de los síntomas clínicos, se sabe que existen cambios patológicos en el cerebro que consisten en una marcada atrofia con una pérdida neuronal significativa, acompañados de la acumulación anormal de las proteínas beta amiloide (βA) y tau hiperfosforilada en patrones particulares de agregación. La identificación de la neuropatología típica en un análisis post mórtem permite el diagnóstico definitivo de la EA.

En cuanto a la etiología, a la fecha se han caracterizado varias mutaciones en genes que han sido implicados en esta enfermedad y se sabe que no sólo factores genéticos, sino también ambientales y su interacción, están involucrados en el desarrollo de la EA. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes se desconoce la causa de la enfermedad, a pesar de los avances que han permitido entender los factores heredables y de propensión a la EA y al mejor entendimiento de los mecanismos de acumulación de las proteínas βA y tau. Tampoco se sabe si la agregación de estas proteínas es la causa de la neurodegeneración o un marcador que acompaña el progreso de la enfermedad.

En este capítulo presentaremos los genes y mutaciones descritos en esta enfermedad, mismos que han permitido el diseño de modelos experimentales y cuyo estudio ha contribuido al entendimiento de los posibles mecanismos moleculares que causan la EA. Abordaremos las alteraciones celulares causadas por las proteínas mutadas en la EA y las fallas en la regulación del ciclo celular como mecanismos de la neurodegeneración en esta patología. Finalmente, describiremos algunos de los modelos

Mutaciones en las presenilinas 1 y 2.

Las mutaciones en los genes de presenilina son la causa más común de la EA familiar. Las presenilinas son proteínas transmembranales localizadas en el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico. PS1 y PS2 forman parte del complejo proteico de la β -secretasa y se piensa que son el núcleo catalítico de dicha proteasa, pero se desconocen sus funciones normales. En el nematodo *C. elegans* se describió un gen homólogo a PS1 cuyo transcrito corresponde a la proteína sel-12 que juega un papel importante en la diferenciación celular y es considerada un inductor de la neurogénesis (Levitan y Greenwald, 1995). PS1, al igual que sel-12, puede ser un gen mediador en la vía de señalización neurogénica de lin-12/Notch (Sternberg, 1988; Sternberg y Horvitz, 1989) y en mamíferos se ha visto que ratones deficientes en PS1 presentan numerosas alteraciones en procesos somatogénicos y neurogénicos (Shen *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997).

PS1 genera fragmentos peptídicos de proteínas transmembranales que regulan la expresión génica y la estabilidad de factores de transcripción (Koo y Kopan, 2004) y tiene efectos reguladores sobre las vías de supervivencia celular y proliferación PI3K/Akt y MEK/ERK (Pimplikar *et al.*, 2010). En consecuencia, la ausencia de las presenilinas en ratones doble mutantes provoca una neurodegeneración severa dependiente de la edad (Wines-Samuelson *et al.*, 2010).

La mayoría de las mutaciones en las presenilinas asociadas con la EA familiar se han descrito para PS1. Las mutaciones por inversión de este gen afectan a 18-50% de los casos de EA familiar de inicio temprano dependiendo de la familia estudiada y hasta ahora se han descrito 176 mutaciones diferentes en aproximadamente 390 familias (Citron *et al.*, 1997). Fenotípicamente, las mutaciones en PS1 aumentan la formación de los péptidos βA_{42} y βA_{43} mediante una ganancia de función dominante que altera la actividad de las secretasas (Citron *et al.*, 1997). En contraste, las mutaciones por inversión en PS2 tienen una incidencia muy baja en la EA familiar y se han descrito diferencias en la sintomatología clínica que presentan las familias con mutaciones en PS1 y PS2. De igual manera, se ha descrito que las mutaciones en PS1 y PS2 afectan diferencialmente el corte de la γ -secretasa, donde las mutaciones en PS2 parecen producir una menor acumulación de βA (Bentahir *et al.*, 2006).

La pérdida de las presenilinas afecta también la plasticidad sináptica. Las respuestas mediadas por los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA se alteran cuando existen mutaciones en estas proteínas (Pimplikar *et al.*, 2010). Se sabe también que la pérdida de la función de las presenilinas compromete la potenciación a largo plazo y la liberación de neurotransmisores (Pimplikar *et al.*, 2010).

Las mutaciones en las presenilinas también afectan procesos fisiológicos como la autofagia, un proceso celular esencial en la supervivencia de células con ciclos de vida largos. Con la edad se presenta un declive en la eficacia de este proceso (Madeo *et al.*, 2010), lo que se ha relacionado con desórdenes lisosomales que provocan cuadros neurodegenerativos severos (Bellettato y Scarpa, 2010; Cherra *et al.*, 2010; McCray y Taylor, 2008; Nixon *et al.*, 2008). El mecanismo propuesto para esta alteración se basa en una función recién descubierta de PS1 que tiene que ver con la N-glicosilación de la subunidad VO1A en la ATPasa vacuolar (vATPasa), una bomba de protones que se encarga de acidificar el interior de los lisosomas proporcionando el pH óptimo para el funcionamiento de las enzimas lisosomales responsables de los procesos de autofagia. Cuando hay un defecto en la glicosilación de esta subunidad, la localización de la vATPasa en la membrana lisosomal se pierde (Lee *et al.*, 2010). Es posible que las mutaciones de PS1 en la EA familiar causen la pérdida de la actividad lisosómica mediante un mecanismo similar. Una de las causas de la acumulación de proteínas en la EA que llevan a la muerte neuronal puede ser una deficiencia en la degradación lisosomal de proteínas. Las fallas lisosómicas conllevan también a una distrofia neurítica relacionada con el hinchamiento de los lisosomas conteniendo fragmentos proteínicos potencialmente neurotóxicos, incluyendo βA (Masliah *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1997).

Susceptibilidad genética a la EA por mutaciones en ApoE

La ApoE es una apolipoproteína presente en las lipoproteínas transportadoras de colesterol y lípidos. El gen de ApoE se encuentra ubicado en el cromosoma 19 y está conformado por cuatro exones que codifican para 299 aminoácidos. ApoE tiene tres alelos ($\epsilon 1$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$) que están definidos por polimorfismos en dos nucleótidos: rs429358 y rs7412, que codifican para tres isoformas de la proteína (ApoE1, ApoE3 y ApoE4). La isoforma más frecuente es ApoE3, que tiene Cys y Arg en las posiciones 112 y 158 respectivamente, mientras que

se debe a la patogenicidad de las mutaciones en APP y presenilinas, y que el péptido se acumula con el progreso de la enfermedad hasta formar los agregados tóxicos que originan la formación de marañas neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada, la muerte celular y la demencia (Hardy, 2006; Hardy y Higgins, 1992). Debido a que la EA esporádica presenta un fenotipo parecido, esta hipótesis considera un mecanismo similar desencadenado por factores ambientales o de susceptibilidad genética. La hipótesis de la cascada de amiloide se puede validar a medida que se demuestre el efecto en cascada que sugiere, para lo que es necesario establecer que la acumulación de β A tiene una relación causal con la acumulación de tau y ésta, a su vez, con la neurodegeneración.

Los casos de EA familiar ligados a mutaciones en APP también cursan con la acumulación patológica de tau y, además, los casos de EA familiar con mutaciones en PS1 presentan más placas seniles y marañas fibrilares que los casos de EA esporádica, lo que sugiere que mutaciones en PS1 causan un incremento en la acumulación de tau (Shepherd *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha propuesto un mecanismo para explicar cómo la acumulación de β A

origina la formación de las marañas, lo que representa un importante argumento en contra de esta hipótesis. Adicionalmente, se ha propuesto que la formación de placas seniles y marañas neurofibrilares puede ser producto de la neurodegeneración y no su causa.

Actualmente, esta hipótesis parte del envejecimiento como el principal factor de riesgo, donde adicionalmente se requiere un detonante que puede ser heredable, como las mutaciones descritas para la EA de tipo familiar, o esporádico que produzca la acumulación del péptido de β A (figura 1). A partir de esta acumulación patológica se puede correlacionar el tipo y grado de agregación del péptido con diferentes eventos patológicos que desenlazan en la neurodegeneración y la demencia.

Alteraciones de la proteína tau

En condiciones normales, la proteína tau juega un papel fundamental en la modulación de la formación de los microtúbulos. Sin embargo, una alteración en las señales reguladoras mediante un mecanismo aún desconocido disocia a la proteína tau de los microtúbulos, formando agregados intracelulares y produciendo una disfunción

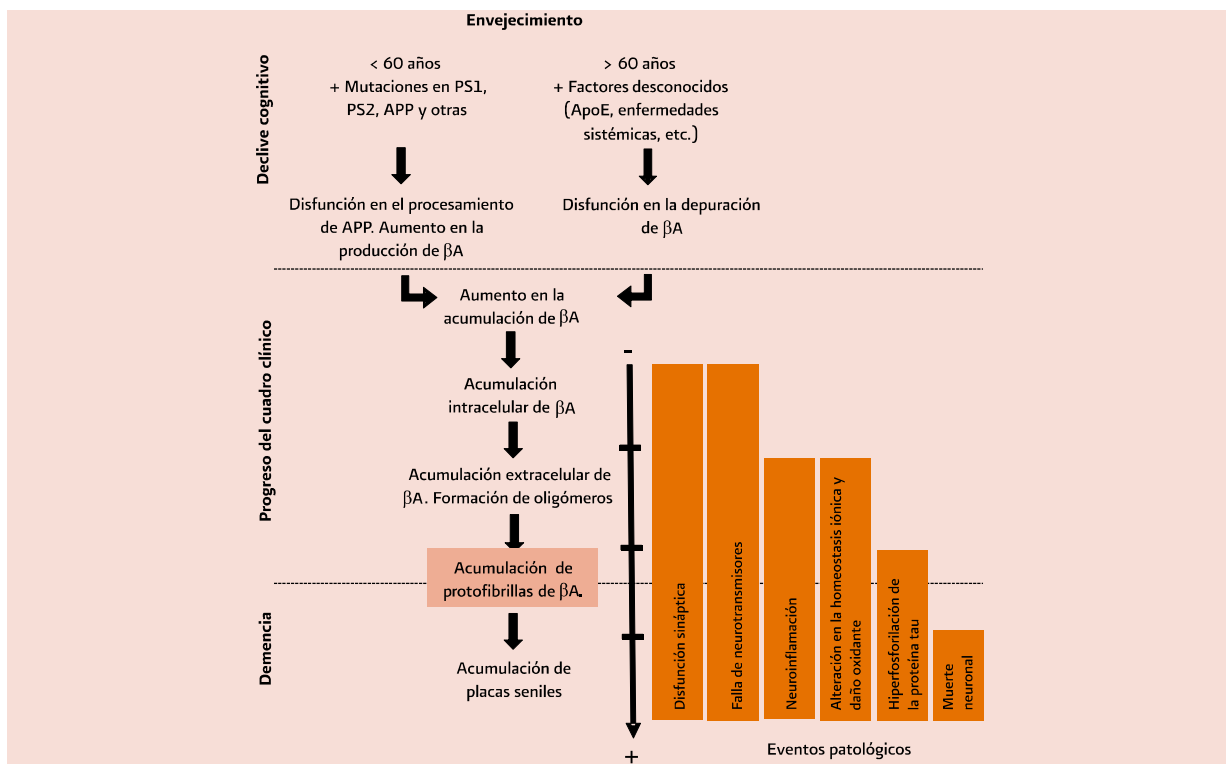


Figura 1. Hipótesis en cascada del amiloide. Este esquema integra la hipótesis de la acumulación del péptido β A como el origen de la EA con el progreso de eventos patológicos ligados a la evolución del cuadro clínico, considerando al envejecimiento como el principal factor de riesgo.

experimentales se han descrito algunos de los efectos tóxicos del péptido β A en estado soluble o en estados intermedios de agregación. Por ejemplo, la administración intracerebroventricular de este péptido resulta en un déficit en el aprendizaje en roedores viejos, mas no en jóvenes, que es independiente de la agregación del mismo y del proceso de inflamación que la acompaña (Malm *et al.*, 2006). También se ha reportado el efecto de β A sobre los sistemas de neurotransmisión colinérgico y glutamatérgico y se ha descrito que este péptido es capaz de alterar la actividad de la colin-acetiltransferasa, interactuar con los receptores nicotínicos para acetilcolina y modificar en general los procesos de aprendizaje y memoria (Tran *et al.*, 2002).

Se ha descrito que la inyección intracerebral directamente en el hipocampo y la corteza somatosensorial de un extracto celular rico en β A obtenido de ratones transgénicos de APP induce la acumulación de tau, lo que apoya la hipótesis que sostiene que β A es una molécula activadora de la patología mediada por tau (Bolmont *et al.*, 2007). La administración conjunta de β A y tiorfan, un inhibidor de la remoción de β A, causa en primates de mediana edad un aumento significativo en la acumulación intracelular de β A en neuronas de los ganglios basales, la corteza y el hipocampo, lo que va acompañado de atrofia y muerte neuronal (Li *et al.*, 2010). Este tipo de estrategias experimentales también ha permitido ensayar el efecto terapéutico de algunos fármacos; por ejemplo, la administración de T-817MA reduce las deficiencias cognitivas debidas a la neurodegeneración causada por la infusión del péptido (Kimura *et al.*, 2009).

Modelos transgénicos

Los primeros modelos transgénicos para la EA están basados en las mutaciones descritas para la EA familiar, a pesar de que éstas afectan sólo a un pequeño porcentaje de los casos. Muchas de las proteínas mutadas se han expresado en organismos invertebrados como *C. elegans* y *D. melanogaster* (Link, 2005). Los estudios en estas especies comenzaron con la identificación de los genes homólogos a APP, presenilinas, tau y ApoE para investigar el efecto de las deleciones correspondientes. Se demostró que el gen de APP en moscas (Rosen *et al.*, 1989) y en gusanos (Daigle y Li, 1993) carece de la secuencia que codifica para β A. La deleción del gen homólogo de APP en moscas no produjo alteraciones fenotípicas, pero

su sobreexpresión causó deficiencias en el proceso de eclosión embrionaria (Torroja *et al.*, 1999). En el caso de las presenilinas, los gusanos poseen dos genes homólogos para PS1 y PS2: sel-12, mientras que las moscas sólo uno: spe-4 (Link, 2005). Como mencionamos anteriormente, se ha descrito que sel-12 participa en la vía de señalización Notch. Las alteraciones causadas por la deleción de sel-12 en *C. elegans* pueden ser rescatadas al insertar los genes funcionales de presenilina humanos (Baumeister *et al.*, 1997).

En mamíferos, muchos de los estudios se han enfocado al desarrollo de roedores transgénicos que en su mayoría sobreexpresan alguna mutación en la APP en combinación con mutaciones presenilinas. Además se han descrito modelos transgénicos basados en alteraciones relacionadas con la proteína tau y la combinación de ambas estrategias. Uno de los primeros modelos generados en ratón emplea el promotor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que está altamente expresado en el sistema nervioso central, para dirigir la transcripción de un transgen humano con la mutación V717F en la APP. La línea generada se identifica como PDAPP, haciendo referencia a la combinación del promotor y la mutación en la APP (Games *et al.*, 1995; Masliah *et al.*, 1996).

En este modelo existe una mayor expresión del ARN mensajero que codifica para la APP humana mutada en relación con la APP silvestre del ratón (Rockenstein *et al.*, 1995), provocando la formación de placas de β A, neuritas distróficas, pérdida de las terminales presinápticas y activación de astrocitos y microglia, que correlacionan con un deterioro de la memoria en tareas espaciales y con problemas cognitivos en tareas asociativas a partir de los 6 meses de edad (Grelai *et al.*, 2002; Morgan, 2003).

También se han generado otros modelos que, de manera semejante, expresan una mutación humana en la APP bajo el control de otros promotores como el de la proteína prion (PrP) (Borchelt *et al.*, 1997; Hsiao *et al.*, 1996) o Thy1 (Andra *et al.*, 1996; Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997).

En estos modelos, la acumulación de β A comienza a los 12 meses de edad pero la coexpresión de una mutación en PS1 acelera la acumulación de β A desde los 4 meses (Borchelt *et al.*, 1997). Se han reportado diferencias en cuanto al tipo y tiempo de la acumulación de β A en

deben ser usadas como una herramienta predictiva y no de diagnóstico, pues conclusiones equivocadas debido a una interpretación sesgada o errada pueden acarrear consecuencias serias en el estado emocional de los individuos y en sus familias. Por otro lado, a pesar de que la evidencia genética disponible aún no permite obtener un diagnóstico temprano para el estudio de terapias, es innegable la importancia de esta información para el desarrollo de nuevas hipótesis y modelos que permitan entender los mecanismos que subyacen a la enfermedad. Dado el fenómeno de envejecimiento poblacional que está ocurriendo en México y en el mundo, el estudio de las enfermedades crónico-degenerativas que afectan principalmente a los adultos mayores adquiere una gran relevancia en diferentes ámbitos, incluyendo a la investigación biomédica básica.

REFERENCIAS

1. Alvarez A, Munoz JP y Maccioni RB. A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res*, 2001;264:266-274.
2. Alvarez A, Toro R, Caceres A, et al. Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett*, 1999;459:421-426.
3. Andra K, Abramowski D, Duke M, et al. Expression of APP in transgenic mice: a comparison of neuron-specific promoters. *Neurobiol Aging*, 1996;17:183-190.
4. Arendt T, Rodel L, Gartner U, et al. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 in Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 1996;7:3047-3049.
5. Armstrong RA. The pathogenesis of Alzheimer's disease: a reevaluation of the "amyloid cascade hypothesis". *Int J Alzheimers Dis*, 2011;2011:630865.
6. Baumeister R, Leimer U, Zweckbronner I, et al. Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate *Caenorhabditis elegans* Notch signalling independently of proteolytic processing. *Genes Funct*, 1997;1:149-159.
7. Bellettato CM y Scarpa M. Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis*, 2010;33:347-362.
8. Bentahir M, Nyabi O, Verhamme J, et al. Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem*, 2006;96:732-742.
9. Bolmont T, Clavaguera F, Meyer-Luehmann M, et al. Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *Am J Pathol*, 2007;171:2012-2020.
10. Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, et al. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*, 1997;19:939-945.
11. Borenstein AR, Copenhaver CI y Mortimer JA. Early-life risk factors for Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2006;20:63-72.
12. Borrell-Pages M, Zala D, Humbert S, et al. Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci*, 2006;63:2642-2660.
13. Busser J, Geldmacher DS y Herrup K. Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci*, 1998;18:2801-2807.
14. Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, et al. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet*, 1999;65:664-670.
15. Canevari L y Clark JB. Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection. *Neurochem Res*, 2007;32:739-750.
16. Citron M, Westaway D, Xia W, et al. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med*, 1997;3:67-72.
17. Cleveland DW y Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*, 2001;2:806-819.
18. Cruz JC, Tseng HC, Goldman JA, et al. Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron*, 2003;40:471-483.
19. Chan SL, Furukawa K y Mattson MP. Presenilins and APP in neuritic and synaptic plasticity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 2002;2:167-196.
20. Cherra SJ, 3rd, Dagda RK y Chu CT. Review: autophagy and neurodegeneration: survival at a cost?

47. LaFerla FM, Green KN y Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2007;8:499-509.
48. Lee JH, Yu WH, Kumar A, et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 2010;141:1146-1158.
49. Lee MS, Kwon YT, Li M, et al. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*, 2000;405:360-364.
50. Levitan D y Greenwald I. Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature*, 1995;377:351-354.
51. Li W, Wu Y, Min F, et al. A nonhuman primate model of Alzheimer's disease generated by intracranial injection of amyloid-beta42 and thiorphan. *Metab Brain Dis*, 2010;25:277-284.
52. Liebson E AM. Cognitive changes in dementia of the Alzheimer type. Philadelphia: Saunders WB 1994.
53. Link CD. Invertebrate models of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav*, 2005;4:147-156.
54. Maccioni RB y Cambiazo V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev*, 1995;75:835-864.
55. Maccioni RB, Munoz JP y Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res*, 2001a;32:367-381.
56. Maccioni RB, Otth C, Concha, II, et al. The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem*, 2001b;268:1518-1527.
57. Madeo F, Tavernarakis N y Kroemer G. Can autophagy promote longevity? *Nat Cell Biol*, 2010;12:842-846.
58. Mahley RW, Weisgraber KH y Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006;103:5644-5651.
59. Malm T, Ort M, Tahtivaara L, et al. beta-Amyloid infusion results in delayed and age-dependent learning deficits without role of inflammation or beta-amyloid deposits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006;103:8852-8857.
60. Masliah E, Mallory M, Deerinck T, et al. Re-evaluation of the structural organization of neuritic plaques in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1993;52:619-632.
61. Masliah E, Sisk A, Mallory M, et al. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 1996;16:5795-5811.
62. McCray BA y Taylor JP. The role of autophagy in age-related neurodegeneration. *Neurosignals*, 2008;16:75-84.
63. McShea A, Harris PL, Webster KR, et al. Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 1997;150:1933-1939.
64. Michikawa M, Fan QW, Isobe I, et al. Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J Neurochem*, 2000;74:1008-1016.
65. Morgan D. Learning and memory deficits in APP transgenic mouse models of amyloid deposition. *Neurochem Res*, 2003;28:1029-1034.
66. Mullan M, Crawford F, Axelman K, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*, 1992;1:345-347.
67. Nixon RA, Yang DS y Lee JH. Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy*, 2008;4:590-599.
68. Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*, 2006;26:10129-10140.
69. Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, et al. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2003a;24:1063-1070.
70. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 2003b;39:409-421.
71. Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, et al. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*, 1999;402:615-622.
72. Pimplikar SW, Nixon RA, Robakis NK, et al. Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci*, 2010;30:14946-14954.
73. Price JL, McKeel DW, Jr., Buckles VD, et al. Neuropathology of nondemented aging: presumptive

- al. Characterization of age-dependent and progressive cortical neuronal degeneration in presenilin conditional mutant mice. *PLoS One*, 2010;5:e10195.
101. Wong PC, Zheng H, Chen H, et al. Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature*, 1997;387:288-292.
102. Yang Y, Geldmacher DS y Herrup K. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2001;21:2661-2668.

RESUMEN CURRICULAR DE LOS AUTORES

Perla Moreno Castilla

Estudió la licenciatura en Química Farmacéutico Biológica y la maestría en Ingeniería en la Facultad de Química de la UNAM. Es profesora de asignatura en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y en la carrera de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Forma parte del personal académico del Departamento de Neurociencias Cognitivas del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Trabaja en el laboratorio de aprendizaje y memoria, donde estudia los trastornos de la transmisión neuroquímica durante el deterioro cognitivo en un modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer.

Luis B. Tovar y Romo

Licenciado en Investigación Biomédica Básica y doctor en Ciencias por la Universidad Nacional Autónoma de México. Especialista en mecanismos celulares y moleculares de la muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas. Ha trabajado en laboratorios de investigación básica en los institutos de Investigaciones Biomédicas y de Fisiología Celular de la UNAM, en el Instituto de Biología del Desarrollo de Marsella Luminy, del Instituto Nacional de Salud e Investigación Médica de Francia, y en el Departamento de Neurología de la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins en Estados Unidos. Ha sido investigador en Ciencias Médicas del Instituto de Geriatría y profesor de asignatura de la Facultad de Medicina de la UNAM. Actualmente es investigador postdoctoral en Johns Hopkins.

1.2 La enfermedad de Alzheimer como una falla sináptica

La EA es la enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central con más alta incidencia por lo que representa un serio problema de salud pública a medida que la población mundial envejece (Tom et al., 2015). En sus primeras etapas la patología afecta de manera exclusiva la memoria de quienes la padecen al tiempo que sus funciones motoras y sensoriales permanecen sanas (Selkoe, 2002). A pesar de que los primeros síntomas amnésicos que presentan los pacientes son variables, ocurren en ausencia de otros síntomas clínicos que puedan indicar daño cerebral. Inicialmente los pacientes pierden la capacidad de codificar nuevas memorias, con el progreso de la patología presentan afectaciones tanto en memorias declarativas (recuerdos que pueden ser evocados de forma consciente, como hechos o eventos específicos), como no declarativas (memorias procedimentales) y pierden su capacidad de razonamiento, abstracción y lenguaje (Selkoe, 2002).

Se propone que la pérdida sináptica y desconexión del hipocampo subyace a los primeros trastornos de la memoria en la EA (Shankar y Walsh, 2009). Basado en que una característica importante de la pérdida de memoria asociada con la EA y las alteraciones leves en la memoria (MCI) es la vulnerabilidad selectiva de la capacidad de consolidar nuevos recuerdos; mientras que se conserva la capacidad para evocar información de un pasado lejano. Esta deficiencia selectiva de la memoria reciente, junto con la rápida pérdida de la información recién adquirida resulta paradójica a los déficits observados en las amnesias del lóbulo temporal y en pacientes con daño en el hipocampo bilateral (Milner y Klein, 2016; Zola-Morgan et al., 1986). Adicionalmente, las alteraciones morfológicas y bioquímicas que correlacionan con los primeros síntomas de la EA sugieren que la principal afectación de la patología es en la función sináptica. Se ha mostrado que la pérdida sináptica correlaciona de manera más robusta con los déficits cognitivos que con la cantidad de placas seniles u ovillos neurofibrilares presentes en los cerebros (Terry et al., 1991). La cuantificación mediante microscopía electrónica o inmunohistoquímica de marcadores sinápticos ha documentado una disminución significativa de marcadores pre- y post- sinápticos en el hipocampo y cortezas adyacentes en cerebros con la EA (Masliah et al., 2001; Reddy et al., 2005; Sze et al., 1997). Por otra parte, se ha propuesto que la pérdida de las terminales sinápticas precede a la pérdida neuronal, dado que la disminución inicial en el número y densidad sináptica resulta desproporcionada en relación con la pérdida de los cuerpos neuronales (Bertoni-Freddari et al., 1996; Davies et al., 1987; DeKosky y Scheff, 1990). Basados en las evidencias anteriores, Selkoe desde 2002 y más tarde Shankar y Walsh en 2005, plantearon que en las primeras etapas de la EA, la función de las sinapsis encargadas de codificar memorias se daña de manera discreta e intermitente (Selkoe, 2002). Sin embargo a la fecha no se conoce con claridad el origen del daño sináptico y su mecanismo.

1.3 La disfunción sináptica y el péptido β A en la EA

Dado el planteamiento de la EA como una falla sináptica, resulta de especial interés la relación que guarda la acumulación de especies patógenas del péptido beta amiloide (β A) y la pérdida progresiva de sinapsis neuronales, de circuitos y redes (Palop y Mucke, 2010).

El péptido β A es producto de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP) y se ha relacionado con la patología de la EA porque se encuentra acumulado en forma de placas seniles en los cerebros de los pacientes. Sin embargo, a niveles fisiológicos se ha demostrado que el β A modula la transmisión sináptica, pues un incremento moderado en los niveles del β A potencia la transmisión sináptica (Puzzo et al., 2008), aumenta la probabilidad de

liberación de las vesículas sinápticas e incrementa la actividad neuronal (Abramov et al., 2009). Asimismo, la producción y secreción del β A al espacio extracelular, regula la actividad neuronal (Cirrito et al., 2005; Kamenetz et al., 2003.) Se ha demostrado que la actividad neuronal aumenta la producción del β A y por el contrario, el bloqueo de la actividad neuronal disminuye la producción del β A (Kamenetz et al., 2003). Por lo que se plantea que dentro de un rango fisiológico, pequeños aumentos en el β A facilitan principalmente funciones presinápticas, lo que resulta en potenciación sináptica.

En cuanto a los efectos sinápticos del β A relacionados a la patología, estudios *in vivo* e *in vitro* (Chapman et al., 1999; Walsh et al., 2002) han demostrado que los oligómeros del β A dañan la fuerza de la transmisión sináptica, que se refiere a el número de sinapsis individuales que conectan una neurona pre-sináptica con una neurona post-sináptica y afectan negativamente la neuroplasticidad que es la habilidad de las sinapsis para fortalecer o debilitar la fuerza de su conexión en función del tiempo. Tanto el fortalecimiento de las sinapsis a largo plazo o potenciación a largo plazo (LTP), como el debilitamiento de la fuerza sináptica a largo plazo o depresión a largo plazo (LTD) son procesos en los que la actividad de los receptores sinápticos NMDA tiene un papel central al originar cualquiera de los dos procesos, en función del aumento en la cantidad del calcio intracelular resultante ($[Ca^{2+}]_i$) en las espinas dendríticas y en función de la activación río abajo de cascadas de señales intracelulares específicas (Kullmann y Lamsa, 2007). La activación de receptores NMDA sinápticos y grandes aumentos en $[Ca^{2+}]_i$ son necesarios para la LTP, mientras que la internalización de los receptores NMDA sinápticos, la activación de receptores NMDA presinápticos y aumentos más discretos en el $[Ca^{2+}]_i$ son necesarios para la LTD. La inducción de LTP promueve el reclutamiento de receptores AMPA y el crecimiento de las espinas dendríticas, mientras que la inducción de LTD promueve la contracción de las espinas dendríticas y la pérdida sináptica (Kullmann y Lamsa, 2007). En relación a esto, se ha descrito que el β A a concentraciones elevadas produce una depresión sináptica, mediante la disminución del número de receptores sinápticos AMPA (Hsieh et al., 2006) y NMDA, lo que se asocia con la pérdida de dendritas glutamatérgicas (Shankar et al., 2007).

Los niveles patológicamente elevados del β A afectan la LTP (Cleary et al., 2005; Walsh et al., 2002) y aumentan la LTD (Hsieh et al., 2006a; Kim et al., 2001; Li et al., 2009). Lo que posiblemente se debe a que el β A en concentraciones altas causa un bloqueo parcial de los receptores NMDA y cambia la activación de cascadas de señalización dependientes de NMDA hacia vías de señalización implicadas en la inducción de LTD y pérdida sináptica (Hsieh et al., 2006; Kamenetz et al., 2003; Shankar et al., 2007). Aunque los mecanismos subyacentes a la inducción de LTD por los niveles del β A aún no han sido completamente aclarados, pueden implicar internalización (Hsieh et al., 2006; Snyder et al., 2005) o desensibilización de receptores (Liu et al., 2004) y posterior colapso de espinas dendríticas (Hsieh et al., 2006; Snyder et al., 2005)

En resumen, las evidencias experimentales han llevado a plantear que los efectos del β A en las sinapsis están en función del procesamiento de APP/ el β A y por lo tanto de la concentración del péptido. Niveles patológicamente elevados del β A, dañan la transmisión sináptica al producir depresión en las sinapsis. Sin embargo, los niveles anormalmente bajos se asocian con menor probabilidad de liberación de vesículas en la presinápsis y deficiencias en la transmisión sináptica; Dentro de un rango fisiológico, pequeños aumentos en el β A facilitan principalmente funciones presinápticas, lo que resulta en potenciación sináptica (ver Figura 1).

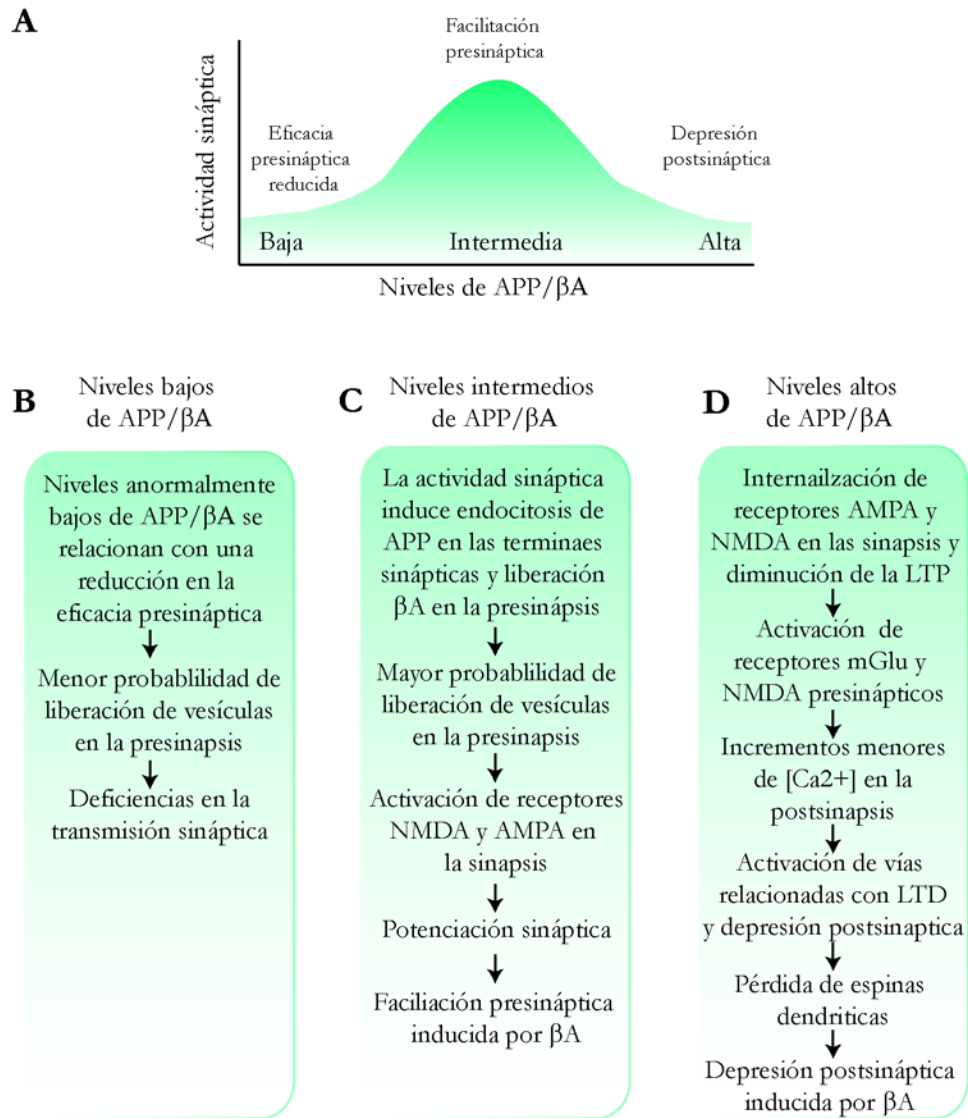


Figura 1| Regulación de la transmisión sináptica por el βA . (A) Relación hipotética entre los niveles del βA y la actividad sináptica. Los niveles anormalmente bajos de APP/ βA se asocian con una reducción de la eficacia presináptica. C) Los niveles intermedios del βA mejoran la actividad sináptica presináptica, pues dentro de un rango fisiológico, pequeños aumentos en el βA facilitan principalmente funciones presinápticas, lo que resulta en potenciación sináptica (Abramov et al., 2009; Puzzo et al., 2008). C) Finalmente, los niveles anormalmente altos del βA perjudican la actividad sináptica mediante el bloqueo de la LTP y la inducción de la depresión post-sináptica, pues el βA potencia los mecanismos relacionados con la LTD, lo que resulta en la depresión post-sináptica y la pérdida de espinas dendríticas (Kamenetz et al., 2003; Li et al., 2009; Shankar et al., 2007; Snyder et al., 2005). Figura modificada de Palop y Mucke (2010).

Un posible mecanismo del efecto patológico de niveles elevados del βA es el planteado por experimentos que muestran que en estas condiciones se bloquea la recaptura de glutamato en la sinapsis, lo que produce a un incremento en los niveles de glutamato en la hendidura sináptica, que en consecuencia activa a los receptores NMDA sinápticos (Li et al., 2009), causando su desensibilización y LTD. Además, el incremento de los niveles de glutamato puede activar a los receptores NMDA extra-sinápticos o de la región pre-sináptica enriquecida

en NR2B, que tienen un papel clave en la inducción de LTD (Liu et al., 2004). Otro factor involucrado en la facilitación de la LTD inducida por el β A es la activación de receptores de glutamato metabotrópicos pre-sinápticos (mGlu) (Hsieh et al., 2006; Li et al., 2009). Por lo tanto, se plantea que la depresión sináptica inducida por el β A puede ser consecuencia de un aumento inicial en la activación sináptica de los receptores NMDA a glutamato, seguido de la desensibilización de los receptores NMDA sinápticos, internalización de receptores NMDA y AMPA, y la activación de receptores NMDA pre-sinápticos y receptores mGlu (Palop y Mucke, 2010). Finalmente, se ha descrito que el bloqueo de las cascadas de señalización relacionadas con la LTD, tales como aquellas mediadas por receptores mGlu o p38MAPK, impide la inhibición de la inducción de LTP provocado por el β A (Wang et al., 2004), lo que apoya que la depresión sináptica inducida por el β A pueden ser la base de los déficits en la inducción de LTP en la patología relacionada a la EA.

Más allá de la posibilidad de que el β A sea la causa de la enfermedad o sólo una consecuencia del progreso de la patología, se ha documentado la estrecha relación del β A con la transmisión sináptica en condiciones normales, con lo que se plantea que el β A es parte de un mecanismo regulado que controla la actividad sináptica excitatoria en función de la concentración que alcance en procesos fisiológicos o patológicos (ver Figura 1).

1.4 Producción y degradación del péptido β A

El péptido β A es producido por la proteólisis secuencial de la APP, que es una proteína integral de membrana de tipo 1, conformada por 695-700 aminoácidos. La proteína APP es procesada ya sea por la β -secretasa (BACE1) o por la α -secretasa para generar dos fragmentos carboxilo terminal de 99 aminoácidos (CTF β) o de 83 aminoácidos (CTF α). Después, la γ -secretasa, una proteasa intermembranal, corta al fragmento CTF β , lo que produce el β A de 4 KDa. Por otro lado, el corte del fragmento CTF α , también por la γ -secretasa, produce un péptido más pequeño de 3 KDa, llamado P3 o A α (Figura 2). Además se han descrito otros productos de la proteólisis de la APP pero estos son producidos en cantidades menores (Vassar et al., 1999). El péptido β A puede variar en longitud desde los 38 hasta los 43 residuos, siendo el de 40 el que se encuentra en mayor proporción. La variante del péptido con 42 residuos se produce muy poco en condiciones normales (10% del total; LaFerla et al., 2007), pero se ha reportado que dicha variante es más hidrofóbica y más susceptible a agregarse (Younkin, 1998).

La proteína APP es sintetizada en el retículo endoplásmico y transportada al aparato de Golgi. Se ha reportado el tráfico de APP desde el sistema de Golgi trans hasta la superficie celular y su secreción hacia el espacio extracelular (Sisodia, 1992). Después de estar en la superficie celular, APP puede ser reciclada de regreso al aparato de Golgi, para ser empacada y continuar su tráfico (Rogaeva et al., 2007) o puede ser reinternalizada desde la superficie celular en el sistema endosomal-lisosomal, mediante endocitosis (Greenfield et al., 1999; Hartmann et al., 1997). Se ha planteado que la producción del β A a partir del corte de APP puede ocurrir en una gran variedad de organelos donde residen APP y las β - y γ -secretasas. Lo que coincide con que se ha reportado la presencia del β A en numerosos compartimentos celulares como el retículo endoplásmico, los complejos de Golgi, mitocondrias, endosomas, lisosomas, cuerpos multivesiculares, en el citosol (LaFerla et al., 2007a) y en vacuolas autofágicas (Yu et al., 2005). Sin embargo, aún no es del todo claro cómo se localiza la producción del β A dentro de la célula. En relación a esto, estudios *in vitro* han reportado que en condiciones normales hay una pobre colocalización del β A con marcadores de organelos como el sistema de Golgi trans, vesículas derivadas del sistema de Golgi, endosomas tempranos y tardíos, lisosomas y

vesículas. Mientras que el péptido se puede encontrar en el citosol y otros compartimentos no determinados (Zheng et al., 2012). El hecho de que en cerebros de pacientes con la EA, los péptidos del βA se encuentren acumulados en los organelos antes mencionados (Cataldo et al., 2004; Yu et al., 2005), ha sugerido que en condiciones normales la célula puede llevar a cabo una digestión proteolítica rápida del βA y que esto cambia con el desarrollo de la patología (Zheng et al., 2012).

Un modelo integral que puede explicar la compartimentalización de la producción del βA sugiere que una vez que APP ha sido transportada a la superficie celular, en condiciones normales, es procesada por la α -secretasa. La APP que no es procesada por dicha enzima, se internaliza en vesículas endocíticas donde es procesada por BACE1 y por la γ -secretasa (vía amiloidogénica), con lo que se forman péptidos del βA que son transportados por vesículas de reciclaje (Baranello et al., 2015). Sin embargo, esta propuesta no considera los casos en los que no hay sobreproducción de APP, por lo que el cambio que ocurre en la distribución intracelular del βA en condiciones normales y patológicas, queda por ser aclarado.

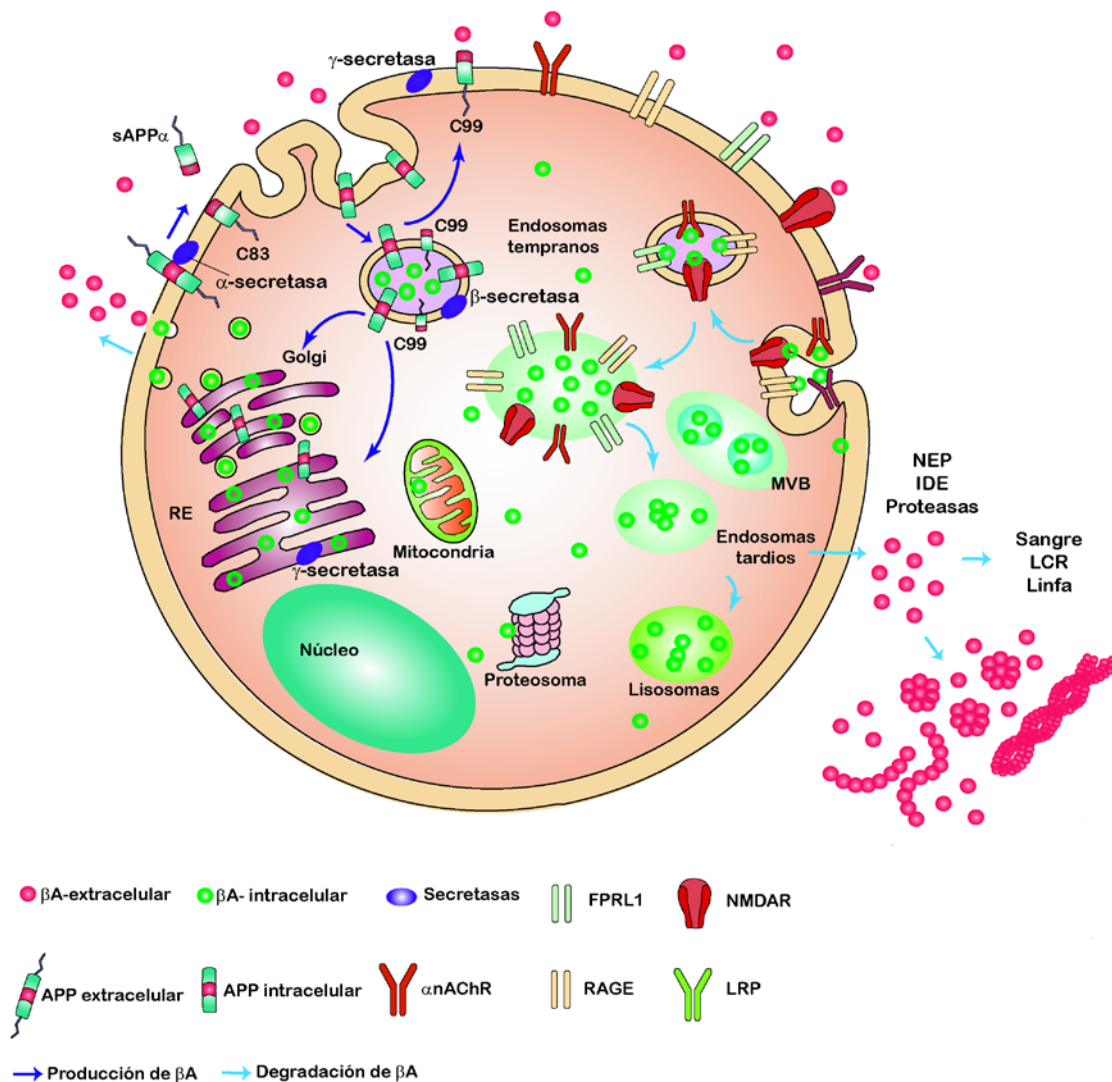


Figura 2| Mecanismos de producción y degradación del β A. El péptido β amiloide (β A) es producido en el retículo endoplásmico (RE) y el sistema de Golgi dentro de la vía de producción constitutiva. La proteína precursora de amiloide (APP) es movilizada a la membrana plasmática, donde es cortada de manera predominante por la α -secretasa, lo que resulta en la generación del fragmento sAPP α hacia el espacio extracelular y el fragmento C83 de 83 aminoácidos. La APP que no se procesó de esta forma se internaliza en endosomas tempranos. La APP además puede ser reciclada de vuelta al aparato de Golgi en endosomas. Los endosomas tempranos contienen la enzima BACE1 que su pH óptimo, cortan APP lo que resulta en un fragmento de 99 aminoácidos conocido como C99. EL fragmento C99 puede ser enviado de vuelta al RE donde es procesado a β A mediante la γ -secretasa, o también puede ser enviado de vuelta a la membrana citoplasmática donde también se encuentra la γ -secretasa y se produce el β A hacia el espacio extracelular. Además el fragmento C99 puede ser procesado al β A en el sistema endosoma/lisosoma. El β A extracelular puede unirse a receptores en la superficie de la celular (por ejemplo el LRP, RAGE, FPRL1, NMDA y α nAChR). El complejo β A-receptor resultante es internalizado en endosomas tempranos. La acumulación intracelular del β A se concentra predominantemente en cuerpos multivesiculares y en lisosomas pero además en la mitocondria, RE, en el aparato de Golgi y en el citosol, donde se sabe que afecta la función del proteosoma. α nAChR, receptor α nicotínico; MVB, multivesicular body; NMDA, N-metil-D-aspartato; RAGE, receptor for advanced glycation end products; LRP, receptor relacionado a LDL; FPRL1 FMLP-receptor-like protein; NEP, nepresilina; IDE, enzima degradadora de insulina; LCR, líquido cefalorraquídeo. Modificado de Baranello et al., 2015 y LaFerla et al., 2007.

Dada la relevancia del β A en la función sináptica y que su función está en dependencia de la concentración que alcance en la sinapsis (Palop y Mucke, 2010), resulta sumamente importante la función de los mecanismos de limpieza y degradación del péptido β A. Además, la desregulación de los sistemas involucrados en el aclaramiento y degradación del péptido β A ha generado interés en la última década debido a su potencial terapéutico (Love 2004) y a que cada vez más evidencias sugieren que la degradación deficiente del β A tiene una mayor contribución en la EA que la sobreproducción del péptido (Bateman et al., 2006). Sin embargo, los sistemas de degradación del β A son complejos e inespecíficos ya que incluyen proteasas del péptido, la degradación por proteosoma y la degradación por captura y fagocitosis por células como la glía, astrocitos y macrófagos (Ries y Sastre, 2016).

Las dos principales vías de proteólisis celular son el sistema ubiquitin-proteosoma (UPS) y el lisosoma. En relación al UPS, se ha descrito que el β A no es ubiquitinado directamente pero las marañas neurofibrilares de la proteína tau, están fuertemente ubiquitinadas (Pappolla et al., 1992). En la EA, se sugiere que las vías relacionadas con el sistema UPS evitan el desarrollo de marañas neurofibrilares, más que con la acumulación del β A (Manetto et al., 1988; Pappolla et al., 1992). Por otro lado, el procesamiento por lisosomas involucra la formación de organelos que contienen proteasas e hidrosalas ácidas y que son capaces de internalizar proteínas mediante una endocitosis mediada por receptor. Se ha demostrado que tanto los endosomas como las vacuolas autofágicas se acumulan en el cerebro de los pacientes con la EA y en los modelos transgénicos para la EA y que estos colocalizan con la γ -secretasa, APP y CTF- β (Nakanishi et al., 1997). Además, los procesos alterados de autofagia reducen la cantidad del β A intracelular debido a que se inhibe la secreción del péptido por defectos en la exocitosis, lo que origina un incremento en la acumulación intracelular del β A en vesículas (Nilsson et al., 2013). Finalmente, hay evidencias que indican que las alteraciones en el procesamiento por lisosomas son un evento temprano en la EA, ya que se ha reportado que las neuronas en áreas vulnerables a la patología, como la corteza entorrinal y el hipocampo incrementan la producción de componentes del sistema lisosomal en etapas tempranas de la EA (Li et al., 2012) y que en el envejecimiento hay un incremento en la expresión de componentes del sistema lisosomal-endosomal y un incremento en la localización de aspartil proteasas (Cataldo et al., 1996; 1997).

Además de las principales vías de eliminación de proteínas que son el sistema proteosoma y el sistema lisosomal-endosomal, las células pueden emplear enzimas de actividad proteolítica para mantener la proteostasis. Una de ellas es la enzima degradadora de insulina (IDE) que es una endopeptidasa dependiente de zinc que se localiza en el citosol, en el peroxisoma y en la superficie celular. La IDE es responsable de la degradación de la insulina y el glucagón (Qiu et al., 1998) y se ha reportado que en neuronas se encuentra asociada a la membrana plasmática y que puede ser secretada al espacio extracelular (Betts et al., 2008; Bulloj et al., 2008). Aunque la IDE es predominantemente citoplásmica, se ha detectado su actividad enzimática en el medio extracelular, donde podría degradar el β A, y se ha propuesto como el mecanismo principal de degradación del β A soluble en el cerebro humano (Pérez et al., 2000). Lo anterior es apoyado por evidencias que han mostrado que los niveles de IDE están aumentados en el hipocampo de pacientes con la EA (Zhao et al., 2007) que la depleción de dicha enzima en un modelo knockout produce un incremento del 64% en los niveles del β A 40 en comparación con los ratones control (Farris et al., 2003; Miller et al., 2003). Además, hay una correlación inversa entre la expresión de IDE y el envejecimiento (Hardy, 2004).

La neprilisina (NEP), es una endopeptidasa de membrana acoplada a zinc que es sintetizada en el aparato de Golgi y transportada a la superficie celular donde su ectodominio es expulsado al espacio extracelular. Se ha reportado una disminución en NEP en cerebros de pacientes con la EA, en particular en regiones vulnerables al desarrollo de la patología (Yasojima et al., 2001) y en función del aumento en los niveles del β A (Carpentier et al., 2002). Se ha demostrado que la NEP presináptica degrada de manera eficiente el β A y que retarda el desarrollo de la patología amiloide (Apelt et al., 2003). También se ha reportado que las placas del β A colocalizan con astrocitos reactivos que expresan niveles elevados de NEP (Apelt et al., 2003). En resumen, la NEP y probablemente la IDE son las principales enzimas que podrían tener actividad proteolítica sobre el péptido β A en el espacio extracelular.

1.5 Plegamiento patológico y acumulación del péptido β A

De manera clásica, se considera que la histopatología de la EA se caracteriza por la presencia de marañas intracelulares y placas seniles extracelulares. Las placas están formadas por depósitos amiloideos insolubles, constituidos principalmente por agregados del β A en su forma fibrilar. Previo a la formación de fibrillas, el β A forma una variedad de estructuras en su estado monomérico y oligomérico, entre las que se encuentran los oligómeros de bajo peso molecular y los oligómeros mayores. A partir de las diferentes formas de oligómeros, se forman las protofibrillas y las fibrillas maduras (Figura 3). Inicialmente se consideraba que las fibrillas del β A eran los agentes responsables de las principales características de la EA, la muerte celular y la pérdida de memoria. Sin embargo, los resultados de la investigación en las últimas décadas han sugerido que las fibrillas maduras no son el principal agente tóxico, si no las especies prefibrilares, oligoméricas del péptido (Ahmed et al., 2010; Chimon et al., 2007; Teplow, 2013). El péptido β A forma oligómeros de una gran diversidad en tamaño y estructura, pero todos los agregados comparten la estructura de hoja β -plegada (Kayed et al., 2003). Sin embargo, la toxicidad de los oligómeros parece no estar relacionada a la estructura β -plegada que tienen en común, ni con su tamaño. En cambio se propone que su toxicidad se relaciona con la conformación tridimensional que adoptan pues los oligómeros del mismo tamaño, que dejan expuestos segmentos del péptido enriquecidos con residuos hidrofóbicos hacia el solvente, muestran mayor toxicidad celular y alteración de los lípidos de membrana, en comparación con oligómeros con una región más hidrofílica expuesta (Ladiwala et al., 2012).

La caracterización estructural de los oligómeros del β A no ha sido completada debido a que poseen una naturaleza heterogénea, pueden interconvertirse y son insolubles, por lo que se dificulta la resolución atómica de estas estructuras (Diaz-Espinoza y Soto, 2012; Eisenberg y Jucker, 2012). Sin embargo, se han obtenido algunas estructuras oligoméricas de baja resolución atómica. Usando microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM), se ha mostrado consistentemente que los oligómeros mayores tienen una forma globular o anular que exhibe un poro (Conway et al., 2000; Janson et al., 1999; Lashuel et al., 2002). Otros estudios se ha mostrado la formación de pentámeros y decámeros del β A 42 en forma de disco. Se ha reportado que la estructura que adoptan los oligómeros es diferente cuando se agregan en fibrillas; el análisis infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) ha mostrado que los oligómeros del β A poseen una estructura de hoja β plegada antiparalela, mientras que las fibrillas del β A poseen arreglos de hoja β -plegada paralelas (Cerf et al., 2009; Eckert et al., 2008; Habicht et al., 2007). También se ha reportado que la distancia de empaquetamiento y ensamblaje varía entre oligómeros y fibrillas del β A (Ahmed et al., 2010) y que los oligómeros muestran mayor difusión, hidrofobicidad y la capacidad de interactuar con las membranas (Broersen et al., 2010), lo que podría explicar su toxicidad. Así mismo, el apilamiento de segmentos idénticos entre diferentes hojas β -plegadas dentro de un oligómero sugiere que los oligómeros prefibrilares pueden interconvertirse a fibrillas (Gu et al., 2014)

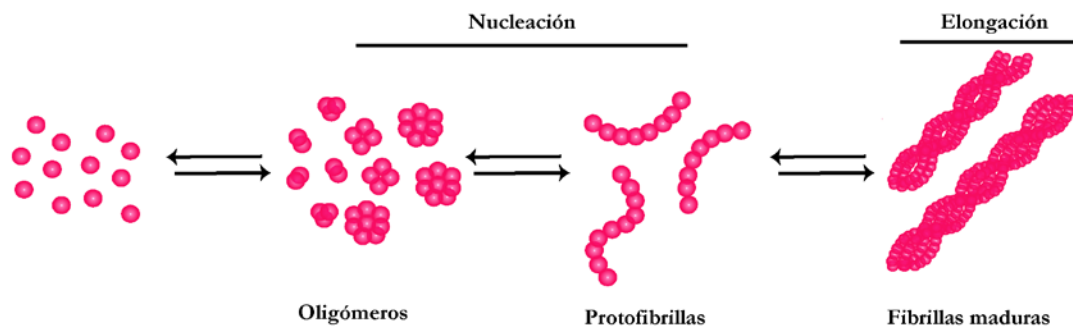


Figura 3| Vía de agregación del péptido β A. Estados de agregación del péptido en la fase de nucleación y de elongación, que culminan en la formación de las placas seniles difusas y densas. Modificado de Salahuddin et al., 2016.

La estructura de las protofibrillas se asemeja a la de las fibrillas maduras. La estructura de protofibrillas es de forma alargada y lineal. Sin embargo, las protofibrillas carecen de una estructura de orden superior y de la periodicidad presente en las fibrillas maduras. Las protofibrillas son curvilíneas, más delgadas (por lo general menos de 10 nm de diámetro) y más cortas (por lo general por debajo de 400 nm de longitud) que las fibrillas (Goldsbury et al., 2000; Walsh et al., 1999). Las fibrillas maduras están formadas por dos a seis protofibrillas que se tuercen una alrededor de la otra para formar una estructura superenrollada similar al de una cuerda que tiene de 7-13 nm de ancho (Dobson, 1999; Serpell et al., 2000; Sunde y Blake, 1997). Las protofibrillas pueden también asociarse lateralmente para formar cintas largas que van de 2-5 nm de espesor y alcanzan hasta 30 nm de ancho (Bauer et al., 1995; Saiki et al., 2005). El núcleo de las fibrillas maduras se encuentra deshidratado debido al empaquetamiento de los residuos hidrofóbicos hacia dentro de las fibrillas (Sawaya et al., 2007). Además la complejidad en la formación de las fibrillas maduras del β A, se deben a las

interacciones cuaternarias de los protofilamentos que se enroscan y pliegan juntas para formar fibrillas maduras (Sawaya et al., 2007).

La importancia de conocer las características de los diferentes agregados del β A radica en que dichos estudios han llevado a explorar diferentes aproximaciones terapéuticas encaminadas a prevenir la oligomerización y subsecuente agregación del β A. Por ejemplo, el estudio de moléculas pequeñas que inhiben la oligomerización del péptido como los polifenoles, la curcumina y moléculas aromáticas como los alcaloides, flavonoides y glicósidos (Salahuddin et al., 2016). También se ha estudiado la neutralización de las especies oligoméricas mediante la inmunoterapia (Bard et al., 2000; Schenk et al., 1999) y los bloqueadores de hojas β -plegadas que consisten en péptidos sintéticos pequeños que tienen la capacidad de unirse al β A sin formar parte de la estructura β -plegada y de esta manera inhibir la agregación (Soto et al., 1998). Además, la descripción de los mecanismos de mal-plegamiento y acumulación del β A, permite el entendimiento de los mecanismos tóxicos que genera. Por ejemplo, se ha planteado que los oligómeros del β A se incorporan a la membrana para formar canales que perturban la homeostasis de Ca^{2+} , lo que produce una cascada de eventos que consiste en la formación de radicales libres, la degeneración de las sinapsis, la fosforilación de tau y finalmente en la muerte neuronal (Kawahara et al., 2011; Salahuddin et al., 2016).

1.6 Las alteraciones en la neurotransmisión como blanco inicial de la patología de la EA

Los primeros análisis neuroquímicos en cerebros de pacientes con la EA mostraron que las enzimas implicadas en la síntesis y metabolismo de la acetilcolina estaban seriamente afectadas (Davies y Maloney, 1976). A partir de este hallazgo y dada la importancia de la acetilcolina en los procesos de memoria, se planteó la hipótesis colinérgica de la EA. Dicha hipótesis postula que las alteraciones en la memoria que sufren los pacientes con la EA se debe a la pérdida de las neuronas colinérgicas, responsables de la liberación de este neurotransmisor en regiones cerebrales implicadas en los procesos de memoria, como el hipocampo (Francis et al., 1999). La relevancia de esta hipótesis es tal, que los tratamientos aprobados para la EA están dirigidos a compensar la pérdida de este neurotransmisor. Los beneficios de estos tratamientos son moderados a corto plazo, en el mejor de los casos. Sus efectos consisten en aminorar los síntomas cognitivos, funcionales y de comportamiento de los pacientes. Sin embargo, no impactan en la progresión de la enfermedad (Galimberti et al., 2013). Además, el tratamiento con inhibidores de acetilcolinesterasa tiene una eficiencia cuestionable y recientemente se ha propuesto que las afectaciones en acetilcolina son un efecto tardío en la enfermedad, dado que se ha reportado que la muerte de las neuronas colinérgicas se relaciona a la acumulación de Tau hiperfosforilada, una vez que la patología está avanzada (Craig et al., 2011).

Además de las alteraciones en la neurotransmisión colinérgica, se conocen las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica relacionadas a la EA. Se ha encontrado que los niveles elevados del β A bloquean la recaptura de glutamato en la sinapsis, lo que produce a un incremento en los niveles de glutamato en la hendidura sináptica, que en consecuencia activa a los receptores NMDA sinápticos (Li et al., 2009). Por lo anterior, las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgicas están asociadas a eventos tempranos de la EA y hoy en día el uso de la memantina, es un tratamiento aprobado para la EA. La memantina es un antagonista del receptor para glutamato NMDA, por lo que la inhibición del receptor protege la sinapsis y a las células de la citotoxicidad mediada por glutamato, rescatando por un periodo entre 6-18 meses funciones cognitivas de forma moderada. Sin embargo, es un

recurso de última instancia por sus efectos secundarios (Galimberti et al., 2013). Lo anterior destaca la necesidad de encontrar nuevos blancos terapéuticos para la EA.

1.7 Alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica en la EA

Estudios *post mortem* en cerebros de pacientes con la EA han demostrado disminución significativa de dopamina en regiones como el hipocampo, el giro cingulado, la amígdala, el estriado, los núcleos *raphe*, el caudado y *el locus coeruleus* (Martorana y Koch, 2014a; Nazarali y Reynolds, 1992; Storga et al., 1996; Wenk, 2003), así como una disminución de levodopa y su metabolito DOPAC (ácido 3,4-diidroxifenilacético) (Storga et al., 1996). También se ha encontrado una marcada pérdida de receptores dopaminérgicos D₁ y D₂ en los lóbulos temporales y frontales, siendo estas regiones asociadas con funciones cognitivas (Kempainen et al., 2003; Kumar y Patel, 2007; Martorana et al., 2010). No solamente se ha reportado una disminución de la concentración del neurotransmisor y sus receptores, sino también pérdida de fibras catecolaminérgicas (Kalaria y Andorn, 1991). Esto impacta de manera directa en el desarrollo de la demencia y el declive cognitivo en los pacientes si los niveles de dopamina se encuentran alterados (Martorana y Koch, 2014). Se plantea que la función dopaminérgica comienza a alterarse con el envejecimiento, dado que las neuronas y transportadores de dopamina disminuyen en el hipocampo y en la corteza frontal, incrementando la probabilidad del desarrollo de problemas motores y demencia (Bäckman et al., 2010; Volkow et al., 1994).

La deficiencia en la transmisión dopaminérgica tiene implicaciones considerables sobre los procesos de aprendizaje y memoria. Los receptores dopaminérgicos D₁/D₅ juegan un papel importante en la cognición, mediando fenómenos de plasticidad y aspectos específicos de la función cognitiva, incluyendo procesos de memoria (Dalley y Everitt, 2009). La dopamina es un modulador clave en la plasticidad sináptica (Lisman et al., 2011; Pignatelli y Bonci, 2015) y la administración de fármacos que estimulan la actividad dopaminérgica mejora el aprendizaje en humanos (Nitsche et al., 2009; Shearman et al., 2006). De manera interesante, Pinessi y colaboradores (1987), encontraron que la severidad de la pérdida de inervación monoaminérgica tiene una correlación con la severidad de la demencia. Más aún, pacientes con la EA mostraron efectos positivos inesperados en el desempeño cognitivo y la plasticidad cortical al recibir tratamiento con fármacos potenciadores de la neurotransmisión dopaminérgica (Koch et al., 2014; Martorana y Koch, 2014).

En modelos animales para la EA se han presentado evidencias que muestran un efecto negativo de la acumulación del β A sobre el sistema dopaminérgico. Estudios realizados en el modelo murino de la EA APP_{swE}/PS1 Δ E9 que presenta la patología amiloide y déficits cognitivos (Savonenko et al., 2005) muestran degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas (Liu et al., 2008; Trillo et al., 2013). Se ha sugerido que los depósitos del β A insoluble no son los agentes tóxicos, sino las formas oligoméricas más pequeñas del β A (Liu et al., 2008). Los ratones APP23 que sobre-expresan la mutación sueca (K670M/N671L) muestran una disminución significativa en la densidad de fibras positivas a TH (Tirosina Hidroxilasa) en la formación hipocampal así como en la neocorteza dorsolateral. Además, el daño significativo y la pérdida de fibras positivas a TH se ha detectado en la cercanía de depósitos del β A en estos ratones (Diez et al., 2003). Los ratones 5xFAD que poseen cuatro mutaciones relacionadas a la acumulación del β A y una mutación para la formación de agregados hiperfosforilados de tau, también muestran una disminución en la expresión de TH en núcleos catecolaminérgicos (Kalinin et al., 2012). En ratas, se ha descrito que la infusión

del β A 40 en el *núcleo accumbens* inhibe la liberación de dopamina que se produce con agonistas colinérgicos en esta región (Preda et al., 2008), y la administración del β A 42 también disminuye los niveles corticales de dopamina y su liberación inducida por alto potasio (Trabace et al., 2007a).

Jürgensen y colaboradores (2011), reportaron que la administración del agonista dopaminérgico SKF81297 previene la inhibición de la LTP inducida por el β A soluble en rebanadas de hipocampo de rata. La activación de receptores D_1/D_5 por medio de SKF81297, incrementó la inserción sináptica de receptores NMDA y AMPA. Como resultado, hay un incremento de actividad del receptor NMDA y de la potenciación sináptica (LTP). Estos resultados implican que la actividad dopaminérgica puede compensar la disfunción de mecanismos de plasticidad sináptica inducidos por la presencia de oligómeros del β A.

El ratón triple transgénico (3xTg-AD) muestra deficiencias en la memoria relacionadas a la edad y progreso de la patología y presenta alteraciones en la plasticidad sináptica (Oddo et al., 2003). Un estudio que realizamos en nuestro laboratorio y que es antecedente directo de este proyecto, evaluó la función dopaminérgica en el modelo 3xTg-AD. Evaluamos el desempeño cognitivo de los ratones 3xTg-AD en la prueba de memoria de reconocimiento de objetos nuevos (ORM), encontramos que a diferencia del ratón silvestre de la misma edad, los ratones transgénicos de 10 meses no distinguieron un objeto previamente presentado respecto a un objeto novedoso. Durante la adquisición de la tarea, se cuantificó la concentración extracelular de varios neurotransmisores en la corteza insular (CI) e hipocampo, regiones relevantes para la memoria, y se observó que los animales transgénicos tenían un déficit en la liberación de dopamina cuando exploran los objetos por primera vez. La administración de nomifensina, un inhibidor de la recaptura de la dopamina, mejoró el desempeño conductual de los ratones. Estas observaciones muestran que en el ratón transgénico de 10 meses presenta un déficit en la neurotransmisión dopaminérgica asociada al progreso de la patología que desarrolla este modelo en función de la edad, lo que afecta la formación de la memoria de reconocimiento, la cual que puede ser restaurada con el incremento de niveles de dopamina (Guzmán-Ramos et al., 2012).

Ambrée y colaboradores (2009) encontraron que el incremento de los niveles de dopamina produce mejoras cognitivas por medio del tratamiento con levodopa, que ha sido utilizada previamente para tratar la enfermedad de Parkinson. La levodopa fue administrada a una dosis de 50 mg/kg durante 11 días a ratones transgénicos TgCRND8, un modelo que acumula el β A rápidamente al tener dos mutaciones de *APP* y presenta déficits cognitivos desde los 3 meses de edad. Una hora después de la administración de levodopa, les realizaron la prueba de ORM y memoria espacial. Encontraron que los animales con tratamiento de levodopa mejoran la ejecución de ambas tareas, igualando el desempeño del grupo control.

En estudios clínicos, la selegilina, un inhibidor de la enzima degradadora de monoaminas MAO-B (monoamino-oxidasa B), se ha utilizado para incrementar la concentración de dopamina y mostró efectos positivos en la cognición de los pacientes (Filip y Kolibás, 1999). Sin embargo, otro estudio con el mismo fármaco no mostró mejoras cognitivas en los pacientes con la EA (Freedman et al., 1998). A pesar de que diversas evidencias apuntan al daño en la neurotransmisión dopaminérgica en la EA, aún no se ha demostrado el mecanismo por el cual el sistema dopaminérgico es afectado en la EA, ni se ha presentado un vínculo directo entre algún componente de la patología y el daño en el sistema dopaminérgico.

1.8 Efecto de la actividad dopaminérgica en la agregación del β A

Un reporte interesante (Ono et al., 2013) muestra los efectos de agentes anti-Parkinsonianos sobre la formación de oligómeros del β A. Por medio de técnicas que permiten la formación y agregación artificial de oligómeros proteicos, estimaron la cantidad, tamaño y distribución de oligómeros del β A y su interacción con otras moléculas de manera similar a un estado *in vivo*. En sus resultados reportaron que tanto la levodopa como la dopamina exhiben potentes efectos anti-oligoméricos cuando se incuban *in vitro* con el β A 40 y el β A 42, impidiendo que estos péptidos se agreguen y formen oligómeros tóxicos. Los autores sugieren que estos efectos son resultado de una interacción molecular directa, donde compuestos con grupo catecol son buenos antioxidantes y se podrían unir de forma covalente y específica a el β A libre, impidiendo su agregación. Por consiguiente, la dopamina y la levodopa resultan relevantes para la EA, no sólo por su efecto sobre la neurotransmisión dopaminérgica, sino también por su efecto anti-oligomérico hacia el β A.

De manera similar, otro reporte (Li et al., 2004) encontró que la levodopa, la dopamina y otras catecolaminas disuelven fibrillas de alfa-sinucleína y del péptido β A generado *in vitro*. Las catecolaminas también inhibieron la fibrilación de estas proteínas. Además, los depósitos de alfa-sinucleína intraneuronales formados en un modelo de ratón se disolvieron mediante la incubación de secciones de tejido con levodopa. Los investigadores mostraron que estas catecolaminas son susceptibles a la oxidación, y que los productos de oxidación son más eficaces que los no oxidados en la inhibición. Más recientemente, Huang y colaboradores demostraron que el catecol y sus derivados, que incluyen a la dopamina, tienen un efecto inhibitorio dosis-dependientes en la formación espontánea de fibrillas del β A. Proponen que la actividad inhibitoria depende de la estructura química de los derivados de catecol, mediante la formación de un aducto con la quinona del catecol el β A por una base de Schiff, lo que representa un paso clave para el efecto de inhibición de la fibrilación del β A (Huang et al., 2010). Un estudio reciente demostró que el grupo catecol forma dicho aducto en específico con la lisina 16 y la lisina 18 del péptido β A 42, lo que representa el mecanismo por el cual los compuestos con este grupo tienen la capacidad de inhibir la agregación del β A y de disgregar péptidos ya agregados (Sato et al., 2013).

El grupo de Himeno (2011) probó que un agonista dopaminérgico D_1/D_2 inespecífico, llamado apomorfina, tiene efectos positivos en un modelo animal para la EA. A ratones 3xTg-AD de 6 meses, se les administró apomorfina vía subcutánea una vez a la semana durante 1 mes. Para evaluar su desempeño en la memoria espacial, realizaron la prueba del laberinto acuático de Morris (MWM) antes y después del tratamiento con apomorfina. Lo que encontraron fue que el tratamiento mejora el aprendizaje y ejecución en la memoria espacial y también disminuye el β A y los acumulados hiperfosforilados de tau en el hipocampo. En este estudio atribuyen el efecto de la apomorfina a sus propiedades como antioxidante y el incremento que produce sobre la actividad del sistema UPS y de la IDE. La relevancia de este trabajo yace en que representa una evidencia *in vivo* de que el tratamiento con un agonista dopaminérgico puede disminuir la histopatología relacionada a la EA, y producir una mejora en el desempeño de una tarea de memoria espacial en el ratón 3xTg-AD. Resulta especialmente interesante considerar que la apomorfina contiene en su estructura molecular un grupo catecol.

2 Planteamiento del problema

Considerando los antecedentes discutidos, este proyecto plantea el estudio de las alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica, su relación con la disfunción en la plasticidad sináptica y en la memoria, así como con el progreso de la histopatología relacionada con el EA. El proyecto incluye investigar tres planteamientos fundamentales (Figura 4): que la disfunción de la neurotransmisión dopaminérgica tiene un papel relevante en la plasticidad sináptica (i) y en la memoria (ii), y que la disminución de los niveles dopaminérgicos contribuye al progreso de la histopatología (iii). De tal manera que la disfunción dopaminérgica y la patología relacionada a la enfermedad de Alzheimer forman un proceso de retroalimentación positiva.

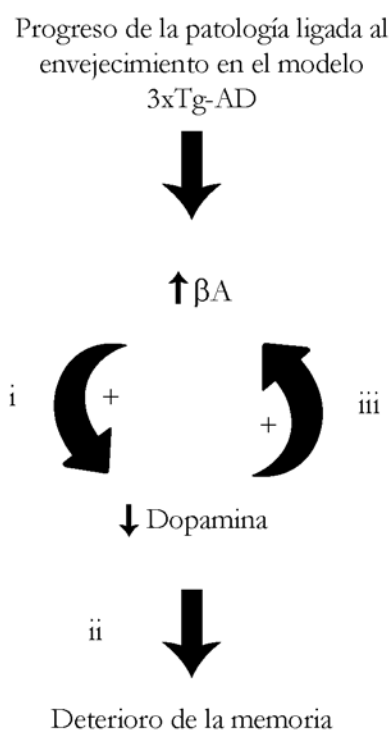


Figura 4| Planteamiento del problema. (i) Dado que encontramos que la disminución en la liberación de dopamina coincide con la acumulación del β A y no con la acumulación de tau en el modelo 3xTgAD (Guzmán-Ramos et al., 2012a), la primer pregunta a abordar fue ¿qué tipo de alteración produce el β A sobre el sistema dopaminérgico para afectar su liberación?. (ii) ¿Cómo la disminución en la liberación de dopamina relacionada a la acumulación del β A produce deficiencias en la función sináptica y la memoria? (iii) ¿La disminución en la liberación de dopamina relacionada a niveles incrementados del β A favorece su acumulación y el progreso de la patología de la EA?

3 Hipótesis

La producción patológica del β A disminuye los niveles de dopamina, lo que altera la plasticidad sináptica y afecta la memoria. A su vez, la disminución en los niveles de dopamina inducidos por el β A, promueve el progreso de la patología al perderse la presencia de moléculas endógenas con grupo catecol que interactúan con el péptido β A, impidiendo su agregación.

4 Objetivos

- Estudiar la relación entre las alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica y las alteraciones en la plasticidad sináptica y la memoria de reconocimiento en modelos experimentales de la EA.
- Evaluar el efecto protector de las catecolaminas sobre la acumulación del β A *in vivo*.
- Estudiar la participación de la neurotransmisión dopaminérgica en la memoria de reconocimiento.

5 Materiales y Métodos

Sujetos.

Se utilizaron ratones macho modelo triple-transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD) homocigotos de 11 a 12 meses. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-CZ00-199) y con la aprobación del Comité Local de Cuidado Animal (FBR30-14). Cuando no realizaban protocolos conductuales, los ratones eran alojados individualmente en cajas de acrílico a temperatura de entre 22 y 24° C, con ciclos controlados de luz/oscuridad de 12 h, y con acceso a agua y alimento *ad libitum* dentro del vivarium del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Administración de levodopa.

El fármaco levodopa (3,4-Dihidroxi-L-fenilalanina; Sigma; St. Louis, EEUU) se administró a una dosis de 50 mg/kg vía intraperitoneal (i.p). La solución de administración se preparó de la siguiente manera: por cada 10 mg de levodopa, se añadieron 400 µL de HCl 0.1 N y se disolvió el fármaco; después, se agregaron 500 µL de solución amortiguadora de fosfatos (PB) 0.4 M pH 7.45 para adecuar la solución a un pH fisiológico y 100 µL de agua desionizada para obtener una solución con concentración de 10 mg/mL. La solución vehículo se preparó de la misma manera a excepción que no se añadió el fármaco. La solución se preparaba diario justo antes de administrar a los animales para evitar la degradación del fármaco. De acuerdo a estudios de farmacocinética, la levodopa cruza la barrera hematoencefálica y alcanza su concentración máxima en plasma de 1 a 3 horas después de su administración (Bredberg et al., 1994; Contin y Martinelli, 2010). Ambas soluciones se administraron a los respectivos sujetos diariamente a la misma hora en toda la duración del protocolo experimental (16 días). Cuando los animales estaban sujetos a un protocolo conductual, la administración de la dosis correspondiente se realizó una hora antes del comienzo de la prueba.

Implantación de cánula para microdiálisis.

Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (1.5-2.0%) y montados en un aparato estereotáxico con un adaptador para ratón. Durante la cirugía se aplicaron lágrimas artificiales para evitar daño a los ojos. Se removió una pequeña porción de piel de la cabeza de ratón para tener acceso al cráneo y se alineó bregma al mismo plano horizontal que lambda. Se implantó una cánula guía de microdiálisis (CMA/7; CMA Microdialysis; Kista, Suecia) dirigida hacia la CI (DV -2.75 mm; AP +1.1 mm; ML -3.3 mm), y se aseguró con pequeños tornillos y cemento dental. Al finalizar la cirugía se aplicó un antibiótico y un antimicótico de efecto local en las heridas (Terramicina y Ketoconazol) y los animales fueron devueltos a sus cajas para su recuperación. Antes del inicio del entrenamiento conductual, los animales se recuperaron de la cirugía durante 7 días.

Microdiálisis en libre movimiento.

La sonda de microdiálisis CMA/7 (CMA Microdialysis; Kista, Suecia) permite la entrada de solución fisiológica Ringer (solución de MgSO₄ 1.2 mM, NaCl 118 mM, CaCl₂ 2.5 mM y KCl 4.7 mM) y la salida de moléculas que se encuentran en el espacio sináptico de la región donde fue implantada la cánula guía. Esto se logra a través de la difusión de la solución Ringer por la membrana semi-permeable de cuprofano de 2 mm (porosidad de 6 KDa) de la sonda, y del principio de gradiente de concentración, lo que resulta en un equilibrio entre los solutos

dentro y fuera de la membrana. Entre los compuestos y moléculas colectados, se encuentra una muestra representativa de los neurotransmisores que son liberados en tiempo real en esa región.

Para infundir solución Ringer en la CI, se utilizaron jeringas para microdiálisis (1 mL) que fueron montadas en una bomba de inyección continua (100 pump CMA Microdialysis; Kista, Suecia). Las jeringas se conectaron con tubería al sistema del brazo para microdiálisis de libre movimiento EICOM Concise Freely Moving System (EICOM; San Diego, E.E.U.U.). A este sistema se conectó la tubería propia de la sonda de microdiálisis, la cual se insertó en las cánulas guía de los animales. Para verificar la entrada y salida adecuada de microdializado se programó un flujo de 1.0 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ en las bombas de inyección. Una vez verificado lo anterior, se cambió el flujo a 0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$ y se mantuvo así hasta finalizar el protocolo. La inserción de la sonda se realizó 45 minutos antes de la fase de adquisición de la prueba conductual de ORM. Este tiempo es necesario para estabilizar el gradiente de solutos del espacio sináptico alrededor de la membrana. Una vez finalizado el tiempo de estabilización, se inició la recolección de fracciones de microdiálisis. Las muestras colectadas consistieron en 5 fracciones por sujeto, que fueron recuperadas cada 15 min para acumular un volumen de 4 μL por fracción (F1-F5). Éstas fueron depositadas en viales conteniendo 1 μL de mezcla antioxidante (ácido L-ascórbico 25 mM, Na_2EDTA 27 mM y ácido acético 1 M) y fueron almacenadas a -70°C hasta su análisis. Con el fin de establecer una línea basal, las primeras tres fracciones, F1, F2 y F3, se obtuvieron antes del inicio de la tarea. La fracción F4 se obtuvo durante la ejecución de la tarea, y la fracción F5 se recuperó cuando esta finalizó. Las muestras de microdiálisis fueron procesadas a través de la técnica de electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser (EC-FIL) para la determinación de neurotransmisores por el equipo de EC-FIL se requiere de una derivatización química. Para llevarla a cabo, se añade el compuesto FQ ([3-(2-furoil) quinolina-2-carboxialdehído], Molecular Probes; Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U.) a la muestra. El FQ reacciona específicamente con aminas primarias para formar conjugados altamente fluorescentes que son excitables por el láser. Esta reacción fue catalizada por cianuro de potasio (24.5 mM) disuelto en amortiguador de boratos (10 mM), y se lleva a cabo a 65°C en oscuridad durante 15 min. Adicionalmente, se agrega el aminoácido O-metil-L-treonina [0.0736 mM (Fluka; St. Louis, E.E.U.U.)] como un estándar interno para verificar la reacción. Una vez derivatizadas las muestras, éstas fueron procesadas en el equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ (Beckman Coulter; Pasadena, E.E.U.U.). Las muestras son inyectadas a un capilar y se corren en amortiguador de separación [boratos 24.85 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) 35.71 mM, beta-ciclodextrina 4.99 mM, urea 10 M y metanol 14.7%; pH: 9.2] a un voltaje de 23 kV. Este amortiguador permite la separación de moléculas de carga neutra por migración diferencial dada por el principio de flujo electro-osmótico. Mientras la muestra migra por el capilar, pasa por una ventanilla de detección. Las sustancias en el capilar fluorescen por la excitación producida por el láser a la longitud de onda de 488 nm. El detector LIF del equipo mide y registra la fluorescencia emitida por los componentes de la muestra. Los datos registrados se transducen como picos en un electroferograma de acuerdo a la concentración del analito y al tiempo de migración. Estos fueron procesados en el software 32 Karat™ 8.0 (Beckman Coulter; Pasadena, E.E.U.U.). La concentración de los neurotransmisores fue determinada al comparar los patrones en los electroferogramas y determinando el área bajo la curva. El área bajo la curva obtenida para cada neurotransmisor, se corrigió respecto al volumen que se obtuvo de cada muestra y respecto al área bajo la curva del compuesto de referencia (O-metil-L-treonina). La concentración fue obtenida a través de una curva de calibración específica para el neurotransmisor. Esta concentración fue normalizada con el promedio de las fracciones F1, F2 y F3, que indican la concentración basal del neurotransmisor, y se presentó

el resultado en valor porcentual. Los datos fueron procesados y calculados en el software MS Excel (Microsoft; Redmond, EEUU).

Laberinto acuático de Morris (MWM).

El laberinto acuático (MWM: Morris Water Maze) es una prueba conductual desarrollada por R. Morris (1984). La característica esencial de este protocolo es que el sujeto es colocado dentro de un tanque circular lleno de agua, del cual puede escapar nadando a una plataforma sumergida oculta a la vista. Con entrenamiento, los animales aprenden a encontrar el emplazamiento de la plataforma utilizando claves visuales que se encuentran fuera del tanque. Si la plataforma se remueve del tanque después de que los roedores fueron entrenados, se espera que los animales nadan sobre el área donde se encontraba la plataforma, si recuerdan su localización. Esta tarea permite medir la eficiencia de aprendizaje de los animales, así como la retención de la memoria espacial basada en un reconocimiento visual. Este tipo de memoria espacial se procesa principalmente en el hipocampo. La arena del MWM consistió en un tanque circular de plástico de 110 cm de diámetro y 65 cm de altura lleno con 237.6 L de agua. El agua se mantuvo entre 20-22°C, se higienizó con un 0.01% de cloro, y fue opacada con pintura blanca lavable para ocultar la plataforma. El tanque se encontraba en un cuarto donde habían cuatro claves viso-espaciales, dos consistiendo en imágenes adheridas a un muro contiguo al tanque y otras dos consistiendo en dos personas realizando el experimento. La fase de memoria de largo plazo (MLP) evaluó la retención de la memoria espacial. Esta se llevó a cabo 4 días después del último día de entrenamiento. Antes de la prueba se removió la plataforma y consistió en un nado libre durante 60 segundos para cada sujeto. Los animales fueron monitoreados por una cámara montada en el techo que grabó la totalidad de la pruebas para su análisis. Los parámetros medidos durante la prueba para saber si los animales recordaron la posición de la plataforma fueron: latencia inicial para llegar a la plataforma (s), que mide tiempo que tarda cada animal en tocar el perímetro virtual de la plataforma por primera vez; número de cruces sobre la plataforma (n), que se registra cada vez que el animal cruza mínimo 2 puntos del perímetro virtual de la plataforma; medición del tiempo que pasó el ratón nadando en el cuadrante virtual opuesto a la plataforma (s); y tiempo de nado en el cuadrante de la plataforma (s). Para saber si el tratamiento con el fármaco hacía que los animales nadaran más rápido, se calculó la velocidad media (cm/s), que es el promedio de la velocidad de nado de la trayectoria del animal durante los 60 segundos de la prueba. La velocidad de nado se midió a través del complemento TrackMate (Jaqaman et al., 2008) del software Fiji (Schindelin et al., 2012).

Genotipificación.

Para verificar que los sujetos utilizados en el experimento fueran transgénicos, se realizó una genotipificación por medio de PCR. Las colas obtenidas de los ratones fueron maceradas con solución de lisis alcalina (250 µL de NaOH 10 N + 40 µL EDTA 0.5 M + 100 mL de H₂O) y se incubaron 1 hora a 95°C. Después se añadió solución de neutralización (Tris HCl 40 mM) y se centrifugaron las muestras (4°C a 12500 rpm por 2 min). A las muestras se les añadió la mezcla de primers con los reactivos correspondientes (Coral Load + dNTPs + Taq Pol + H₂O) y se colocaron en el termociclador de PCR para su procesamiento. La secuencia de los primers utilizados se muestra en la tabla 1. Posteriormente, a las muestras resultantes de la PCR fueron digeridas con la enzima BSTII durante 2 h a 37°C, que escinde la presenilina mutante en dos fragmentos. Con esto es posible distinguir ratones homocigotos que presentan únicamente dos bandas para presenilina mutada, mientras que los ratones heterocigotos presentarán además una banda de presenilina no mutada.

Elemento de DNA	Gen que identifica	Secuencia del primer
5TAU REV	Tau humana	5' TCCAAAGTTCACCTGATAGT 3'
APPInternal 5'	APP humano	5' GCTTGCACCAGTTCTGGATGG 3'
Thy 12.4	Elemento regulatorio Thy 1.2	5' GAGGTATTTCAGTCATGTGCT 3'
PS1k 13	Presenilina mutada	5' CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC 3'
PS1k 15	Presenilina mutada	5' AGGCAGGAAGATCACGTGTTCCAAGTAC 3'

Tabla 1| Secuencia de los primers para PCR.

Los productos de la digestión fueron identificados por medio de electroforesis en un gel de agarosa. Se cargaron 10 μ L de cada muestra por carril de gel y fueron corridas en solución amortiguadora TBE 0.5 M a 45 V durante 1 hora. El gel fue teñido con bromuro de etidio para marcar los sitios de presencia de DNA. Los genes *APP* y *MAPT* fueron observados en el gel en los pesos moleculares de 500 y 350 y presenilina 300 y 250.

Cuantificación de β A por inmunofluorescencia.

Se tomaron microfotografías del tejido tratado en las regiones de CI, hipocampo, amígdala, y corteza motora en ambos hemisferios del cerebro. Dependiendo de su extensión, se tomaron un número aproximado de ocho microfotografías por cada región para posteriormente ser reconstruidas en una imagen de mayor tamaño y abarcando la región completa. Para considerar a un ratón en la cuantificación, tenía que tener mínimo 4 repeticiones por cada región. Se tomaron microfotografías con un microscopio confocal de fluorescencia Olympus FV10i (Olympus; Tokio, Japón) con filtros para el fluoróforo FITC, a un aumento de 30x y una apertura confocal de 2.5x. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software *Fiji* (Schindelin et al., 2012). Las regiones de interés fueron reconstruidas en mosaicos y recortadas para permitir el análisis de un área homogénea y que resultara comparable entre distintos sujetos. El área elegida para cada región fue: 1800x940 μ m para CI, 1300x1300 μ m para corteza motora, y 700x900 μ m para amígdala. Para hipocampo, el análisis se dividió en 2 subregiones: 2300x700 μ m para la región de CA1 y 900x600 μ m para CA3 700x700 μ m. Una vez recortadas, se realizó un conteo de partículas positivas a señal del β A utilizando *Analyze Particles*, software complemento de *Fiji*. Esto se llevó a cabo generando imágenes que son máscaras en blanco y negro de las regiones de interés, en las cuales se registran las áreas oscuras de la imagen que corresponden a señal inmunorreactiva positiva a β A. Esta señal es cuantificable en forma de partículas y su consideración como señal positiva o negativa depende de su valor umbral gráfico, valor de circularidad, y tamaño de la partícula. Para todas las fotografías, se fijaron los mismos parámetros de análisis de acuerdo a la región de interés. El análisis de las imágenes se hizo de tal forma que los analistas fueron ciegos al tratamiento.

Cuantificación del β A por análisis de inmunorreconocimiento multiplex:

Los ratones tratados con levodopa y con vehículo (n=3 en cada caso) fueron sacrificados al final del esquema de tratamiento. Se disecaron 2 mm de la corteza que incluyó el área motora y regiones adyacentes desde +1.2 AP hasta -1.2 AP y el hipocampo dorsal. Las muestras fueron lisadas en una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, NaCl 150 mM, SDS

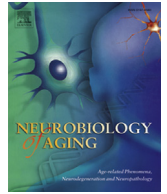
2% y una tableta con inhibidores de proteasas (Roche, Darmstadt, Alemania) y analizadas con el kit para detectar β A y tau humano en muestras de LCR, que incluye la detección de los analitos A β 1-40 y A β 1-42 en una plataforma de placa de 96 pozos leída en un lector Luminex xMAP (Millipore). Los valores obtenidos fueron correlacionados con una curva de referencia con concentraciones conocidas de los respectivos analitos. Cada muestra fue analizada por duplicado.

6 Resultados

6.1 La disfunción en la neurotransmisión dopaminérgica inducida por β -amiloide transforma la potenciación a largo plazo a depresión a largo plazo cortical y afecta la memoria

“Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid- β transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment”.

Moreno-Castilla P., Rodriguez-Duran L.F., Guzman-Ramos K., Barcenas-Femat A., Escobar M.L., Bermudez-Rattoni F. *Neurobiology of Aging*, 2016 May;41:187-99. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.021.



Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid- β transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment



Perla Moreno-Castilla^a, Luis F. Rodriguez-Duran^{b,1}, Kioko Guzman-Ramos^{a,1},
Alejandro Barcenas-Femat^a, Martha L. Escobar^b, Federico Bermudez-Rattoni^{a,*}

^a División de Neurociencias, Departamento de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

^b Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria, Facultad de Psicología, División de Investigación y Estudios de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 September 2015
Received in revised form 18 February 2016
Accepted 21 February 2016
Available online 3 March 2016

Keywords:

Amyloid-beta
Alzheimer's disease
Long-term depression
Long-term potentiation
Dopamine
Recognition memory impairment

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative condition manifested by synaptic dysfunction and memory loss, but the mechanisms underlying synaptic failure are not entirely understood. Although dopamine is a key modulator of synaptic plasticity, dopaminergic neurotransmission dysfunction in AD has mostly been associated to noncognitive symptoms. Thus, we aimed to study the relationship between dopaminergic neurotransmission and synaptic plasticity in AD models. We used a transgenic model of AD (triple-transgenic mouse model of AD) and the administration of exogenous amyloid- β ($A\beta$) oligomers into wild type mice. We found that $A\beta$ decreased cortical dopamine levels and converted in vivo long-term potentiation (LTP) into long-term depression (LTD) after high-frequency stimulation delivered at basolateral amygdaloid nucleus–insular cortex projection, which led to impaired recognition memory. Remarkably, increasing cortical dopamine and norepinephrine levels rescued both high-frequency stimulation-induced LTP and memory, whereas depletion of catecholaminergic levels mimicked the $A\beta$ -induced shift from LTP to LTD. Our results suggest that $A\beta$ -induced dopamine depletion is a core mechanism underlying the early synaptopathy and memory alterations observed in AD models and acts by modifying the threshold for the induction of cortical LTP and/or LTD.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative condition characterized by memory loss and synaptic failure, which has become a concern for public health as the population peak ages. To find effective interventions for AD, novel targets based on the identification of altered molecular mechanisms underlying AD-related pathophysiology are required.

Dopamine is a key neuromodulator of synaptic plasticity (Lisman et al., 2011; Pignatelli and Bonci, 2015). It has been shown that enhancement of dopamine activity improve memory in humans and animals (Calabresi et al., 2007; Nitsche et al., 2009). In line with this, we reported that acute stimulation of dopaminergic

neurotransmission improved deficits in object recognition memory in a triple-transgenic mouse model of AD (3 \times Tg-AD; Guzmán-Ramos et al., 2012a). Other studies in AD models have also shown that pharmacologic stimulation of dopaminergic transmission improves memory performance (Ambrée et al., 2009; Himeno et al., 2011). Moreover, AD patients showed unexpected positive effects of dopaminergic drugs on cognitive performance and cortical plasticity, strengthening the hypothesis of dopamine involvement in AD (Koch et al., 2011, 2014; Martorana and Koch, 2014; Martorana et al., 2009). However, a direct link between AD-associated synaptic plasticity impairment and dopaminergic neurotransmission failure has yet to be demonstrated.

Experimental evidence suggests that increased production and deposition of amyloid- β ($A\beta$) has a causal role in early synaptic failure in AD pathogenesis (Shankar et al., 2008; Townsend et al., 2006). Thus, we sought to evaluate the effects of $A\beta$ on dopaminergic neurotransmission, and its outcome in synaptic plasticity and memory, which allow us to understand memory alterations and the contribution of aging to the pathology. To this aim, we

* Corresponding author at: División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-253, México D.F., 04510, México. Tel.: +52 55 56225626; fax: +52 55 56225607.

E-mail address: fbermude@ifc.unam.mx (F. Bermudez-Rattoni).

¹ Present Address: Biological and Health Sciences Division, UAM, Campus Lerma, Lerma 52,000, Mexico.

integrate several techniques like behavioral tasks, free-moving microdialysis, *in vivo* electrophysiologic recordings, pharmacologic manipulations, and histologic and immunohistochemical analyses in the 3×Tg-AD model, that shows a progressive deposition of hyperphosphorylated tau tangles and intracellular and extracellular A β depositions (Billings et al., 2005) and in a nonfamilial AD model induced by the administration of exogenous A β oligomers in wild type (WT) mice.

We focused on the insular cortex (IC), a neocortical region affected early in AD patients (Suto et al., 2014) and animal models (Guzmán-Ramos et al., 2012a), that is known to play a key role in dopamine-dependent memory, particularly in the conditioned taste aversion, a robust learning paradigm in which animals associate novel taste to gastric malaise, resulting in a reduced consumption of the associated taste (coded as aversive) in subsequent presentations (Bermúdez-Rattoni, 2004). This learning paradigm requires dopamine release in the IC during the presentation of novel taste (Guzmán-Ramos et al., 2010), and it is a relevant memory model regarding synaptic facilitation, as *in vivo* high-frequency stimulation (HFS) applied to the basolateral amygdaloid nucleus (BLA) induces long-term potentiation (LTP) in the IC and enhances conditioned taste aversion retention (Escobar and Bermúdez-Rattoni, 2000). Moreover, this synaptic facilitation requires functional (N-methyl-D-aspartate) NMDA receptors and involves the same molecular mechanisms in the IC during novel taste learning (Escobar and Bermúdez-Rattoni, 2000; Jones et al., 1999). Through these experimental approaches, here we show that dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by A β in the 3×Tg-AD model, or by administration of exogenous A β oligomers in WT mice transforms LTP into long-term depression (LTD) in the BLA-IC pathway and produces memory impairment.

2. Methods and materials

2.1. Animals

Homozygous 3×Tg-AD (<http://jaxmice.jax.org/strain/004807.html>; Oddo et al., 2003) and B6129SF2/J WT (<http://jaxmice.jax.org/strain/101045.html>) male mice were used at 3 to 4-month old (3-month) and 10 to 11-month old (10-month). Experiments were performed in accordance with the current rulings in Mexican law (NOM-062-ZOO-1999) and with the approval of the local Animal Care Committee (FBR30-14). Mice were individually housed in a 22 °C–24 °C environment with a 12/12 light or dark cycle with water and food *ad libitum*, except when stated otherwise.

2.2. Surgical procedures

Mice were placed on a stereotaxic apparatus with a mouse adaptor and maintained under anesthesia with ~0.5% isoflurane. A microdialysis guide cannulae (CMA/7 Microdialysis, Solna, Sewden) or two 23-ga stainless steel cannulae (9-mm long; Small Parts, Logansport, IN, USA) were implanted aiming to the IC (dorsoventral [DV] –2.75 mm; anteroposterior [AP] +1.1 mm; mediolateral [ML] –3.3 mm) and secured with small screws and dental acrylic. Dummy cannulae (33 ga, 12 mm) were inserted into the guide cannulae to prevent clogging. Local antibiotics were applied (polymyxin B and iodine). In all cases, we performed histologic analyses after mice sacrifice.

2.3. Behavioral tasks

Novel and aversive taste recognition: behavioral experiments were performed between 10:00 AM and 2:00 PM. After 7 days of surgery recovery, the implanted mice were deprived from water and trained to drink in microdialysis cages (system for freely moving animals CMA-Microdialysis, Solna, Sewden), through two

bottles (20 min/d). The mean water consumption of consecutive five days was considered baseline. On the conditioning day, mice were allowed to drink only 0.3% saccharin solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) through a single bottle during 20 minutes and then 30 minutes later received an intraperitoneal 0.4 M LiCl (7.5 mL/Kg). Saccharin intake was measured, and the percent consumption of saccharin compared to daily water intake represented an evaluation of novel taste recognition. Twenty-four hour later, mice were allowed to choose between water presented in one bottle and 0.3% saccharin solution presented in another bottle to test conditioned taste aversion memory. Preference index was obtained from two-bottle memory test, it is defined as mL of saccharin/(mL of saccharin + mL of water) × 100, consumed in the test; hence, 50 indicates equal preference. Two-bottle taste preference test: saccharin solutions were prepared in drinking water using reagent-grade chemicals purchased from Sigma-Aldrich. All taste stimuli were presented at room temperature. Male 3×Tg-AD and WT mice at 3-month and 10-month (n = 5 for each group) were used for two-bottle taste preference test as previously described (Bachmanov et al., 2001; Golden et al., 2011). Mice were given access for 48 hours to 2 bottles, one containing drinking tasteless water and the other a saccharin solution; the food was provided *ad libitum*. After 24 hours, the intake of each fluid was recorded, and the bottle positions were switched to minimize any positional effect. After another 24 hours, the fluid intake was again recorded. Saccharin was presented in an ascending concentration series: 0.01%, 0.02%, 0.1%, 0.3%, 1% and 3% (Bachmanov et al., 2001; Golden et al., 2011).

2.4. Microdialysis and capillary electrophoresis

Microdialysis membranes (CMA/7 Microdialysis, Solna, Sewden) of 2 mm were inserted in the guide cannula placed in the IC. Ringer solution (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, and 2.5 mM CaCl₂) or high-potassium Ringer solution (110 mM KCl) were perfused at a rate of 0.25 μ L/min with an automated microinfusion pump (Carnegie Medicine, Stockholm, Sweden). After 60 minutes of stabilization, samples were collected every 16 minutes. The first 3 samples were taken as baseline levels and then, we proceeded to conditioned taste aversion acquisition (Fig. 1A). Samples were stored at –80 °C until analysis. Samples were derivatized with 5-furoylquinoline-3-carbaldehyde and analyzed by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detector (Beckman-Coulter PACE/MDQ, Glycoprotein System CA, USA) as previously described (Guzmán-Ramos et al., 2010, 2012b).

2.5. A β oligomers preparation and characterization

The A β _{1–42}, ultrapure, treated with NaOH peptide was obtained from Millipore (Temecula, CA, USA). The powder was suspended in 1% NH₄OH at a concentration of 1 mg/mL, and the solution was sonicated for one minute to allow conversion to monomers (Fezoui et al., 2000). The A β _{1–42} oligomers were prepared by diluting stock solution in phosphate buffered saline (PBS) and incubating for 24 hours at 4 °C. Oligomer solutions were maintained at 4 °C and used within 5 hours of preparation (Lambert et al., 1998). The solution of A β oligomers was prepared at a concentration of 4 μ M, determined by bicinchoninic acid. A volume of 0.5 μ L of 4 μ M solution was intracortically administered in each experiment (see in the following). Routine characterization of oligomer preparations was performed by western blot and size-exclusion capillary electrophoresis that showed the presence of low-molecular-weight A β oligomers (dimers, trimers, tetramers, and higher molecular mass oligomers; See Supplementary Fig. 1). For this, western blot was carried out by polyacrylamide gel in 12% polyacrylamide precast gels (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 100 V for 105 minutes and

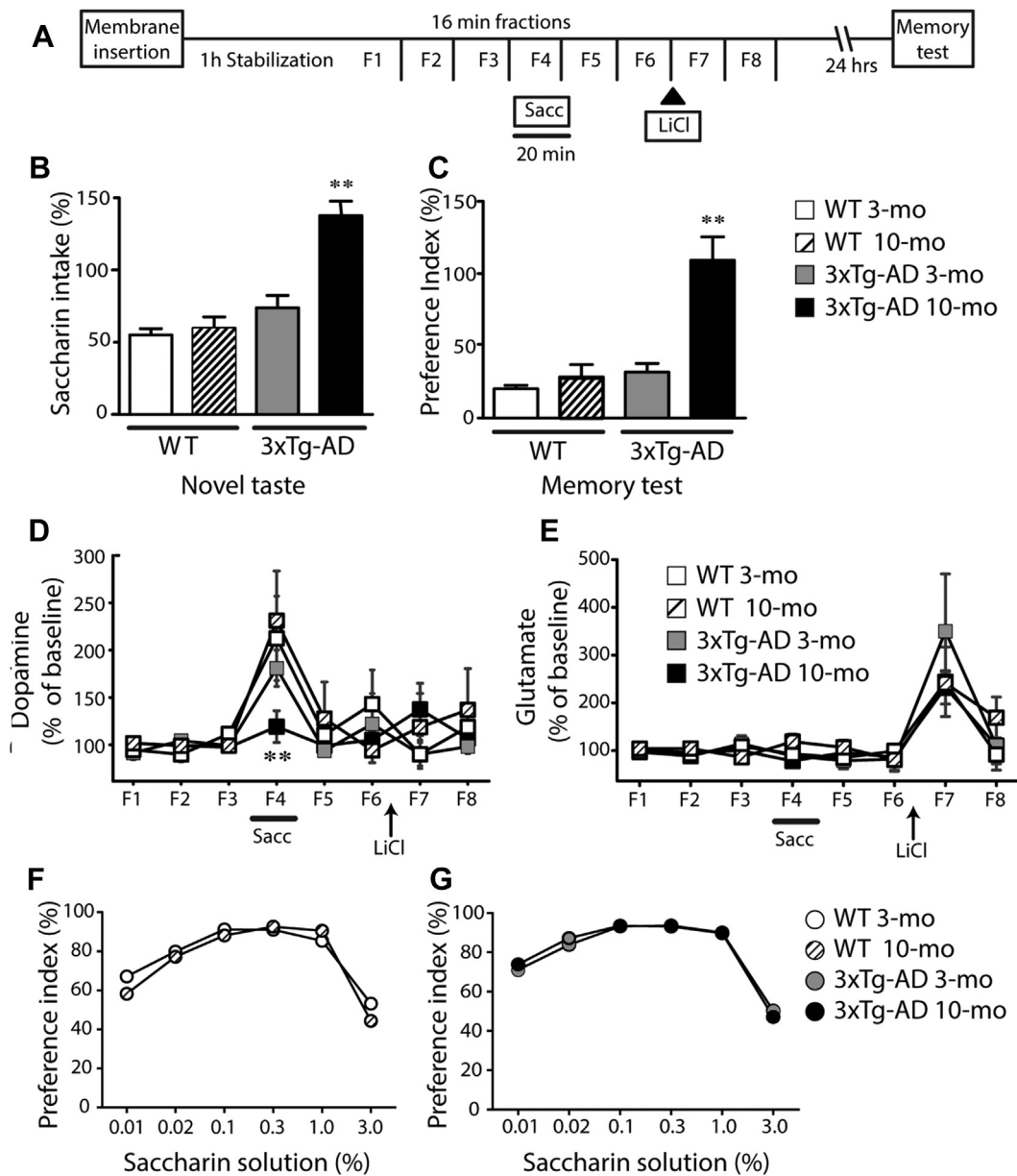


Fig. 1. Memory impairment is related to dysfunctional dopamine release during novel taste recognition in 3×Tg AD mice. (A) Experimental protocol for gustatory recognition memory test during in vivo microdialysis performance. After the collection of 3 baseline microdialysis fractions (F1–F3), saccharin (Sacc) was presented for 20 minutes at fraction 4 and LiCl intraperitoneal administration occurred at the end of fraction 6. Aversive memory test was performed 24 hours later. (B) Novel saccharin consumption, graph shows mean ± SEM saccharin intake over baseline water consumption in the indicated groups (n = 7 per group). (C) Preference index obtained from 2-bottle memory test (n = 7 per group). Extracellular levels of dopamine (D) and glutamate (E) collected by in vivo microdialysis in the IC. Each point is the mean ± SEM for a fraction of 4 μL obtained during a period of 16 minutes n = 7 per group. **p < 0.01 versus rest of the groups. (F and G) Preference index for saccharin solutions of increasing concentrations during taste preference test. Each point represents mean ± SEM for preference index obtained from 24 hours consumption. n = 6 per group. Abbreviations: AD, Alzheimer’s disease; IC, insular cortex; SEM, standard error of mean.

transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using a semidry blot system (Bio-Rad) at 25 V for 50 minutes. Membranes were blocked in PBS of 2% nonfat dry milk of 0.2% Triton X-100 and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies BAM10 (1:500; Sigma, St. Louis, MO, USA). After washing with PBS of 0.2% Tween-20, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated antimouse IgG1 (1:2500; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 2 hours at room temperature. Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using SuperSignal West Dura (Pierce Biochemistry, Rockford, IL, USA). In addition, size-exclusion analyzes were carried out by sodium dodecyl sulfate-molecular weight capillary electrophoresis, a

separation method based on size-dependent mobility of proteins in the sample. For this, we used the sodium dodecyl sulfate-molecular weight analysis kit (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), which was designed for the separation of proteins using a gel matrix that provides an effective sieving range of approximately 10–225 kDa. Proteins were detected by ultraviolet, using the photo diode array detection module.

2.6. Drug administration

Drugs were injected through 30-ga needles that protruded 1 mm from the tip of the guide cannulae and were administered

bilaterally for behavioral experiments and unilaterally for electrophysiologic recordings. A volume of 0.5 μL per hemisphere was delivered at a rate of 0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$. PBS 0.1 M, pH 7.4 or nomifensine (25 μM ; Sigma-Aldrich) were administered 20 minutes before HFS and recordings or before novel taste presentation. The $\text{A}\beta_{1-42}$ peptide was obtained for Millipore (Temecula, CA) and reverse sequence of $\text{A}\beta_{42-1}$, inactive control for the $\text{A}\beta$, was obtained from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Both peptides prepared at a final concentration of 4 μM and 0.5 μL were injected 24 hours before behavioral protocol or electrophysiologic recordings. A 6-hydroxydopamine (OHDA) (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in 2% ascorbic acid; Sigma-Aldrich) or vehicle was injected 24 hours before electrophysiologic recordings. The tracer fluoro-gold (FG; 2% w/v diluted in 0.9% saline; Sigma-Aldrich) was injected unilaterally into the right IC (total volume of 0.3 μL) of anesthetized $3\times\text{Tg-AD}$ mice or in WT mice that had 24 hours previous surgery, during which $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomers or control peptide were injected into the right IC. FG and $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomers were injected exactly in the same anatomic site. Animals were sacrificed 10 days after FG injection for histologic analysis.

2.7. *In vivo* electrophysiologic recordings

A constant current stimulation (150–200 μA monophasic pulses, 0.25 ms duration) was delivered to the BLA (AP -1.46 mm, ML $+2.79$ mm, DV -4.75 mm \pm 0.5). IC-evoked responses were recorded unilaterally by using a monopole stainless steel electrode placed in the IC (DV -2.75 mm; AP $+1.1$ mm; ML ± 3.3 mm) in anesthetized animals with pentobarbital (47.5 mg/kg i.p.). The IC responses were measured by obtaining the field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) slope measured 1–2 ms after the fEPSP onset. The current intensity that elicited a 50% maximal response was determined and used for all subsequent stimulation. Low-frequency responses were evoked once every 20 seconds throughout a 20 minutes baseline period. LTP was tested if the fEPSP slope was stable, defined by fEPSP amplitudes that differed from the mean of the 20 minutes baseline period by $\pm 5\%$ or less. To induce, LTP 10 trains of 100 Hz/1 s were delivered, after which, IC-evoked responses were collected for an additional hour. Input–output (I/O) curves were assessed to determine the synaptic excitability for a range of stimulation intensities, using multiples of threshold intensity (1–10). Threshold intensity was defined as the stimulation intensity required to produce a 0.1 mV response amplitude. The I/O curves were plotted by the relationship of the fEPSP amplitude (mV) to the raw shock strength (μA). In addition, to investigate changes on synaptic strength induced by $\text{A}\beta$ oligomers, electrodes were implanted and secured with Loctite super glue adhesive (Henkel, Düsseldorf, Germany) in BLA and IC. To verify the correct positions of the electrodes, simultaneous evoked test pulses were applied during the implantation procedure. fEPSP were evoked throughout the baseline period, after which $\text{A}\beta$ oligomers were administered in the IC through the recording electrode and IC-evoked responses were collected for additional 20 minutes. Twenty four hour later, animals were anesthetized and basal transmission, I/O and LTP were tested.

2.8. Histologic and immunohistochemical analyses

Animals were killed with an overdose of pentobarbital, and the brains fixed by cardiac perfusion with 0.9% NaCl followed by 4% paraformaldehyde, pH 7.4. Brains were removed and postfixed for 48 hours before being transferred into 30% sucrose. The tissue was embedded in Tissue-Tek (VWR, Chicago, IL, USA) and cut coronally using a cryostat (Leica Biosystems, Richmond, USA) into 35- μm thick free-floating sections. Trizma-buffered saline 0.1 M, pH 7.4

was used to dilute immunoreagents and for washing brain sections between incubations. Free-floating sections were washed for 30 minutes, then placed in 5% bovine serum albumin (BSA, Sigma) for 60 minutes, and incubated at 4 $^{\circ}\text{C}$ on 5% BSA, 0.1% Triton X-100 with the following primary antibodies: mouse monoclonal antibody against $\text{A}\beta$ 1–16 (1:1000; 6E10, Covance, Emeryville, CA, USA) and a rabbit polyclonal antibody against tyrosine hydroxylase (TH; 1:1000; Pel-Freez, Rogers, AR, USA). For $\text{A}\beta$ immunodetection, epitopes were previously exposed with 86% formic acid for 5 minutes. Negative controls with no primary antibodies were prepared. Sections were then washed for 60 minutes in trizma-buffered saline followed by incubation at room temperature for 2 hours in 5% BSA, 0.1% Triton X-100 with secondary antibodies: goat antimouse IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (1:250; Millipore, Darmstadt, Germany) and goat antirabbit IgG conjugated to CY3 (1:250; Millipore, Darmstadt, Germany). Sections were again washed and mounted on Super-frost Plus micro slides (VWR, Leuven, Belgium). Quantification of $\text{A}\beta$, density of TH+ fibers and number of FG-labeled neurons were characterized by capturing images using an Olympus FV10i confocal microscope (Olympus, Miami, FL, USA), equipped with ultraviolet and/or visible light LD lasers. A 10 \times objective was used. For quantification, a total of 5–6 mice were used. Five consecutive sections were imaged for the IC and ventral-tegmental area (VTA) and 9 images were acquired per section. Each confocal image corresponded to a field of $424.6 \times 424.6 \mu\text{m}$ and was analyzed with ImageJ (NIH). We used the feature Hessian plugin to analyze cortical fibers (Sathyanesan et al., 2012) and the triangle function to adjust threshold limits for intracellular $\text{A}\beta$ accumulation and FG-labeled cells.

2.9. Statistical analyses

Multifactorial analysis of variance (ANOVA) was performed for neurotransmitter levels, one-way ANOVA for behavioral scores and Student's *t* test for histologic analysis. Data obtained from *in vivo* electrophysiologic recordings were analyzed by repeated measures two-way ANOVA (RM2wANOVA, groups factor) for the fEPSP slopes of baseline (20 minutes) and after-tetanus (last 20 minutes). I/O curves relationship was analyzed by comparing nonlinear regression curves with extra-sum-of-squares *F* test analysis for Y_0 , plateau and *K* parameters. In all cases, Bonferroni's post hoc analysis was used, and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Taste memory impairment is related to lack of dopamine release during novel taste recognition in $3\times\text{Tg-AD}$ model

We first evaluated the performance of $3\times\text{Tg-AD}$ mice on taste recognition memory test in 3-month and 10-month $3\times\text{Tg-AD}$ and WT mice. Pairing of the novel taste saccharin with malaise induced by LiCl resulted in significant reductions in the preference index for saccharin during memory test in WT 3-month, WT 10-month, and $3\times\text{Tg-AD}$ 3-month mice but not in $3\times\text{Tg-AD}$ 10-month mice, which failed to show an aversion to saccharin [$F(3,24) = 19.96$; $p < 0.01$; Fig. 1C]. Poor performance in memory test was associated to differences in saccharin consumption during novel taste presentation [$F(3,25) = 11.31$, $p < 0.01$; Fig. 1B]. Thus, to determine an impaired neurochemical activity during the presentation of a new taste and LiCl administration, we performed *in vivo* microdialysis in the same groups evaluated for gustatory recognition memory (Fig. 1A). Dopamine release, measured in the IC, revealed significant differences among groups [$F(3,89) = 7.530$, $p < 0.01$]. When novel taste was presented, significant increase of cortical dopamine levels was evident as compared with baseline levels in 3-month WT, 3-month

3×Tg-AD, and 10-month WT mice ($p < 0.05$). However, 10-month 3×Tg-AD mice did not show any increase in the extracellular concentration of dopamine [Factor genotype: $F(1,89) = 4.209, p < 0.05$; factor age: $F(1,89) = 7.704, p < 0.01$; Fig. 1D]. Conversely, extracellular glutamate levels showed no significant difference among groups [$F(3,90) = 0.911, p = 4.388$]. The injection of LiCl produced an increase of extracellular glutamate in all tested groups compared to baseline fractions [$F(3,103) = 18.722, p < 0.01$], indicating that the visceral signaling is unimpaired regardless of age or genotype (Fig. 1E).

Increased consumption of novel taste in transgenic animals could be explained by sensorial gustative impairments. Thus, we evaluated taste preferences and taste sensitivity curves in the 3×Tg-AD and WT mice at both ages. Data for each group were analyzed using two-way ANOVA with strain as the between group-factor and concentration as the within group-factor. Taste preference test show comparable taste sensitivities and gustatory curves for all groups [$F(3,122) = 0.598, p = 0.67$; Fig. 1F and G], which rules out the possibility of loss of taste perception and reflects that impaired release of dopamine in 10-month 3×Tg-AD mice roots the loss of novel taste recognition, and thus impairs aversive taste memory formation.

3.2. A β accumulation is related to low cortical catecholaminergic levels and axonal loss in 3×Tg-AD mice

We next sought to determine whether dopamine release could be stimulated in 3×Tg-AD mice. High potassium stimulation significantly increased release of dopamine and norepinephrine levels compared with baseline in 3-month WT mice [$F(3,91) = 7.891, p < 0.01$ for dopamine and $F(3,101) = 4.720, p < 0.05$ for norepinephrine]; 10-month WT mice [$F(3,98) = 8.345, p < 0.01$ for dopamine and $F(3,98) = 3.581, p < 0.05$ for norepinephrine] and in 3-month 3×Tg-AD [$F(3,97) = 4.934, p < 0.05$ for dopamine and $F(3,97) =$ for norepinephrine]. Interestingly, the 10-month 3×Tg-AD animals showed a significantly lower increase in dopamine and norepinephrine levels than the 10-month WT group ($p < 0.05$ for dopamine and $p < 0.01$ for norepinephrine; Fig. 2A and B). These results suggest that catecholamine release is impaired in 10-month 3×Tg-AD mice, but it is still susceptible to be stimulated by high potassium depolarization. Analysis of baseline neurotransmitter levels confirmed that dopamine concentration was lower in the IC of 10-month 3×Tg-AD mice compared with other groups [$F(3,23) = 6.341, p = 0.002$; see Supplementary Fig. 2A]. Baseline norepinephrine levels were not different among groups [$F(3,23) = 0.20, p = 0.8918$; Supplementary Fig. 2B].

Then, we performed immunofluorescence analyses to evaluate the effect of A β pathology progression on the expression of TH as a marker of catecholamine function. Histologic analysis revealed that TH expression is not significantly affected by aging in 10-month WT mice in comparison with 3-month WT mice ($p = 0.15$; Fig. 2C and D). The WT mice at both ages did not show any A β immune-positive signal. Interestingly, the density of TH immunoreactive (TH+) cortical terminals in 10-month 3×Tg-AD mice was less profuse than in 3-month 3×Tg-AD mice. Quantification analysis show that at 3-month intracellular A β accumulation is low in the IC, and TH+ terminals are plentiful. At 10-month, 3×Tg-AD mice showed an extensive accumulation of intracellular A β , which coincides with reduction of density of TH+ axons in 10-month 3×TgAD mice ($p < 0.01$), at approximately 50% relative to the analyzed area and compared with 3-month 3×Tg-AD group (Fig. 2E). Atrophy of TH+ fibers related to A β has been described in APP^{swE/PS1 Δ E9} mouse model of amyloidosis previous to neurodegeneration in the VTA (Liu et al., 2008). Thus, we confirmed cortical axonal loss from VTA neurons by detection of retrogradely transported FG in neurons

expressing TH in VTA. Fig. 2F and G shows a decreased number of FG+ neurons in the VTA of 10-month 3×Tg-AD mice in comparison with 3-month 3×Tg-AD mice ($p < 0.01$).

Altogether, our results show that the dopaminergic and noradrenergic systems are impaired in 10-month 3×Tg-AD because of the A β -induced loss of TH+ axons. The dopaminergic system is strongly affected in 10-month 3×Tg-AD mice, as denoted by the reduced basal levels and the impaired release induced by activity and high potassium stimulation. On the other hand, the noradrenergic system seems to be less affected in 10-month 3×Tg-AD mice, which have an altered potassium-induced release. The impairment in gustatory recognition memory might be related to the lack of dopamine release as we previously reported that dopamine, but not norepinephrine, release in the IC is related to novel taste presentation (Guzmán-Ramos et al., 2010).

3.3. A β pathology impairs synaptic plasticity in the BLA-IC pathway by switching HFS-induced LTP to LTD in the 3×Tg-AD model

To further understand how intracellular A β accumulation leads to memory impairment, we evaluated whether synaptic plasticity in the BLA-IC pathway is affected by age-related A β pathology. We used an experimental protocol of HFS to induce in vivo LTP in anesthetized animals and measured fEPSP of IC-evoked responses in 3-month and 10-month 3×Tg-AD mice (Fig. 3A). Electrophysiologic recordings show that 3-month 3×Tg-AD mice display LTP in the BLA-IC pathway [$F(1,5) = 97.09, p < 0.01$], whereas a clear LTD is shown in 10-month 3×Tg-AD mice after HFS [$F(1,4) = 86.19, p < 0.01$; Fig. 3B and C]. We also evaluated the impact of aging in synaptic plasticity in the BLA-IC pathway performing the same experimental protocol of HFS to induce in vivo LTP in control mice. The 3-month WT mice group showed a clear synaptic potentiation [$F(1,5) = 137.9, p < 0.01$], but the induction of LTP was blocked in 10-month WT mice [$F(1,4) = 12.17, p = 0.02$; Fig. 3B and C]. This stresses the role of aging in AD-synaptic failure but also highlights the role of dopamine and norepinephrine in the A β -related synaptopathy. We found that aging-mediated mechanisms seem to disrupt LTP to the point of flattening changes in synaptic plasticity, whereas A β not only impaired LTP but induced LTD after HFS related to a catecholaminergic neurotransmission dysfunction. To analyze whether the change in the ability to induce synaptic plasticity is accompanied by a change in basal synaptic communication through the BLA-IC pathway, we conducted I/O curve experiments. Nonlinear regression analyses showed a significant reduction of I/O curves in 10-month mice when compared with 3-month 3×Tg-AD mice ($p < 0.01$), which reflects a decrease of basal synaptic efficacy in 3×Tg-AD mice, as accumulation of cortical intracellular A β progresses (Fig. 3D). Synaptic transmission resulted also affected by aging in control mice as shown in the I/O curves [$F(3,14) = 471.7, p < 0.01$; Fig. 3D].

3.4. Blockade of catecholamine's reuptake restores synaptic plasticity and memory

We previously showed that administration of 0.5 μ L of 0.25- μ M nomifensine increased IC levels of dopamine in 3×Tg-AD mice and restored memory impairment (Guzmán-Ramos et al., 2012a). In addition, it has been reported that treatment with dopaminergic (Jürgensen et al., 2011) and noradrenergic (Li et al., 2013) receptors agonists ameliorates A β -mediated effects on synaptic plasticity in vitro models. Therefore, we asked whether restoration of dopamine cortical levels could retrieve both synaptic dysfunction and memory. For this, we administered the catecholaminergic reuptake inhibitor nomifensine. Nomifensine or vehicle was administered by bilateral intracortical injection in the IC, 20 minutes before HFS

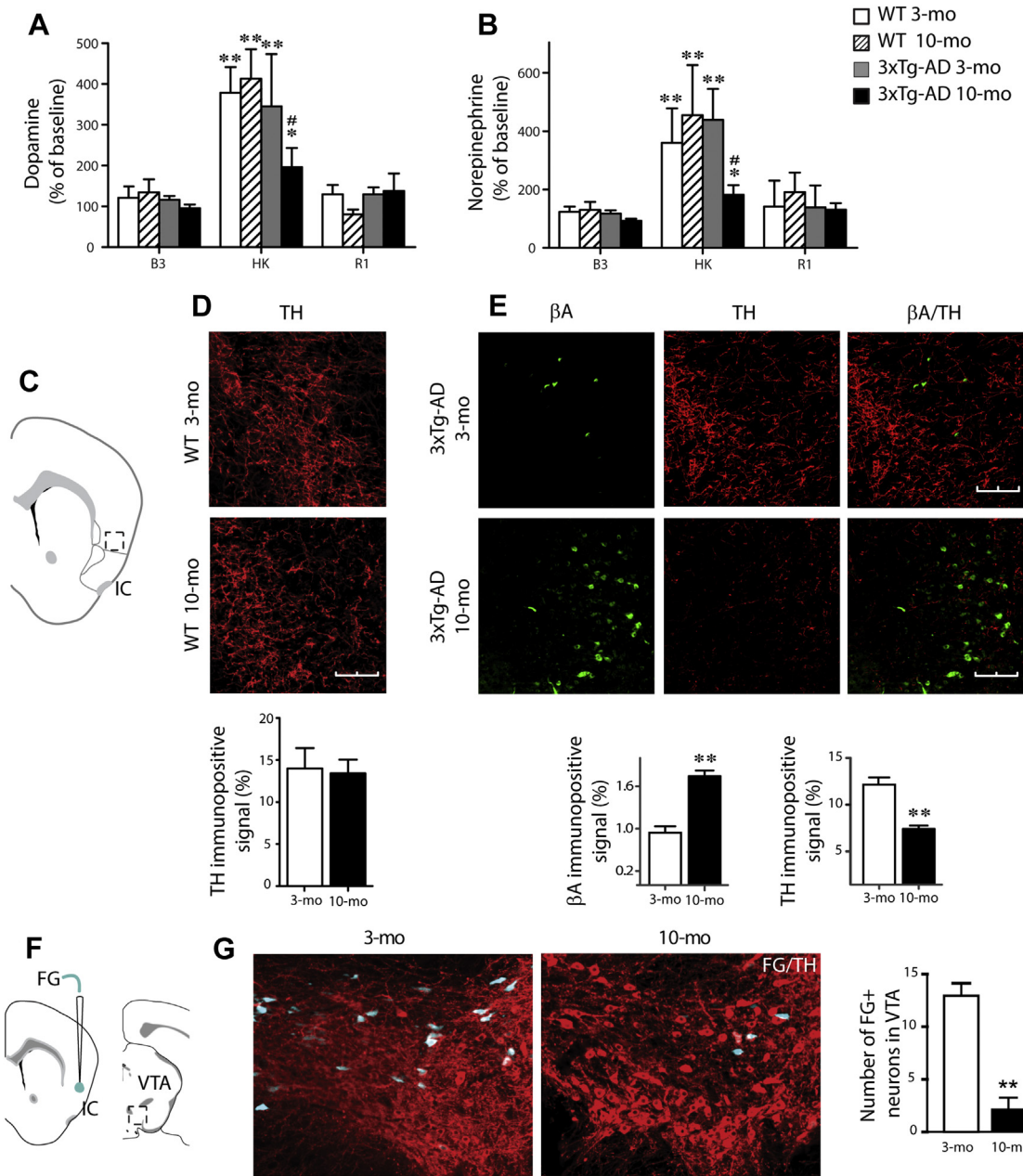


Fig. 2. Aβ accumulation in the IC during administration of high potassium (110 mM) cerebrospinal fluid (HK). B3 refers to basal neurotransmitter levels at baseline fraction 3 and R1 refers to recovery of basal neurotransmitters levels after HK during microdialysis fraction 5. Each column is the mean ± SEM for a fraction of 4 μL obtained during a period of 16 minutes $n = 7$ per group. (**) $p < 0.001$ versus baseline fractions; (*) $p < 0.01$ versus baseline fractions versus (#) $p < 0.01$ 3xTg-AD 10-month versus HK levels for the rest of the groups. Ten-month 3xTg-AD animals show a significantly lower increase in dopamine and norepinephrine levels than the 10-month WT group ($p < 0.05$ for dopamine and $p < 0.01$ for norepinephrine). (C) IC diagram showing the place where the microphotographs were taken (dotted square). (D) Representative micrographs and quantification of immunofluorescence for TH (red) in the IC of 3-month and 10-month WT mice. Scale bar equals to 100 μm. Density of TH+ terminals of 3-month and 10-month WT animals are not significantly different between groups ($p = 0.15$; $n = 3$). (E) Representative micrographs of double immunofluorescence for TH (red) and Aβ (green) in the IC of 3-month and 10-month 3xTg-AD mice showing progressive axonal dystrophy with age-related intracellular Aβ aggregation. Scale bar equals to 100 μm. Graphs on the right show the quantification of Aβ and TH signal in the IC in 3-month ($n = 6$) and 10-month ($n = 6$) 3xTg-AD mice. The percentage mean ± SEM of signal intensity is ** $p < 0.01$. (F) Diagram of FG unilateral injection into the IC (2% FG, 0.3 μL) in 3-month and 10-month 3xTg-AD mice and diagram on the right indicates the VTA showing the place where microphotographs were taken (red square). (G) Representative micrographs and quantification of FG fluorescence shows a decreased number of FG+ neurons in VTA of 10-month 3xTg-AD mice in comparison with 3-month 3xTg-AD mice ($p < 0.01$; $n = 5$ for 3-month 3xTg-AD mice and $n = 4$ for 10-month 3xTg-AD). Abbreviations: Aβ, amyloid-beta; AD, Alzheimer's disease; FG, fluoro-gold; IC, insular cortex; SEM, standard error of mean; TH, tyrosine hydroxylase; VTA, ventral-tegmental area. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

delivery in the BLA-IC pathway. As shown in Fig. 4A and B, the 10-month 3xTg-AD vehicle-treated group expressed LTD [$F(1,5) = 888.6$, $p < 0.01$] after HFS in the IC, whereas the group treated with nomifensine expressed reliable LTP [$F(1,4) = 2601.4$; $p < 0.01$]. I/O curves for the nomifensine-administrated group displayed no

differences with the vehicle-administrated group showing that dopamine reuptake inhibition did not restore the synaptic excitability of the IC [$F(3,14) = 4.637$, $p = 0.018$; Fig. 4C].

Then, we aimed to determine whether the inhibition of dopamine reuptake, which reversed synaptic plastic dysfunction in the

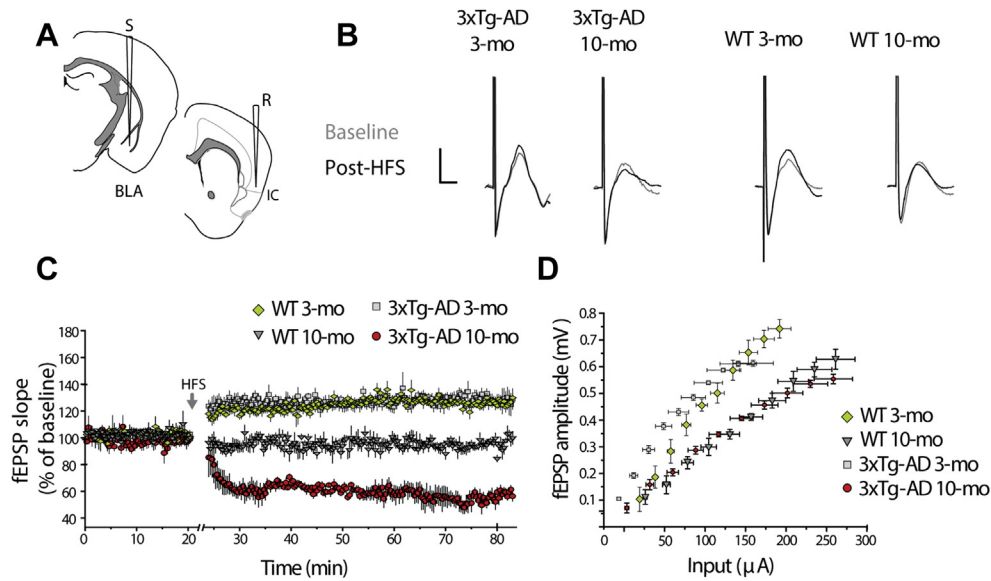


Fig. 3. A β pathology impairs neural plasticity by switching HFS-induced LTP to LTD in the 3 \times Tg-AD model. (A) Schematic representation of sites for stimulation (S) and recording (R) in vivo electrophysiologic responses. (B) Representative traces show fEPSPs before and after tetanic stimulation to induce LTP (calibration: 0.5 mV, 10 ms) in WT and 3 \times Tg-AD mice. (C) Plot of fEPSP of IC-evoked responses in 3-month (n = 6), 10-month (n = 5) WT mice and 3-month (n = 6) and 10-month (n = 5) 3 \times TgAD mice. Note that aging impairs induction of LTP after HFS but A β accumulation in 10-month 3 \times Tg-AD mice (Fig. 2E) blocks LTP induction at the BLA-IC pathway and causes LTD induction under HFS indicated by arrow (10 trains of 100 Hz/1 s/20 s intertrain). Data are the slope mean \pm SEM for fEPSP after HFS indicated as percentage of baseline for each group. (D) Input–output curves for the same 3-month, 10-month WT mice and 3-month and 10-month 3 \times Tg-AD mice. Nonlinear regression analysis of I/O relationship shows significant differences between the 3-month and 10-month groups ($p < 0.001$). Abbreviations: A β , amyloid-beta; AD, Alzheimer’s disease; BLA, basolateral amygdaloid nucleus; fEPSP, field excitatory postsynaptic potentials; HFS, high-frequency stimulation; I/O, input–output; IC, insular cortex; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; SEM, standard error of mean; TH, tyrosine hydroxylase; VTA, ventral-tegmental area.

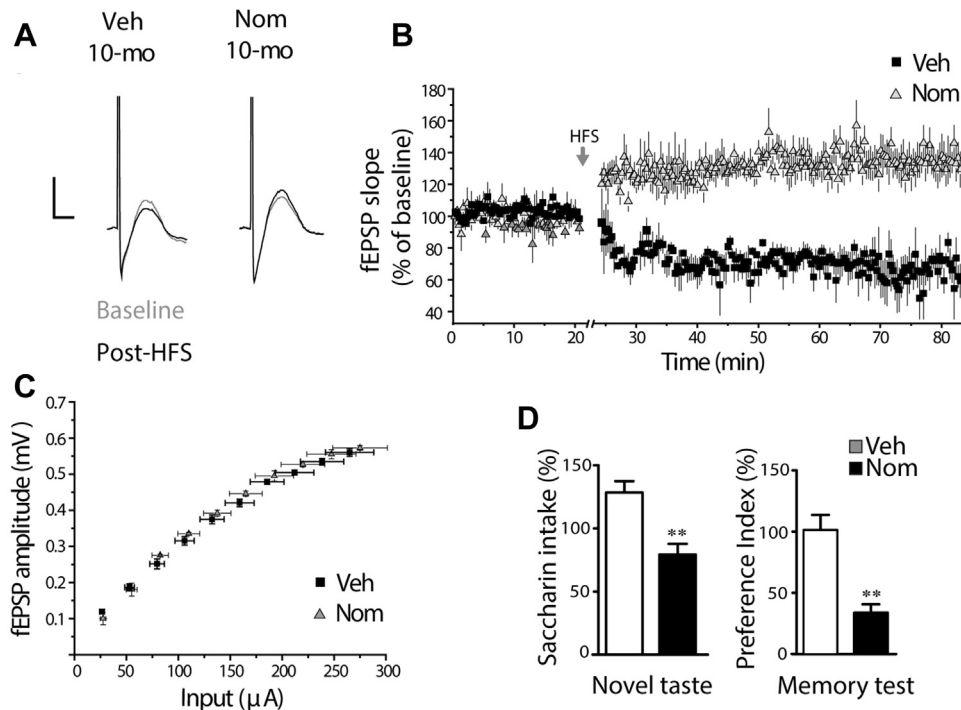


Fig. 4. Blockade of dopamine reuptake restores synaptic plasticity and memory. (A) Representative traces show fEPSPs before and after tetanic stimulation to induce LTP (calibration: 0.5 mV, 10 ms) in 3 \times Tg-AD mice treated with nomifensine or vehicle. (B) Plot of fEPSP of IC-evoked responses in 10-month 3 \times Tg-AD mice treated with nomifensine (Nom; n = 5) or vehicle (Veh; n = 6). HFS failed to induce LTP and evoked LTD in vehicle group. Intracortical injection of nomifensine (25 μ M, 0.5 μ L) 20 minutes before HFS (arrow) enabled back the LTP induction. Slope mean \pm SEM for fEPSP after HFS is indicated as percent of baseline for each group. (C) Input–output curves for 10-month 3 \times Tg-AD mice treated with nomifensine and vehicle. Nonlinear regression analysis of I/O relationship shows no significant differences between the nomifensine and vehicle. (D) Novel taste consumption (left) for 20 minutes after bilateral IC injection of nomifensine (25 μ M, 0.5 μ L). Columns are mean \pm SEM saccharin intake over baseline water consumption. Two-bottle memory test (right) performed 24 hours after novel saccharin presentation and LiCl intraperitoneal administration. $**p < 0.01$; n = 7 for vehicle and n = 10 for nomifensine. Abbreviations: AD, Alzheimer’s disease; fEPSP, field excitatory postsynaptic potentials; HFS, high-frequency stimulation; I/O, input–output; IC, insular cortex; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; SEM, standard error of mean.

BLA-CI pathway, could have a behavioral impact. Nomifensine or vehicle was administered in the IC in two 10-month 3×Tg-AD mice. Intracortical administration of nomifensine was performed 20 minutes before saccharin presentation (novel taste) followed by LiCl injection, and taste memory was assessed 24 hours later. Blockade of dopamine reuptake improved novel taste and aversive taste recognition [One-way ANOVAs for novel taste recognition $F(1,15) = 11.57, p < 0.01$, and $F(1,15) = 26.076, p < 0.01$, for aversive taste memory; Fig. 4D]. These results confirm that increasing extracellular dopamine levels can restore synaptic plasticity and memory function.

3.5. Intracortical administration of $A\beta_{1-42}$ in WT animals induces loss of TH+ terminals, synaptic plasticity alterations and memory deficits

To verify that the switch from LTP to LTD could be attributed to $A\beta$ deposition in the 3×Tg-AD model, we assessed the effect of an intracortical infusion of $A\beta_{1-42}$ oligomers, or the reverse peptide $A\beta_{42-1}$ in 3-month and 10-month WT mice. We administered 0.5 μ L of a 4- μ M solution of each peptide intracortically, as this dose and peptide were previously reported to decrease cortical dopamine levels in rats (Trabace et al., 2007). We performed in vivo BLA-IC electrophysiologic recordings 24 hours after peptide administration (Fig. 5A and B). WT mice administered with reverse peptide ($A\beta_{42-1}$) reached LTP [$F(1,5) = 166.5, p < 0.01$], but 3-month [$F(1,7) = 9.3, p < 0.01$] and 10-month WT mice administered with $A\beta_{1-42}$ oligomers [$F(1,6) = 95.0, p < 0.01$] had a decrease in synaptic efficacy instead of LTP after HFS. A trend toward stronger LTD was shown by 10-month WT mice compared with 3-month WT mice, both administered with $A\beta_{1-42}$ oligomers. The I/O ramp indicates that synaptic transmission in the BLA-IC pathway is affected after infusion of $A\beta_{1-42}$ ($p < 0.01$; Fig. 5C). To investigate whether $A\beta$ oligomers change the basal synaptic strength, we implanted electrodes in the BLA-IC pathway to determine intra-animal basal transmission changes before, immediately after and 24 hours after the $A\beta$ infusion. We found a mild trend toward decrease in basal fEPSP comparing before (0.53 ± 0.02 mV) and 24 hours after (0.47 ± 0.02 mV) peptide infusion ($p = 0.81, n = 3$). This implies that synaptic strength, measured as basal transmission, is not profoundly affected by $A\beta$ oligomers after 24 hours, but its deleterious effect on BLA-IC synapses is evident by increasing the stimulation current in I/O curves.

Histologic analysis revealed that administration of $A\beta_{1-42}$ oligomers induced a significant loss of TH+ axons density in the IC of 3-month WT mice as shown by the reduction in TH expression ($p < 0.01$; Fig. 5D). In addition, the IC injection of the retrograde tracer FG, 24 hours after the $A\beta_{1-42}$ oligomers administration resulted in a decreased number of FG+ neurons in the VTA compared with control peptide injection ($p < 0.01$; Fig. 5E). This implies that $A\beta$ impairs the VTA-IC dopaminergic pathway. Behaviorally, the group receiving $A\beta_{1-42}$ oligomers increased novel saccharin consumption and failed to show aversion during memory test in comparison with reverse peptide [One-way ANOVAs ($F(1,8) = 8.22; p < 0.05$, for novel taste recognition and $F(1,8) = 15.77; p < 0.01$), for preference index; Fig. 5F]. In summary, $A\beta_{1-42}$ but not $A\beta_{42-1}$ decreased dopaminergic neurotransmission and produced synaptic dysfunction and memory impairment, similar to the effects observed in the 10-month 3×TgAD mice.

3.6. Cortical dopamine levels modify LTP and/or LTD-induction threshold

To corroborate that the $A\beta$ -induced conversion from LTP to LTD after HFS was because of a decreased dopaminergic

neurotransmission, we administered 0.25 μ g of 6-OHDA intracortically in 3-month WT mice. This neurotoxin selectively damages catecholaminergic terminals, decreases dopamine levels in the IC and impairs taste aversion, as previously described (Fernandez-Ruiz et al., 1993). Twenty-four hour after 6-OHDA administration, HFS was delivered in the BLA-IC pathway. Fig. 6A and B shows that WT mice administered with vehicle, displayed LTP after HFS [$F(1,4) = 927.1, p < 0.01$], but the 6-OHDA administered group presented a sustained LTD [$F(1,4) = 1029.0, p < 0.01$]. The I/O ramp did not show an affected synaptic transmission in the BLA-IC pathway after injection of 6-OHDA ($p = 0.02$; Fig. 6C). Immunohistochemical analyses confirmed that 3-month WT mice administered with 6-OHDA had a significant loss of TH+ axons in the IC at 24 hours (Fig. 6D).

Summary graphs (Fig. 7A and B) show that a reduced cortical dopamine levels induced by $A\beta$ in 10-month 3×Tg-AD mice, by $A\beta_{1-42}$ oligomers or by 6-OHDA administered in WT mice, produce a switch from LTP to LTD after HFS, while aging only blocks LTP. Remarkably restoring dopamine levels with nomifensine can reverse $A\beta$ -induced conversion from LTP to LTD, allowing the induction of LTP (Fig. 5E).

4. Discussion

We report here that $A\beta$ accumulation in an AD transgenic model or $A\beta_{1-42}$ oligomers administered in WT mice caused the loss of TH+ terminals and reduced cortical dopamine release. This dopamine dysfunction switched the induction of LTP into LTD in the BLA-IC pathway and produced recognition memory impairments. Remarkably, the administration of a catecholaminergic reuptake blocker reverted $A\beta$ -induced synaptic dysfunction. Moreover, the depletion of cortical dopaminergic levels by 6-OHDA, mimicked the conversion of LTP to LTD. All in all, these results suggest that $A\beta$ induces cortical plasticity dysfunction and memory deficiency through an impaired control of dopamine neuromodulation.

Dopamine basal concentration and dopamine release were reduced in 10-month 3×Tg-AD mice when they were presented with a novel gustatory stimulus. This is consistent with our previous findings of impaired dopaminergic release when 10-month 3×Tg-AD mice were exposed to novel objects in a recognition memory task (Guzmán-Ramos et al., 2012a). Conversely, glutamate release remained unaffected during gustatory memory test. In addition, a strong stimulation by high potassium showed an impaired dopamine and norepinephrine release. Accordingly, it has been demonstrated that $A\beta_{1-42}$ oligomers administered to adult rats decreased dopamine baseline levels and reduced dopamine release in the cerebral cortex after high potassium stimulation (Itoh et al., 1996; Trabace et al., 2007). We also assessed the $A\beta$ -linked dopaminergic dysfunction by histologic analyses that showed loss and atrophy of TH+ terminals related to $A\beta$ deposition in the 3×Tg-AD model and a decreased labeling of the retrograde tracer FG in the VTA. Moreover, the exogenous administration of $A\beta_{1-42}$ oligomers mimicked the loss of cortical TH+ terminals in WT mice, which strongly suggests that an $A\beta$ -induced loss of catecholaminergic immunopositive fibers could be a hallmark of early stage AD histopathology. This is consistent with the reduction of TH+ terminals found in AD patients (Booze et al., 1993a, 1993b) and other AD mouse models (Francis et al., 2012; Liu et al., 2008).

Our results show that both $A\beta$ accumulation in the 3×Tg-AD model and $A\beta_{1-42}$ oligomers administration in the IC impair aversive taste memory. This is consistent with other reports in different transgenic mouse models of AD (Devi and Ohno, 2010; Janus et al., 2004; Pistell et al., 2008; Ramírez-Lugo et al., 2009), but we found that aversive taste memory impairment is due a dysfunctional recognition of the novel taste. Only scant studies have investigated

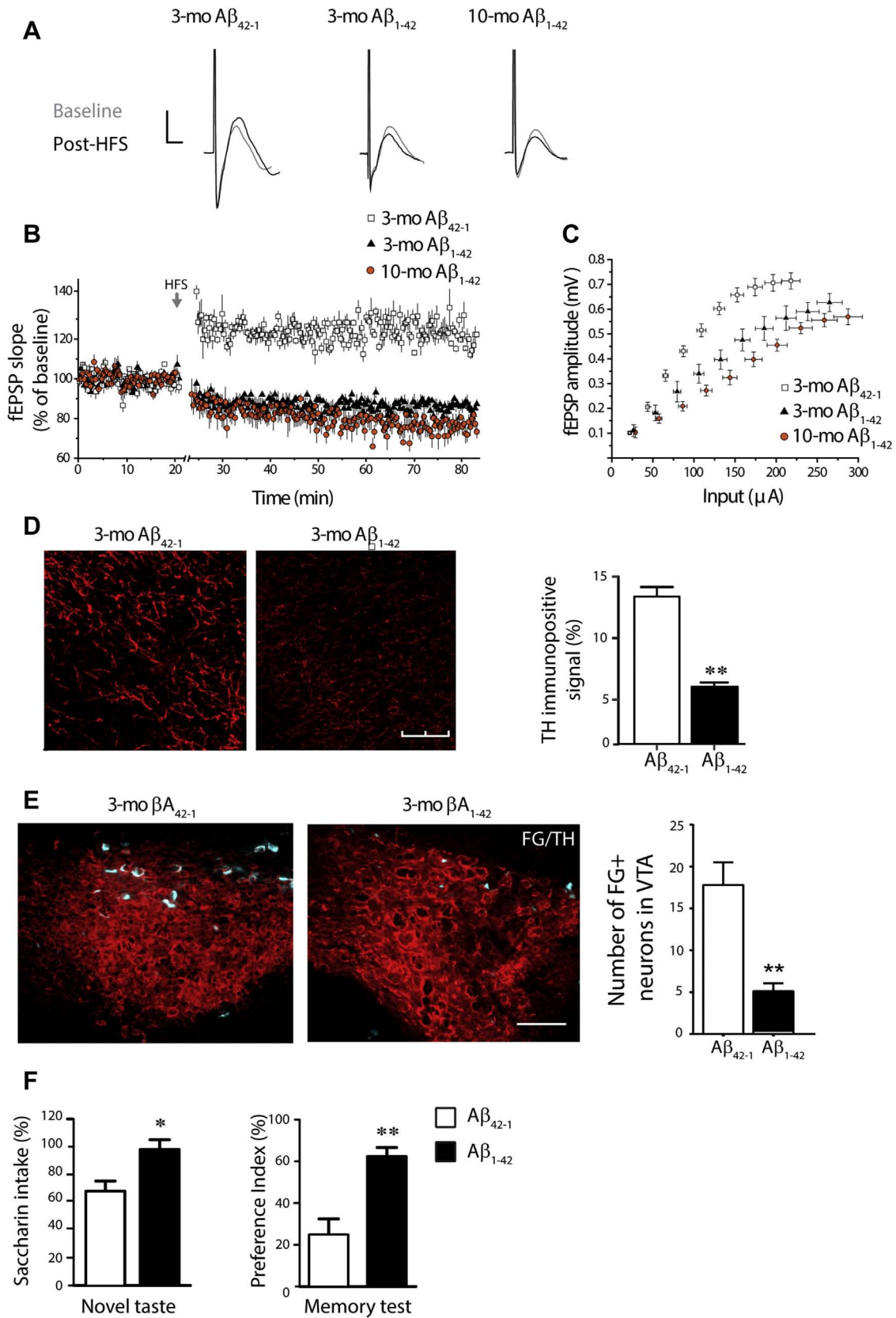


Fig. 5. Intracortical infusions of $A\beta_{1-42}$ induce synaptic plasticity shifting, memory dysfunction, and catecholaminergic axonal dystrophy in WT mice. (A) Representative traces show fEPSPs before and after tetanic stimulation to induce LTP (calibration: 0.5 mV, 10 ms) in WT mice. (B) Plot of fEPSP of IC-evoked responses in 3-month ($n = 8$) and 10-month WT ($n = 7$) mice injected with 4 μM $A\beta_{1-42}$ and 3-month WT-mice injected with the reverse peptide $A\beta_{42-1}$ ($n = 6$). Twenty-four hour later, HFS induced LTP in the $A\beta_{42-1}$ -control group, but produced LTD in groups treated with $A\beta_{1-42}$ at both ages. (C) Input–output (I/O) curves for 3-month and 10-month WT-anesthetized mice infused with $A\beta_{1-42}$ and 3-month WT-mice infused with $A\beta_{42-1}$ as control. I/O ramp indicates that synaptic transmission in the BLA-IC pathway is affected after infusion of $A\beta_{1-42}$. This impairment is significantly stronger in

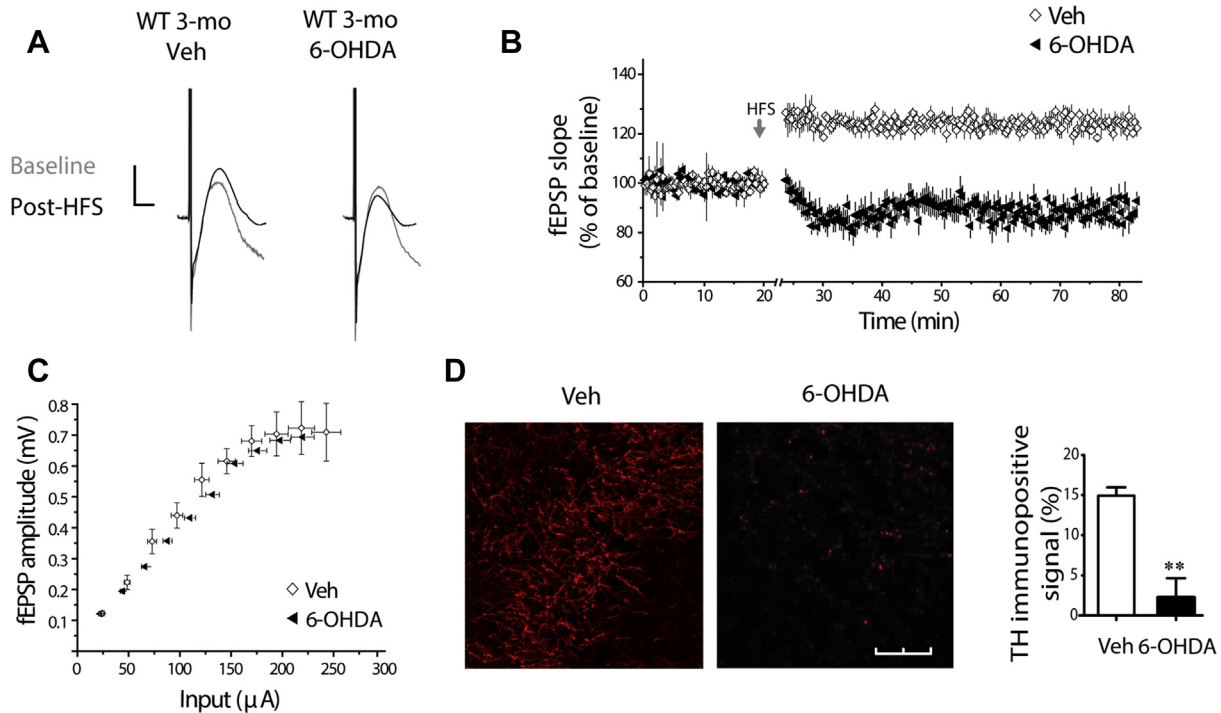


Fig. 6. Cortical catecholaminergic depletion switches HFS-induced LTP to LTD. (A) Representative traces show fEPSPs before and after tetanic stimulation to induce LTP (calibration: 0.5 mV, 5 ms) in WT mice. (B) Plot of fEPSP of IC-evoked responses in 3-month WT mice administered with 0.25 μ g 6-hydroxydopamine (OHDA) ($n = 5$) or vehicle ($n = 5$). Twenty-four hour later, HFS resulted in LTP in control group but failed to induce LTP and evoked LTD in 6-OHDA group. Data are the slope mean \pm SEM for fEPSP after HFS indicated as percent of baseline for each group. (C) Input–output curves for WT-anesthetized mice injected with 6-OHDA or vehicle. Nonlinear regression analysis of I/O relationship shows no significant differences between the 6-OHDA and vehicle groups. (D) Representative images of TH immunofluorescence of the vehicle and 6-OHDA injected mice. Graph on the right shows the density of TH⁺ terminals in the IC of WT animals injected with 6-OHDA ($n = 6$) or vehicle (** $p < 0.01$; $n = 6$). Abbreviations: fEPSP, field excitatory postsynaptic potentials; HFS, high-frequency stimulation; I/O, input–output; IC, insular cortex; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; SEM, standard error of mean; TH, tyrosine hydroxylase.

taste perception in AD patients (Schiffman et al., 1990, 2002; Steinbach et al., 2010). Those studies hardly differentiate between alterations in odor and taste perception, leading to contradictory conclusions. However, a recent study shows alterations in taste recognition but not in taste perception in AD patients (Suto et al., 2014). Interestingly, these authors found by functional magnetic resonance imaging that impaired taste recognition is associated to alterations in the IC. Similar to this finding in AD patients, we did not find differences in taste preference curve or taste threshold sensitivity among ages and genotypes, which supports a memory formation deficiency instead of a sensory disorder.

Altogether, these findings go in the same line with the notion that dopaminergic activity is highly involved in novelty processing. Novel stimuli trigger burst firing of dopamine cells which is related to familiarization to the stimuli, as shown by electrophysiologic experiments in primates (Schultz, 2007). Also microdialysis and voltammetry studies have shown that dopamine release is produced by various types of novelty (Lisman et al., 2011; Schultz, 2013), including novel tastes in the IC (Bermudez-Rattoni, 2014). It is likely that dopamine neurotransmission dysfunction linked to A β pathology may lead to deficiencies in novel and/or familiar

stimuli processing and to recognition memory impairment. Therefore, these results are relevant to understand the recognition deficiencies presented by AD patients, supporting the notion that agnosia could be an early symptom that may lead to memory formation impairments (Ferreira and Klein, 2011).

One of the major findings reported here is that A β induces a switch from LTP to LTD in the BLA-IC pathway under the same parameters of HFS. It has been demonstrated by in vitro and in vivo studies that A β rapidly alters synaptic plasticity, inhibiting LTP after HFS (Lambert et al., 1998; Townsend et al., 2006; Walsh et al., 2002), whereas facilitating LTD after low-frequency stimulation (Hsieh et al., 2006; Shankar et al., 2008; Wang et al., 2004). In this regard, it has been shown that A β activates signaling pathways of LTD, including the activation of kinases and glutamate metabotropic receptors, to drive endocytosis of synaptic α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionic (AMPA) and NMDA receptors, thus enhancing LTD (Hsieh et al., 2006; Renner et al., 2010; Wang et al., 2004; Wu et al., 2011). Nevertheless, A β -mediated mechanisms in the previously discussed reports seem to disrupt LTP to the point of flattening changes in synaptic plasticity but not displaying actual LTD. Here, we found not only an impaired LTP after HFS in the

10-month WT mice treated with A β_{1-42} . (D) Representative images of TH immunofluorescence in the IC for 3-month WT mice bilaterally administered with A β_{1-42} or control peptide. Quantification showed that administration of A β_{1-42} induced a significant loss of TH⁺ axons density in the IC of 3-month WT mice ($p < 0.01$; $n = 5$). (E) Effects of bilateral IC injection of A β_{1-42} or reverse peptide in 3-month WT mice in novel and aversive taste recognition tests. Data are the mean \pm SEM saccharin intake over baseline water consumption. Two-bottle memory test performed 24 hours after novel saccharin presentation and LiCl intraperitoneal administration. (** $p < 0.01$; $n = 6$ in each group). (F) Representative micrographs of FG fluorescence showing a decreased number of FG⁺ neurons in the VTA of 3-month WT mice unilaterally injected with A β_{1-42} in comparison with control peptide injection ($p < 0.01$; $n = 6$ for A β_{1-42} and $n = 5$ for A β_{42-1}). The tracer FG was injected unilaterally into the IC (0.3 μ L of 2% FG) in 3-month WT mice that had a 24 hours previous administration of A β_{1-42} peptide or control peptide into the IC, exactly in the same anatomic site. Graph on the right shows the quantification of FG⁺ neurons in the VTA; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Abbreviations: A β , amyloid-beta; BLA, basolateral amygdaloid nucleus; fEPSP, field excitatory postsynaptic potentials; FG, fluoro-gold; HFS, high-frequency stimulation; I/O, input–output; IC, insular cortex; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; SEM, standard error of mean; TH, tyrosine hydroxylase; VTA, ventral-tegmental area.

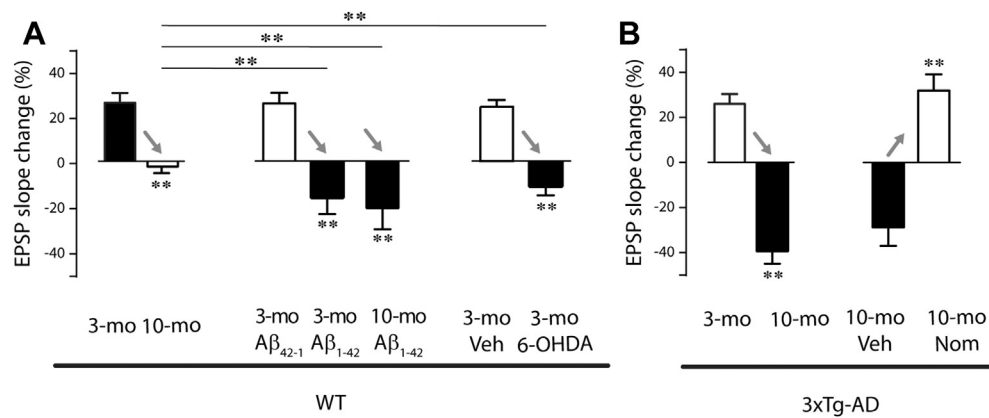


Fig. 7. Cortical catecholaminergic levels modify the threshold of LTP and/or LTD induction. Summary graphs showing that cortical dopamine levels modify LTP and/or LTD induction, data are the slope mean \pm SEM for the last 20 minutes after HFS. (A) Aged WT mice (10-month) failed to display LTP, but A β -administered WT mice at 3- or 10-month displayed LTD after HFS. The 6-hydroxydopamine-administered WT mice also showed LTD after HFS, (B) 10-month 3 \times Tg-AD mice presented a clear LTD under the same experimental protocol. Administration of nomifensine restored the A β -induced LTD and allowed the induction and maintenance of LTP in 10-month 3 \times Tg-AD mice. ** $p < 0.01$. Abbreviations: A β , amyloid-beta; AD, Alzheimer's disease; EPSP, excitatory postsynaptic potentials; HFS, high-frequency stimulation; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; SEM, standard error of mean.

presence of A β but a significant LTD, which was related to low cortical levels of dopamine. This goes well in line with recent findings proposing that the main synaptic defect in AD-mouse models is because of their inability to undergo normal metaplasticity, showing an altered LTP and/or LTD induction threshold across different ages in the APPswe; PS1 Δ E9 transgenic model (Megill et al., 2015).

The altered LTP and/or LTD induction reported here is related to low cortical levels of dopamine. In line with this, it has been proposed that the dopamine control of the threshold for LTP and/or LTD induction depends on sustained tonic dopamine release regulated by cortical afferents rather than phasic dopamine release presynaptically controlled by neuron firing (Grace, 1991; Sheynikhovich et al., 2013). This proposed role of tonic dopamine is different to the role of the hippocampal phasic dopamine shown to control the temporal persistence of LTP (O'Carroll and Morris, 2004; Takeuchi et al., 2014). In addition, experiments in prefrontal cortical slices have shown that switching from LTD to LTP depends on dopamine levels before synaptic stimulation (Kolomiets et al., 2009; Matsuda et al., 2006), showing that tonic dopamine release modulates synaptic AMPA and NMDA receptors trafficking, which in turn modify the threshold for LTP and/or LTD induction (Sheynikhovich et al., 2013). Similarly, it has been shown in vivo that under conditions of chronic D1 receptors blockade, HFS of the medial prefrontal cortex actually induces LTD instead of the expected LTP (Coppa-Hopman et al., 2009).

The IC has a high density of dopaminergic fibers arising principally from the ipsilateral VTA and substantia nigra (Ohara et al., 2003), whereas noradrenergic fibers arise from locus coeruleus, subcoeruleus, and other hindbrain nuclei (Robertson et al., 2013). In addition, noradrenergic terminals could also release dopamine in the IC (Smith and Greene, 2012). Here, we show that A β induces the loss of catecholaminergic terminals and decreases tonic and phasic dopamine levels which may lead to a modification of the threshold to generate cortical plasticity and may also impair the temporal persistence of synaptic plasticity. This idea was corroborated in our experiments by abrogating dopaminergic neurotransmission by 6-OHDA, which induced loss of TH+ axons and mimicked synaptic plasticity alterations found in the AD models.

Remarkably, we found that administration of nomifensine in the 3 \times Tg-AD mice reinstated the ability to induce LTP after HFS. This is consistent with an in vitro study using A β oligomers (Jürgensen et al., 2011) and studies in AD patients (Koch et al., 2014;

Martorana and Koch, 2014) suggesting that AD-related plasticity dysfunction may be ameliorated by dopaminergic activity stimulation. Moreover, a feasible mechanism for this was showed by Jürgensen et al., who demonstrated in hippocampal neurons that the selective activation of dopamine D1/D5 receptors prevents the reduction of surface located AMPA and NMDA receptors by decreasing the GluR1 AMPA receptor subunit phosphorylation at Ser⁸⁴⁵, which regulates the membrane location of the receptor. Nomifensine, in this work, increases dopamine levels in the IC of 10-month 3 \times Tg-AD mice by inhibiting its reuptake (Guzmán-Ramos et al., 2012a), which may lead to an increased activation of D1/D5 receptors that restores synaptic AMPA and NMDA receptors trafficking damaged by A β oligomers. It is important to emphasize, that although we found that A β impairs the dopaminergic control of LTP and/or LTD induction threshold in the BLA-IC pathway, we would expect that this phenomenon may also occur in other brain areas given that; first, it has been shown that dopamine controls the threshold for LTP and/or LTD induction in the prefrontal cortex (Sheynikhovich et al., 2013) and hippocampus (Abraham et al., 2001); and second, dopaminergic terminals have been found lost in the hippocampus, motor, and somatosensory cortices in AD models and patients (Booze et al., 1993b; Liu et al., 2008). This suggests that the dopaminergic system may constitute a target for the development of novel therapeutic approaches for AD.

The fact that age is the major risk factor for AD is reflected in our experiments showing an impaired induction of LTP in middle-aged mice. This is consistent with findings of LTP impairment in middle-aged animals in the neocortex (Lalo et al., 2014) and hippocampus (Rex et al., 2005, 2006) and could reflect that the plasticity in the BLA-IC pathway affected by age renders these pathways vulnerable in AD. Interestingly, 10-month WT mice showed a higher synaptic impairment with a single dose of A β ₁₋₄₂ oligomers in the BLA-IC pathway, this is in the same vein with reports showing that AD-prone areas are also highly vulnerable to normal age changes (Fjell et al., 2014) and stresses the importance of studying aging as an important factor in A β mechanisms of synaptic failure.

5. Conclusions

We have established a novel relationship between catecholaminergic neurotransmission and AD by demonstrating that A β -induced pathological alterations in cortical synapses and memory are

mediated by dopamine dysfunction. One of the implications of this interaction is that dopamine may constitute a target for the development of novel therapeutic approaches for AD treatment. Our work represents an *in vivo* evidence of the dopaminergic control of LTP and/or LTD induction threshold and its implication in AD, outlining the important function of cortical dopamine underlying the mechanism of synaptic plasticity and memory formation in the healthy and diseased brain.

Disclosure statement

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgements

This research was supported by grants from CONACYT (155242 and CB 250870) and PAPIIT-UNAM (IN209413 and IN208616) to FBR, and PAPIIT-UNAM (IN215816) to MLE. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of Moreno-Castilla P at the UNAM. The authors declare no competing financial interests. We thank Dr. Israel Balderas and Biol. Gonzalo Acero Galindo for technical assistance, Fernanda Lopez-Gutierrez, Silvia Morales, and Rodrigo Perez-Ortega for their assistance in experiments. We thank Drs. Luis B. Tovar-y-Romo, Carlos Rodríguez-Ortiz, and Leticia Ramírez-Lugo for careful reading earlier versions of the article.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.021>.

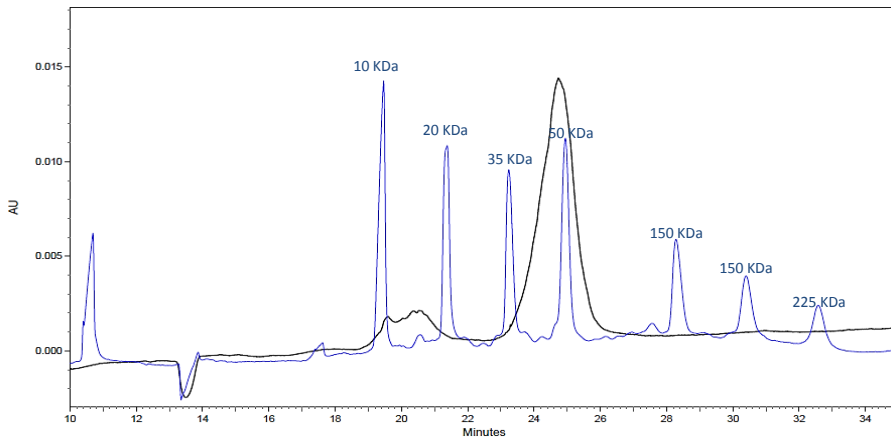
References

- Abraham, W.C., Mason-Parker, S.E., Bear, M.F., Webb, S., Tate, W.P., 2001. Heterosynaptic metaplasticity in the hippocampus *in vivo*: a BCM-like modifiable threshold for LTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10924–10929.
- Ambrée, O., Richter, H., Sachser, N., Lewejohann, L., Dere, E., de Souza Silva, M.A., Herring, A., Keyvani, K., Paulus, W., Schäbitz, W.R., 2009. Levodopa ameliorates learning and memory deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 30, 1192–1204.
- Bachmanov, A.A., Tordoff, M.G., Beauchamp, G.K., 2001. Sweetener preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *Chem. Senses* 26, 905–913.
- Bermúdez-Rattoni, F., 2004. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 209–217.
- Bermúdez-Rattoni, F., 2014. The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 109, 207–216.
- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., LaFerla, F.M., 2005. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45, 675–688.
- Booze, R.M., Mactutus, C.F., Gutman, C.R., Davis, J.N., 1993a. Frequency analysis of catecholamine axonal morphology in human brain. I. Effects of postmortem delay interval. *J. Neurol. Sci.* 119, 99–109.
- Booze, R.M., Mactutus, C.F., Gutman, C.R., Davis, J.N., 1993b. Frequency analysis of catecholamine axonal morphology in human brain. II. Alzheimer's disease and hippocampal sympathetic ingrowth. *J. Neurol. Sci.* 119, 110–118.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Di Filippo, M., 2007. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 30, 211–219.
- Coppa-Hopman, R.D., Galle, J., Pimkine, D., 2009. D1 receptor antagonist-induced long-term depression in the medial prefrontal cortex of rat, *in vivo*: an animal model of psychiatric hypofrontality. *J. Psychopharmacol.* 23, 672–685.
- Devi, L., Ohno, M., 2010. Genetic reductions of BACE1 and amyloid- β ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer model mice. *Eur. J. Neurosci.* 31, 110–118.
- Escobar, M.L., Bermúdez-Rattoni, F., 2000. Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res.* 852, 208–212.
- Fernandez-Ruiz, J., Miranda, M.J., Bermúdez-Rattoni, F., Drucker-Colín, R., 1993. Effects of catecholaminergic depletion of the amygdala and insular cortex on the potentiation of odor by taste aversions. *Behav. Neural Biol.* 60, 189–191.
- Ferreira, S.T., Klein, W.L., 2011. The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 529–543.
- Fezoui, Y., Hartley, D.M., Harper, J.D., Khurana, R., Walsh, D.M., Condron, M.M., Selkoe, D.J., Lansbury, P.T., Fink, A.L., Teplow, D.B., 2000. An improved method of preparing the amyloid beta-protein for fibrillogenesis and neurotoxicity experiments. *Amyloid* 7, 166–178.
- Fjell, A.M., McEvoy, L., Holland, D., Dale, A.M., Walhovd, K.B., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2014. What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Prog. Neurobiol.* 117, 20–40.
- Francis, B.M., Yang, J., Hajderi, E., Brown, M.E., Michalski, B., McLaurin, J., Fahnestock, M., Mount, H.T.J., 2012. Reduced tissue levels of noradrenaline are associated with behavioral phenotypes of the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 37, 1934–1944.
- Golden, G.J., Ishiwatari, Y., Theodorides, M.L., Bachmanov, A.A., 2011. Effect of chorda tympani nerve transection on salt taste perception in mice. *Chem. Senses* 36, 811–819.
- Grace, A.A., 1991. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41, 1–24.
- Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., Bermúdez-Rattoni, F., 2010. Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *J. Neurochem.* 114, 226–236.
- Guzmán-Ramos, K., Moreno-Castilla, P., Castro-Cruz, M., McGaugh, J.L., Martínez-Coria, H., LaFerla, F.M., Bermúdez-Rattoni, F., 2012a. Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N.* 19, 453–460.
- Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., Bermúdez-Rattoni, F., 2012b. Post-acquisition release of glutamate and norepinephrine in the amygdala is involved in taste-aversion memory consolidation. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N.* 19, 231–238.
- Himeno, E., Ohyagi, Y., Ma, L., Nakamura, N., Miyoshi, K., Sakae, N., Motomura, K., Soejima, N., Yamasaki, R., Hashimoto, T., Tabira, T., LaFerla, F.M., Kira, J., 2011. Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid- β degradation. *Ann. Neurol.* 69, 248–256.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., Malinow, R., 2006. AMPAR removal underlies A β -induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52, 831–843.
- Itoh, A., Nitta, A., Nadai, M., Nishimura, K., Hirose, M., Hasegawa, T., Nabeshima, T., 1996. Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in beta-amyloid protein-infused rats. *J. Neurochem.* 66, 1113–1117.
- Janus, C., Welzl, H., Hanna, A., Lovasik, L., Lane, N., St. George-Hyslop, P., Westaway, D., 2004. Impaired conditioned taste aversion learning in APP transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 25, 1213–1219.
- Jones, M.W., French, P.J., Bliss, T.V., Rosenblum, K., 1999. Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex *in vivo*. *J. Neurosci.* 19, RC36.
- Jürgensen, S., Antonio, L.L., Mussi, G.E.A., Brito-Moreira, J., Bomfim, T.R., De Felice, F.G., Garrido-Sanabria, E.R., Cavalheiro, É.A., Ferreira, S.T., 2011. Activation of D1/D5 dopamine receptors protects neurons from synapse dysfunction induced by amyloid-beta oligomers. *J. Biol. Chem.* 286, 3270–3276.
- Koch, G., Esposito, Z., Codecà, C., Mori, F., Kusayanagi, H., Monteleone, F., Di Lorenzo, F., Bernardi, G., Martorana, A., 2011. Altered dopamine modulation of LTD-like plasticity in Alzheimer's disease patients. *Clin. Neurophysiol.* 122, 703–707.
- Koch, G., Di Lorenzo, F., Bonni, S., Giacobbe, V., Bozzali, M., Caltagirone, C., Martorana, A., 2014. Dopaminergic modulation of cortical plasticity in Alzheimer's disease patients. *Neuropsychopharmacology* 39, 2654–2661.
- Kolomiets, B., Marzo, A., Caboche, J., Vanhoutte, P., Otani, S., 2009. Background dopamine concentration dependently facilitates long-term potentiation in rat prefrontal cortex through postsynaptic activation of extracellular signal-regulated kinases. *Cereb. Cortex* 19, 2708–2718.
- Lalo, U., Rasooli-Nejad, S., Pankratov, Y., 2014. Exocytosis of gliotransmitters from cortical astrocytes: implications for synaptic plasticity and aging. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1275–1281.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L., 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6448–6453.
- Li, S., Jin, M., Zhang, D., Yang, T., Koeglsperger, T., Fu, H., Selkoe, D.J., 2013. Environmental novelty activates β 2-adrenergic signaling to prevent the impairment of hippocampal LTP by A β oligomers. *Neuron* 77, 929–941.
- Lisman, J., Grace, A.A., Duzel, E., 2011. A neoHebbian framework for episodic memory: role of dopamine-dependent late LTP. *Trends Neurosci.* 34, 536–547.
- Liu, Y., Yoo, M.J., Savonenko, A., Stirling, W., Price, D.L., Borchelt, D.R., Mamounas, L., Lyons, W.E., Blue, M.E., Lee, M.K., 2008. Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 28, 13805–13814.
- Martorana, A., Koch, G., 2014. Is dopamine involved in Alzheimer's disease? *Front. Aging Neurosci.* 6, 252.
- Martorana, A., Mori, F., Esposito, Z., Kusayanagi, H., Monteleone, F., Codecà, C., Sancesario, G., Bernardi, G., Koch, G., 2009. Dopamine modulates cholinergic cortical excitability in Alzheimer's disease patients. *Neuropsychopharmacology* 34, 2323–2328.
- Matsuda, Y., Marzo, A., Otani, S., 2006. The presence of background dopamine signal converts long-term synaptic depression to potentiation in rat prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 26, 4803–4810.

- Megill, A., Tran, T., Eldred, K., Lee, N.J., Wong, P.C., Hoe, H.S., Kirkwood, A., Lee, H.K., 2015. Defective age-dependent metaplasticity in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 35, 11346–11357.
- Nitsche, M.A., Kuo, M.F., Grosch, J., Bergner, C., Monte-Silva, K., Paulus, W., 2009. D1-receptor impact on neuroplasticity in humans. *J. Neurosci.* 29, 2648–2653.
- O'Carroll, C.M., Morris, R.G.M., 2004. Heterosynaptic co-activation of glutamatergic and dopaminergic afferents is required to induce persistent long-term potentiation. *Neuropharmacology* 47, 324–332.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.
- Ohara, P.T., Granato, A., Moallem, T.M., Wang, B.R., Tillet, Y., Jasmin, L., 2003. Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *J. Neurocytol.* 32, 131–141.
- Pignatelli, M., Bonci, A., 2015. Role of dopamine neurons in reward and aversion: a synaptic plasticity perspective. *Neuron* 86, 1145–1157.
- Pistell, P.J., Zhu, M., Ingram, D.K., 2008. Acquisition of conditioned taste aversion is impaired in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 152, 594–600.
- Ramírez-Lugo, L., Jensen, M.S., Söderman, A., West, M.J., 2009. Deficits in aversive but not in safe taste memory in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *J. Alzheimers Dis.* 18, 281–293.
- Renner, M., Lacor, P.N., Velasco, P.T., Xu, J., Contractor, A., Klein, W.L., Triller, A., 2010. Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66, 739–754.
- Rex, C.S., Kramár, E.A., Colgin, L.L., Lin, B., Gall, C.M., Lynch, G., 2005. Long-term potentiation is impaired in middle-aged rats: regional specificity and reversal by adenosine receptor antagonists. *J. Neurosci.* 25, 5956–5966.
- Rex, C.S., Lauterborn, J.C., Lin, C.Y., Kramár, E.A., Rogers, G.A., Gall, C.M., Lynch, G., 2006. Restoration of long-term potentiation in middle-aged hippocampus after induction of brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurophysiol.* 96, 677–685.
- Robertson, S.D., Plummer, N.W., de Marchena, J., Jensen, P., 2013. Developmental origins of central norepinephrine neuron diversity. *Nat. Neurosci.* 16, 1016–1023.
- Sathyasesan, A., Ogura, T., Lin, W., 2012. Automated measurement of nerve fiber density using line intensity scan analysis. *J. Neurosci. Methods* 206, 165–175.
- Schiffman, S.S., Clark, C.M., Warwick, Z.S., 1990. Gustatory and olfactory dysfunction in dementia: not specific to Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 11, 597–600.
- Schiffman, S.S., Graham, B.G., Sattely-Miller, E.A., Zervakis, J., Welsh-Bohmer, K., 2002. Taste, smell and neuropsychological performance of individuals at familial risk for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 23, 397–404.
- Schultz, W., 2007. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 259–288.
- Schultz, W., 2013. Updating dopamine reward signals. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 229–238.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., Selkoe, D.J., 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837–842.
- Sheynikhovich, D., Otani, S., Arleo, A., 2013. Dopaminergic control of long-term depression/long-term potentiation threshold in prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 33, 13914–13926.
- Smith, C.C., Greene, R.W., 2012. CNS dopamine transmission mediated by noradrenergic innervation. *J. Neurosci.* 32, 6072–6080.
- Steinbach, S., Hundt, W., Vaitl, A., Heinrich, P., Förster, S., Bürger, K., Zahnert, T., 2010. Taste in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Neurol.* 257, 238–246.
- Suto, T., Meguro, K., Nakatsuka, M., Kato, Y., Tezuka, K., Yamaguchi, S., Tashiro, M., 2014. Disorders of "taste cognition" are associated with insular involvement in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia: "memory of food is impaired in dementia and responsible for poor diet." *Int. Psychogeriatr.* 26, 1–12.
- Takeuchi, T., Duzskiewicz, A.J., Morris, R.G.M., 2014. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130288.
- Townsend, M., Shankar, G.M., Mehta, T., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., 2006. Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J. Physiol.* 572, 477–492.
- Trabace, L., Kendrick, K.M., Castrignano, S., Colaïanna, M., De Giorgi, A., Schiavone, S., Lanni, C., Cuomo, V., Govoni, S., 2007. Soluble amyloid beta_{1–42} reduces dopamine levels in rat prefrontal cortex: relationship to nitric oxide. *Neuroscience* 147, 652–663.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539.
- Wang, Q., Walsh, D.M., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., 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, 3370–3378.
- Wu, J., Petralia, R.S., Kurushima, H., Patel, H., Jung, M., Volk, L., Chowdhury, S., Shepherd, J.D., Dehoff, M., Li, Y., Kuhl, D., Haganir, R.L., Price, D.L., Scannevin, R., Troncoso, J.C., Wong, P.C., Worley, P.F., 2011. Arc/Arg3.1 regulates an endosomal pathway essential for activity-dependent β -amyloid generation. *Cell* 147, 615–628.

Supplementary Figure 1

A



B

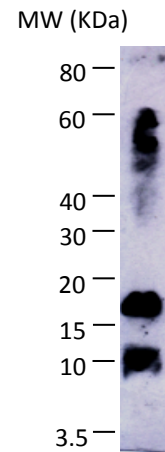


Figure S1: Characterization of Aβ₁₋₄₂ oligomers by size-exclusion capillary electrophoresis and western blot. **A)** Blue trace shows a representative electropherogram of the molecular weight standard containing the indicated protein sizes. Black trace is a representative electropherogram of the separation of Aβ₁₋₄₂ oligomers that were injected in mice. **B)** Western blot of Aβ₁₋₄₂ oligomers probed with the BAM-10 antibody. Both analyses show that size of aggregates varies from dimers and tetramers (9-18 KDa) to higher molecular weight oligomers (40-60 KDa).

Supplementary Figure 2

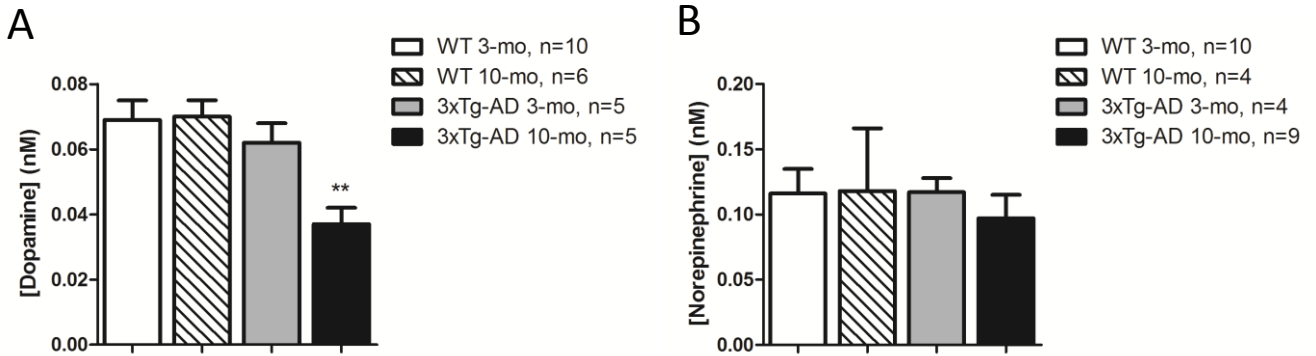


Figure S2: Basal extracellular concentration of dopamine (A) and norepinephrine (B) in the insular cortex. Each column is the mean \pm S.E.M concentration in nM. Three microdialysis fractions of 4 μ l were analyzed per mouse. Dopamine concentration was lower in the IC of 10-mo 3xTg-AD mice (0.037 ± 0.005 nM, n=6) compared to the other groups (0.062 ± 0.006 nM for 3-mo 3xTg-AD mice; n=5, 0.069 ± 0.006 nM and 0.070 ± 0.005 nM for 3-mo and 10-mo WT mice; n=10 and n=6, respectively; $F(3,23)=6.341$, $p=0.002$). Norepinephrine levels were not significantly different among groups ($F(3,23)=0.20$, $p=0.8918$).

6.2 Las catecolaminas tienen un efecto protector sobre la acumulación del β A y el progreso de la patología relacionada a la enfermedad de Alzheimer

“Catecholamines reduce $A\beta$ accumulation in vivo by preventing misfolding and aggregation”

Moreno-Castilla P., Hernández-Órtiz J.E., López Gutiérrez M.F., Bermúdez-Rattoni F.
Manuscrito en preparación.

Resumen

Se ha reportado que en la EA se producen alteraciones en la neurotransmisión colinérgica y glutamatérgica del cerebro, que repercuten en el aprendizaje y formación de memorias. Si bien se han desarrollado tratamientos para compensar la disfunción de estos sistemas de neurotransmisión, no han sido suficientes para aminorar los síntomas y la progresión de la enfermedad, por lo que resulta necesario investigar otros blancos terapéuticos. La relación entre la EA y el sistema dopaminérgico ha sido poco explorada, y se ha encontrado que este sistema, que es modulador de procesos de aprendizaje y memoria, está alterado tanto en pacientes, como en modelos experimentales para la EA. Asimismo, estudios *in vitro* han reportado que las catecolaminas, moléculas que poseen un grupo catecol en su estructura, son capaces de disgregar el péptido β A e impedir su agregación en placas. Además, experimentos en animales a los que se les administraron agonistas dopaminérgicos o precursores de dopamina muestran una disminución en la deposición del β A y un mejor desempeño en tareas conductuales. Debido a que estos compuestos poseen un grupo catecol, y este mismo ha demostrado inhibir la fibrilación del β A, el segundo objetivo de este proyecto plantea evaluar el efecto protector de las catecolaminas sobre la acumulación del β A y el progreso de la patología de la enfermedad de Alzheimer. Lo anterior permitirá el desarrollo de alternativas terapéuticas que aminoren los síntomas cognitivos y progresión de este padecimiento. El presente trabajo investiga en una primera etapa el efecto de la administración aguda de catecol y dopamina en la acumulación que presenta el modelo 3xTg-AD. Además, evaluamos el efecto del tratamiento sub-agudo con levodopa sobre el desempeño cognitivo y la acumulación del β A en el mismo modelo. Hallamos que la administración aguda de dopamina y catecol disminuyen la acumulación del β A en la corteza cerebral y en el hipocampo después de 24 h de la administración intra-cerebral. El tratamiento con levodopa incrementó los niveles de dopamina y restauró la memoria de reconocimiento del ratón 3xTg-AD. Además, los animales tratados con levodopa mostraron una disminución de la acumulación del β A intracelular en hipocampo y la corteza insular, regiones cerebrales relevantes en los procesos de memoria. Los resultados que se obtuvieron apoyan la relevancia del sistema dopaminérgico como un factor participante en el desarrollo de la patología de la EA y develan su potencial terapéutico para el tratamiento de la EA

6.2.1 La administración aguda de catecol y dopamina disminuye la acumulación del β A en el modelo 3xTg-AD

Estudios *in vitro* han demostrado que debido a su estructura química, la dopamina, la norepinefrina y algunos agonistas dopaminérgicos tienen la capacidad de interactuar con el β A, al formar interacciones estables que alteran su patrón de agregación (Huong et al., 2010; Ono et al., 2006). Con el fin de determinar el efecto de la dopamina sobre los agregados del β A *in vivo*, hicimos administraciones intra-cerebrales de vehículo, dopamina y catecol (Figura 5A), todos a una concentración 1500 nM. Administramos 0.5 μ L en un hemisferio y analizamos el hemisferio contralateral como control. Después de 24 horas de la administración, los animales fueron sacrificados y cuantificamos la acumulación del β A mediante inmunohistoquímica. Encontramos, como es posible observar en la figura 5 B-C que la administración de dopamina y catecol en la corteza motora, disminuye de manera significativa la acumulación del β A. Asimismo en el hipocampo encontramos disminución en los acumulados en los hemisferios tratados (Figura 5 B-C). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el grupo catecol de la dopamina interactúa directamente con el péptido β A impidiendo su plegamiento y favoreciendo su degradación.

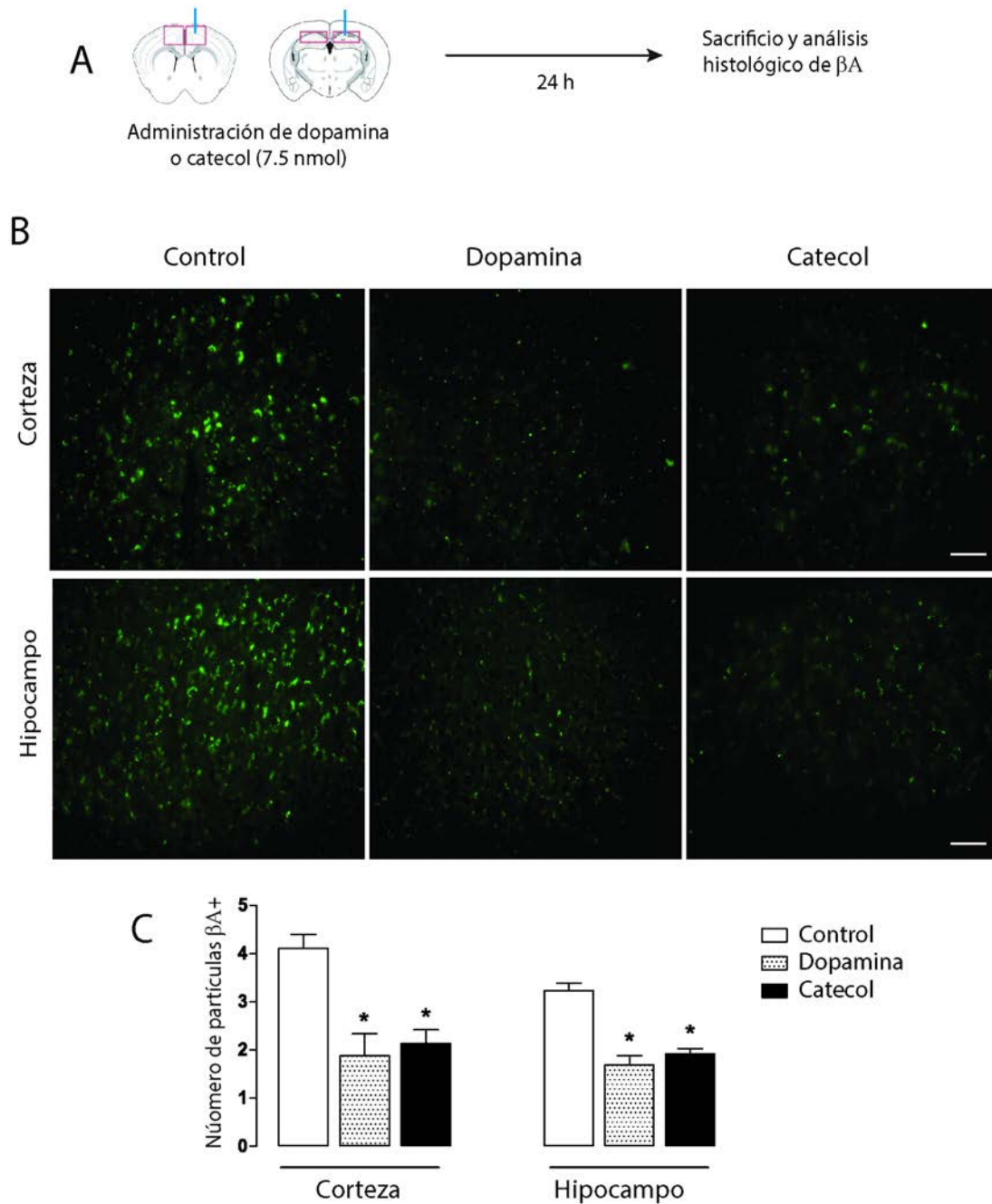


Figura 5] Reducción de la acumulación del βA tras la administración intra-cerebral de dopamina y catecol (7.5 nmoles) en la corteza motora (Cortex) y CA1 del hipocampo (Hippocampus) de ratones 3xTg-AD de 12 meses de edad. A) Representación esquemática de la administración de dopamina o catecol en un hemisferio. 24 h después de la administración, los animales fueron sacrificados para el análisis histológico. B) Fotos representativas de la señal inmunorreactiva de βA (anticuerpo 6E10) en el hipocampo y corteza del hemisferio administrado con dopamina y catecol, y el hemisferio contralateral intacto como control. C) Cuantificación del número de partículas inmunorreactivas a el βA (el $\beta A+$) en la corteza y el hipocampo de hemisferios administrados con dopamina (n=3) y catecol (n=3). Promedio del número de partículas \pm error estándar, * $p < 0.05$. La barra de escala en cada imagen representa 100 μm

6.2.1 El tratamiento con levodopa restaura la liberación de dopamina y el desempeño cognitivo de los ratones 3xTg-AD

Con el fin de determinar el efecto de la administración de levodopa en los niveles extracelulares de dopamina en la CI durante la fase de adquisición de la ORM, se analizaron los cambios en la concentración extracelular de dopamina y norepinefrina (Figura 6A-C). Observamos un incremento significativo en el porcentaje de liberación de dopamina durante la exploración de los objetos, en el grupo tratado con levodopa (n=4) respecto al grupo vehículo (n=4) ($F(1,4)=6.575$ $p=0.0167$; Figura 6 D-E). Al realizar un análisis post-hoc con la prueba Fisher *least significant difference* (LSD), se reveló que el porcentaje de liberación de dopamina en los animales tratados con levodopa incrementa de manera significativa durante la fracción que corresponde a la exploración durante la fase de adquisición respecto a la línea base (F3-F4, $p=0.0140$) y a la fracción posterior (F4-F5, $p=0.030$). Estos resultados indican que la administración de levodopa restaura la liberación de dopamina en CI de los ratones 3xTg-AD durante la adquisición del ORM. El análisis de la liberación de los neurotransmisores norepinefrina ($F(1,4)=1.160$, $p=0.2922$; Figura 6C) y GABA ($F(1,4)=0.625$, $p=0.4371$; dato no mostrado) mostró que la concentración extracelular de dichos neurotransmisores no cambia durante la fase de adquisición del ORM.

El efecto del tratamiento de levodopa sobre la memoria de reconocimiento de los ratones fue evaluado a través del protocolo de ORM. Se midieron los tiempos de exploración de los sujetos y se calculó en índice de reconocimiento de objeto (IRO) para la fase de adquisición y la fase de MLP. En la fase de adquisición encontramos que los ratones en ambos grupos exploraron los objetos idénticos de manera similar y no hubo diferencia significativa en su IRO (vehículo n=11, $p=0.4369$; levodopa n=16, $p=0.6523$; Figura 6D). Los índices obtenidos indican que los ratones no mostraron preferencia por alguno de los objetos. En la MLP, se encontró que el grupo tratado con levodopa pudo distinguir al objeto familiar del objeto novedoso, contrario al grupo vehículo, que exploró ambos objetos por igual por lo que indica no hubo detección de un objeto novedoso (vehículo n=11, $p=0.6176$; levodopa n=16, $p<0.0001$; Figura 6D). Los datos obtenidos confirman que los ratones 3xTg-AD de 12 meses presentan un déficit en la memoria de reconocimiento que puede ser restaurado con la administración de levodopa.

Los tiempos totales de exploración (TTE) fueron analizados para saber si había alguna diferencia en el tiempo de exploración entre los tratamientos. Los resultados indicaron los sujetos tratados con levodopa tuvieron variaciones significativas en el TTE entre la adquisición y MLP ($F(15,15)=6.502$, $p=0.0008$). Al realizar una prueba U de Mann-Whitney no se halló una interacción significativa entre las variables (levodopa n=7, $p=0.1935$). En el grupo vehículo no hubo diferencias significativas entre el TTE de la fase de adquisición y memoria de largo plazo (vehículo n=11, $p=0.1091$; levodopa n=16, $p=0.1190$), así como no se encontraron diferencias en el tiempo al comparar las fases entre tratamientos (adquisición, $p=0.5333$; MLP, $p=0.8002$) (Figura 6E), lo que indica que la levodopa no produce un cambios en la exploración de los objetos. Estos resultados comprueban que el tratamiento sub-agudo con levodopa mejora el desempeño de los ratones 3xTg-AD en una tarea de memoria de reconocimiento, lo que quiere decir que la restauración de la actividad dopaminérgica por medio de este fármaco tiene efectos observables a nivel conductual y de relevancia cognitiva.

Con el fin de determinar el efecto del tratamiento con levodopa en la memoria espacial que es dependiente de hipocampo, evaluamos el desempeño cognitivo de los ratones en el laberinto acuático de Morris. La latencia de escape a la plataforma en cada ensayo y se analizó por cada

día de entrenamiento. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con levodopa mejora la ejecución de la tarea conductual, al mostrar una diferencia significativa entre grupos el día 3 y día 4 del entrenamiento (vehículo $n=12$, $p=0.6176$; levodopa $n=11$, $p=0.0124$; Figura 7A). Ambos grupos mostraron una disminución del tiempo requerido para llegar a la plataforma en función de los días de entrenamiento pero los ratones tratados con levodopa alcanzaron latencias más cortas los días 3 y 4 del entrenamiento (Figura 7A).

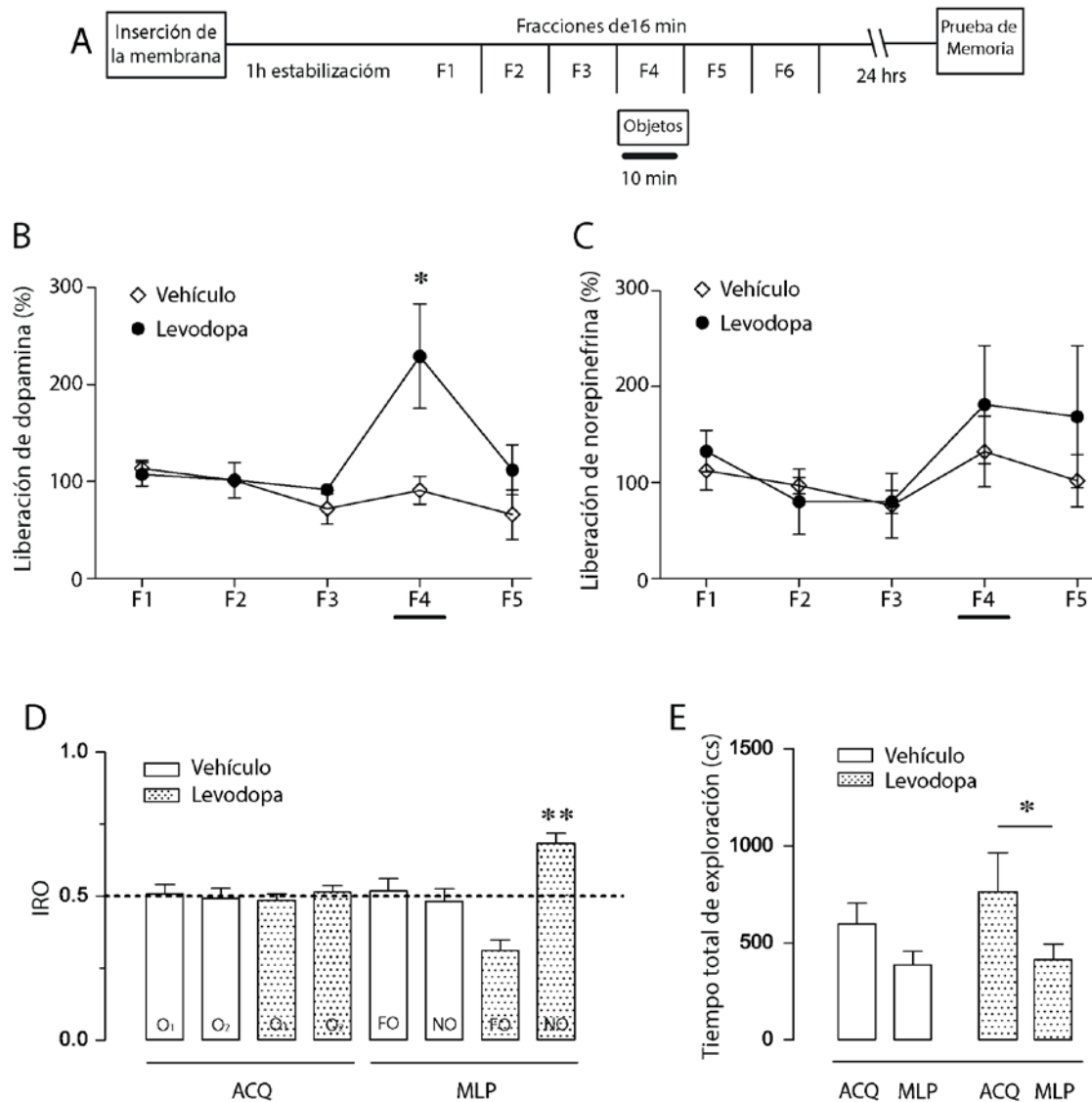


Figura 6 | La administración de levodopa incrementa los niveles de dopamina y mejora el desempeño cognitivo de la memoria de reconocimiento de objeto nuevo en ratones 3xTg-AD de 12 meses. Gráficas que expresan el porcentaje de liberación de dopamina (B) y norepinefrina (C) determinado mediante la técnica de microdiálisis en la corteza insular. F1-F5 se refieren a fracciones consecutivas de 16 min. La F4 corresponde al tiempo en que el animal se encontraba explorando los objetos nuevos en la fase de adquisición de la memoria (A). Los animales tratados con levodopa presentan un incremento significativo de liberación de dopamina respecto al grupo vehículo (* $p=0.0167$). D) Índice de reconocimiento de objeto (IRO) durante la fase de adquisición (ACQ) y memoria de largo plazo (MLP). En la ADQ, los animales exploraron 2 objetos idénticos (O1 y O2) durante 10 min. Durante la prueba de LTM, los ratones tratados con levodopa ($n=16$) distinguieron el objeto novedoso (NO) del objeto

familiar (FO) (** $p < 0.0001$), a diferencia de los animales vehículo ($n=11$). En la gráfica, cada barra representa el IRO de cada objeto, y la línea punteada representa la media hipotética. Los datos se presentan en promedio \pm error estándar. E) Gráfica de Tiempo total de exploración (TTE) expresado en centésimas de segundo (cs) de ambos grupos en las fases de ACQ y MLP.

La prueba de MLP evaluó si los sujetos recordaban la localización de la plataforma. Para ello, la plataforma se removió durante toda la sesión. La prueba consistió en un nado libre que tuvo una duración de 60 segundos para cada sujeto. Durante la prueba de MLP, se cuantificó la velocidad media de nado (cm/s), el recorrido total (m), la latencia inicial para llegar a la plataforma (s), número de cruces sobre la plataforma (n) y tiempo nado en el cuadrante de la plataforma (s). Estos parámetros fueron comparados entre los grupos vehículo y con tratamiento de levodopa (Figura 7B-F). Al realizar el conteo del número de cruces en la ubicación original de la plataforma, se encontró que no hubo diferencias entre tratamientos (vehículo $n=10$, levodopa $n=11$; $p=0.4670$). El tiempo de latencia a la plataforma fue comparado entre los grupos y no se observaron diferencias significativas ($p=0.1057$). Tanto en tiempo de nado en el cuadrante de ubicación de la plataforma ($p=0.6162$), como en el tiempo de nado en cuadrante opuesto a la plataforma ($p=0.4347$), no se observó que los sujetos tratados con levodopa mejoraran su desempeño respecto al grupo vehículo. El tratamiento con el fármaco tampoco tiene influencia en la velocidad de nado, ya que no se encontró diferencia entre los grupos ($p=0.3188$). Los resultados observados muestran que el tratamiento sub-agudo con levodopa no produce una mejora significativa en la ejecución de la tarea de MWM.

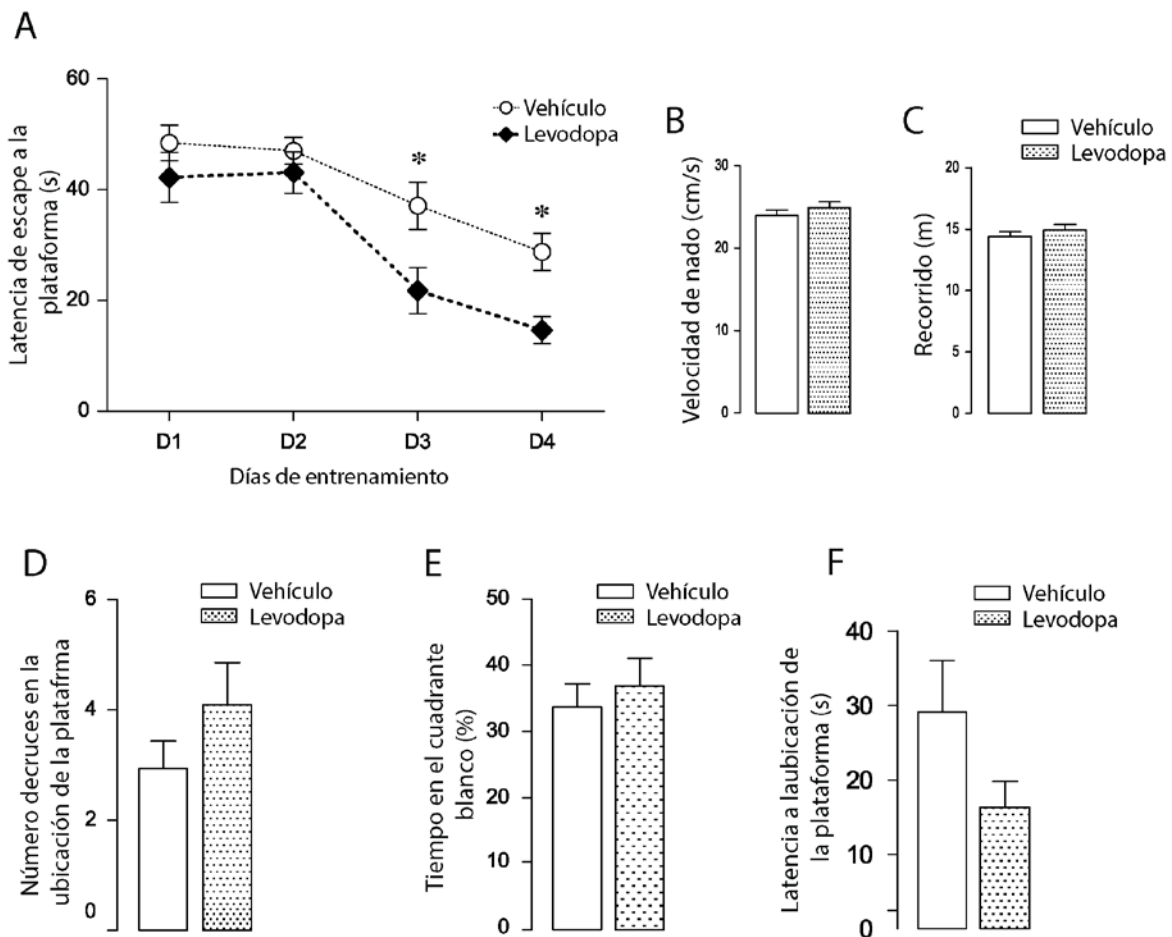


Figura 7 | Efecto del tratamiento con levodopa en el laberinto acuático de Morris. A) Promedio de la latencia a plataforma durante cuatro entrenamientos por día, un total de cuatro días consecutivos (D1-D4). B) Velocidad media de nado durante la prueba de memoria a largo plazo. C) Trayectoria total de nado durante la prueba de memoria a largo plazo. D) Número de cruces en el sitio original de la plataforma en la prueba de memoria a largo plazo. E) Porcentaje de tiempo de nado en el cuadrante correspondiente a la ubicación de la plataforma. F) Latencia a la plataforma durante la prueba de memoria a largo plazo. En todos los casos se evaluó el grupo vehículo (n=12) y el grupo de ratones administrados con levodopa (n=14). *p<0.05.

6.2.2 El incremento sostenido de los niveles de dopamina disminuye la acumulación del β A en el modelo 3xTg-AD

El análisis histológico permitió evaluar el efecto de la administración de levodopa en la acumulación del β A en el cerebro de los animales en las regiones CA1 y CA3 de hipocampo, CI, corteza motora, y amígdala. Las regiones de interés fueron elegidas por su relevancia en procesos de memoria, incluyendo la memoria de reconocimiento y memoria espacial. La cuantificación de la señal inmunorreactiva a el β A mostró que en la región de la CI hay una disminución significativa en la acumulación del β A en los ratones tratados con levodopa respecto a los vehículo (vehículo n=8, levodopa n=8; p=0.0008). En CA1 del hipocampo también se observó una disminución significativa de presencia del β A entre tratamientos (vehículo n=8, levodopa n=8; p=0.0493). En las regiones de corteza motora (vehículo n=8, levodopa n=9; p=0.2071), CA3 (vehículo n=8, levodopa n=8; p=0.1888), y amígdala (vehículo n=7, levodopa n=7; p=0.7432) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Las imágenes y gráficas del análisis están representadas en la Figura 6 A-E. Aunque no tiene un efecto global, estos datos demuestran que el tratamiento sub-agudo con levodopa disminuye la acumulación del β A intracelular. Con el fin de corroborar los resultados anteriores y hacer una cuantificación precisa de la cantidad de β A en los ratones tratados con levodopa y los ratones control, hicimos un análisis multiplex de la corteza cerebral y el hipocampo de ambos grupos. Dicho análisis nos permitió la cuantificación de β A de 40 y de 42 aminoácidos en la misma muestra. Encontramos que el grupo tratado con levodopa tiene una disminución significativa en la cantidad de β A, tanto de 40 como de 42 aminoácidos en la corteza cerebral (Figura 8G; p= 0.0291 para β A de 40 aminoácidos y p= 0.0126 para β A de 42 aminoácidos; n=3 en ambos grupos). Por otro lado el análisis del hipocampo no mostró diferencias significativas entre grupos para ninguna de las formas de β A (Figura 8F; p= 0.0291 para β A de 40 aminoácidos y p= 0.5765 para β A de 42 aminoácidos; n=3 en ambos grupos).

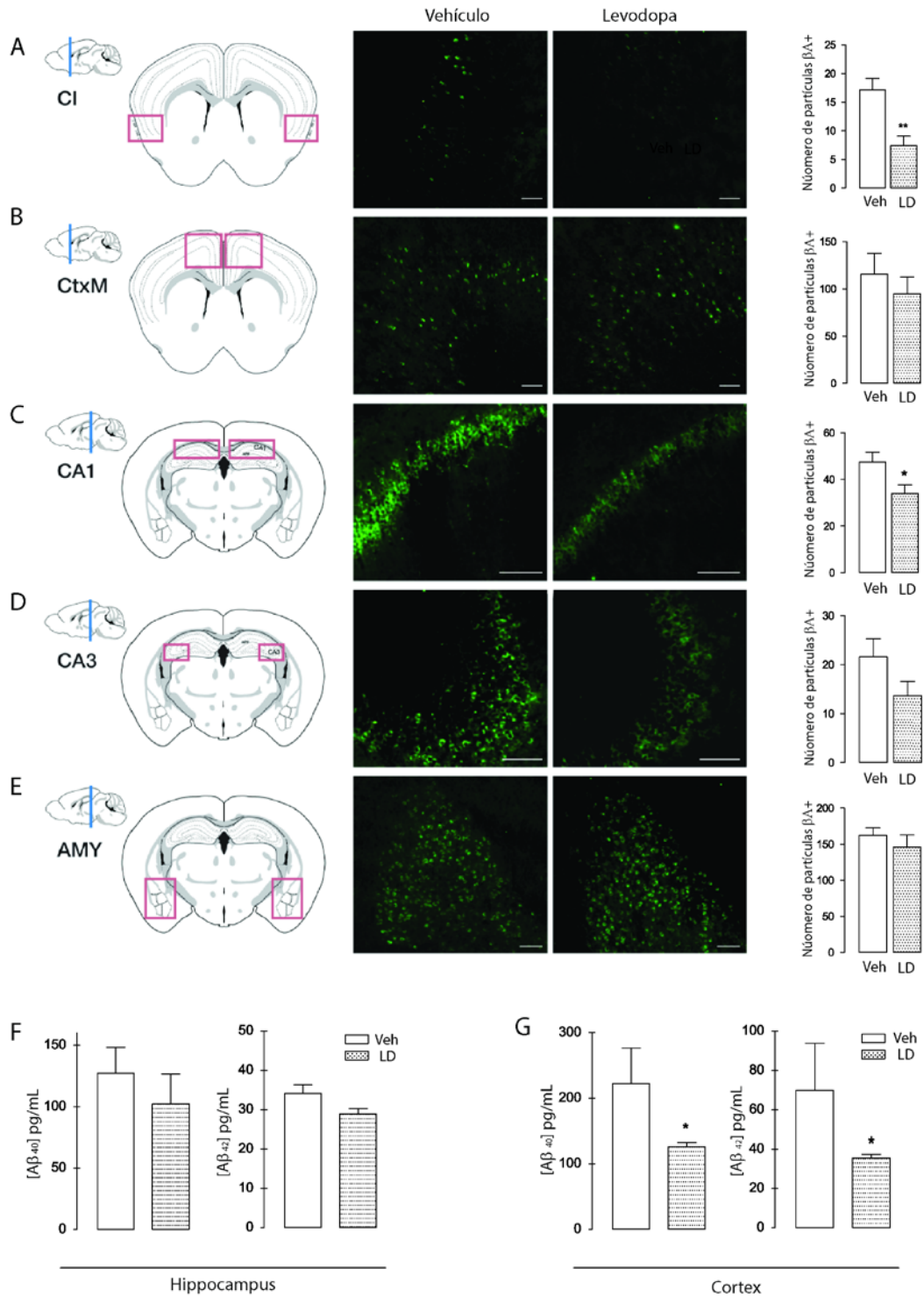


Figura 8] El tratamiento con levodopa disminuye la acumulación de βA en los ratones 3xTgAD de 12 meses. Región analizada, micrografía representativa y cuantificación de la acumulación de βA por inmunohistoquímica (anticuerpo 6E10) en la corteza insular (CI; A), corteza motora (CtxM; B), CA1(C) y CA3 (D) en hipocampo, y amígdala (AMY; E). La barra de escala en cada imagen representa 100 μm . El análisis estadístico de los resultados de la cuantificación mostró una disminución significativa en la acumulación del βA en los sujetos tratados con levodopa (LD), en la CI (** $p=0.0008$) y CA1 (* $p=0.0493$) respecto al grupo vehículo (Veh). Análisis multiplex de la concentración del βA de 40 y 42 aminoácidos en el hipocampo (F) y la corteza cerebral (G) de ratones 3xTg-AD de 12 meses administrados con vehículo o levodopa ($n=3$ en casa grupo; * $p<0.05$).

6.3 La liberación hipocampal de dopamina y norepinefrina codifican la información contextual nueva en la memoria de reconocimiento

"Hippocampal release of dopamine and noradrenaline encodes novel contextual information"

Moreno-Castilla P., Balderas I., Violante-Soria V., Pérez-Ortega R., Bermúdez-Rattoni F. Artículo en revisión.

Hippocampal release of dopamine and noradrenaline encodes novel contextual information

Moreno-Castilla Perla, Balderas Israel, Violante-Soria Valeria, Perez-Ortega Rodrigo, Bermudez-Rattoni Federico*

Departamento de Neurociencia Cognitiva, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-253, 04510 México D.F., México.

*To whom correspondence should be addressed. División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-253 México D.F., 04510, México. E-mail: fbermude@ifc.unam.mx. Tel. (52) 55 5622 56264

Abstract

The detection and processing of novel information encountered in our environment is crucial for proper adaptive behavior and learning. Hippocampus is a prime structure for novelty detection that receives high-level inputs including context information. It is of our interest to understand the mechanisms by which the hippocampus processes contextual information. For this, we performed *in vivo* microdialysis in order to monitor extracellular changes in neurotransmitter levels during Object Location Memory (OLM), a behavioral protocol developed to evaluate contextual information processing in recognition memory. Neurotransmitter release was evaluated in the dorsal hippocampus and insular cortex during OLM in 3 month-old B6129SF2/J mice. We found a simultaneous release of dopamine and norepinephrine in hippocampus during OLM, while neurochemical activity remained unaltered in the cortex. Additionally, we administered 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA), a neurotoxic compound selective to dopaminergic and noradrenergic neurons, in the dorsal hippocampus in a different group of mice. Depletion of catecholaminergic terminals in the hippocampus by 6-OHDA impaired OLM but did not affect novel object recognition. Our results support the relevance of hippocampal catecholaminergic neurotransmission in recognition memory. The significance of catecholaminergic function may be extended to the clinical field as it has been reported that innervation of hippocampus by the noradrenergic and dopaminergic system is reduced and atrophied in aging and Alzheimer's disease brain.

Introduction

Processing of novel information is crucial for learning and adaptive behavior as individuals not only must detect novel elements within the environment, but they must also react to changes in the spatial arrangement of familiar items. Little is understood about how the brain processes these different forms of novelty, but the hippocampus has long been proposed to play a critical role in novelty detection through its ability to act as a comparator between past and present experience (Kumaran & Maguire, 2007; Vinogradova, 2001). However, the hippocampal mechanisms of novelty processing remain largely unknown and it is unclear whether the hippocampus preferentially encodes novel content or context (Brown and Aggleton, 2001; Yonelinas et al., 2002; Smith et al., 2011; Song et al., 2011).

Among its various functions, dopamine is a neurotransmitter involved in the processing of novel stimuli. Experimental evidence have demonstrated that dopaminergic neurons in the ventral-tegmental area (VTA)

show electrical activity with bursts of spikes in response to novel stimuli, which are lost as the novel stimuli become familiar (Ljungberg, Apicella, & Schultz, 1992; Steinfels, Heym, Strecker, & Jacobs, 1983). Additionally, dopamine has been found to be differentially increased in brain areas after novel stimuli (Lisman, Grace, & Duzel, 2011; Ljungberg et al., 1992; Schultz, 2007), including in the insular cortex (IC) when novel tastes are presented (Bermudez-Rattoni, 2014) and in the hippocampus when mice are exposed to a novel environment (Ihalainen, Riekkinen, & Feenstra, 1999). This evidence supports the hypothesis that the circuit VTA-hippocampus detects novelty to control the entry of behaviorally significant information into the hippocampal store of long-term memory (Lisman & Grace, 2005). Nonetheless, the role of dopamine in hippocampal processing of novelty has been mostly related to spatial novelty (Nguyen et al., 2014; Tran et al., 2008). In this regard, we previously reported that exposure to novel objects in a familiar context produces a significant increase in the release of dopamine in the rodent IC; while the release of dopamine remained

unchanged in the hippocampus (Guzmán-Ramos et al., 2012), suggesting a dissociative involvement of dopaminergic transmission between those brain regions. Given this evidence, we hypothesized that the recognition of a novel spatial arrangement might be related to a release of dopamine in the hippocampus. In the present study, we tested this hypothesis by measuring the release of neurotransmitters in the hippocampus and the IC in response to the recognition of a novel configuration of familiar items in the Object Location Memory (OLM) protocol, a memory paradigm widely used in the study of the neurobiological mechanisms underlying memory formation and cognitive impairment in disease models.

Materials and Methods

Animals

In this study we used 3 month-old male B6129SF2/J mice. Experiments were performed in accordance with the current rulings in Mexican law (NOM-062-ZOO-1999) and with the approval of the local Animal Care Committee (FBR30-14). Mice were individually housed in a 22–24°C environment with a 12/12 light/dark cycle with water and food ad libitum.

Surgical procedures

Mice were placed on a stereotaxic apparatus and maintained under anesthesia with ~0.5% isoflurane. A microdialysis guide cannulae (CMA/7 Microdialysis, Solna, Sweden) were implanted aiming to the IC (DV -2.75 mm; AP +1.1 mm; L- 3.3 mm) and the hippocampus (DV -1.0 mm; AP -2.35 mm; ML +0.5 mm, with an angle of 40°), and secured with small stainless steel screws and dental acrylic (See Figure 5). Dummy cannulae were inserted into the guide cannulae to prevent clogging. Topical antibiotics were applied (polymyxyn B and iodine) after surgery.

Microdialysis and Capillary Electrophoresis

Two mm-long microdialysis membranes (CMA/7 Microdialysis, Solna, Sweden) were inserted into the guide cannulas, through which a Ringer solution (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, and 2.5 mM CaCl₂) was perfused at a flux rate of 0.25 µL/min with an automated microinfusion pump (Carnegie Medicine, Stockholm, Sweden). After 60 min of stabilization, samples were collected every 16 min. The first 3 samples were taken as baseline levels and then, we proceeded to the OLM protocol (Figure 1D). Samples were derivatized with 5-furoylquinoline-3-carbaldehyde and analyzed by capillary electrophoresis coupled to a Laser-induced fluorescence detector (Beckman-Coulter PACE/MDQ, Glycoprotein System CA, USA.) as previously described (Guzmán-Ramos et al., 2010, 2012b).

Intracerebral 6-OH administration

6-hydroxydopamine was injected in mice secured on a stereotaxic apparatus under anesthesia (~0.5% isoflurane). The injections were performed through 30-gauge needles and 40 µg of 6-OHDA (0.5 µL at 0.08 mg/µL were dissolved in 3.2% ascorbic acid in isotonic saline solution) or vehicle solutions were administered bilaterally in the hippocampus (DV -1.25 mm; AP -2.3 mm; ML +1.5 mm). A volume of 0.5 µL per hemisphere was delivered at a flux rate of 0.25 µL/min.

Behavioral tasks

Behavioral procedures were performed between 10:00 and 14:00 hrs that correspond to the light cycle for housing, starting 7 d after surgery in both protocols. A wooden square arena (33 × 33 × 30 cm) coated with enamel paint and stuffed with sawdust was placed in a dim-light illuminated room, the arena has a rectangular black and white striped wall that serves as visual cue. The objects to be discriminated were two different Lego™ figures (3.2 cm length × 1.6 cm width × 4.5 cm height, and 4.8 cm length × 3.0 cm width × 4.0 cm height). Objects were fixed to the floor at the back corners of the arena (6.5 cm from walls) with Velcro to prevent displacement by the animals. To avoid olfactory cues, objects were thoroughly cleaned with 70% ethanol and sawdust was stirred after each trial.

To avoid stress conditions that could affect the performance of the tasks, on each session animals were transported from the vivarium to the experimental room 1 h before the beginning of each session, and were left in the experimental room for an additional h at the end of each session.

Object Location Memory Test: For 3 consecutive days, animals were handled for 1 min and immediately after, placed on the open-field arena without any objects for 10 min allowing them to move freely. On the sample phase 1, mice were placed in the arena facing the wall opposite to 2 objects and were allowed to freely explore for 10 min. The same procedure was performed 24 h later, when animals explored the same objects placed at the same location as in sample phase 1 (Sample phase 2). Long-term memory was tested 24 h later, when one of the objects was displaced to a novel location and mice were allowed to explore freely for 10 min.

Object Recognition Memory: For 3 consecutive days, animals were handled for 1 min and immediately after, placed on the open-field arena without any objects for 10 min allowing them to move freely. On the sample phase mice were placed in the arena facing the wall opposite to 2 identical objects and were allowed to freely explore for 10 min. Memory was tested 24 h, when mice were allowed to explore freely one of the previously presented objects (familiar) along with a new one for 10 min.

Sample and test sessions for both protocols were recorded by a video camera placed over the arena. The analysis of the time spent exploring the two objects was made off-line by an experimenter blind to the treatment of each animal. Exploration was considered as pointing the nose to an object at a distance of 1 cm or less and/or touching it with the nose. Turning around or sitting on the objects was not considered as exploratory behavior. For all experiments, objects and their relative positions were counterbalanced. All experiments were carried out in independent groups. Recognition index was calculated as the time spent exploring each object expressed as percentage of the total exploration time in seconds. A recognition index equal to 0.5 indicates no preference for any of the objects. Preference for an object was considered by a recognition index significantly higher than 0.5.

Histological and Immunohistochemical analyses

Animals were killed with an overdose of pentobarbital and the brains were fixed by cardiac perfusion with 0.9% NaCl followed by 4% paraformaldehyde, pH 7.4. Brains were removed and post-fixed for 48 h before being transferred into 30% sucrose. The tissue was embedded in tissue-tek and cut coronally using a cryostat (Leica Biosystems, Richmond, USA) into 35 μm -thick free-floating sections. Trizma-buffered saline 0.1 M, pH 7.4 (TBS) was used to dilute immuno-reagents and for washing brain sections between incubations. Free floating sections were washed for 30 min, then placed in 5% bovine serum albumin (BSA, Sigma) for 60 min, and incubated at 4°C on 5% BSA, 0.1% Triton X-100 with the primary rabbit polyclonal antibody against tyrosine hydroxylase (TH) (1:1000; Pel-Freez, Rogers, AR). Negative controls with no primary antibodies were prepared. Sections were then washed for 60 min in TBS followed by incubation at RT for 2 h in 3% BSA, 0.1% Triton X-100 with secondary biotinylated antibody goat anti-rabbit IgG conjugated to biotin (1:250; Millipore, Darmstadt, Germany) and then developed with diaminobenzidine (DAB; Vector Labs) using the avidin horseradish peroxidase system (Vector Labs). Sections were again washed and mounted on glass slides. Quantification of density of TH+ fibers was characterized by capturing images using an Axiostar Plus Carl Zeiss transmitted-light microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). A 10 \times objective was used. For quantification, eight consecutive sections were imaged for the hippocampus, and 3 images were acquired per section. Each image corresponded to a field of 500 \times 500 μm , and were analyzed with ImageJ (NIH). We used the Hessian plugin to analyze the density of hippocampal fibers (Sathyanesan et al., 2012).

Statistical analyses

Multifactorial ANOVA was performed for neurotransmitter levels, one-way ANOVA for behavioral scores and Student's t-test for histological analysis. In all cases Bonferroni's post hoc analysis was used and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Increments of extracellular dopamine and norepinephrine in the hippocampus are associated to recognition of a novel configuration of familiar items during OLM test.

In order to determine hippocampal changes in neurotransmitter levels produced by a novel spatial configuration, we performed free-moving *in vivo* microdialysis the day of testing OLM protocol, when one object is moved to a novel location (Figure 1A). All mice exhibited a similar amount of time exploring two objects in the sample phase 1 and 2 (Figure 1B). One-sample t-test showed no preference for any object in sample phases (Sample phase 1: $p = 0.826$, and sample phase 2: $p = 0.634$, $n = 9$ for both phases). On the day of testing LTM, we inserted two microdialysis membranes one aiming the dorsal hippocampus and the other one aiming the IC as a reference cortical area that has been shown to exhibit release of dopamine at time mice explore novel objects (Guzmán-Ramos et al., 2012). Dopamine extracellular concentration, measured in the hippocampus, revealed significant differences among groups (See Figure 1E; $F(5;29) = 8.74$, $p < 0.001$). When the object was moved to a novel location, significant increase of cortical dopamine levels were evident as compared to baseline levels in the hippocampus ($p = 0.0002$). Conversely, extracellular dopamine concentration in the IC remained unchanged among fractions (Figure 1E; $F(3,90) = 0.911$, $p = 4.388$). Similarly, hippocampal norepinephrine levels also revealed significant differences among groups (Figure 1F; $F(5;40) = 2.65$, $p = 0.036$), while norepinephrine release remained unchanged in the IC (Figure 1F; $F(5;32) = 2.07$, $p = 0.09$). Extracellular glutamate and GABA levels showed no increments during the behavioral protocol, neither in the IC nor in the hippocampus (Figures 1G and 1H). The behavioral analysis showed that on the long-term memory test (LTM; 24h after sample phase 2) animals explored more the object moved to a novel location as indicated for one-sample t test, showing that the preference for the object in the novel location was different from chance level ($p = 0.03$, $n = 9$). This suggests that both hippocampal dopamine and norepinephrine activity are involved in the recognition of a novel contextual configuration. Meanwhile the IC appears to be neurochemically inactive during contextual novelty.

Depletion of hippocampal catecholaminergic terminals impairs the recognition of a novel

configuration of familiar items in OLM but does not affect ORM.

In order to confirm a causal relationship between dopamine and norepinephrine release in the hippocampus and the recognition of a novel context, we administered 6-hydroxy dopamine (6-OHDA), a neurotoxin that selectively damages catecholaminergic terminals and will impair the release of both dopamine and norepinephrine when administered locally (see (Moreno-Castilla et al., 2016)). We administered 6-OHDA or vehicle, bilaterally in the hippocampus and seven days later we performed the OLM protocol (Figure 2A). We found that in the OLM protocol, vehicle animals showed recognition of the object in a new location by increasing the exploration of the object moved to a novel location as indicated for one-sample t test, showing that the preference for the object in the novel location was different from chance level (Figure 2C; $p = 0.002$, $n=12$). Conversely, animals lesioned with 6-OHDA in the hippocampus explored equally both objects in the novel and familiar location (Figure 2C; $p = 0.443$, $n=14$), suggesting that 6-OHDA impaired OLM. It is important to notice that both groups exhibited a similar amount of time exploring two objects in the sample phase 1 and 2 (Figure 2B). One-sample t-test showed no preference for any object in sample phases for vehicle (Sample phase 1: $p=0.809$, and sample phase 2: $p=0.908$, $n=12$ for both phases) neither for 6-OHDA treated animals (Sample phase 1: $p=0.758$, and sample phase 2: $p=0.105$, $n=14$ for both phases). Additionally, we monitored the total time of exploration expended in each day of OLM protocol for both, 6-OHDA and vehicle groups. We found no differences in total time of exploration between groups, suggesting that 6-OHDA did not impair the rodent's innate tendency to explore objects (Table 1; $p=0.789$, $n=12$ for vehicle and $n=14$ for 6-OHDA treated mice).

The evaluation of ORM seven days after vehicle or 6-OHDA intra-hippocampal administration (Figure 3A) showed that both groups explored equally the identical objects in the acquisition phase (Figure 3B; $p=0.649$, $n=9$ for vehicle- and $p=0.477$, $n=10$ for 6-OHDA treated mice). Both groups presented an increased exploration of the novel object in the LTM test, as indicated for one-sample t test (Figure 3C; $p=0.004$, $n=9$ for vehicle- and $p=0.004$, $n=10$ for 6-OHDA treated mice).

After behavioral protocols animals were killed in order to verify the lesion. Immunohistochemical analysis aimed to quantify the density of tyrosine hydroxylase terminals in the hippocampus showed that 6-OHDA induced a depletion of catecholaminergic terminals from more than 90% in CA1, CA3 and the dental gyrus (Figures 4A-4C). All in all, these results indicate that depletion of hippocampal catecholaminergic terminals impairs

recognition of environmental novelty during OLM but does not affect ORM.

Discussion

In the present study we show that dopamine and norepinephrine are released in the hippocampus during the recognition of a novel spatial configuration in the OLM test. We also found that the release of both catecholamines is necessary for signaling the novel contextual information, but it seemed not to be involved in the recognition of novel objects in the ORM protocol.

In this regard, it has been shown that animals habituated to a familiar environment display an increased exploration activity when a novel object is introduced or when a familiar one is placed in a different location (O'Keefe & Nadel, 1978; Vogel-Ciernia & Wood, 2014), which might be a process of information gathering, necessary for updating the internal representation of the modified environment. The role of hippocampus in novelty detection is supported by several lines of evidence that indicate that presentation of novel stimuli produces a robust increase of hippocampal activity shown by single-unit recordings (Fyhn, Molden, Hollup, Moser, & Moser, 2002; Nitz & McNaughton, 2004), c-fos expression (VanElzakker, Fevurly, Breindel, & Spencer, 2008), imaging studies (Strange & Dolan, 2001; Tulving, Markowitsch, Craik, Habib, & Houle, 1996), and further supported by pharmacological studies showing that interfering with hippocampal function inhibits the process of contextual novelty (Barker & Warburton, 2011; Bussey, Duck, Muir, & Aggleton, 2000; Honey, Watt, & Good, 1998). Additionally, CA1 cells show robust increases in firing rate during exploration of displaced familiar objects (Larkin, Lykken, Tye, Wickelgren, & Frank, 2014), and regarding dopamine neurotransmission, it has been demonstrated that dopamine release occurs in the hippocampus when rats are placed in novel environments (Ihalainen et al., 1999). Here, we confirm and extend these findings demonstrating that not only dopamine is involved in this process but norepinephrine as well. Our results support the notion that hippocampal and midbrain dopaminergic neurons of the ventral tegmental area form a functional loop that regulates the entry of novel information in to long-term memory (Lisman & Grace, 2005).

The recollective matching of contextual information (spatial/temporal) and the discrimination of novelty/familiarity are two processes considered to compose recognition memory, which has been described as the ability to know that something has been previously experienced (individual stimulus or a whole event (Brown & Aggleton, 2001)). One of the current debates on the field of behavioral neurobiology of memory is whether or

not the hippocampus participates in the familiarization as well as the recollection component of recognition memory. One model holds that hippocampus is specifically involved in recollection, while familiarization depends on cortical areas like the perirhinal cortex and IC (Balderas, Rodriguez-Ortiz, & Bermudez-Rattoni, 2015; Eichenbaum, Yonelinas, & Ranganath, 2007). An opposing view maintains that both, hippocampus and perirhinal cortex, are involved in recollection and familiarity (Squire, Wixted, & Clark, 2007). According with the first model, we show that dopaminergic and noradrenergic activity is necessary for the recognition of a novel contextual configuration (recollection) in the OLM test, but not for the recognition of a novel object in ORM test. In this regard, we previously showed that dopamine is released in the insular cortex during novel objects exploration in the ORM acquisition phase (Guzmán-Ramos et al., 2012). Here we monitored neurotransmitter levels in the insular cortex and in the hippocampus during the exploration of a novel contextual configuration in the OLM test and found that dopamine is released in the hippocampus but not in the IC, which supports a dopaminergic dissociation between the cortex and the hippocampus for the recollective matching of contextual information and the discrimination of novelty/familiarity. This is in the same vain with the finding that dopamine D1 receptor activity modulates object recognition memory consolidation in the perirhinal cortex but not in the hippocampus (Balderas et al., 2013). Additionally, 6-OHDA lesions also support that the cortical areas and the hippocampus contribute differentially to the recognition memory components, as depletion of TH+ terminals in the hippocampus prevents the recognition of a familiar object in a novel location but did not diminish the exploration of an entirely novel object, which is consistent with similar reports (Barker & Warburton, 2011; Oliveira, Hawk, Abel, & Havekes, 2010).

The release of dopamine found in this work might be involved in the consolidation of the novel spatial configuration, as it has been shown that dopaminergic activity promotes memory consolidation in the hippocampus and hippocampal dopamine is important for maintenance and persistence of LTP (Jay, 2003; Lisman et al., 2011). On the other hand, the hippocampal release of norepinephrine has been associated to retrieval of information previously stored, as it has been shown that noradrenergic signaling is critical for retrieval of contextual and spatial memories (Murchison et al., 2004). In this regard, we propose that in order to update the internal representation of a modified environment (like in the OLM test), animals require evoking the previous contextual configuration, which is probably signaled by norepinephrine, and they also require consolidating the novel contextual information, which might be signaled by the increase in dopamine levels.

Another important implication of our results is that the lesion induced by 6-OHDA allowed us to evaluate the effect of the depletion of hippocampal TH+ terminals in the recognition memory. This is important as it has been shown that patients with Alzheimer's disease have lost catecholaminergic terminals in the hippocampus (Booze, Mactutus, Gutman, & Davis, 1993; Powers et al., 1988). Even more, reports in transgenic animal models of AD have shown hippocampal loss of norepinephrine (Francis et al., 2012), and recently we demonstrated that amyloid beta induces the loss of TH+ in the insular cortex (Moreno-Castilla et al., 2016). Thus, the early contextual recognition memory impairment shown in AD-related pathology could be caused by a failure in the catecholaminergic-dependent process of novel contextual information.

Acknowledgments

This research was supported by grants from CONACYT (250870) and PAPIIT-UNAM (IN209413) to FBR. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in the Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas of Perla Moreno-Castilla at the Universidad Nacional Autónoma de México. We thank Fernanda Lopez-Gutierrez for the artwork design.

References

- Balderas, I., Moreno-Castilla, P., & Bermudez-Rattoni, F. 2013. Dopamine D1 receptor activity modulates object recognition memory consolidation in the perirhinal cortex but not in the hippocampus. *Hippocampus*, 23(10), 873–878.
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., & Bermudez-Rattoni, F. 2015. Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 285, 213–222.
- Barker, G. R. I., & Warburton, E. C. 2011. When Is the Hippocampus Involved in Recognition Memory? *The Journal of Neuroscience*, 31(29), 10721–10731.
- Bermudez-Rattoni, F. 2014. The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109, 207–216.
- Booze, R. M., Mactutus, C. F., Gutman, C. R., & Davis, J. N. 1993. Frequency analysis of catecholamine axonal morphology in human brain. II. Alzheimer's disease and hippocampal sympathetic ingrowth. *Journal of the Neurological Sciences*, 119(1), 110–118.
- Brown, M. W., & Aggleton, J. P. 2001. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(1), 51–61.
- Bussey, T. J., Duck, J., Muir, J. L., & Aggleton, J. P. 2000. Distinct patterns of behavioural impairments

- resulting from fornix transection or neurotoxic lesions of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *Behavioural Brain Research*, 111(1–2), 187–202.
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A. P., & Ranganath, C. 2007. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 123–152.
- Francis, B. M., Yang, J., Hajderi, E., Brown, M. E., Michalski, B., McLaurin, J., ... Mount, H. T. J. 2012. Reduced tissue levels of noradrenaline are associated with behavioral phenotypes of the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(8), 1934–1944.
- Fyhn, M., Molden, S., Hollup, S., Moser, M.-B., & Moser, E. 2002. Hippocampal neurons responding to first-time dislocation of a target object. *Neuron*, 35(3), 555–566.
- Guzmán-Ramos, K., Moreno-Castilla, P., Castro-Cruz, M., McLaugh, J. L., Martínez-Coria, H., LaFerla, F. M., & Bermúdez-Rattoni, F. 2012. Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learning & Memory*, 19(10), 453–460.
- Honey, R. C., Watt, A., & Good, M. 1998. Hippocampal lesions disrupt an associative mismatch process. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(6), 2226–2230.
- Ihalainen, J. A., Riekkinen, P., & Feenstra, M. G. 1999. Comparison of dopamine and noradrenaline release in mouse prefrontal cortex, striatum and hippocampus using microdialysis. *Neuroscience Letters*, 277(2), 71–74.
- Jay, T. M. 2003. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Progress in Neurobiology*, 69(6), 375–390.
- John O'Keefe Lynn Nadel. 1978. The Hippocampus as a Cognitive Map. *Oxford University Press*.
- Kumaran, D., & Maguire, E. A. 2007. Match mismatch processes underlie human hippocampal responses to associative novelty. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(32), 8517–8524.
- Larkin, M. C., Lykken, C., Tye, L. D., Wickelgren, J. G., & Frank, L. M. 2014. Hippocampal output area CA1 broadcasts a generalized novelty signal during an object-place recognition task. *Hippocampus*, 24(7), 773–783.
- Lisman, J. E., & Grace, A. A. 2005. The Hippocampal-VTA Loop: Controlling the Entry of Information into Long-Term Memory. *Neuron*, 46(5), 703–713.
- Lisman, J., Grace, A. A., & Duzel, E. 2011. A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP. *Trends in Neurosciences*, 34(10), 536–547.
- Ljungberg, T., Apicella, P., & Schultz, W. 1992. Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *Journal of Neurophysiology*, 67(1), 145–163.
- Moreno-Castilla, P., Rodriguez-Duran, L. F., Guzman-Ramos, K., Barceñas-Femat, A., Escobar, M. L., & Bermúdez-Rattoni, F. 2016. Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid- β transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment. *Neurobiology of Aging*, 41, 187–199.
- Murchison, C. F., Zhang, X.-Y., Zhang, W.-P., Ouyang, M., Lee, A., & Thomas, S. A. 2004. A Distinct Role for Norepinephrine in Memory Retrieval. *Cell*, 117(1), 131–143.
- Nguyen, C. L., Tran, A. H., Matsumoto, J., Hori, E., Uwano, T., Ono, T., & Nishijo, H. 2014. Hippocampal place cell responses to distal and proximal cue manipulations in dopamine D2 receptor-knockout mice. *Brain Research*, 1567, 13–27.
- Nitz, D., & McNaughton, B. 2004. Differential modulation of CA1 and dentate gyrus interneurons during exploration of novel environments. *Journal of Neurophysiology*, 91(2),
- Oliveira, A. M. M., Hawk, J. D., Abel, T., & Havekes, R. 2010. Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learning & Memory*, 17(3), 155–160.
- Powers, R. E., Struble, R. G., Casanova, M. F., O'Connor, D. T., Kitt, C. A., & Price, D. L. 1988. Innervation of human hippocampus by noradrenergic systems: normal anatomy and structural abnormalities in aging and in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 25(2), 401–417.
- Schultz, W. 2007. Behavioral dopamine signals. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 203–210.
- Squire, L. R., Zola-Morgan, J., & Clark, R. E. 2007. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(11), 872–883.
- Steinfels, G. F., Heym, J., Strecker, R. E., & Jacobs, B. L. 1983. Response of dopaminergic neurons in cat to auditory stimuli presented across the sleep-waking cycle. *Brain Research*, 277(1), 150–154.
- Strange, B. A., & Dolan, R. J. 2001. Adaptive anterior hippocampal responses to oddball stimuli. *Hippocampus*, 11(6), 690–698.
- Tran, A. H., Uwano, T., Kimura, T., Hori, E., Katsuki, M., Nishijo, H., & Ono, T. 2008. Dopamine D1 receptor modulates hippocampal representation plasticity to spatial novelty. *The Journal of*

- Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(50), 13390–13400.
- Tulving, E., Markowitsch, H. J., Craik, F. E., Habib, R., & Houle, S. 1996. Novelty and familiarity activations in PET studies of memory encoding and retrieval. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 6(1), 71–79.
- VanElzaker, M., Fevurly, R. D., Breindel, T., & Spencer, R. L. 2008. Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 15(12), 899–908.
- Vinogradova, O. S. 2001. Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus*, 11(5), 578–598.
- Vogel-Ciernia, A., & Wood, M. A. 2014. Examining Object Location and Object Recognition Memory in Mice. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]*, 69, 8.31.1-8.31.17.

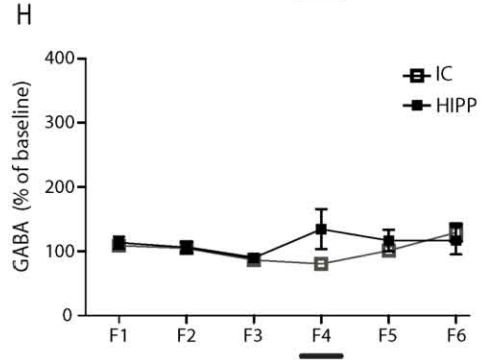
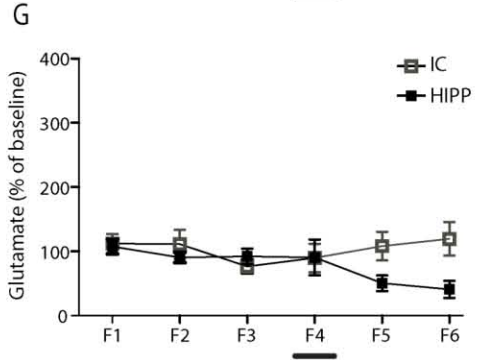
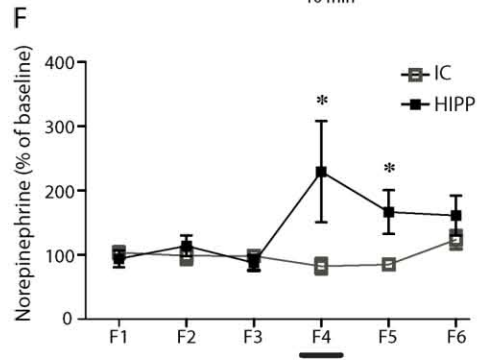
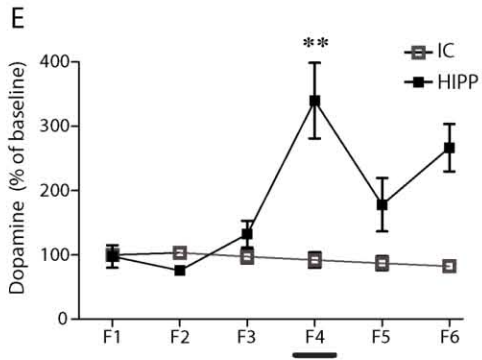
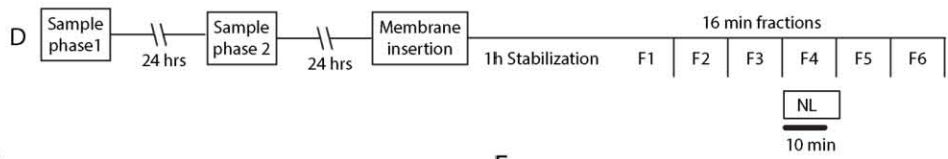
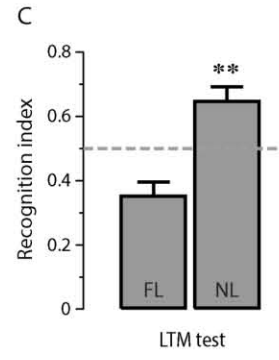
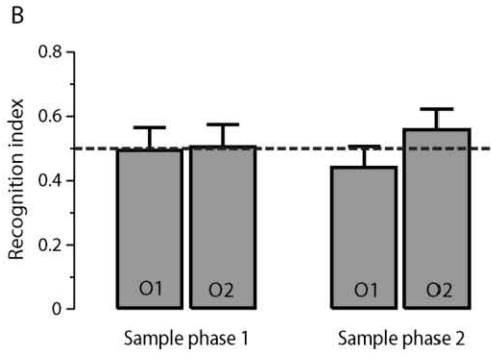
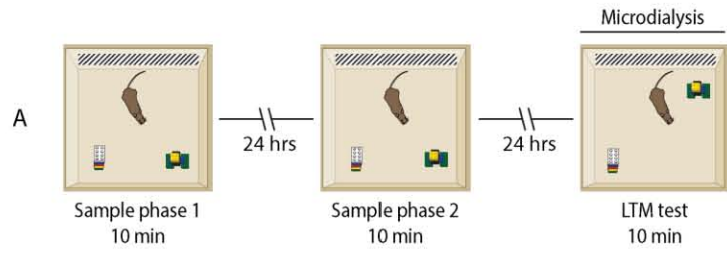


Figure 1. Release of dopamine and norepinephrine in the hippocampus is associated to recognition of a novel configuration of familiar items during OLM. **A)** Schematic representation of the behavioral protocol. During the sample phases 1 and 2, mice were exposed to objects (O1-O2) placed in a constant and specific location for 10 min. A memory test was conducted 24 h after the end of the second sample phase, in which one object was placed in the familiar object location (FL) and the other was moved to a novel object location (NL). **B)** Recognition index during sample phase 1 and 2 (n= 7 per group). A recognition index equal to 0.5 means no preference for any object (dotted line). **C)** Recognition index for the familiar object location (FL) and for the novel object location (NL; n= 7 per group). One sample t-tests showed that preference for the novel object location was different from chance level (recognition index higher than 0.5). **D)** Experimental protocol for free-moving microdialysis during long-term memory test. After the collection of 3 baseline microdialysis fractions (F1-F3), object in a novel location (NL) was presented for 10 min at fraction 4 (F4). Two additional fractions were collected (F5-F6) before finishing memory test. Extracellular levels of dopamine (DA; **E**), norepinephrine (NE; **F**), glutamate (**G**) and GABA (**H**) were collected in the Insular cortex (IC) and the Hippocampus (HIPPP). Each point is the mean \pm S.E.M. for a fraction of 4 μ l obtained during a period of 16 min. n= 7 per group. ** p < 0.01 vs. rest of the groups.

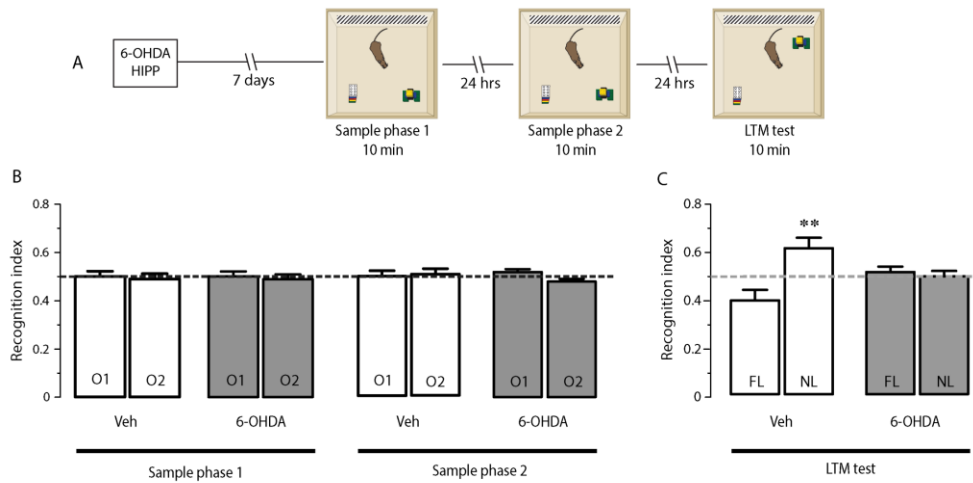


Figure 2. Intra-hippocampal administration of 6-hydroxy dopamine impairs Object Location Memory. **A)** Schematic representation of the behavioral protocol in which 6-hydroxy dopamine (6-OHDA) was intra-hippocampally administered 7 days before the presentation of objects in sample phases 1 and 2. Long-term memory test was performed 24 h after the second sample phase. **B)** Recognition index during sample phase 1 and 2 for animals injected with vehicle and 6-OHDA (n= 12 and 14, respectively). **C)** Recognition index for the familiar object location (FL) and for the novel object location (NL; n= 12 for vehicle and n=14 for 6-OHDA treated animals). One sample t-tests showed that preference for the novel object location was different from chance level in vehicle-administered mice but animals lesioned with 6-OHDA failed to recognize novel object location. ** p < 0.01.

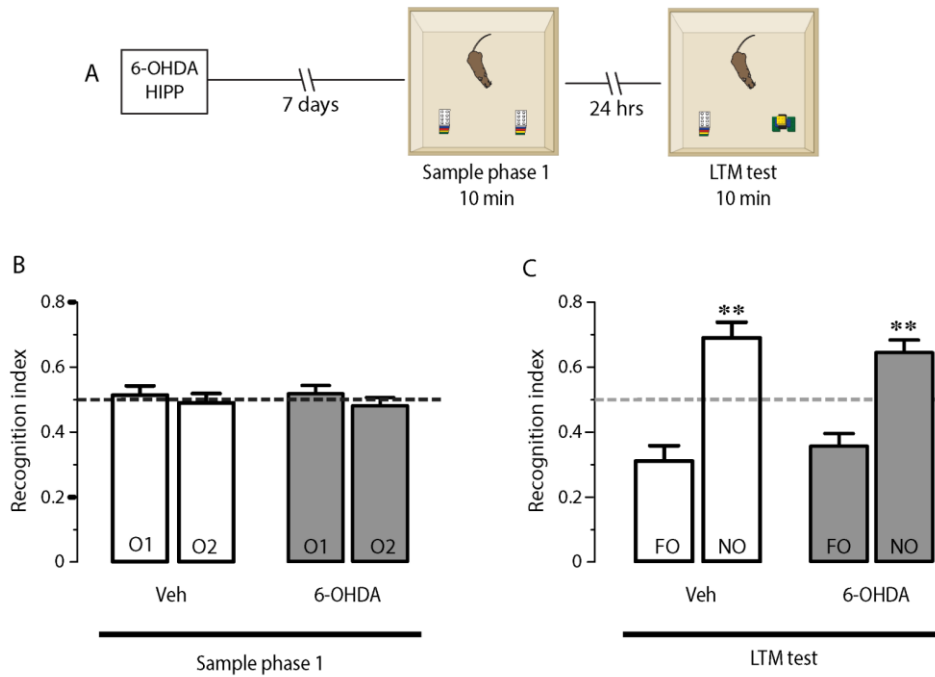


Figure 3. Intra-hippocampal administration of 6-hydroxy dopamine does not affect Object Recognition Memory. **A)** Schematic representation of the behavioral protocol in which 6-hydroxy dopamine (6-OHDA) was bilaterally administered into the hippocampus 7 days before the presentation of two identical objects for 10 min in the sample phase. Long-term memory test was conducted 24 h after the end of the sample phase, in which a copy of the familiar object and a new object were presented, both in a familiar location. **B)** Recognition index during sample phase for animals injected with vehicle ($n=9$) and 6-OHDA ($n=10$). **C)** Recognition index for the familiar object (FO) and for the novel object (NO). One sample t-tests showed that both groups recognized successfully the novel object as indicated for recognition index different from chance level in vehicle- and 6-OHDA administered mice. $** p < 0.01$

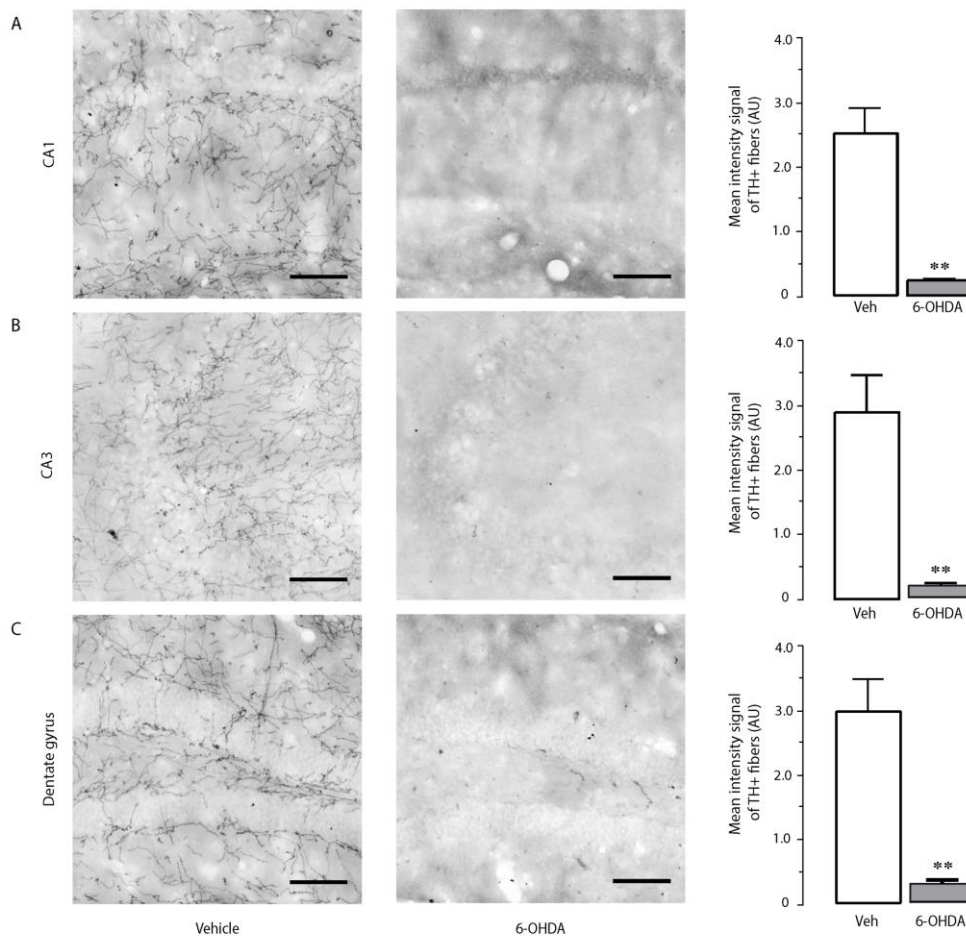


Figure 4. The administration of 6-hydroxy dopamine depletes catecholaminergic terminals in the hippocampus. Immunohistochemical determination of tyrosine hydroxylase (TH) in the hippocampus show that 6-hydroxy dopamine (6-OHDA) destroys catecholaminergic terminals in CA1 (A), CA3 (B) and dentate gyrus (C), causing a significant decrement of TH+ fibers in comparison to vehicle-administered mice. (t-test, $p < 0.01$, $n = 8$ for each area). ** $p < 0.01$. Scale bar = 100 μm .

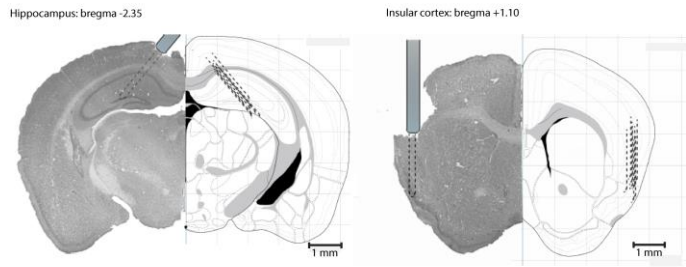


Figure 5. Verification of probes and cannulae placement. Representative photomicrograph of the guide cannula track aiming to the hippocampus and the insular cortex for location of microdialysis membranes (dotted lines).

Object Location Memory			
	Exploration in Sample Phase 1 (s)	Exploration in Sample Phase 2 (s)	Exploration in LTM test (s)
Microdialysis	12.9±2.84	11.0±2.14	11.5±2.61
Vehicle	9.38±0.37	12.4±5.4	8.59±0.89
6-OHDA	12.2±2.03	11.0±3.4	6.90±1.47

Novel Object Recognition		
	Exploration in Sample Phase 1 (s)	Exploration in LTM test (s)
Vehicle	9.42±3.91	7.51±1.21
6-OHDA	10.7±3.97	6.16±2.50

Table 1. Mean exploration values in the sample phases and long-term memory (LTM) test in seconds ± SEM for the animals evaluated in OLM and ORM.

7 Discusión

7.1 La neurotransmisión dopaminérgica y el β A forman un proceso cíclico de retroalimentación positiva en la patología relacionada a la enfermedad de Alzheimer

En este proyecto encontramos que la disfunción dopaminérgica y la patología relacionada a la EA se relacionan en forma de un proceso cíclico de retroalimentación positiva que se presenta en forma esquemática en la Figura 9. En esta relación, el incremento patológico en los niveles del β A produce una atrofia en las terminales catecolaminérgicas en la CI, lo que afecta la concentración basal de dopamina y su liberación durante un reto cognitivo o la inducida por estimulación con alto potasio (Moreno-Castilla et al., 2016).

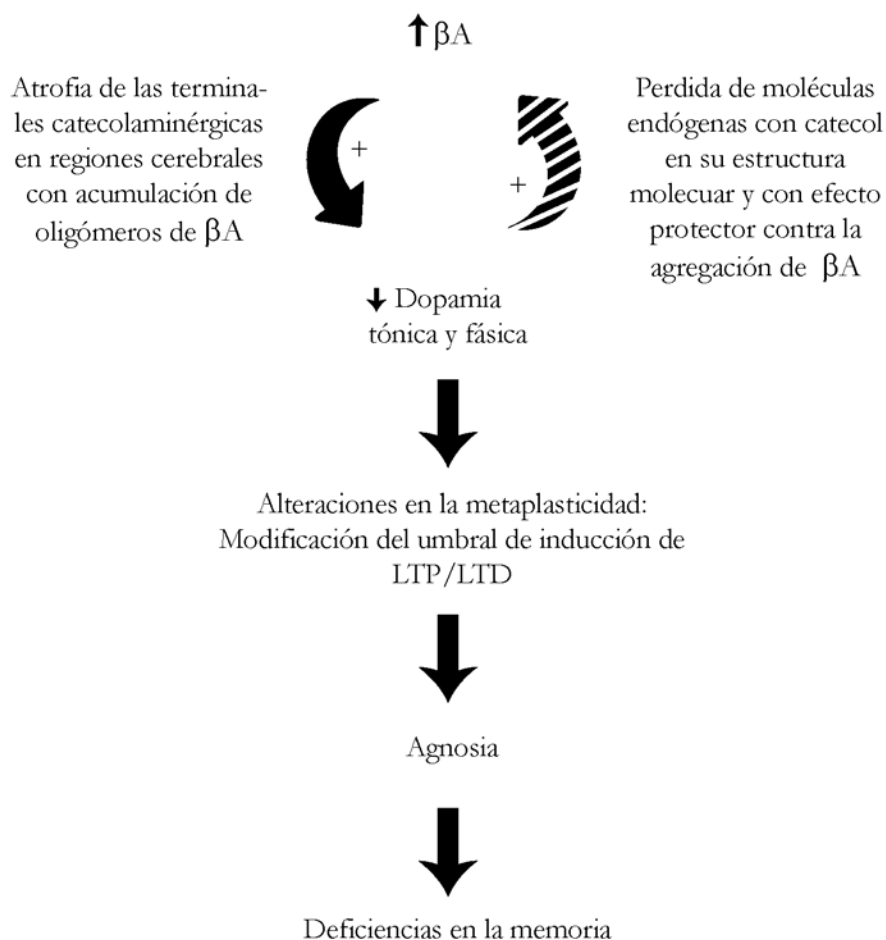


Figura 9 | La relación entre el β A y la disfunción dopaminérgica como un proceso de retroalimentación positiva. El aumento patológico en los niveles del β A en la CI, produce atrofia de las terminales catecolaminérgicas, disminuyendo los niveles tónicos y fásicos de dopamina. En consecuencia se afecta la plasticidad sináptica y se produce agnosia y deficiencias en la memoria de reconocimiento. La atrofia de las terminales catecolaminérgicas también produce la pérdida del efecto protector de las moléculas endógenas con grupo catecol en su estructura molecular sobre la agregación del β A, lo que contribuye al progreso de la patología (flecha discontinua).

La disminución de los niveles de dopamina inducida por el β A afecta la inducción de LTP en la vía BLA-CI, de tal forma que la estimulación de alta frecuencia administrada en la BLA, produce la inducción de LTD en ratones transgénicos de 10 meses de edad o en ratones WT inyectados con oligómeros del β A, en lugar de producir la inducción de LTP que se observa en los respectivos controles. La disfunción dopaminérgica inducida por el β A daña en consecuencia la memoria de reconocimiento gustativo, pues la administración del inhibidor de la recaptura de dopamina, nomifensina, que incrementa los niveles de dopamina en la CI, recupera la inducción de LTP y la memoria de reconocimiento gustativo (Moreno-Castilla et al., 2016). Asimismo, estudiamos el efecto de la depleción de los niveles de dopamina mediante la administración de 6-hidroxi dopamina (6-OHDA), una toxina selectiva a las neuronas catecolaminérgicas que administramos en la CI. Encontramos que después de 24 h de la administración de 6-OHDA, la estimulación de alta frecuencia en la BLA, produce la inducción de LTD medida en la CI, de manera semejante a la LTD producida tras la administración de oligómeros del β A y a la LTD registrada en ratones 3xTg-AD de 10 meses de edad (Moreno-Castilla et al., 2016). Lo anterior reitera que la disfunción dopaminérgica afecta la plasticidad sináptica y la memoria. En el proceso opuesto del ciclo, estudiamos el efecto de los niveles disminuidos de dopamina y norepinefrina en la acumulación del β A (Figura 9). Encontramos que tanto la administración local y aguda, como una administración sistémica y prolongada, de dopamina y de su precursor, la levodopa, disminuyen la acumulación del β A en el modelo 3xTg-AD. Proponemos que el mecanismo de este efecto se relaciona con la estructura molecular de las catecolaminas, pues la administración de catecol, mostró un efecto similar tras 24 h de su administración, en la corteza cerebral y en el hipocampo. Lo anterior nos permite proponer que las catecolaminas tienen un efecto protector sobre la acumulación del β A, con lo que al estar disminuidas por el efecto tóxico que tiene el β A sobre las terminales catecolaminérgicas, se favorece el progreso de la patología.

Finalmente, estudiamos el efecto de la depleción de las terminales catecolaminérgicas del hipocampo sobre la memoria. Para esto, estandarizamos una tarea de memoria que nos permitiera la determinación de la liberación de neurotransmisores mediante microdiálisis en el hipocampo, durante su ejecución. La tarea seleccionada fue la OLM, durante la cual medimos la liberación de neurotransmisores en la CI y en el hipocampo. Encontramos que durante la exploración de los objetos dispuestos en una configuración espacial novedosa, se registra un incremento en los niveles extracelulares de dopamina y de norepinefrina en el hipocampo, mientras que la CI se mantiene sin cambios en la liberación. La lesión con 6-OHDA disminuyó las terminales catecolaminérgicas del hipocampo y afectó el reconocimiento de los objetos dispuestos en una nueva configuración espacial, mientras que el tiempo de exploración total y la memoria de reconocimiento de un objeto nuevo no se muestran afectadas por la lesión (ver Moreno-Castilla, et. al., en revisión). Con esto extendemos nuestras conclusiones sobre las afectaciones que se producen en la memoria al dañar la neurotransmisión dopaminérgica. En suma, hemos encontrado que afectaciones en la liberación de dopamina inducida por la presentación de estímulos novedosos ya sean nuevos sabores (Moreno-Castilla et al., 2016), exploración de nuevos objetos (Guzmán-Ramos et al., 2012) o de una nueva configuración espacial (Moreno-Castilla, et. al., en revisión) afectan la memoria de reconocimiento al dañar el procesamiento de la información novedosa. Proponemos que las alteraciones en la memoria se deben a una agnosia inducida por fallas en la neurotransmisión dopaminérgica que impiden el procesamiento del estímulo novedoso y en consecuencia la adquisición y consolidación de la información. A continuación se discutirán punto por punto, los componentes del ciclo propuesto en la figura 9.

7.2 El incremento en los niveles del β A daña las terminales catecolaminérgicas y la liberación de dopamina

La liberación de dopamina durante la presentación de un sabor nuevo se encontró reducida en los ratones 3xTg-AD de 10 meses. Esto es consistente con nuestros hallazgos anteriores, en donde mostramos que la liberación dopaminérgica se encuentra disminuida cuando los ratones 3xTg-AD de 10 meses fueron expuestos a objetos nuevos en una tarea de memoria de reconocimiento (Guzmán-Ramos et al., 2012). Además, se ha demostrado que los oligómeros del β A administrados a ratas adultas producen una disminución de los niveles basales de dopamina y reducción de la liberación de dopamina en la corteza cerebral después de la estimulación con alto potasio (Itoh et al., 1996; Trabace et al., 2007). Lo anterior es consistente con nuestro hallazgo que muestra que la dopamina basal o dopamina tónica está disminuida en la corteza insular de ratones 3xTg-AD que presentan acumulación intracelular del β A en dicha región cerebral y que la estimulación con alto potasio muestra una liberación mermada de dopamina y norepinefrina, con respecto a ratones silvestres de la misma edad y ratones transgénicos de 3 meses que no presentan acumulación del β A en la CI.

Con el fin de determinar la causa de la disminución en la liberación de dopamina relacionada al β A, hicimos un análisis histológico que mostró la pérdida de las terminales inmunorreactivas a TH, responsables de la síntesis de dopamina, en correlación con la deposición del β A en el modelo 3xTg-AD. A continuación, con la administración del trazador retrógrado, fluorogold, administrado en la CI, estudiamos la conectividad entre esta estructura y el VTA. Encontramos que la acumulación del β A en el ratón 3xTg-AD disminuye la cantidad de terminales TH provenientes del VTA. Con el fin de corroborar que dicho efecto se debiera a el β A, hicimos una administración exógena de oligómeros el β A 42 en la CI y encontramos la pérdida cortical de terminales TH en ratones WT, lo que sugiere fuertemente que la pérdida de fibras catecolaminérgicas inducida por el β A podría ser una característica temprana de la histopatología de la EA. Esto es consistente con la reducción de los terminales TH que se encuentran en pacientes con EA (Booze et al., 1993a, 1993) y en otros modelos transgénicos para la EA (Francis et al., 2012; Liu et al., 2008). Sin embargo, aún está pendiente elucidar el mecanismo por el cual el β A afecta las terminales TH y determinar si se trata de un efecto selectivo del β A sobre las terminales catecolaminérgicas o afecta también otras y si estas terminales son más sensibles a los efectos tóxicos del β A en relación a otros sistemas de neurotransmisión.

7.3 Un nuevo vínculo mediado por dopamina entre la enfermedad de Alzheimer y la metaplasticidad

Recientemente se ha planteado una liga entre la acumulación patológica del β A y la metaplasticidad aberrante (ver revisión de Jang y Chung, 2016). La metaplasticidad es una forma de plasticidad homeostática que controla el umbral de inducción de LTP/LTD, y que funciona como un proceso de retroalimentación que permite censar y contrarrestar los efectos desestabilizadores que ocurren en las sinapsis después de eventos de plasticidad Hebbiana (LTP y LTD). Pues, una vez que el LTP es inducido, las sinapsis involucradas presentan una saturación en los mecanismos de potenciación, lo que conduce a una excitación inestable (Abbott y Nelson, 2000; Cooper y Bear, 2012; Turrigiano y Nelson, 2000). De manera semejante, la inducción de LTD puede resultar en un silenciamiento sináptico innecesario (Cooper y Bear, 2012). La plasticidad homeostática desencadena mecanismos

compensatorios como un escalamiento sináptico a la baja que disminuye la fuerza sináptica para prevenir hiperexcitación después de la facilitación a largo plazo, o el escalamiento sináptico compensatorio al alza para prevenir el silenciamiento sináptico y la pérdida de sinapsis. Trabajos recientes (Li et al., 2009; Megill et al., 2015; Zorumski y Izumi, 2012), incluyendo la primera publicación resultante de éste proyecto de doctorado, apoyan el vínculo entre la acumulación patológica del β A y la metaplasticidad aberrante, y han sugerido que la metaplasticidad aberrante contribuye a la inhibición del LTP y al aumento del LTD, en la EA. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen las alteraciones metaplásticas inducidas por el β A se desconocen en su totalidad.

Nosotros encontramos que las alteraciones en la metaplasticidad inducidas por el β A están mediadas por dopamina. Uno de los principales resultados del proyecto es que el β A induce un cambio de LTP a LTD en la vía BLA-IC. Se ha demostrado en estudios *in vitro* por e *in vivo* que el β A altera rápidamente la plasticidad sináptica, inhibiendo la LTP después de una estimulación de alta frecuencia (Lambert et al., 1998; Townsend et al., 2006; Walsh et al., 2002), mientras que facilita la LTD tras una estimulación de baja frecuencia (Hsieh et al., 2006c; Shankar et al., 2008; Wang et al., 2004b). En este sentido, se ha demostrado que el β A activa vías de señalización de LTD, incluyendo la activación de cinasas y receptores metabotrópicos de glutamato, para promover la endocitosis de receptores sinápticos AMPA y NMDA, aumentando así la LTD (Hsieh et al., 2006c; Renner et al., 2010; Wang et al., 2004b; Wu et al., 2011). Sin embargo, en los informes anteriormente discutidos se muestra que el β A afecta la inducción de LTP, pero no se presenta una LTD. Aquí, encontramos no sólo una alteración de la LTP después de la estimulación de alta frecuencia en presencia del β A sino una marcada LTD, que está relacionada con bajos niveles corticales de dopamina y norepinefrina.

Experimentos de plasticidad a largo plazo en rebanadas de la corteza prefrontal, han demostrado que el cambio de LTD para LTP depende de los niveles de dopamina antes de la estimulación sináptica (Kolomiets et al., 2009; Matsuda et al., 2006), de tal forma que se propone que la liberación tónica de dopamina modula el tráfico de los receptores AMPA y NMDA a la sinapsis, lo que a su vez modifica el umbral para la inducción de LTP / LTD (Sheynikhovich et al., 2013). Del mismo modo, se ha demostrado *in vivo* que durante un bloqueo crónico de los receptores D1, la estimulación de alta frecuencia en la corteza prefrontal medial induce LTD en vez de la esperada LTP (Coppa-Hopman et al., 2009). La CI tiene una alta densidad de fibras dopaminérgicas derivadas principalmente de la región ipsilateral del VTA y de la sustancia nigra (Ohara et al., 2003), mientras que las fibras noradrenérgicas surgen de locus coeruleus, subcoeruleus y otros núcleos del cerebro posterior (Robertson et al., 2013). Además, las terminales noradrenérgicas podrían también la liberación de dopamina en la CI (Smith y Greene, 2012). Se ha propuesto que el control del umbral de inducción de LTP / LTD depende de la liberación de dopamina tónica que es regulada por los aferentes corticales, en lugar de la liberación de dopamina fásica controlada presinápticamente por el disparo de las neuronas (Grace, 1991; Sheynikhovich et al., 2013). Esta función propuesta de la dopamina tónica es diferente a la función de la dopamina fásica del hipocampo, de la que se ha demostrado que controla la persistencia temporal de la LTP, o su mantenimiento a largo plazo (O'Carroll y Morris, 2004; Takeuchi et al., 2014). En este trabajo mostramos que el β A induce la pérdida de terminales catecolaminérgicas y disminuye los niveles tónicos y fásicos de dopamina, lo que conduce a una modificación del umbral para generar plasticidad cortical y también puede alterar la persistencia temporal de la plasticidad sináptica. Esta idea fue corroborada en nuestros experimentos, mediante la anulación

neurotransmisión dopaminérgica por 6-OHDA, que induce la pérdida de axones TH+ que imitó alteraciones de plasticidad sináptica que se encuentran en los modelos de la EA.

Encontramos también que la administración de nomifensina en los ratones 3xTg-AD restableció la capacidad de inducir LTP. Esto es consistente con un estudio *in vitro* usando oligómeros del β A (Jürgensen et al., 2011) y en estudios en pacientes con la EA (Koch et al., 2014; Martorana y Koch, 2014b) lo que sugiere que la disfunción plasticidad relacionada con la EA se puede mejorar mediante la estimulación de la actividad dopaminérgica. Un mecanismo viable para esto se mostró por Jürgensen et al., quienes encontraron en rebanadas de hipocampo que la activación selectiva de receptores de dopamina D1 / D5 impide la internalización de receptores AMPA y NMDA sinápticos por la disminución de la fosforilación de la subunidad del receptor GluR1 AMPA en Ser845 que, regula la localización de la membrana del receptor. La nomifensina, en este trabajo, aumenta los niveles de dopamina en la CI de los ratones 3xTg-AD de 10 meses mediante la inhibición de su recaptura (Guzmán-Ramos et al., 2012b) que puede conducir a un aumento de la activación de los receptores D1 / D5 que restaura el tráfico de los receptores AMPA y NMDA sinápticos, dañados por oligómeros del β A. Es importante enfatizar, que a pesar de que se encontró que el β A perjudica el control dopaminérgico del umbral de inducción de LTP / LTD en la vía BLA-IC, es de esperar que este fenómeno también puede ocurrir en otras áreas del cerebro, dado que, en primer lugar; se ha demostrado que la dopamina controla el umbral de inducción de LTP / LTD en la corteza prefrontal (Sheynikhovich et al., 2013) y en el hipocampo (Abraham et al., 2001) y en segundo lugar, se han encontrado pérdida de terminales dopaminérgicas en el hipocampo, la corteza somatosensorial y motora, tanto en los modelos de la EA como en pacientes (Booze et al., 1993; Liu et al., 2008).

7.4 Fallas en el procesamiento de la información nueva y agnosia en la enfermedad de Alzheimer

Nuestros resultados muestran que tanto la acumulación del β A en el modelo 3xTg-AD y la administración de oligómeros del β A en la CI afectan la memoria de aversión al sabor. Esto es consistente con otros informes en diferentes modelos de ratones transgénicos de la EA (Devi y Ohno, 2010; Janus et al., 2004; Pistell et al., 2008; Ramírez-Lugo et al., 2009). Sin embargo, nosotros encontramos que las deficiencias en la memoria gustativa se deben a una disfunción durante la adquisición de la memoria, ligada a un defecto en el reconocimiento del sabor nuevo. Sólo escasos estudios han investigado la percepción del gusto en pacientes con la EA (Schiffman et al., 1990, 2002; Steinbach et al., 2010). Esos estudios no diferencian entre las alteraciones en la percepción del gusto y el olor, lo que lleva a conclusiones contradictorias. Sin embargo, un estudio reciente muestra alteraciones en el reconocimiento gusto, pero no en la percepción del gusto en pacientes con la EA (Suto et al., 2014). De manera interesante, estos autores reportaron que el deterioro en el reconocimiento de sabores se asocia a alteraciones en la CI. Similar a este hallazgo en pacientes con la EA, nosotros no encontramos diferencias en la curva de preferencia de sabor o la sensibilidad umbral del sabor entre las edades y genotipos, lo que orienta a una deficiencia de formación de la memoria y no a un trastorno sensorial.

Nuestros resultados en el reconocimiento gustativo se suman a lo que encontramos en las pruebas de reconocimiento de una configuración espacial nueva (sección 6.2), donde encontramos que la liberación de dopamina y norepinefrina en el hipocampo es necesaria para el reconocimiento de una nueva configuración. Además, en el laboratorio reportamos con anterioridad que los ratones 3xTg-AD de 10 meses tienen una deficiencia en la memoria

de reconocimiento de un objeto nuevo que se relaciona con la incapacidad de liberar dopamina en la CI cuando exploran objetos novedosos (Guzmán-Ramos et al., 2012). En suma, hemos encontrado que afectaciones en la liberación de dopamina inducida por la presentación de estímulos novedosos ya sean nuevos sabores (Moreno-Castilla et al., 2016), exploración de nuevos objetos (Guzmán-Ramos et al., 2012) o de una nueva configuración espacial (Moreno-Castilla, et. al., en revisión) afectan la memoria de reconocimiento al dañar el procesamiento de la información novedosa. Proponemos que las consecuentes alteraciones en la memoria se deben a una agnosia inducida por fallas en la neurotransmisión dopaminérgica que impiden el procesamiento del estímulo novedoso y en consecuencia la adquisición y consolidación de la información.

La agnosia se define como es la perturbación de la capacidad para reconocer estímulos previamente aprendidos, o de aprender nuevos estímulos, sin haber deficiencia en la percepción. Lo anterior se ajusta al fenómeno conductual que hemos estudiado y es relevante porque una importante corriente en el estudio de la EA, plantea que las alteraciones en la memoria imitan las observadas en pacientes amnésicos con lesiones en el hipocampo (Selkoe, 2002). Lo anterior es sostenido en base a reportes que sugieren que el hipocampo y las cortezas para-hipocampales son los primeros blancos de la enfermedad. Sin embargo nuestros resultados nos conducen a proponer que a diferencia de los síndromes amnésicos, en los que la consolidación de la información está afectada, en la EA se presenta una deficiencia en el procesamiento de la información novedosa, mediada por alteraciones en la señalización dopaminérgica. Es posible que la información novedosa no tenga la saliencia necesaria para ser procesada como tal, es decir que dicha información no destaque, y por eso no se pueda reconocer como nueva, lo que en consecuencia altera la adquisición de la información, su consolidación y evocación.

La liga entre la agnosia y las deficiencias en la liberación de dopamina van línea con la idea de que la actividad dopaminérgica está involucrada en el procesamiento de la novedad. estímulos novedosos producen una ráfaga de disparo de las células de dopamina en le VTA y ese ha demostrado que la actividad de estas células disminuye en relación a la familiarización a los estímulos, como se muestra en experimentos electrofisiológicos en primates (Schultz, 2007). Además, estudios de microdiálisis y de voltametría han demostrado que la liberación de dopamina es producida por varios tipos de novedad (Lisman et al., 2011; Schultz, 2013), incluyendo nuevos sabores en la CI (Bermudez-Rattoni, 2014). Lo que apoya que la disfunción de la neurotransmisión dopaminérgica relacionada con la patología del βA puede dar lugar a deficiencias en el procesamiento de estímulos novedosos, lo que conlleva al deterioro de la memoria de reconocimiento y dado que este sistema de neurotransmisión es vulnerable a los efectos tóxicos del βA como lo mostramos en este proyecto, proponemos que puede ser un fenómeno temprano en la patología relacionada a la EA. Por lo tanto, estos resultados son relevantes para entender las deficiencias de reconocimiento que presentan los pacientes con la EA, en apoyo a la idea de que la agnosia podría ser un síntoma precoz que pueden conducir a un perjuicio formación de la memoria (Ferreira y Klein, 2011).

7.5 El efecto protector de las catecolaminas sobre la acumulación del βA

Los resultados presentados en la sección 5.3 muestran que una disminución de la señal positiva del βA tras la administración de dopamina y de catecol intra-cerebral, tanto en el hipocampo como en la corteza cerebral de ratones 3xTg-AD. Esto concuerda con experimentos *in vitro* en los que se muestra que la incubación del βA en condiciones

fisiológicas con moléculas con un grupo catecol, incluyendo la dopamina, la norepinefrina y la levodopa, disminuyen la fibrilación del β A y disgregan fibrillas preformadas del péptido (Huong et al., 2010; Li et al., 2004; Ono et al., 2006; Sato et al., 2013). Los datos obtenidos son relevantes debido a que refuerzan las evidencias de que es el grupo catecol, presente en las catecolaminas, interactúa con el péptido β A promoviendo su disgregación y a la vez impidiendo su agregación. En este sentido, el trabajo de Himeno et al, 2011, propone que la disminución de la acumulación del β A tras un tratamiento con el agonista dopaminérgico, apomorfina, se debe a que la actividad de los receptores dopaminérgicos potenciada por el tratamiento, desencadena cascadas de eventos celulares que derivan en el aumento de la actividad de las enzimas degradadoras del β A. Sin embargo, la apomorfina contiene el grupo catecol en su estructura molecular, por lo que la apomorfina podría interactuar directamente con el β A, disgregando el péptido y favoreciendo los mecanismos de limpieza. En este mismo trabajo se reporta que el tratamiento con otro agonista dopaminérgico, pramipexol, no tiene efecto sobre la acumulación del β A, pero cabe resaltar que el pramipexol no contiene un grupo catecol en su estructura molecular, lo que apoya nuestra hipótesis de que es el grupo catecol de las catecolaminas, el que les confiere un efecto sobre la agregación del β A.

En apoyo a nuestra hipótesis, además, diferentes grupos de investigación han descrito la interacción entre diferentes moléculas que incluyen el grupo catecol en su estructura molecular y el β A (Bu et al., 2015; Sato et al., 2013). Hasta ahora se propone que la interacción del grupo catecol con el β A ocurre a través de la formación de una o-quinona, producto de oxidación del catecol, con los residuos de lisina presentes en el péptido (Sato et al., 2013). Los residuos 16 y 28 presentes en la estructura del β A, tienen un papel importante en la oligomerización de dicho péptido. De estos residuos se trata de dos residuos de lisina que pueden formar un aducto o-quinona-el β A. La formación de este aducto se impide el mal-plegamiento del β A impidiendo y su agregación (Ver figura 10; Sato et al., 2013).

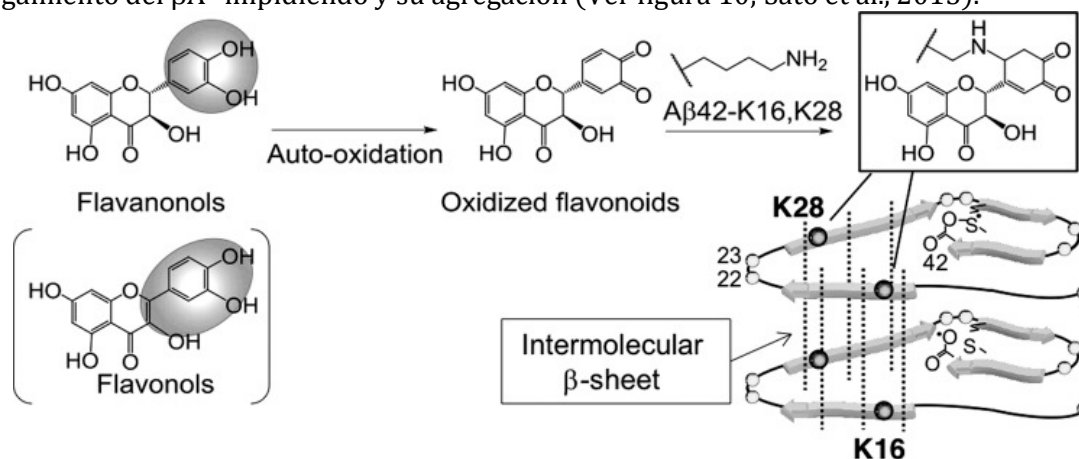


Figura 10| Mecanismo de inhibición de la agregación del β A por flavonoides de tipo catecol. Los flavonoides se oxidan a sus correspondientes o-quinonas en el anillo catecol y forman aductos con las lisinas 16 y 28 (K16 y K28) del β A. La formación de estas interacciones interfiere plegamiento en hojas del β A y desestabiliza los agregados del péptido. (Sato et al., 2013)

Los resultados del análisis histológico de los cerebros de los ratones 3xTg-AD sugiere que el tratamiento con levodopa disminuye la acumulación intraneuronal del β A en las regiones de la CI y CA1 en el hipocampo. La acumulación de β A es un evento temprano en la progresión de la neuropatología y precede la aparición de placas seniles extracelulares (LaFerla et al., 2007).

La patología amiloide del ratón 3xTg-AD se distribuye en patrones y de forma diferencial en distintas regiones cerebrales, lo cual se atribuye a la interconectividad anatómica de proyecciones neuronales y el procesamiento de APP (Mastrangelo y Bowers, 2008). El anticuerpo utilizado para detectar el β A en este trabajo fue el 6E10, el cual reconoce el residuo 1-16 de este péptido. Este anticuerpo comienza a detectar la expresión de APP/ β A desde los 3 meses de edad en la región más caudal del hipocampo, en neuronas de la capa II y III de la corteza entorrinal, y neuronas de la corteza motora primaria (Mastrangelo y Bowers, 2008). Esto coincide con lo que se observó en este trabajo, donde se observó la presencia del β A en estas mismas regiones en los ratones de 12 meses, así como una marcada señal en la amígdala basolateral.

Además de la presencia del β A intraneuronal en el ratón 3xTg-AD, algunos reportes la han hallado en pacientes con la EA y se ha propuesto que tiene un rol en desarrollo de la patología (Gyure et al., 2001; Hashimoto et al., 2010). La relevancia del β A intraneuronal yace en que la oligomerización del β A tanto en el ratón triple transgénico como en los pacientes podría comenzar de manera intraneuronal (Oddo et al., 2006). Se ha descrito que el β A producido inicialmente por neuronas se deposita en terminales neuronales y puede formar agregados de mayor orden (Cummings et al., 1992), y fenómenos similares se han observado en líneas celulares neuronales y otros modelos transgénicos (Kawarabayashi, 2004; Takahashi, 2004; Walsh et al., 2000). Esto significa que la presencia del β A intraneuronal detectada en el ratón 3xTg-AD puede implicar consecuencias similares a las del β A extracelular, y perjudicar la homeostasis neuronal, función sináptica, y contribuir en el desarrollo del déficit cognitivo observado en este modelo.

Bajo esta hipótesis, la administración de levodopa podría estar mitigando los síntomas y la patología el β A a través de distintos blancos de tratamiento. La levodopa es internalizada en las neuronas dopaminérgicas por el transportador de aminoácidos tipo-L, y tras su descarboxilación a dopamina, es transferida a vesículas sinápticas por el transportador vesicular de monoaminas. Dentro de la vesícula permanece almacenada hasta su liberación al espacio sináptico, momento en que la dopamina tiene la oportunidad de interactuar con el β A en el exterior de la célula y evitar su oligomerización. El equipo de Oddo (Oddo et al., 2006) ha propuesto que existe una relación dinámica entre el β A intraneuronal y extracelular, ya que la disminución de la acumulación de uno afecta la del otro y existe movimiento del β A entre el compartimento celular. De esta manera, la subsecuente limpieza del β A extracelular por la dopamina causaría una disminución en la β A intracelular. De manera alternativa, la activación de receptores dopaminérgicos también estaría produciendo un efecto terapéutico en las células nerviosas al reactivar los mecanismos necesarios para el procesamiento y mantenimiento de la memoria. El trabajo de Kalinin y colaboradores (2012) describió que en ratones 5xFAD de 4.5 meses, la administración de L-DOPA, precursor de la noradrenalina y poseedor de un grupo catecol, incrementó los niveles de mRNA de enzimas degradadoras del β A como la neprilisina y la enzima degradadora de insulina. También se observó un incremento en marcadores de crecimiento neuronal como la sinaptofisina, BDNF, NGF y DBH, un marcador catecolaminérgico. Este efecto se atribuye a propiedades anti-inflamatorias del fármaco, y existe la posibilidad que la administración de levodopa esté produciendo cambios similares en el ratón 3xTg-AD, ayudando a restaurar la homeostasis celular perdida por causa de la acumulación tóxica del β A y promover su limpieza en el interior de la neurona.

En nuestro trabajo encontramos una disminución significativa del β A intraneuronal en la CI. Desde el cuarto día del tratamiento con levodopa, se observó el incremento de los niveles de

dopamina y la mejora en la memoria de reconocimiento al quinto día, por lo que es poco probable que la recuperación cognitiva se deba a la disminución de la acumulación del β A por acción del tratamiento. Esto apoya la idea de que la disminución visible del β A intraneuronal al día 16 de la administración en la CI, sería resultado de la actividad dopaminérgica sumada a la interacción directa de la dopamina con el β A.

En el caso de lo reportado para la memoria espacial, la administración de levodopa no tuvo un efecto significativo en el desempeño de la memoria espacial en el MWM. Sin embargo, el análisis histológico indicó que la presencia del β A en el hipocampo dorsal disminuyó significativamente en CA1 en los animales tratados con levodopa. CA1 es la región del hipocampo que muestra una actividad importante durante aprendizaje de tareas de memoria espacial (Laeremans et al., 2015), lo cual sugiere que la presencia y actividad moduladora de la dopamina en esta región tuvo un efecto en disminuir la acumulación del β A, pero no el suficiente para recuperar la función cognitiva. Es muy probable que la limpieza del β A, observado en CA1 sea resultado de los efectos de la dopamina en disgregar el β A más que por la actividad dopaminérgica.

El tratamiento con levodopa tuvo efectos contundentes en la región de la CI, recuperando la función cognitiva y disminuyendo la presencia de la neuropatología, a diferencia de su efecto en otras regiones como el hipocampo, donde se encontró un efecto parcial, y en la amígdala y la corteza motora, en las que no se observaron diferencias. Aunque este trabajo propone que la levodopa tiene un efecto doble, donde por una parte produce estimulación dopaminérgica y por otra disminuye la neuropatología, los resultados sugieren que el tratamiento con levodopa parece estar limitado a regiones donde la actividad dopaminérgica es predominante. Es probable que el fármaco esté teniendo efecto en múltiples regiones del cerebro, pero no con la misma eficacia ni significancia que la observada en un circuito dopaminérgico. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento sub-agudo con levodopa disminuye la acumulación del β A intraneuronal a través de una interacción directa de dopamina con el β A que impide la agregación de este péptido a formas oligoméricas, las que pueden acumularse dentro de las células del ratón 3xTg-AD. Esta disminución fue notoria en regiones donde se ha reportado actividad dopaminérgica.

8 Conclusiones

Con el desarrollo de este proyecto hemos establecido una nueva relación entre la neurotransmisión catecolaminérgica y la patología relacionada a la EA mediante la demostración de que las alteraciones patológicas inducidas por el β A en las sinapsis corticales y alteraciones en la memoria que están mediadas por una disfunción dopaminérgica. Nuestro trabajo representa además una evidencia in vivo del control dopaminérgico del umbral de la inducción de LTP / LTD y su implicación en la EA, destacando la importante función de la dopamina en el mecanismo de la plasticidad sináptica y la formación de la memoria en el cerebro sano y enfermo. Además, encontramos que de manera adicional a su función como neuromoduladores, la dopamina y la norepinefrina tienen un efecto protector sobre la acumulación del β A y el progreso de la histopatología de la EA. En suma, nuestros resultados apoyan la relevancia de tratamientos dirigidos a compensar la función dopaminérgica en la EA, tanto para mitigar los síntomas cognitivos de la EA, como tratamiento de progresión que puede disminuir la agregación del β A o prevenir su acumulación patológica.

9 Referencias

- Abbott, L.F., and Nelson, S.B. (2000). Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat. Neurosci.* 3 *Suppl*, 1178–1183.
- Abraham, W.C., Mason-Parker, S.E., Bear, M.F., Webb, S., and Tate, W.P. (2001). Heterosynaptic metaplasticity in the hippocampus in vivo: a BCM-like modifiable threshold for LTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10924–10929.
- Abramov, E., Dolev, I., Fogel, H., Ciccotosto, G.D., Ruff, E., and Slutsky, I. (2009). Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat. Neurosci.* 12, 1567–1576.
- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J.I., Van Nostrand, W.E., and Smith, S.O. (2010). Structural conversion of neurotoxic amyloid- β (1–42) oligomers to fibrils. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 561–567.
- Apelt, J., Ach, K., and Schliebs, R. (2003). Aging-related down-regulation of neprilysin, a putative beta-amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of beta-amyloid plaques. *Neurosci. Lett.* 339, 183–186.
- Bäckman, L., Lindenberger, U., Li, S.-C.C., and Nyberg, L. (2010). Linking cognitive aging to alterations in dopamine neurotransmitter functioning: Recent data and future avenues. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 670–677.
- Baranello, R.J., Bharani, K.L., Padmaraju, V., Chopra, N., Lahiri, D.K., Greig, N.H., Pappolla, M.A., and Sambamurti, K. (2015). Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 12, 32–46.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.-L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., et al. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* 6, 916–919.
- Bateman, R.J., Munsell, L.Y., Morris, J.C., Swarm, R., Yarasheski, K.E., and Holtzman, D.M. (2006). Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat. Med.* 12, 856–861.
- Bauer, H.H., Aebi, U., Häner, M., Hermann, R., Müller, M., Arvinte, T., and Merkle, H.P. (1995). Architecture and Polymorphism of Fibrillar Supramolecular Assemblies Produced by in Vitro Aggregation of Human Calcitonin. *J. Struct. Biol.* 115, 1–15.
- Bermudez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 109, 207–216.
- Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., Casoli, T., Caselli, U., and Meier-Ruge, W. (1996). Deterioration threshold of synaptic morphology in aging and senile dementia of Alzheimer's type. *Anal. Quant. Cytol. Histol. Int. Acad. Cytol. Am. Soc. Cytol.* 18, 209–213.
- Betts, V., Leissring, M.A., Dolios, G., Wang, R., Selkoe, D.J., and Walsh, D.M. (2008). Aggregation and catabolism of disease-associated intra-Abeta

- mutations: reduced proteolysis of AbetaA21G by neprilysin. *Neurobiol. Dis.* *31*, 442–450.
- Booze, R.M., Mactutus, C.F., Gutman, C.R., and Davis, J.N. (1993a). Frequency analysis of catecholamine axonal morphology in human brain. I. Effects of postmortem delay interval. *J. Neurol. Sci.* *119*, 99–109.
- Booze, R.M., Mactutus, C.F., Gutman, C.R., and Davis, J.N. (1993b). Frequency analysis of catecholamine axonal morphology in human brain. II. Alzheimer's disease and hippocampal sympathetic ingrowth. *J. Neurol. Sci.* *119*, 110–118.
- Bredberg, E., Lennernäs, H., and Paalzow, L. (1994). Pharmacokinetics of levodopa and carbidopa in rats following different routes of administration. *Pharm. Res.* *11*, 549–555.
- Broersen, K., Rousseau, F., and Schymkowitz, J. (2010). The culprit behind amyloid beta peptide related neurotoxicity in Alzheimer's disease: oligomer size or conformation? *Alzheimers Res. Ther.* *2*, 12.
- Bulloj, A., Leal, M.C., Surace, E.I., Zhang, X., Xu, H., Ledesma, M.D., Castaño, E.M., and Morelli, L. (2008). Detergent resistant membrane-associated IDE in brain tissue and cultured cells: Relevance to Abeta and insulin degradation. *Mol. Neurodegener.* *3*, 22.
- Carpentier, M., Robitaille, Y., DesGroseillers, L., Boileau, G., and Marcinkiewicz, M. (2002). Declining expression of neprilysin in Alzheimer disease vasculature: possible involvement in cerebral amyloid angiopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *61*, 849–856.
- Cataldo, A.M., Hamilton, D.J., Barnett, J.L., Paskevich, P.A., and Nixon, R.A. (1996). Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *16*, 186–199.
- Cataldo, A.M., Barnett, J.L., Pieroni, C., and Nixon, R.A. (1997). Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 6142–6151.
- Cataldo, A.M., Petanceska, S., Terio, N.B., Peterhoff, C.M., Durham, R., Mercken, M., Mehta, P.D., Buxbaum, J., Haroutunian, V., and Nixon, R.A. (2004). Abeta localization in abnormal endosomes: association with earliest Abeta elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol. Aging* *25*, 1263–1272.
- Cerf, E., Sarroukh, R., Tamamizu-Kato, S., Breydo, L., Derclaye, S., Dufrêne, Y.F., Narayanaswami, V., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M., and Raussens, V. (2009). Antiparallel β -sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid β -peptide. *Biochem. J.* *421*, 415–423.
- Chapman, P.F., White, G.L., Jones, M.W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V.J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M.A., Bliss, T.V., Hyman, B.T., et al. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat. Neurosci.* *2*, 271–276.
- Chimon, S., Shaibat, M.A., Jones, C.R., Calero, D.C., Aizezi, B., and Ishii, Y.

- (2007). Evidence of fibril-like β -sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's β -amyloid. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 1157–1164.
- Cirrito, J.R., Yamada, K.A., Finn, M.B., Sloviter, R.S., Bales, K.R., May, P.C., Schoepp, D.D., Paul, S.M., Mennerick, S., and Holtzman, D.M. (2005). Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* *48*, 913–922.
- Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., and Ashe, K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* *8*, 79–84.
- Contin, M., and Martinelli, P. (2010). Pharmacokinetics of levodopa. *J. Neurol.* *257*, 253–261.
- Conway, K.A., Harper, J.D., and Lansbury, P.T. (2000). Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry (Mosc.)* *39*, 2552–2563.
- Cooper, L.N., and Bear, M.F. (2012). The BCM theory of synapse modification at 30: interaction of theory with experiment. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 798–810.
- Craig, L.A., Hong, N.S., and McDonald, R.J. (2011). Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *35*, 1397–1409.
- Cummings, B.J., Su, J.H., Geddes, J.W., Van Nostrand, W.E., Wagner, S.L., Cunningham, D.D., and Cotman, C.W. (1992). Aggregation of the amyloid precursor protein within degenerating neurons and dystrophic neurites in Alzheimer's disease. *Neuroscience* *48*, 763–777.
- Dalley, J.W., and Everitt, B.J. (2009). Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward circuitry. *Semin. Cell Dev. Biol.* *20*, 403–410.
- Davies, P., and Maloney, A.J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet Lond. Engl.* *2*, 1403.
- Davies, C.A., Mann, D.M., Sumpter, P.Q., and Yates, P.O. (1987). A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* *78*, 151–164.
- DeKosky, S.T., and Scheff, S.W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* *27*, 457–464.
- Devi, L., and Ohno, M. (2010). Genetic reductions of BACE1 and amyloid- β ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer model mice. *Eur. J. Neurosci.* *31*, 110–118.
- Diaz-Espinoza, R., and Soto, C. (2012). High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 370–377.
- Diez, M., Danner, S., Frey, P., Sommer, B., Staufenbiel, M., Wiederhold, K.-H., and Hökfelt, T. (2003). Neuropeptide alterations in the hippocampal formation and cortex of transgenic mice overexpressing beta-amyloid precursor protein (APP) with the Swedish double mutation (APP23). *Neurobiol. Dis.* *14*, 579–594.

- Dobson, C.M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 329–332.
- Eckert, A., Hauptmann, S., Scherping, I., Meinhardt, J., Rhein, V., Dröse, S., Brandt, U., Fändrich, M., Müller, W.E., and Götz, J. (2008). Oligomeric and fibrillar species of β -amyloid (A β 42) both impair mitochondrial function in P301L tau transgenic mice. *J. Mol. Med.* *86*, 1255–1267.
- Eisenberg, D., and Jucker, M. (2012). The Amyloid State of Proteins in Human Diseases. *Cell* *148*, 1188–1203.
- Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E.A., Frosch, M.P., Eckman, C.B., Tanzi, R.E., Selkoe, D.J., and Guenette, S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 4162–4167.
- Ferreira, S.T., and Klein, W.L. (2011). The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Learn. Mem.* *96*, 529–543.
- Filip, V., and Kolibás, E. (1999). Selegiline in the treatment of Alzheimer's disease: a long-term randomized placebo-controlled trial. Czech and Slovak Senile Dementia of Alzheimer Type Study Group. *J. Psychiatry Neurosci.* *JPN 24*, 234–243.
- Francis, B.M., Yang, J., Hajderi, E., Brown, M.E., Michalski, B., McLaurin, J., Fahnestock, M., and Mount, H.T.J. (2012). Reduced tissue levels of noradrenaline are associated with behavioral phenotypes of the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *37*, 1934–1944.
- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., and Wilcock, G.K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *66*, 137–147.
- Freedman, M., Rewilak, D., Xerri, T., Cohen, S., Gordon, A.S., Shandling, M., and Logan, A.G. (1998). L-deprenyl in Alzheimer's disease: cognitive and behavioral effects. *Neurology* *50*, 660–668.
- Galimberti, D., Ghezzi, L., and Scarpini, E. (2013). Immunotherapy against amyloid pathology in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* *333*, 50–54.
- Goldsbury, C.S., Wirtz, S., Müller, S.A., Sunderji, S., Wicki, P., Aebi, U., and Frey, P. (2000). Studies on the in Vitro Assembly of A β 1–40: Implications for the Search for A β Fibril Formation Inhibitors. *J. Struct. Biol.* *130*, 217–231.
- Grace, A.A. (1991). Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: A hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* *41*, 1–24.
- Greenfield, J.P., Tsai, J., Gouras, G.K., Hai, B., Thinakaran, G., Checler, F., Sisodia, S.S., Greengard, P., and Xu, H. (1999). Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 742–747.
- Gu, L., Liu, C., Stroud, J.C., Ngo, S., Jiang, L., and Guo, Z. (2014). Antiparallel Triple-strand Architecture for Prefibrillar A β 42 Oligomers. *J. Biol. Chem.* *289*, 27300–27313.

Guzmán-Ramos, K., Moreno-Castilla, P., Castro-Cruz, M., McGaugh, J.L., Martínez-Coria, H., LaFerla, F.M., and Bermúdez-Rattoni, F. (2012a).

Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N 19*, 453–460.

Guzmán-Ramos, K., Moreno-Castilla, P., Castro-Cruz, M., McGaugh, J.L., Martínez-Coria, H., LaFerla, F.M., and Bermúdez-Rattoni, F. (2012b).

Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N 19*, 453–460.

Guzmán-Ramos, K., Moreno-Castilla, P., Castro-Cruz, M., McGaugh, J.L., Martínez-Coria, H., LaFerla, F.M., and Bermúdez-Rattoni, F. (2012c).

Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N 19*, 453–460.

Gyure, K.A., Durham, R., Stewart, W.F., Smialek, J.E., and Troncoso, J.C. (2001). Intraneuronal A β -amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *125*, 489–492.

Habicht, G., Haupt, C., Friedrich, R.P., Hortschansky, P., Sachse, C., Meinhardt, J., Wieligmann, K., Gellermann, G.P., Brodhun, M., Götz, J., et al. (2007). Directed selection of a conformational

antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing A β protofibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 19232–19237.

Hardy, J. (2004). Toward Alzheimer therapies based on genetic knowledge. *Annu. Rev. Med.* *55*, 15–25.

Hartmann, T., Bieger, S.C., Brühl, B., Tienari, P.J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G.W., Masters, C.L., Dotti, C.G., Unsicker, K., et al. (1997). Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat. Med.* *3*, 1016–1020.

Hashimoto, M., Bogdanovic, N., Volkman, I., Aoki, M., Winblad, B., and Tjernberg, L.O. (2010). Analysis of microdissected human neurons by a sensitive ELISA reveals a correlation between elevated intracellular concentrations of A β 42 and Alzheimer's disease neuropathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *119*, 543–554.

Himeno, E., Ohyagi, Y., Ma, L., Nakamura, N., Miyoshi, K., Sakae, N., Motomura, K., Soejima, N., Yamasaki, R., Hashimoto, T., et al. (2011). Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid- β degradation. *Ann. Neurol.* *69*, 248–256.

Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2006a). AMPAR Removal Underlies A β -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron* *52*, 831–843.

Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2006b). AMPAR removal underlies A β -induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* *52*, 831–843.

- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2006c). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52, 831–843.
- Huong, V.T., Shimanouchi, T., Shimauchi, N., Yagi, H., Umakoshi, H., Goto, Y., and Kuboi, R. (2010). Catechol derivatives inhibit the fibril formation of amyloid-beta peptides. *J. Biosci. Bioeng.* 109, 629–634.
- Itoh, A., Nitta, A., Nadai, M., Nishimura, K., Hirose, M., Hasegawa, T., and Nabeshima, T. (1996). Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in beta-amyloid protein--infused rats. *J. Neurochem.* 66, 1113–1117.
- Jang, S.-S., and Chung, H.J. (2016). Emerging Link between Alzheimer's Disease and Homeostatic Synaptic Plasticity. *Neural Plast.* 2016, 7969272.
- Janson, J., Ashley, R.H., Harrison, D., McIntyre, S., and Butler, P.C. (1999). The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes* 48, 491–498.
- Janus, C., Welzl, H., Hanna, A., Lovasic, L., Lane, N., St. George-Hyslop, P., and Westaway, D. (2004). Impaired conditioned taste aversion learning in APP transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 25, 1213–1219.
- Jaqaman, K., Loerke, D., Mettlen, M., Kuwata, H., Grinstein, S., Schmid, S.L., and Danuser, G. (2008). Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nat. Methods* 5, 695–702.
- Jürgensen, S., Antonio, L.L., Mussi, G.E.A., Brito-Moreira, J., Bomfim, T.R., De Felice, F.G., Garrido-Sanabria, E.R., Cavaleiro, É.A., and Ferreira, S.T. (2011). Activation of D1/D5 dopamine receptors protects neurons from synapse dysfunction induced by amyloid-beta oligomers. *J. Biol. Chem.* 286, 3270–3276.
- Kalaria, R.N., and Andorn, A.C. (1991). Adrenergic receptors in aging and Alzheimer's disease: decreased alpha 2-receptors demonstrated by [3H]p-aminoclonidine binding in prefrontal cortex. *Neurobiol. Aging* 12, 131–136.
- Kalinin, S., Polak, P.E., Lin, S.X., Sakharkar, A.J., Pandey, S.C., and Feinstein, D.L. (2012). The noradrenaline precursor L-DOPS reduces pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 33, 1651–1663.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., Malinow, R., and Point, W. (2003). APP Processing and Synaptic Function. *Neuron* 37, 925–937.
- Kawahara, M., Ohtsuka, I., Yokoyama, S., Kato-Negishi, M., and Sadakane, Y. (2011). Membrane Incorporation, Channel Formation, and Disruption of Calcium Homeostasis by Alzheimer's β -Amyloid Protein. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2011, 304583.
- Kawarabayashi, T. (2004). Dimeric Amyloid β Protein Rapidly Accumulates in Lipid Rafts followed by Apolipoprotein E and Phosphorylated Tau Accumulation in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 24, 3801–3809.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman,

- C.W., and Glabe, C.G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486–489.
- Kemppainen, N., Laine, M., Laakso, M.P., Kaasinen, V., Någren, K., Vahlberg, T., Kurki, T., and Rinne, J.O. (2003). Hippocampal dopamine D2 receptors correlate with memory functions in Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurosci.* 18, 149–154.
- Kim, J.H., Anwyl, R., Suh, Y.H., Djamgoz, M.B., and Rowan, M.J. (2001). Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of (beta)-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 1327–1333.
- Koch, G., Di Lorenzo, F., Bonni, S., Giacobbe, V., Bozzali, M., Caltagirone, C., and Martorana, A. (2014). Dopaminergic Modulation of Cortical Plasticity in Alzheimer's Disease Patients. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*
- Kolomiets, B., Marzo, A., Caboche, J., Vanhoutte, P., and Otani, S. (2009). Background dopamine concentration dependently facilitates long-term potentiation in rat prefrontal cortex through postsynaptic activation of extracellular signal-regulated kinases. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 19, 2708–2718.
- Kullmann, D.M., and Lamsa, K.P. (2007). Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 687–699.
- Kumar, U., and Patel, S.C. (2007). Immunohistochemical localization of dopamine receptor subtypes (D1R-D5R) in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 1131, 187–196.
- Ladiwala, A.R.A., Litt, J., Kane, R.S., Aucoin, D.S., Smith, S.O., Ranjan, S., Davis, J., Van Nostrand, W.E., and Tessier, P.M. (2012). Conformational differences between two amyloid β oligomers of similar size and dissimilar toxicity. *J. Biol. Chem.* 287, 24765–24773.
- Laeremans, A., Sabanov, V., Ahmed, T., Nys, J., Van de Plas, B., Vinken, K., Woolley, D.G., Gantois, I., D'Hooge, R., Arckens, L., et al. (2015). Distinct and simultaneously active plasticity mechanisms in mouse hippocampus during different phases of Morris water maze training. *Brain Struct. Funct.* 220, 1273–1290.
- LaFerla, F.M., Green, K.N., and Oddo, S. (2007a). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 499–509.
- LaFerla, F.M., Green, K.N., and Oddo, S. (2007b). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 499–509.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., et al. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6448–6453.
- Lashuel, H.A., Hartley, D., Petre, B.M., Walz, T., and Lansbury, P.T. (2002). Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418, 291.
- Li, J., Zhu, M., Manning-Bog, A.B., Di Monte, D.A., and Fink, A.L. (2004). Dopamine and L-dopa disaggregate amyloid fibrils: implications for Parkinson's and Alzheimer's disease.

FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *18*, 962–964.

Li, J., Kanekiyo, T., Shinohara, M., Zhang, Y., LaDu, M.J., Xu, H., and Bu, G. (2012). Differential regulation of amyloid- β endocytic trafficking and lysosomal degradation by apolipoprotein E isoforms. *J. Biol. Chem.* *287*, 44593–44601.

Li, S., Hong, S., Shepardson, N.E., Walsh, D.M., Shankar, G.M., and Selkoe, D. (2009). Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* *62*, 788–801.

Lisman, J., Grace, A.A., and Duzel, E. (2011a). A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP. *Trends Neurosci.* *34*, 536–547.

Lisman, J., Grace, A.A., and Duzel, E. (2011b). A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP. *Trends Neurosci.* *34*, 536–547.

Liu, L., Wong, T.P., Pozza, M.F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y.P., and Wang, Y.T. (2004). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* *304*, 1021–1024.

Liu, Y., Yoo, M.-J., Savonenko, A., Stirling, W., Price, D.L., Borchelt, D.R., Mamounas, L., Lyons, W.E., Blue, M.E., and Lee, M.K. (2008a). Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 13805–13814.

Liu, Y., Yoo, M.-J., Savonenko, A., Stirling, W., Price, D.L., Borchelt, D.R., Mamounas, L., Lyons, W.E., Blue, M.E., and Lee, M.K. (2008b). Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 13805–13814.

Manetto, V., Perry, G., Tabaton, M., Mulvihill, P., Fried, V.A., Smith, H.T., Gambetti, P., and Autilio-Gambetti, L. (1988). Ubiquitin is associated with abnormal cytoplasmic filaments characteristic of neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 4501–4505.

Martorana, A., and Koch, G. (2014a). "Is dopamine involved in Alzheimer's disease?" *Front. Aging Neurosci.* *6*, 252.

Martorana, A., and Koch, G. (2014b). Is dopamine involved in Alzheimer's disease? *Front. Aging Neurosci.* *6*.

Martorana, A., Esposito, Z., and Koch, G. (2010). Beyond the cholinergic hypothesis: Do current drugs work in alzheimer's disease? *CNS Neurosci. Ther.* *16*, 235–245.

Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L.A., McKeel, D.W., and Morris, J.C. (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* *56*, 127–129.

Mastrangelo, M. a, and Bowers, W.J. (2008). Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC Neurosci.* *9*, 81.

- Matsuda, Y., Marzo, A., and Otani, S. (2006). The Presence of Background Dopamine Signal Converts Long-Term Synaptic Depression to Potentiation in Rat Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* *26*, 4803–4810.
- Megill, A., Tran, T., Eldred, K., Lee, N.J., Wong, P.C., Hoe, H.-S., Kirkwood, A., and Lee, H.-K. (2015). Defective Age-Dependent Metaplasticity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* *35*, 11346–11357.
- Miller, B.C., Eckman, E.A., Sambamurti, K., Dobbs, N., Chow, K.M., Eckman, C.B., Hersh, L.B., and Thiele, D.L. (2003). Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 6221–6226.
- Milner, B., and Klein, D. (2016). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions: memory and memories-looking back and looking forward. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *87*, 230.
- Moreno-Castilla, P., Rodriguez-Duran, L.F., Guzman-Ramos, K., Barcenas-Femat, A., Escobar, M.L., and Bermudez-Rattoni, F. (2016). Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid- β transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment. *Neurobiol. Aging* *41*, 187–199.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* *11*, 47–60.
- Nakanishi, H., Amano, T., Sastradipura, D.F., Yoshimine, Y., Tsukuba, T., Tanabe, K., Hirotsu, I., Ohono, T., and Yamamoto, K. (1997). Increased expression of cathepsins E and D in neurons of the aged rat brain and their colocalization with lipofuscin and carboxy-terminal fragments of Alzheimer amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* *68*, 739–749.
- Nazarali, A.J., and Reynolds, G.P. (1992). Monoamine neurotransmitters and their metabolites in brain regions in Alzheimer's disease: a postmortem study. *Cell. Mol. Neurobiol.* *12*, 581–587.
- Nilsson, P., Loganathan, K., Sekiguchi, M., Matsuba, Y., Hui, K., Tsubuki, S., Tanaka, M., Iwata, N., Saito, T., and Saido, T.C. (2013). A β secretion and plaque formation depend on autophagy. *Cell Rep.* *5*, 61–69.
- Nitsche, M. a, Kuo, M.-F., Grosch, J., Bergner, C., Monte-Silva, K., and Paulus, W. (2009). D1-receptor impact on neuroplasticity in humans. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 2648–2653.
- O'Carroll, C.M., and Morris, R.G.M. (2004). Heterosynaptic co-activation of glutamatergic and dopaminergic afferents is required to induce persistent long-term potentiation. *Neuropharmacology* *47*, 324–332.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., and LaFerla, F.M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *24*, 1063–1070.
- Oddo, S., Caccamo, A., Tran, L., Lambert, M.P., Glabe, C.G., Klein, W.L., and LaFerla, F.M. (2006a). Temporal profile of amyloid- β (A β) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease: A link between A β and tau pathology. *J. Biol. Chem.* *281*, 1599–1604.

- Oddo, S., Caccamo, A., Smith, I.F., Green, K.N., and LaFerla, F.M. (2006b). A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of A β . *Am. J. Pathol.* *168*, 184–194.
- Ohara, P.T., Granato, A., Moallem, T.M., Wang, B.-R., Tillet, Y., and Jasmin, L. (2003). Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *J. Neurocytol.* *32*, 131–141.
- Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., and Yamada, M. (2006). Anti-Parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Neurochem. Int.* *48*, 275–285.
- Ono, K., Takasaki, J., Takahashi, R., Ikeda, T., and Yamada, M. (2013). Effects of antiparkinsonian agents on β -amyloid and α -synuclein oligomer formation in vitro. *J. Neurosci. Res.* *91*, 1371–1381.
- Palop, J.J., and Mucke, L. (2010). Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.* *13*, 812–818.
- Pappolla, M.A., Omar, R.A., Kim, K.S., and Robakis, N.K. (1992). Immunohistochemical evidence of oxidative [corrected] stress in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* *140*, 621–628.
- Pérez, A., Morelli, L., Cresto, J.C., and Castaño, E.M. (2000). Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochem. Res.* *25*, 247–255.
- Pignatelli, M., and Bonci, A. (2015). Role of Dopamine Neurons in Reward and Aversion: A Synaptic Plasticity Perspective. *Neuron* *86*, 1145–1157.
- Pinessi, L., Rainero, I., De Gennaro, T., Gentile, S., Portaleone, P., and Bergamasco, B. (1987). Biogenic amines in cerebrospinal fluid and plasma of patients with dementia of Alzheimer type. *Funct. Neurol.* *2*, 51–58.
- Pistell, P.J., Zhu, M., and Ingram, D.K. (2008). Acquisition of conditioned taste aversion is impaired in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* *152*, 594–600.
- Preda, S., Govoni, S., Lanni, C., Racchi, M., Mura, E., Grilli, M., and Marchi, M. (2008). Acute β -amyloid administration disrupts the cholinergic control of dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *33*, 1062–1070.
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fà, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., and Arancio, O. (2008). Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 14537–14545.
- Qiu, W.Q., Walsh, D.M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M.B., Rosner, M.R., Safavi, A., Hersh, L.B., and Selkoe, D.J. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J. Biol. Chem.* *273*, 32730–32738.
- Ramírez-Lugo, L., Jensen, M.S., Sørderman, A., and West, M.J. (2009). Deficits in aversive but not in safe taste memory in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *J. Alzheimers Dis. JAD* *18*, 281–293.

- Reddy, P.H., Mani, G., Park, B.S., Jacques, J., Murdoch, G., Whetsell, W., Kaye, J., and Manczak, M. (2005). Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *J. Alzheimers Dis. JAD* 7, 103-117-180.
- Renner, M., Lacor, P.N., Velasco, P.T., Xu, J., Contractor, A., Klein, W.L., and Triller, A. (2010). Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66, 739–754.
- Ries, M., and Sastre, M. (2016). Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front. Aging Neurosci.* 8, 160.
- Robertson, S.D., Plummer, N.W., de Marchena, J., and Jensen, P. (2013). Developmental origins of central norepinephrine neuron diversity. *Nat. Neurosci.* 16, 1016–1023.
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J.H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C.T., Cheng, R., Hasegawa, H., et al. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 39, 168–177.
- Saiki, M., Honda, S., Kawasaki, K., Zhou, D., Kaito, A., Konakahara, T., and Morii, H. (2005). Higher-order Molecular Packing in Amyloid-like Fibrils Constructed with Linear Arrangements of Hydrophobic and Hydrogen-bonding Side-chains. *J. Mol. Biol.* 348, 983–998.
- Salahuddin, P., Fatima, M.T., Abdelhameed, A.S., Nusrat, S., and Khan, R.H. (2016). Structure of amyloid oligomers and their mechanisms of toxicities: Targeting amyloid oligomers using novel therapeutic approaches. *Eur. J. Med. Chem.* 114, 41–58.
- Sato, M., Murakami, K., Uno, M., Nakagawa, Y., Katayama, S., Akagi, K., Masuda, Y., Takegoshi, K., and Irie, K. (2013). Site-specific Inhibitory Mechanism for Amyloid β 42 Aggregation by Catechol-type Flavonoids Targeting the Lys Residues. *J. Biol. Chem.* 288, 23212–23224.
- Savonenko, A., Xu, G.M., Melnikova, T., Morton, J.L., Gonzales, V., Wong, M.P.F., Price, D.L., Tang, F., Markowska, A.L., and Borchelt, D.R. (2005). Episodic-like memory deficits in the APP^{sw}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease: Relationships to β -amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiol. Dis.* 18, 602–617.
- Sawaya, M.R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M.I., Sievers, S.A., Apostol, M.I., Thompson, M.J., Balbirnie, M., Wiltzius, J.J.W., McFarlane, H.T., et al. (2007). Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447, 453–457.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., et al. (1999). Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173–177.
- Schiffman, S.S., Clark, C.M., and Warwick, Z.S. (1990). Gustatory and olfactory dysfunction in dementia: not specific to Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 11, 597–600.
- Schiffman, S.S., Graham, B.G., Sattely-Miller, E.A., Zervakis, J., and Welsh-Bohmer, K. (2002). Taste, smell and neuropsychological performance of individuals at familial risk for

- Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 23, 397–404.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Schultz, W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 259–288.
- Schultz, W. (2013). Updating dopamine reward signals. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 229–238.
- Selkoe, D.J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789–791.
- Serpell, L.C., Sunde, M., Benson, M.D., Tennent, G.A., Pepys, M.B., and Fraser, P.E. (2000). The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* 300, 1033–1039.
- Shankar, G.M., and Walsh, D.M. (2009). Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A β . *Mol. Neurodegener.* 4, 48.
- Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., and Sabatini, B.L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 2866–2875.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837–842.
- Shearman, E., Rossi, S., Szasz, B., Juranyi, Z., Fallon, S., Pomara, N., Sershen, H., and Lajtha, A. (2006). Changes in cerebral neurotransmitters and metabolites induced by acute donepezil and memantine administrations: a microdialysis study. *Brain Res. Bull.* 69, 204–213.
- Sheynikhovich, D., Otani, S., and Arleo, A. (2013). Dopaminergic Control of Long-Term Depression/Long-Term Potentiation Threshold in Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* 33, 13914–13926.
- Sisodia, S.S. (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6075–6079.
- Smith, C.C., and Greene, R.W. (2012). CNS dopamine transmission mediated by noradrenergic innervation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 6072–6080.
- Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., Nairn, A.C., Salter, M.W., Lombroso, P.J., Gouras, G.K., et al. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat. Neurosci.* 8, 1051–1058.
- Soto, C. Alzheimer's and prion disease as disorders of protein conformation: implications for the design of novel therapeutic approaches. *J. Mol. Med.* 77, 412–418.
- Soto, C., Sigurdsson, E.M., Morelli, L., Asok Kumar, R., Castaño, E.M., and Frangione, B. (1998). β -sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis:

- Implications for Alzheimer's therapy. *Nat. Med.* 4, 822–826.
- Steinbach, S., Hundt, W., Vaitl, A., Heinrich, P., Förster, S., Bürger, K., and Zahnert, T. (2010). Taste in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Neurol.* 257, 238–246.
- Storga, D., Vrecko, K., Birkmayer, J.G., and Reibnegger, G. (1996). Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients. *Neurosci. Lett.* 203, 29–32.
- Sunde, M., and Blake, C. (1997). The Structure of Amyloid Fibrils by Electron Microscopy and X-Ray Diffraction. In *Advances in Protein Chemistry*, D.S.E. and P.S.K. Frederic M. Richards, ed. (Academic Press), pp. 123–159.
- Suto, T., Meguro, K., Nakatsuka, M., Kato, Y., Tezuka, K., Yamaguchi, S., and Tashiro, M. (2014). Disorders of “taste cognition” are associated with insular involvement in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia: “Memory of food is impaired in dementia and responsible for poor diet.” *Int. Psychogeriatr. FirstView*, 1–12.
- Sze, C.I., Troncoso, J.C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D.L., and Martin, L.J. (1997). Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 933–944.
- Takahashi, R.H. (2004). Oligomerization of Alzheimer's -Amyloid within Processes and Synapses of Cultured Neurons and Brain. *J. Neurosci.* 24, 3592–3599.
- Takeuchi, T., Duszkiewicz, A.J., and Morris, R.G.M. (2014). The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369.
- Teplow, D.B. (2013). On the subject of rigor in the study of amyloid β -protein assembly. *Alzheimers Res. Ther.* 5, 39.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., and Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572–580.
- Tom, S.E., Hubbard, R.A., Crane, P.K., Haneuse, S.J., Bowen, J., McCormick, W.C., McCurry, S., and Larson, E.B. (2015). Characterization of dementia and Alzheimer's disease in an older population: updated incidence and life expectancy with and without dementia. *Am. J. Public Health* 105, 408–413.
- Townsend, M., Shankar, G.M., Mehta, T., Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2006). Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J. Physiol.* 572, 477–492.
- Trabace, L., Kendrick, K.M., Castrignanò, S., Colaianna, M., De Giorgi, A., Schiavone, S., Lanni, C., Cuomo, V., and Govoni, S. (2007a). Soluble amyloid beta1-42 reduces dopamine levels in rat prefrontal cortex: relationship to nitric oxide. *Neuroscience* 147, 652–663.
- Trabace, L., Kendrick, K.M., Castrignanò, S., Colaianna, M., De Giorgi, A., Schiavone, S., Lanni, C., Cuomo, V., and Govoni, S. (2007b). Soluble amyloid beta1-42 reduces dopamine levels in rat prefrontal cortex: relationship to nitric oxide. *Neuroscience* 147, 652–663.

- Trillo, L., Das, D., Hsieh, W., Medina, B., Moghadam, S., Lin, B., Dang, V., Sanchez, M.M., De Miguel, Z., Ashford, J.W., et al. (2013). Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. Translating basic science into clinical care. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *37*, 1363–1379.
- Turrigiano, G.G., and Nelson, S.B. (2000). Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* *10*, 358–364.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* *286*, 735–741.
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G.J., Logan, J., Schlyer, D., MacGregor, R., Hitzemann, R., and Wolf, A.P. (1994). Decreased dopamine transporters with age in healthy human subjects. *Ann. Neurol.* *36*, 237–239.
- Walsh, D.M., Hartley, D.M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Selkoe, D.J., and Teplow, D.B. (1999). Amyloid β -Protein Fibrillogenesis STRUCTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF PROTOFIBRILLAR INTERMEDIATES. *J. Biol. Chem.* *274*, 25945–25952.
- Walsh, D.M., Tseng, B.P., Rydel, R.E., Podlisny, M.B., and Selkoe, D.J. (2000). The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry (Mosc.)* *39*, 10831–10839.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002a). Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* *416*, 535–539.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002b). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* *416*, 535–539.
- Wang, Q., Walsh, D.M., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., and Anwyl, R. (2004a). 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. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 3370–3378.
- Wang, Q., Walsh, D.M., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., and Anwyl, R. (2004b). 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. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 3370–3378.
- Wenk, G.L. (2003). Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry* *64*, 7–10.
- Wu, J., Petralia, R.S., Kurushima, H., Patel, H., Jung, M., Volk, L., Chowdhury, S., Shepherd, J.D., Dehoff, M., Li, Y., et al. (2011). Arc/Arg3.1 regulates an endosomal pathway essential for

activity-dependent β -amyloid generation. *Cell* 147, 615–628.

Yasojima, K., Akiyama, H., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2001). Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci. Lett.* 297, 97–100.

Younkin, S.G. (1998). The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J. Physiol. Paris* 92, 289–292.

Yu, W.H., Cuervo, A.M., Kumar, A., Peterhoff, C.M., Schmidt, S.D., Lee, J.-H., Mohan, P.S., Mercken, M., Farmery, M.R., Tjernberg, L.O., et al. (2005). Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 171, 87–98.

Zhao, Z., Xiang, Z., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Stetka, B., and Pasinetti, G.M. (2007). Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 28, 824–830.

Zheng, L., Cedazo-Minguez, A., Hallbeck, M., Jerhammar, F., Marcusson, J., and Terman, A. (2012). Intracellular distribution of amyloid beta peptide and its relationship to the lysosomal system. *Transl. Neurodegener.* 1, 19.

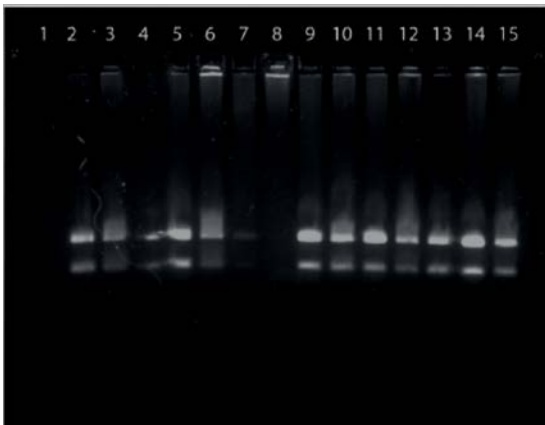
Zola-Morgan, S., Squire, L.R., and Amaral, D.G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 6, 2950–2967.

Zorumski, C.F., and Izumi, Y. (2012). NMDA receptors and metaplasticity: mechanisms and possible roles in neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 989–1000.

10 Anexo

Imágenes representativas del resultado de la genotipificación.

Bandas de 500 y 530 pb del producto de la PCR para APP/tau. El carril 1 es agua, los carriles 2-6, 9-15 contienen DNA de ratones 3xTg AD y los carriles 7 y 8 ratones WT.



Bandas de 550 pb del producto de la PCR para presenilina de ratones WT en los carriles 2, 4 y 9. Bandas de 300 y 250 pb en el caso de los ratones 3xTg AD tras la digestión del producto de PCR en los carriles 3, 5-8, 10-12. El carril 1 fue agua.

