



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

EL PAPEL DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN LA PATOLOGÍA  
CARACTERÍSTICA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Azul Islas Hernández

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Federico Bermúdez Rattoni  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Leonor Pérez  
[Instituto de Biotecnología](#)  
Dr. Iván Velasco Velazquez  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

**Ciudad de México. Marzo, 2017**



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.

<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<i>Tau</i>	5
<i>APP</i>	6
<i>Fallas en el sistema dopaminérgico.</i>	8
<i>Corteza Insular</i>	12
<i>Modelo murino triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer</i>	16
<i>Detección y procesamiento de un estímulo nuevo.</i>	17
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>18</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>18</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>19</b>
<b>Objetivos Particulares</b>	<b>19</b>
<b>Metodología</b>	<b>20</b>
<i>Animales</i>	20
<i>Implantación de cánulas guía</i>	20
<i>Microdiálisis en libre movimiento</i>	20
<i>SKF-38393</i>	22
<i>Atenuación de la Neofobia</i>	23
<i>Laberinto Acuático de Morris (WM)</i>	24
<i>Genotipificación</i>	24
<b>Resultados</b>	<b>25</b>
<i>Liberación de dopamina en la CI ante la presentación del estímulo gustativo novedoso.</i>	25
<i>Respuesta neofóbica de animales 3xTg-AD comparada con la de animales WT de 6-8 meses de edad.</i>	26
<i>Efecto de la estimulación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 en ratones de 6 a 8 meses de edad.</i>	27
<i>Efecto de la estimulación de receptores dopaminérgicos tipo D1 en ratones de 11 a 13 meses de edad.</i>	29
<i>Efectos del SKF sobre el consumo de líquido.</i>	30
<i>Efecto de la estimulación de receptores dopaminérgicos tipo D1 en una tarea de memoria espacial.</i>	32
<b>Discusión</b>	<b>34</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>38</b>

## Resumen

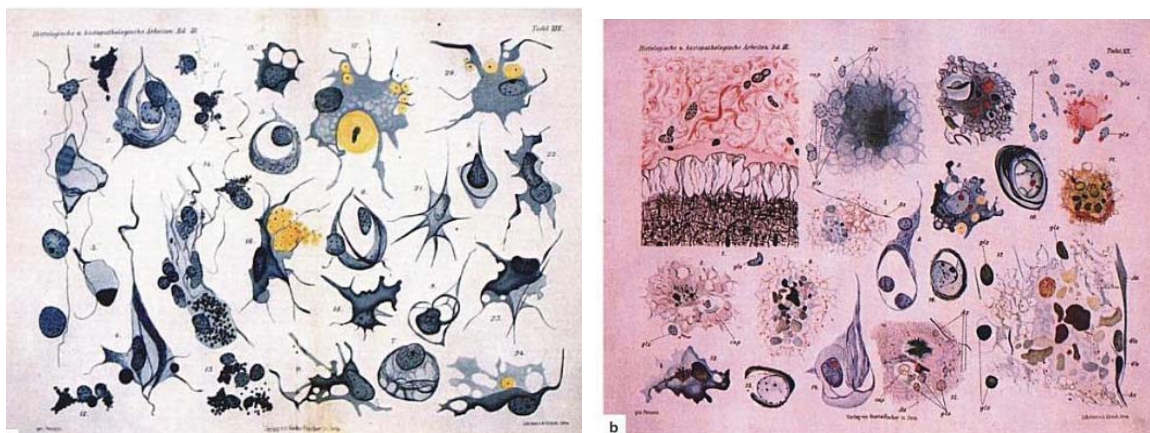
La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia. Es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva. Los síntomas más tempranos se manifiestan como déficits súbitos e intermitentes en el recuerdo de eventos menores de la vida cotidiana, referido como una pérdida de la memoria episódica, además de cambios en la personalidad, desórdenes de lenguaje y de habilidades espaciales.

La EA se caracteriza a nivel histopatológico por: placas neuríticas difusas compuestas por el péptido  $\beta$ -amiloide1-42 y ovillos neurofibrilares compuestos de agregados filamentosos de la proteína tau hiperfosforilada. Además de estas lesiones cerebrales, la EA se asocia también a una degeneración del sistema de neurotransmisión, particularmente del de catecolaminas, que participa en procesos como el de la señalización de la novedad en un estímulo. Una de las estructuras más afectadas por la acumulación de las placas de  $A\beta$  y de ovillos neurofibrilares de tau es la corteza insular (CI). En este trabajo, medimos la liberación de dopamina ante la presencia de un estímulo gustativo novedoso en ratones viejos en un modelo 3xTg para la EA comparándolos con animales WT de la misma edad (11-13 meses) en la CI. Además estimulamos a los receptores dopaminérgicos tipo D1 mediante la inyección intra peritoneal del agonista SKF38393 y probamos la detección de la novedad de un estímulo gustativo en animales 3xTg-AD tanto de 6-8 meses como de 11-13 meses de edad y analizamos la ejecución de los animales de ambos grupos en una tarea de memoria espacial. Los principales resultados muestran que existe un rescate en la respuesta neofóbica de los ratones de 6-8 meses de edad y que existe una tendencia hacia la neofobia en los ratones de 11-13 meses, aunque no alcanza a ser significativa estadísticamente.

## Introducción

En el año de 1907, el doctor Alois Alzheimer publicó sus observaciones sobre el caso de una paciente, Auguste D., describiendo una enfermedad que “comenzó con un fuerte sentimiento de celos hacia su marido. Muy pronto mostró problemas de memoria que incrementaron muy rápidamente. Ella se muestra desorientada en tiempo y espacio. En

medio año, Auguste desarrolló síntomas típicos de demencia presenil” (Maurer, Maurer, & Ruiz Ezquerro, 2006). Además de sus descripciones sobre el estado de salud de la paciente, el doctor Alzheimer realizó un estudio post-mortem en el cerebro de August, describiendo la patología de la siguiente manera: “dentro de células aparentemente normales, se pueden observar una o más fibras... en una etapa más avanzada, muchas fibrillas, arregladas en paralelo, mostraban los mismos cambios. Después se acumulan, formando ovillos densos y gradualmente avanzan a la superficie de las células. Eventualmente el núcleo y el citoplasma desaparecen y solo un ovillo de fibrillas indica el sitio donde alguna vez se localizaba una neurona.” (Fig. 1). En la misma publicación hace notorio que la zona mayormente afectada por estas fibrillas es la corteza cerebral “especialmente en las capas superiores”. A esta enfermedad se le nombró posteriormente como enfermedad de Alzheimer, en honor al doctor que la describió por primera vez (Maurer et al., 2006).



*Fig. 1. Dibujos de las neuropatologías observadas en el cerebro de Auguste D.*

*Tomado de (Riley, 2014)*

La enfermedad de Alzheimer (EA) se describe actualmente como una enfermedad neurodegenerativa, progresiva y se reconoce como la causa más común de demencia en el mundo. Su prevalencia en la población aumenta conforme aumenta su edad (Billings, Oddo, Green, McGaugh, & LaFerla, 2005). La prevalencia mundial de la EA es de 24.3 millones con 4.6 millones de nuevos casos siendo diagnosticados cada año (Ferri et al., 2005) y se considera que 1 de cada 85 personas padecerá esta enfermedad en el 2050 (Ziegler-Graham, Brookmeyer, Johnson, & Arrighi, 2008). Los síntomas más tempranos de

la EA se manifiestan como déficits súbitos e intermitentes en el recuerdo de eventos menores de la vida cotidiana, referido como una pérdida de la memoria episódica (Walsh & Selkoe, 2004), además de cambios en la personalidad, desórdenes de lenguaje y de habilidades espaciales (Albert, 1996). Los síntomas de la EA se confunden a menudo con la pérdida de habilidades propias de las personas de edad avanzada, e incluso con otros tipos de demencia, además no hay un marcador definitivo medible *in vivo* que sea específico de esta enfermedad; sin embargo, si se realiza un exámen post-mortem del cerebro de estos pacientes, se observa que existe una pérdida considerable de neuronas de la formación hipocampal y áreas neocorticales (Braak & Braak, 1991). Esta atrofia celular en áreas específicas del cerebro se debe a la acumulación de la proteína Tau en su forma hiperfosforilada, además de la formación de placas intra y extracelulares del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y se cree, son las causantes de los síntomas que experimentan los pacientes con Alzheimer (Oddo et al., 2003) .

La EA se caracteriza entonces por estas dos lesiones principales: placas neuríticas difusas compuestas principalmente por el péptido  $\beta$ -amiloide<sub>1-42</sub> y ovillos neurofibrilares compuestos de agregados filamentosos de la proteína tau hiperfosforilada. Las placas neuríticas derivan del rompimiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide (APP) por la acción de las secretasas beta y gama y se encuentran principalmente en las cortezas del sistema límbico y cortezas asociadas. Son focos microscópicos de deposiciones extracelulares de  $\beta$ -amiloide<sub>1-42</sub> asociadas a daño axonal y dendrítico. En cambio, los ovillos de fibras anormales ocupan gran parte del citoplasma perinuclear de neuronas de regiones como el hipocampo, la amígdala o la corteza entorrinal (Selkoe, 2001).

### ***Tau***

Tau es una proteína de 441 aminoácidos que contiene 4 dominios de unión a microtúbulos y dos regiones ricas en prolina (PRR), su función consiste promover la polimerización de microtúbulos y estabilizarlos.

El gen que codifica para la proteína se encuentra localizado en el cromosoma 17 en humanos, y se pueden encontrar varias isoformas de la proteína debidas a modificaciones post-transcripcionales (splicing alternativo, Fig. 2) (Avila et al., 2004)

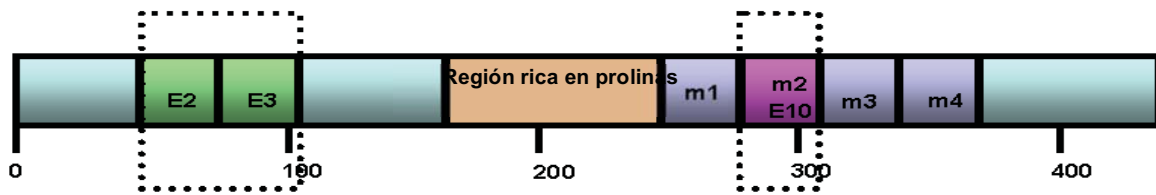


Figura 2. Splicing alternativo de los exones 2,3 y 10 dan lugar a las isoformas de la proteína. Modificado de (Tian et al., 2013).

El mRNA de la proteína se expresa predominantemente en neuronas, particularmente en los axones. Las PRR son blanco de fosforilación de varias cinasas de serina/treonina (GSK3  $\beta$ , PKA, Cdk5/p35, caseína II cinasa, CaMK III, ERK2) y la fosforilación de estos sitios puede resultar en cambios conformacionales que afecten la estabilidad de la proteína y su habilidad para unirse a microtúbulos (Avila et al., 2004).

Las patologías en las que está implicada tau son el resultado de la presencia de la proteína en su forma hiperfosforilada. En situación patológica, existe una fosforilación simultánea de una sola isoforma de la proteína en diferentes sitios, lo que provoca que esta pierda la capacidad de unión a microtúbulos y se dimerice formando estructuras llamadas pares helicoidales que son sumamente insolubles en el citosol, por lo cual se agregan formando marañas neurofibrilares observadas en cerebros de pacientes con alguna tau-patología, como lo es la EA. Estas marañas neurofibrilares resultan tóxicas para las neuronas y llevan a la pérdida de contactos sinápticos y posteriormente a la muerte neuronal (Oddo et al., 2003).

## **APP**

La proteína precursora de  $\beta$ -amiloide (APP, por sus siglas en inglés) es una glicoproteína transmembranal tipo I. Esta proteína es procesada ya sea por la  $\alpha$ - o la  $\beta$ -secretasa para liberar su dominio extracelular largo. Subsecuentemente, el fragmento C-terminal que permanece retenido en la membrana está sujeto al corte intramembranal por el complejo de la  $\gamma$ -secretasa para generar el dominio intracelular de APP y simultáneamente liberar un fragmento conocido como p3 (si se procesa por la  $\alpha$ -secretasa) o  $A\beta$  (si la  $\beta$ -secretasa es la

que actúa) (Wolfe et al., 1999). La APP está codificada en el cromosoma 21 en humanos y al igual que tau, sufre cambios post-transcripcionales que generan varias isoformas.

Su acumulación en células neuronales se relaciona fuertemente con la patología observada en pacientes con EA. Se ha encontrado que existen más de 20 mutaciones en APP que se encuentran relacionadas con la EA familiar; todas ellas provocan que se potencie la generación o la agregación de los péptidos de A $\beta$  (Hardy & Selkoe, 2002).

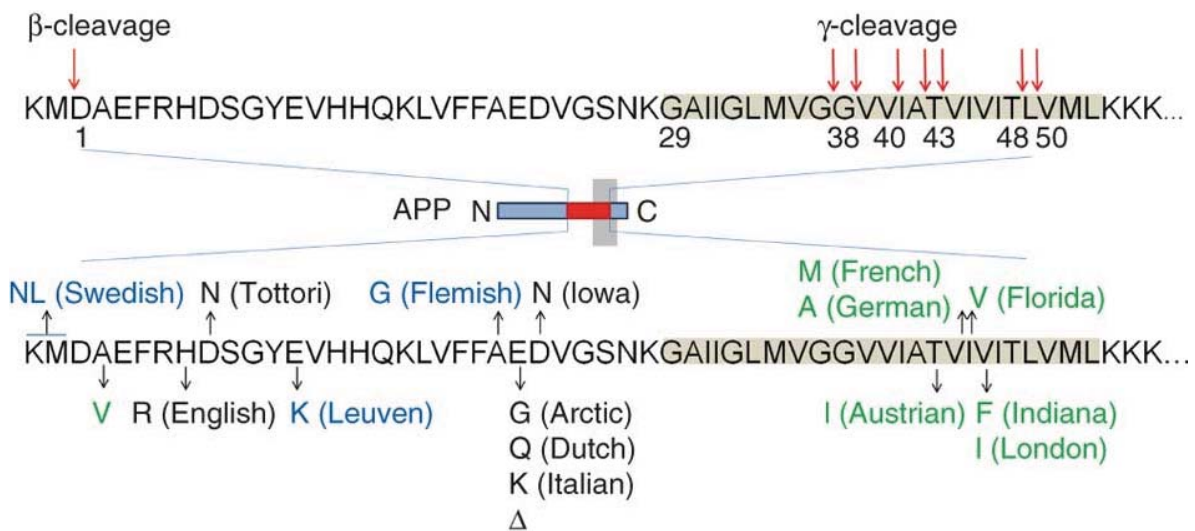


Figura. 3. Esquema representativo del gen codificante para APP y los sitios de corte de las diferentes secretasas que procesan a la proteína. Tomado de (Benilova, Karran, & De Strooper, 2012).

La APP puede ser cortada por distintas proteasas de la familia de las secretasas. En condiciones no patológicas, la proteína es procesada por la  $\alpha$ -secretasa, que la corta en el dominio A $\beta$ , entre la Lys<sup>687</sup> y la Leu<sup>688</sup> (Fig. 3) y produce dos fragmentos, un dominio APP que es soluble, y el dominio C-terminal de 83 residuos de aminoácidos que es cortado posteriormente por la  $\gamma$ -secretasa para liberar un fragmento denominado p3 que realiza diversas funciones en la célula, como mediar la adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular. En neuronas, la APP se ha ligado al crecimiento de los conos de neuritas (Small et al., 1994), a la sinaptogénesis (Priller et al., 2006) y a la migración neuronal dentro de la placa cortical (Young-Pearse et al., 2007).

Sin embargo, la APP también puede ser procesada por otro tipo de secretasa, la  $\beta$ -secretasa. Esta corta la proteína entre los residuos Met<sup>671</sup> and Asp<sup>672</sup>, generando 2



fragmentos, un fragmento APP soluble y un fragmento C-terminal de 99 residuos que queda anclado en la membrana; cuando actúa la  $\beta$ -secretasa, el residuo que queda anclado a la membrana es sustrato también de la  $\gamma$ -secretasa, que lo corta ya sea en la Val<sup>711</sup> o en la Ile<sup>713</sup>, y produce un péptido  $\beta$  de 40 o 42 residuos, dependiendo de en que aminoácido se realice el corte (Young-Pearse et al., 2007). Estos péptidos son altamente insolubles y forman agregados intra y extracelulares, las placas A $\beta$  que se observan en pacientes con la EA.

### ***Fallas en el sistema dopaminérgico.***

Además de la presencia de estas lesiones cerebrales, la EA se asocia también a una degeneración del sistema de neurotransmisión, particularmente del colinérgico y del de monoaminas, tanto de modelos para la EA como de pacientes con dicha enfermedad (Trillo et al., 2013).

La dopamina (DA) es un neurotransmisor que pertenece a la familia de las catecolaminas, es sintetizado a partir del aminoácido tirosina y constituye aproximadamente el 80% de las catecolaminas en el cerebro (Vallone et al. 2000). Ejerce su acción en la célula uniéndose a cinco tipos de receptores de membrana de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G, divididos en dos grupos: los tipo D1, que se encuentran acoplados a proteínas Gs que activan a la adenilato ciclasa provocando un aumento de AMPc, y los tipo D2, acoplados a proteínas Gi que inhiben a la adenilato ciclasa (Marsden, 2006). Estudios in vitro han demostrado que existe una reducción en la concentración de dopamina, sus metabolitos y su re-captación en el estriado de pacientes con EA (Kemppainen, Ruottinen, Någren, & Rinne, 2000).

Storga y colaboradores en 1996 encontraron que existían niveles significativamente bajos de DA, de su precursor (L-DOPA) y de su metabolito (DOPAC) medidos en el giro cingulata, la amígdala, el estriado y el núcleo de raphe en cerebros de pacientes con EA (Storga, Vrecko, Birkmayer, & Reibnegger, 1996).

Además se ha detectado que existe una disminución en los niveles de DA en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA que correlaciona con un puntaje bajo en pruebas de demencia (Tohgi, Ueno, Abe, Takahashi, & Nozaki, 1992).

En cuanto a los receptores para DA, se ha encontrado que existe una disminución en la densidad de receptores tipo D2 que parece estar asociada con un declive en la función cognitiva en algunos pacientes con EA (Kemppainen et al., 2003). Este grupo midió el potencial de unión del receptor D2, a partir del consumo de un agonista específico marcado con un radioligando ( $[^{11}\text{C}]$ FLB 457) y medido por PET y encontró que este disminuyó en un 12-43% en el hipocampo y en las regiones de la corteza temporal en pacientes con EA comparado con controles sanos (Fig. 4), además de que encontraron que existía una correlación entre un menor potencial de unión del receptor al ligando con una menor puntuación en el test de memoria verbal (Wechsler Memory Scale-Revised) (Fig. 5)

TABLE 1. Binding potentials ( $B_{\text{max}}/K_d$ ) in AD patients and controls

	Control (n = 11)	AD (n = 14)	AD/control (%)
Temporal cortex			
R hippocampus	0.90 ± 0.23	0.59 ± 0.33*	66
L hippocampus	0.77 ± 0.23	0.66 ± 0.40	84
R lateral temporal cortex	0.75 ± 0.26	0.66 ± 0.44	88
L lateral temporal cortex	0.81 ± 0.28	0.56 ± 0.24	69
Frontal cortical regions			
Frontal cortex	0.28 ± 0.12	0.25 ± 0.14	89
DLPF cortex	0.43 ± 0.15	0.43 ± 0.15	100
ACC	0.42 ± 0.14	0.38 ± 0.14	90
Thalamus			
Medial	3.11 ± 0.58	2.90 ± 0.59	93
Lateral	1.96 ± 0.36	2.04 ± 0.37	104

Fig 4. La tabla muestra el potencial de unión de los receptores D2, medido como el consumo de  $[^{11}\text{C}]$ FLB 457 en diferentes áreas cerebrales de pacientes con EA comparados con controles sanos. Tomado de (Kemppainen et al., 2003)

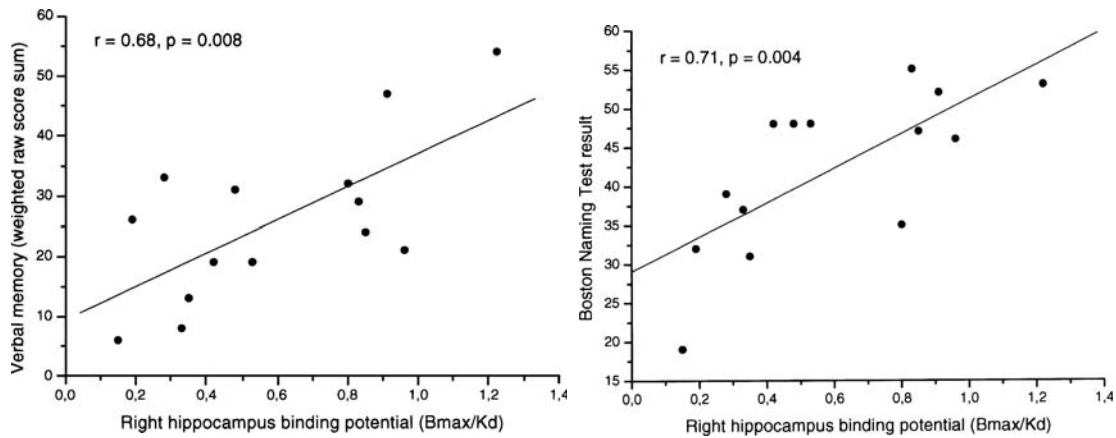


Fig 5. Correlación entre los potenciales de unión en el hipocampo derecho de pacientes con EA y la suma de los puntajes de estos en las pruebas de memoria verbal. Tomado de (Kempainen et al., 2003)

Por otro lado, Cortés y colaboradores compararon cortes de cerebros de personas con diagnóstico de demencia senil tipo Alzheimer (SDAT) con cerebros de personas sin ninguna enfermedad psiquiátrica o neurológica (C) y encontraron que había una disminución en los de tipo D1, principalmente en el hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado). En la figura 6 se muestra la diferencia en la densidad de receptores a DA tipo D1 entre los controles (personas sin enfermedades neurológicas) y pacientes con SDAT medida por la unión de un agonista de D1 marcado ( $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ ) (Roser Cortés, Probst, & Palacios, 1988).

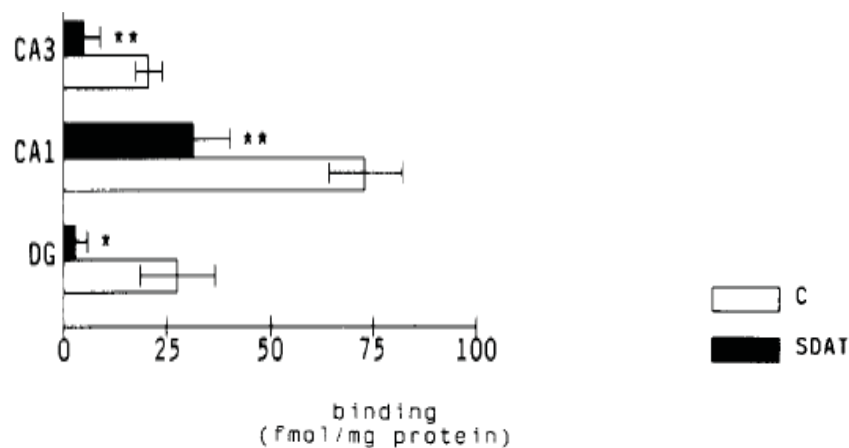


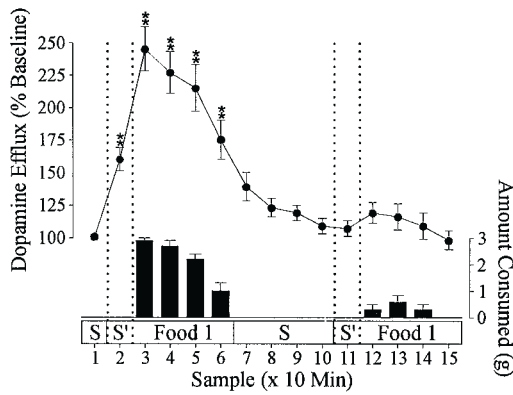
Fig 6. La gráfica muestra la disminución en la densidad de receptores D1 encontrada en el hipocampo de pacientes con SDAT comparados con controles sanos medida como el potencial de unión del ligando ( $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ ) al receptor. Tomado de (R Cortés, Probst, & Palacios, 1988)

La dopamina es un neurotransmisor al cual se le han atribuido diferentes funciones en diferentes regiones cerebrales, entre ellas está la del procesamiento de estímulos nuevos. En este sentido, existe evidencia experimental que ha demostrado que las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (VTA), en el núcleo acumbens (NAC) y en la corteza prefrontal media (MPC) tienen un pico de actividad en respuesta a un estímulo nuevo, que se pierde conforme el estímulo se vuelve familiar (Ahn & Phillips, 1999; Schultz, Apicella, & Ljungberg, 1993).

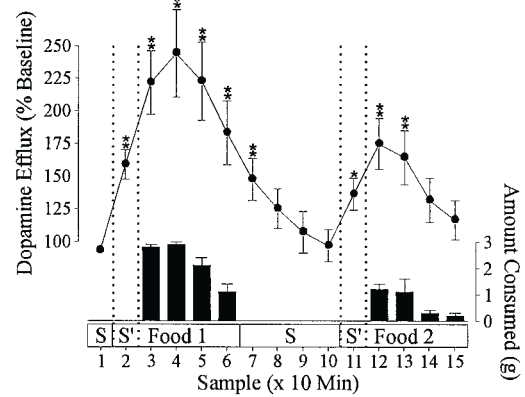
En el experimento se presentaron a ratas privadas de alimento dos comidas diferentes (Different Food Condition) o bien la misma comida en dos ocasiones (Same Food Condition) y se midió la liberación de DA en el NAC y en la MPC por medio de microdiálisis. Los resultados muestran que existe un aumento en la liberación de DA en ambas estructuras cuando los animales prueban por primera vez una comida, y que este aumento se atenúa cuando la comida ya es familiar, sin embargo, si se les presenta una nueva comida, vuelve a ocurrir un aumento de DA (Fig 7) (Ahn & Phillips, 1999). Este patrón ha sido observado ante la presentación de otro tipo de estímulos, por ejemplo, se observó un aumento en la cantidad de DA en el NAC de ratas macho durante la copulación con una hembra, que disminuyó gradualmente y volvió a aumentar cuando se les presentó una hembra nueva (Fiorino, Coury, & Phillips, 1997)

Medial Prefrontal Cortex

A. Same Food Condition

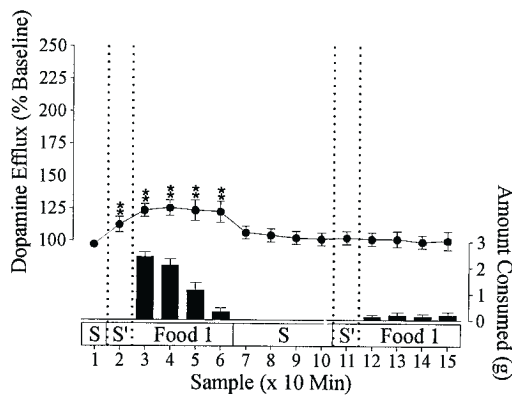


B. Different Food Condition



Nucleus Accumbens

A. Same Food Condition



B. Different Food Condition

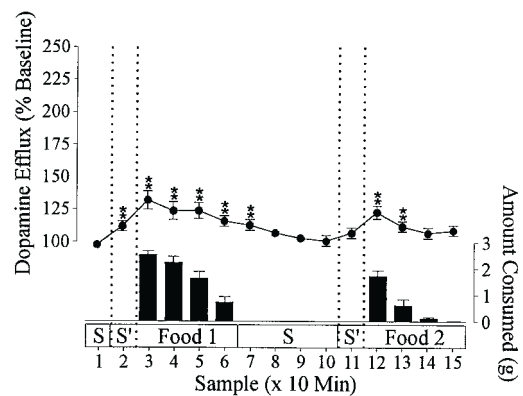


Fig 7. Cambios en la cantidad de DA (gráfica línea) en la MPC y el NAC y de comida consumida (gráfica barras). Tomado de (Ahn & Phillips, 1999).

### Corteza Insular

Durante la enfermedad de Alzheimer, una de las estructuras más afectadas por la acumulación de las placas de A $\beta$  y de ovillos neurofibrilares de tau es la corteza insular (CI) (Bonthius, DJ, 2005); por medio de inmunohistoquímica se reveló, en estudios con 17 cerebros de pacientes con EA, que la corteza insular tenía alto contenido de ovillos

neurofibrilares, confinados principalmente a las capas profundas de la corteza, y las placas de A $\beta$  se encuentran distribuidas en todas las capas celulares (Bonthius, Solodkin, & Van Hoesen, 2005).

La corteza insular (CI) es una región localizada en el centro de cada hemisferio cerebral y procesa estímulos sensoriales en todas sus modalidades: gustativos, olfativos, auditivos, visuales y somatosensoriales (Chen, Li, Xu, & Liu, 2009).

Diferentes trabajos han demostrado ya que la activación de la CI es necesaria para el procesamiento de estímulos gustativos. El bloqueo de la corteza insular, ya sea por medio de antagonistas de algunos receptores (Ferreira, Gutiérrez, De La Cruz, & Bermúdez-Rattoni, 2002; Naor & Dudai, 1996), o bien por la infusión de bloqueadores de síntesis proteica, como la anisomicina (Bermúdez-Rattoni, 2004; Rosenblum, Meiri, & Dudai, 1993), provoca que no se consoliden cierto tipo de memorias, preferencialmente aquellas que involucran el reconocimiento de algún sabor específico, e incluso la asociación de este con un estímulo aversivo (Bures, Fenton, Kaminsky, Wesierska, & Zahalka, 1998).

En 1992, el grupo de Ogawa y posteriormente otros grupos relacionaron cambios eléctricos y el incremento de disparos unitarios de neuronas de la CI ante la presentación de un estímulo gustativo nuevo (Ogawa, Hasegawa, & Murayama, 1992). Además también se ha visto la expresión de genes de expresión temprana, como *c-fos* ante la presentación de un estímulo gustativo novedoso (Bernstein & Koh, 2007).

Miranda y colaboradores observaron por medio de microdiálisis que existe un aumento en la liberación de acetilcolina (ACh) en la corteza insular de ratas cuando se les presenta un sabor nuevo y que esta liberación decreciente conforme el sabor se va convirtiendo en familiar (Miranda, Ramírez-Lugo, & Bermúdez-Rattoni, 2000) (Fig. 8).

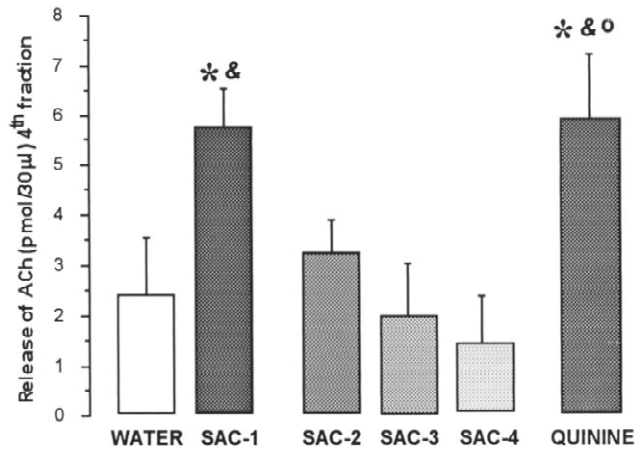


Fig. 8. Liberación de ACh en la CI ante la presentación de un estímulo novedoso. Tomado de (Miranda et al., 2000)

Hay poca información sobre las afectaciones que se presentan en esta estructura cerebral durante el desarrollo de la EA. Algunos trabajos muestran que existe una degeneración del sistema colinérgico en la CI además de otras estructuras (Bartus, Dean III, Beer, & Lippa, 1982) y es por ello que algunos de los fármacos diseñados para el tratamiento de la EA se han enfocado en tratar de revertir esta falla colinérgica, y son en general, inhibidores de la acetilcolinesterasa, la enzima encargada de la degradación de la acetilcolina después de que ha sido liberada en la sinapsis. Sin embargo, trabajos recientes han mostrado que la falla en el sistema colinérgico ocurre en la fase tardía de la EA (DeKosky et al., 2002), además de que se ha probado que la inyección de estos fármacos tiene implicaciones en la liberación de otros neurotransmisores, como dopamina (DA) o noraepinefrina en estructuras como el hipocampo y la corteza prefrontal.

En 2006, Shearman y colaboradores midieron la liberación de DA y la concentración de su metabolito (DOPAC) cuando se administró Donepezil (fármaco inhibidor de la acetilcolinesterasa, utilizado para el tratamiento de los síntomas de la EA) por medio de microdiálisis en el hipocampo, la corteza temporal y la corteza prefrontal y encontraron que había un aumento significativo en la cantidad de ambos en el hipocampo dorsal y una disminución de la DA en la corteza pero aumento en su metabolitos (Fig 9) (Shearman et al., 2006).

Tomando en cuenta estos resultados se ha especulado que la efectividad en el tratamiento de los síntomas tempranos de la EA de estos medicamentos podría estar también relacionada a el efecto sobre la liberación de DA en estos pacientes.

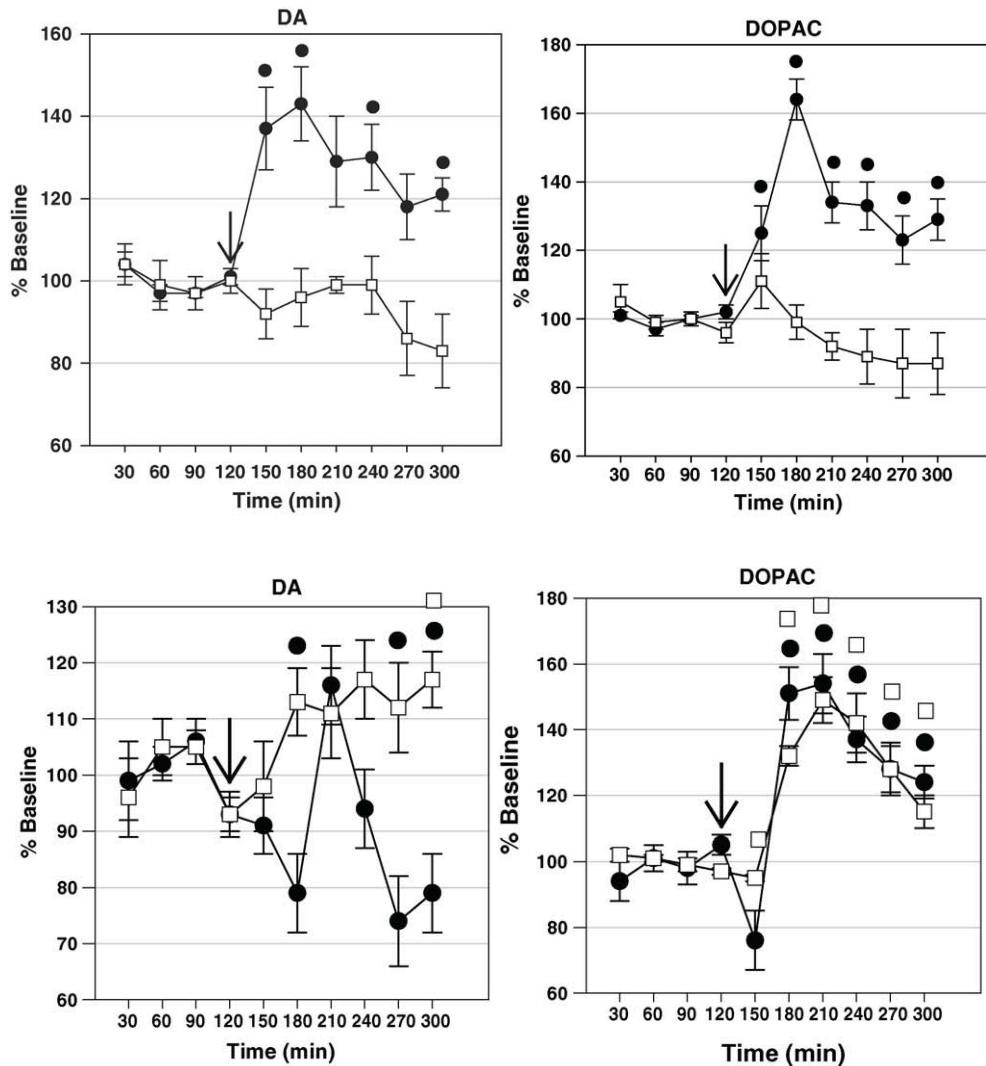


Fig 9. Efecto de la administración de donepezil sobre la concentración de DA y DOPAC en el hipocampo dorsal (●), y ventral (□) (primer par de gráficas) y en la corteza media temporal (●), y la corteza prefrontal (□). Los datos están expresados como porcentaje de cambio con respecto a la línea basal (promedio de los primeros 4 puntos). La flechaintica el momento de la inyección. Tomado de (Shearman et al., 2006).



### **Modelo murino triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer**

Para el estudio de la EA el grupo de LaFerla desarrolló un modelo de ratón triple transgénico (3xTg-AD) (PS1<sup>M146V</sup>, APP<sup>Swe</sup>, tau P301L) (Oddo et al., 2003) en el cual, los depósitos de placas del péptido A $\beta$  y de marañas de tau se desarrollan en estructuras relevantes en la EA humana y además se acumulan a través del tiempo. En estos ratones se comienzan a presentar deficiencias en procesos de memoria y aprendizaje a partir de los 6 meses de edad, asociadas a la acumulación de A $\beta$  intraneuronal, sin que se observen aún a esta edad alteraciones en la estructura de las células neuronales. Mientras la enfermedad progresa, la acumulación de placas y de marañas neurofibrilares provoca cambios estructurales que potencian este déficit cognitivo.

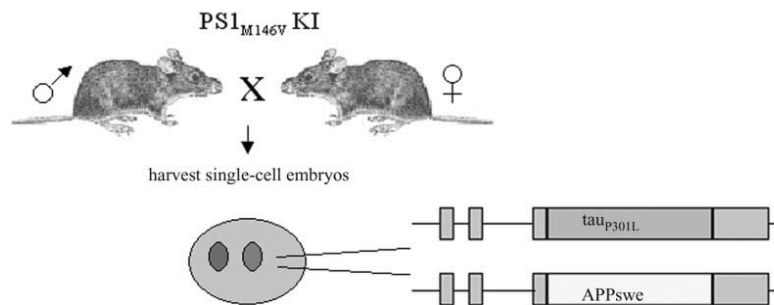


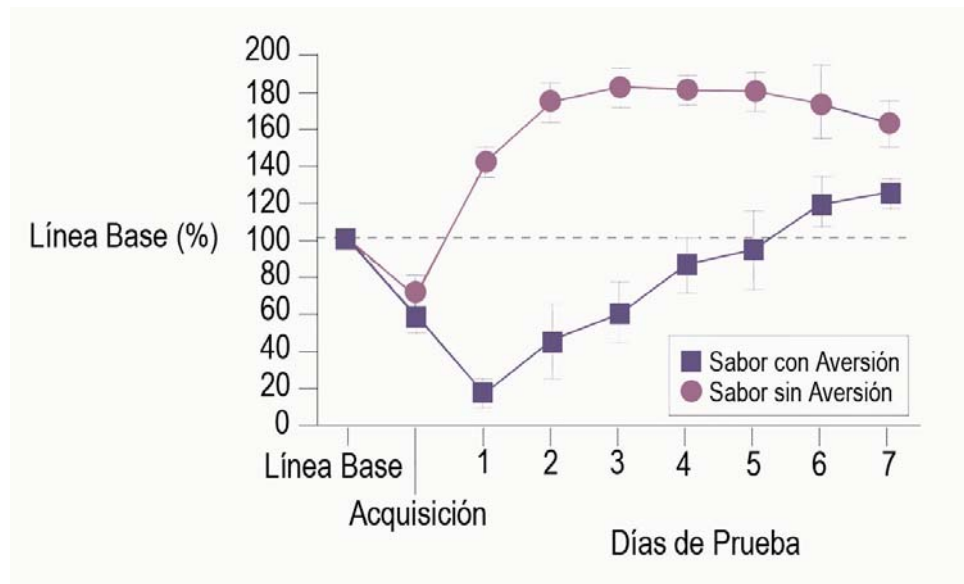
Fig. 10. Esquemización de la construcción del modelo de ratón 3xTg-AD. Tomado de (Oddo et al., 2003)

El modelo se realizó introduciendo directamente dos transgenes humanos (APP<sup>Swe</sup> y tau<sup>P301L</sup>) adicionales a una línea germinal de ratones modificados genéticamente con una mutación en el gen de la presenilina 1 (PS1). Ambos genes insertados bajo el control del elemento regulatorio Thy 1.2, que permite que los genes se expresen solo en el sistema nervioso del ratón (Fig. 10).

El modelo de Oddo y colaboradores es el primer modelo animal que desarrolla ambas fisiopatologías (placas de A $\beta$  y neurofibrillas de Tau) y que además lo hace a través del tiempo. .

### ***Detección y procesamiento de un estímulo nuevo.***

Cuando un animal se enfrenta por primera vez a un sabor, este lo consume con recelo, esta respuesta neofóbica representa un mecanismo de defensa ante la ingesta de comida posiblemente tóxica y se refleja en una baja en el consumo de ese sabor con respecto al consumo normal de agua (neofobia) (Nachman & Jones, 1974). Si este sabor no le provoca ningún malestar, el animal aprenderá que el sabor es seguro, aumentando su consumo hasta llegar a una asíntota, a lo cual se le denomina atenuación de la neofobia (Fig. 11).



*Fig. 11. Consumo de una solución de sacarina 0.25% como sabor seguro (círculos). La primera baja en el consumo respecto a la LB es la neofobia, Tomado de (Bermúdez-Rattoni, 2004)*

Por medio de la técnica de electroforesis capilar acoplada a microdialisis, en el laboratorio en el que se desarrolló el presente trabajo, se demostró que tanto en ratones 3xTg-AD jóvenes (5 meses) como en ratones no transgénicos (WT) las concentraciones de DA en CI aumentan significativamente cuando se presenta un objeto por primera vez; sin embargo cuando se analizó la liberación de DA en ratones 3xTg-AD viejos (10 meses) se encontró que no había un aumento en las concentraciones de este neurotransmisor (Fig. 12).

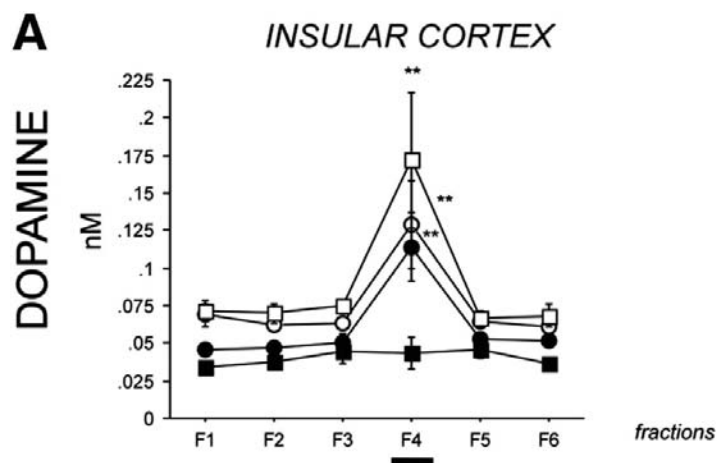


Figura 12. Liberación de DA en la CI de ratones 3xTg-AD jóvenes, viejos y wild type, después de la presentación de un objeto por primera vez. La presentación del estímulo fue realizada en F4 de la gráfica. Tomado de (Guzmán-Ramos et al., 2012)

Además se encontró una correlación entre deficiencia en la liberación de DA con una pobre memoria de reconocimiento (Guzmán-Ramos et al., 2012)

## Planteamiento del problema

Hasta ahora se ha documentado una correlación entre la presentación de un estímulo novedoso y el aumento de DA en CI. La CI se ha asociado principalmente al procesamiento de estímulos gustativos, sin embargo hay poca evidencia del papel que juega la DA en la CI en cuanto a la detección de estímulos gustativos nuevos y si esta se encuentra afectada en algún punto durante el desarrollo de la EA.

También se ha demostrado que existen deficiencias en el sistema dopaminérgico en hipocampo de pacientes con EA, y que estos muestran problemas para realizar tareas espaciales.

## Hipótesis

La liberación de DA en la CI estará disminuida en un modelo 3xTg-AD de ratones viejos y estos mostrarán deficiencias en la detección de un sabor como nuevo. Además si estimulamos los receptores dopaminérgicos post-sinápticos D1 mediante la administración

de un agonista (SKF38393) , los ratones 3xTg-AD viejos podrán recobrar la capacidad de detección de la novedad del estímulo gustativo.

Si se estimulan los receptores dopaminérgicos D1 con el mismo agonista y se prueba a los animales en una tarea dependiente de hipocampo, también se verán mejorías en la ejecución de una tarea asociada a esta estructura.

## **Objetivo General**

Evaluar el efecto de la estimulación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 sobre la detección de un estímulo gustativo novedoso y sobre la ejecución de una tarea de memoria espacial en ratones 3xTg-AD y WT de 6-8 meses y 11-13 meses de edad.

## **Objetivos Particulares**

- Medir mediante electroforesis capilar acoplada a microdiálisis en libre movimiento la liberación de dopamina ante la presentación de un estímulo gustativo novedoso en ratones 3xTg-AD de 11-13 meses de edad comparados con ratones WT de la misma edad.
- Evaluar el efecto de la estimulación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 en la respuesta neofóbica (detección de la novedad del estímulo) mediante la administración del agonista SKF38393 en una dosis de 12mg/kg, vía intraperitoneal en un grupo de animales 3xTg-AD de 6-8 meses de edad comparado con un grupo de animales WT de la misma edad.
- Evaluar el efecto de la estimulación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 en la respuesta neofóbica mediante la administración del agonista SKF38393 en una dosis de 12mg/kg, vía intraperitoneal en un grupo de animales 3xTg-AD de 11-13 meses de edad comparado con un grupo de animales WT de la misma edad.
- Evaluar el efecto de la estimulación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 en una tarea de laberinto acuático de Morris mediante la administración del agonista SKF38393 en una dosis de 12mg/kg, vía intraperitoneal en un grupo de animales 3xTg-AD de 6-8 meses de edad comparado con un grupo de animales WT de la misma edad.

## **Metodología**

### ***Animales***

Se emplearon ratones hembras transgénicas para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD), como animales control se utilizaron ratones hembras no transgénicas (WT), sin modificaciones genéticas de entre 6 y 13 meses de edad, obtenidos y mantenidos en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se colocaron en cajas individuales bajo un ciclo de 12 horas luz/oscuridad con alimento y agua *ad libitum* excepto en los procedimientos experimentales.

### ***Implantación de cánulas guía***

Los animales se montaron en un aparato estereotáxico con un adaptador para ratones y se mantuvieron bajo anestesia con isofluorano (1.25%-2.0%). Para evitar daño en los ojos, se les aplicó una capa fina de lubricante óptico durante la cirugía. Se realizó una insición en la piel para poder tomar medida y alinear bregma y  $\lambda$  en el plano horizontal.

Se implantaron cánulas guía unilaterales (CMA Microdialysis, Stockholm, Sweden) dirigidas a la corteza insular izquierda con coordenadas a partir de Bregma [Anteroposterior (AP) +1.2mm; Mediolateral (L) -4.75 mm; Dorsoventral (DV) -4.5 mm] (Paxinos and Franklin 2007) y se aseguraron con pequeños tornillos y cemento dental.

Se aplicaron antibióticos en la herida y una vez recuperados de la cirugía, los animales se colocaron individualmente en cajas plásticas a temperatura ambiente de 22-24°C y bajo un ciclo 12/12 de luz/oscuridad con agua y comida *ad libitum* excepto durante los procedimientos conductuales.

### ***Microdiálisis en libre movimiento***

Cinco días después de la cirugía, los animales fueron privados de agua por 24 h y colocados en la cámara de microdiálisis (Bioanalytical systems, Inc., E.U.A.) por 3 h durante 5 días

para habituarlos al ambiente y a la manipulación. Se les permitió beber 10ml de agua en botellas graduadas durante 20 minutos al día. Por la tarde, estando los animales en el bioterio, se les dio acceso a otros 20ml más de agua para evitar que se deshidrataran.

La microdiálisis en libre movimiento permite monitorear la liberación extracelular de neurotransmisores en una estructura en particular; el principio de la microdiálisis se basa en la difusión de las moléculas a través de poros de diámetro pequeño en una membrana semipermeable unida a una sonda constituida de dos tubos concéntricos; al tubo de entrada se conecta una bomba de perfusión que infunde líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) fluido cerebroespinal (NaCl 125 mM, KCl 5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O 1.25 mM, MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O 1.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, glucosa 10 mM) éste se equilibra con el fluido en el exterior por difusión en ambas direcciones, así el LCRA recuperado por la tubería de salida contiene los neurotransmisores que lograron atravesar la membrana; de manera que un análisis cuantitativo de las moléculas recolectadas en las fracciones de microdializado refleja su patrón de liberación temporal en el fluido extracelular (Orlowska-Majdak 2004, Ungerstedt 1991).

El día del procedimiento experimental, la sonda de microdiálisis fue perfundida con LCRA filtrado (membrana de filtración de 0.20µm) a una velocidad de 2µl/min con ayuda de una bomba (CMA/100 pump) conectada a través de una tubería de propileno etileno fluorinado para eliminar el glicerol en el cuál se conserva la membrana. Tras verificar la ausencia de burbujas en el sistema, se disminuyó la velocidad de perfusión a 1µl/min y se insertó en el animal la sonda con una membrana de 1-mm (CMA 7 MD Probe; CMA Microdialysis). Se midió la longitud de la tubería de salida para calcular el “volumen muerto” (volumen interno de la tubería x longitud de la tubería x tasa de infusión) que causa un retraso entre el inicio de la respuesta conductual y la fracción microdializada correspondiente.

Se dejó estabilizar el flujo por 1 h y se recolectaron 4 muestras cada 16 minutos en tubos appendorf de 200µl que contenían 1µl de una mezcla de antioxidantes (ácido ascórbico 0.25 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 0.27 mM, ácido acético 0.1 M) y fueron inmediatamente congeladas a -80°C hasta el momento del análisis.

Se colectaron tres fracciones para establecer la línea basal de liberación (LB) después de las cuales se expuso a los animales al estímulo gustativo (Quinina 0.005%). Después se realizó la cuantificación de dopamina por electroforesis capilar acoplada a detección por fluorescencia inducida por laser.

La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica instrumental de separación, la cual permite la identificación y cuantificación de los analitos una vez separados al acoplarse al detector adecuado. La separación en EC se basa en la migración de especies cargadas que se encuentran disueltas o suspendidas en una solución electrolítica dentro de un tubo capilar de diámetro muy pequeño al aplicar un voltaje (Landers 1997). La respuesta a la detección de los compuestos se traduce en un pico dentro de una gráfica llamada electroferograma.

### **SKF-38393**

El SKF38393 (2,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-1 phenyl-1H-3-benzepine) es un agonista dopamiérgico selectivo para receptores D1. Estimula a la adenilato ciclasa lo cual incrementa el flujo de adenosil monofosfato cíclico (cAMP). Muestra mayor afinidad por los receptores que la DA y su efecto se ve antagonizado por el SCH 23390.

La cinética de unión de este con el receptor (medida en el estriado en cortes de cerebro) a concentraciones de 1nM muestra que la asociación del ligando fue completa a los 60 minutos a 22°C (Fig 13) (Dubois, Savasta, Curet, & Scatton, 1986).

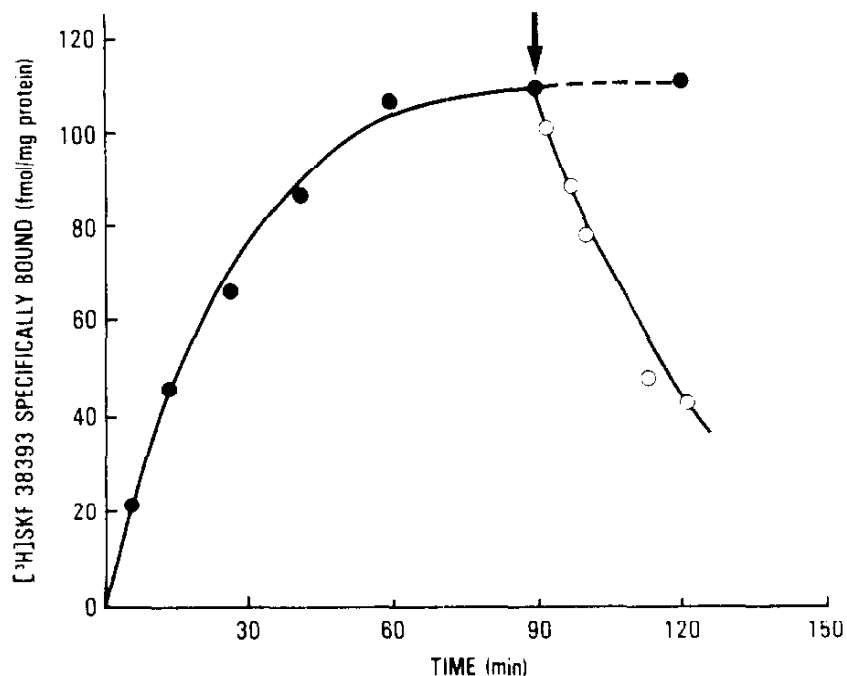


Fig 13. Asociación del [3H]SKF 38393 en cortes del estriado de ratas. Los cortes fueron incubados con 1nM [3H]SKF 38393 a 22°C durante 150 minutos. Cada punto representa la al promedio de determinaciones por triplicado. Tomado de (Dubois et al., 1986)

### **Atenuación de la Neofobia**

Para medir si los animales podían detectar el estímulo gustativo como nuevo, realizamos un protocolo de atenuación de la neofobia que consiste en lo siguiente: Los animales fueron privados de agua por 24 horas y después fueron sometidos a un régimen de consumo en el que se les presentó una probeta graduada con 10 ml de agua durante 20 minutos cada 24 horas durante 7 días consecutivos. De estos 7 días se obtuvo un promedio de consumo, denominado línea base. En el día 7 los animales se separaron aleatoriamente y se clasificaron en su correspondiente grupo (SKF o solución salina).

El día 8 se realizó una sola inyección de SKF o SS dependiendo el grupo y 10 minutos después se les presentó a los animales 10 ml de una solución de quinina 0.05% por 20 min. y se midió el consumo del día. 24 horas después se presentó nuevamente una botella con 10 ml. de quinina 0.05% por 20 minutos. Se realizaron presentaciones en los días subsiguientes hasta alcanzar la asíntota de consumo.



### ***Laberinto Acuático de Morris (WM)***

El WM consiste en un tanque con agua en el cual hay una plataforma sumergida 1cm en el agua y el cuarto en el que se encuentra está rodeado de pistas espaciales. En esta tarea los animales a través de los ensayos, deben aprender por medio de estas pistas espaciales, a llegar a la plataforma para escapar del agua.

Dividimos a los animales en 4 grupos: WT-SS, WT-SKF, 3xTg-AD-SS y 3xTg-AD-SKF y los entrenamos durante cuatro ensayos diarios por tres días. Al inicio del cuarto y quinto días realizamos la inyección del SKF o de SS dependiendo el grupo y continuamos con el entrenamiento durante ambos días. El sexto día se realiza la prueba, que consiste en remover la plataforma y contar el número de cruces que realiza el animal por el cuadrante en el que se encontraba la plataforma.

### ***Genotipificación***

Con el fin de corroborar el genotipo de los animales utilizados, primero se realizó la extracción de ADN, mediante el método de "hot shot". Se cortó un fragmento de la cola del animal, se trituró en tubos eppendorf de 1.5ml con 75µl de buffer de lisis alcalino (250µl de NaOH, 40 µl de EDTA 0.5 M en 100ml de agua desionizada), se incubó durante una hora a 96°C. Posteriormente adicionaron 75µl de buffer de neutralización (Tris HCL 40mM en 100ml de agua desionizada), se mezcló y centrifugó a 12000 rpm durante 2 min a 4°C se tomó el sobrenadante y se almacenó en un ultracongelador a -50°C (Rudbeck y Dissing, 1998).

Después se corrió una PCR convencional para la amplificación del DNA obtenido. Se colocaron 2.5µl de "Coral load" (CL) (buffer de PCR 1x, MgCl<sub>2</sub>, y Glicerina), 0.5µl de dNTP's, 0.125µl de Taq polimerasa, 21.875µl de H<sub>2</sub>O, 1.5µl de la mezcla de los primers APP, Tau y el regulador Thy 12.4 más 3µl del DNA; esto se realizó para la amplificación de los fragmentos APP y Tau.

Para la amplificación de los fragmentos de PS1 se agregó 2.5µl de CL, 0.5 µl de dNTP's, 0.125µl de Taq polimerasa, 21.875µl de H<sub>2</sub>O, 1.5µl de la mezcla de primers (PS1-k13, PS1-k15) y 3µl del DNA extraído. Estos fragmentos amplificados de PS1 se sometieron a un corte por medio de la enzima BstII y el buffer NEB 1x más 20µl del resultado del PCR, se

incubó durante 2 horas a 37°C, al final se obtuvieron dos fragmentos que identificaron la presencia o ausencia de la mutación de PS1.

Por último se separaron los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (37ml de TAE, 0.7g de agarosa). La migración se efectuó en una cámara de Southern Bloth y una fuente de poder a 75V durante una hora. Se cargaron 5µl de marcador de peso molecular, 10µl de muestras obtenidas del PCR y 5 µl de Midori y se capturó la imagen del gel con Midori en un transiluminador UV.

## **Resultados**

### ***Liberación de dopamina en la CI ante la presentación del estímulo gustativo novedoso.***

previamente se había demostrado en nuestro laboratorio que ratones 3xTg-AD de entre 5 y 9 meses de edad no presentan un aumento en la liberación de dopamina en la CI ante la presentación de un estímulo gustativo nuevo a comparación de ratones transgénicos jóvenes (2-5 meses) y WT (Guzmán-Ramos et al. 2007).

Primero quisimos corroborar que este efecto se observara en nuestro grupo de ratones más viejos (entre 11 y 13 meses de edad). Mediante la técnica de electroforesis capilar acoplada a microdialisis, medimos directamente en la CI, la liberación de dopamina en ratones 3xTg-AD y ratones WT ante la presentación de una botella con 10 ml de quinina al 0.05%.

El la figura 14 se grafica la fracción 4 recolectada durante el tiempo en el que los animales bebían el sabor novedoso, y se hace una comparación entre el porcentaje de liberación de dopamina a partir de 3 líneas basales recolectadas antes de la presentación del sabor, de animales 3xTg-AD contra animales WT.

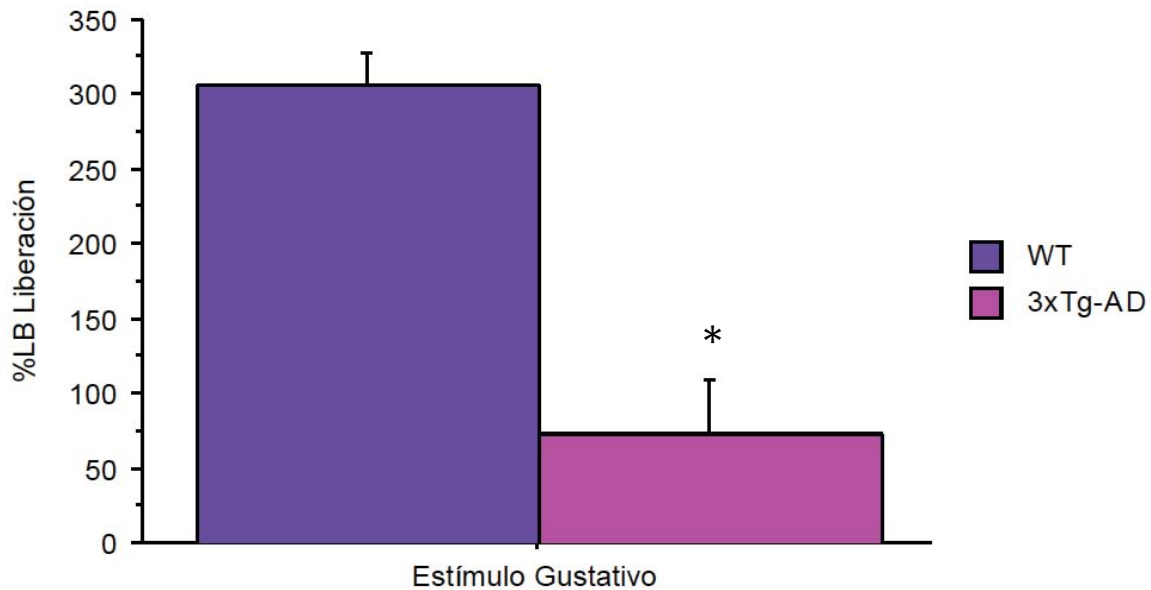


Fig. 14 Porcentaje a partir de la línea basal de liberación de dopamina durante la primera presentación de quinina 0.05% a ratones 3xTg-AD y WT de entre 11 y 13 meses de edad. Existen diferencias significativas (\* $p < 0.05$ ) entre el grupo WT y el 3xTg-AD.

Los resultados muestran que, mientras en los ratones silvestres se observa un aumento de casi un 350% en la liberación de dopamina en la CI cuando el sabor novedoso es presentado, en los animales transgénicos este aumento no se sucede (\* $t=5.6$ ;  $p < 0.05$ ).

Estos resultados indican que los animales 3xTg-AD de más de 5 meses edad muestran una deficiencia en la liberación de dopamina (comparados con animales WT) en la CI cuando se encuentran con un sabor novedoso, y este efecto continúa hasta los 11-13 meses de edad.

### ***Respuesta neofóbica de animales 3xTg-AD comparada con la de animales WT de 6-8 meses de edad.***

Una vez que comprobamos que tanto los ratones de entre 6 y 9 meses y los ratones de entre 11 y 13 meses de edad muestran una deficiencia en la liberación de dopamina en la CI ante la presentación del estímulo gustativo novedoso, probamos a los animales en la tarea atenuación de la neofobia para saber si esta deficiencia en la liberación de dicho neurotransmisor correlacionaba con un déficit en la detección del estímulo novedoso, que de manera conductual se puede observar con la ausencia de neofobia.

En la figura 15 se muestra el consumo en mililitros de una solución de quinina al 0.05% presentada por primera vez tanto a ratones 3xTg-AD como a animales WT de 6-8 meses de edad.

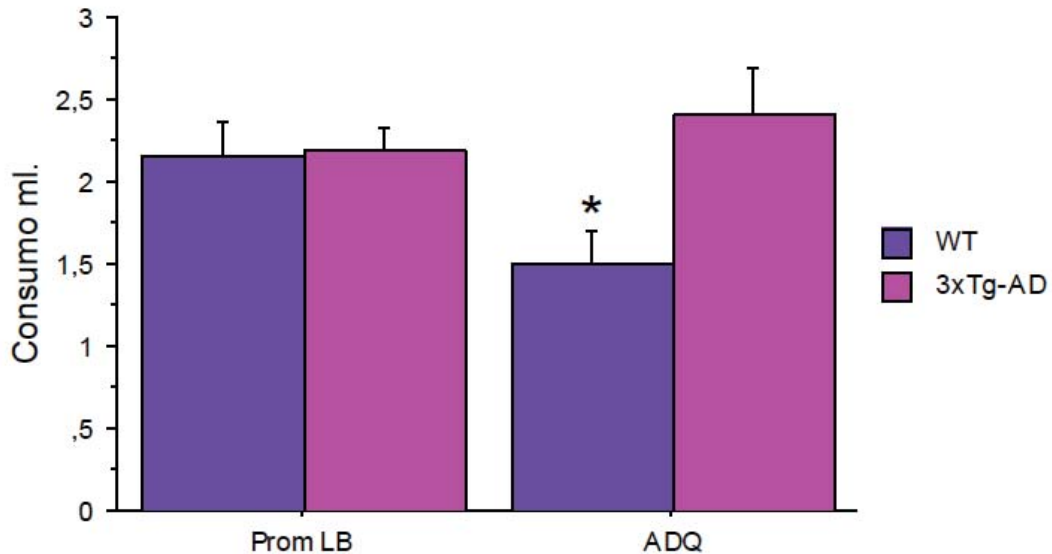


Fig.15 Consumo en ml. de una solución de quinina 0.05% de animales 3xTg-AD y WT de 6-8 meses de edad. Existe una diferencia significativa (\* $p < 0.05$ ) entre los grupos WT y 3xTg-AD el día de la adquisición. Eje: quinina

Como se puede observar, los animales WT tienen una baja en el consumo del sabor por primera vez, mostrando una respuesta neofóbica ante este; en cambio, los animales transgénicos no muestran esta respuesta (\* $t = -2.5$ ;  $p < 0.05$ ).

Con este resultado podemos suponer que debido a que estos animales no tienen un aumento en la liberación de dopamina en la CI cuando se enfrentan a un sabor por primera vez, no existe la señalización de que dicho sabor es novedoso y esto se refleja de manera conductual con la falta de neofobia.

### ***Efecto de la estimulación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 en ratones de 6 a 8 meses de edad.***

Posteriormente realizamos la inyección del fármaco (SKF) o bien de solución salina (SS) a cuatro grupos de ratones (WT-SS, 3xTg-AD-SS, WT-SKF y 3xTg-AD-SKF).

Previamente privados de consumo de líquidos durante 24 hrs, se les presentó una probeta con 10 ml agua, durante 20 minutos por siete días, para obtener un promedio de consumo basal (PROM LB), el octavo día se inyectó SKF38393 (SKF) o solución salina (SS) 10 minutos antes de la presentación de una botella con 10 ml de quinina al 0.05% durante 20 minutos y posteriormente se midió su consumo (ADQ). El consumo en ml se grafica en la figura 16, la flecha indica el momento de la inyección, antes de la primera presentación del sabor, y se muestran 4 presentaciones posteriores del mismo pero sin inyección previa (AN1-4).

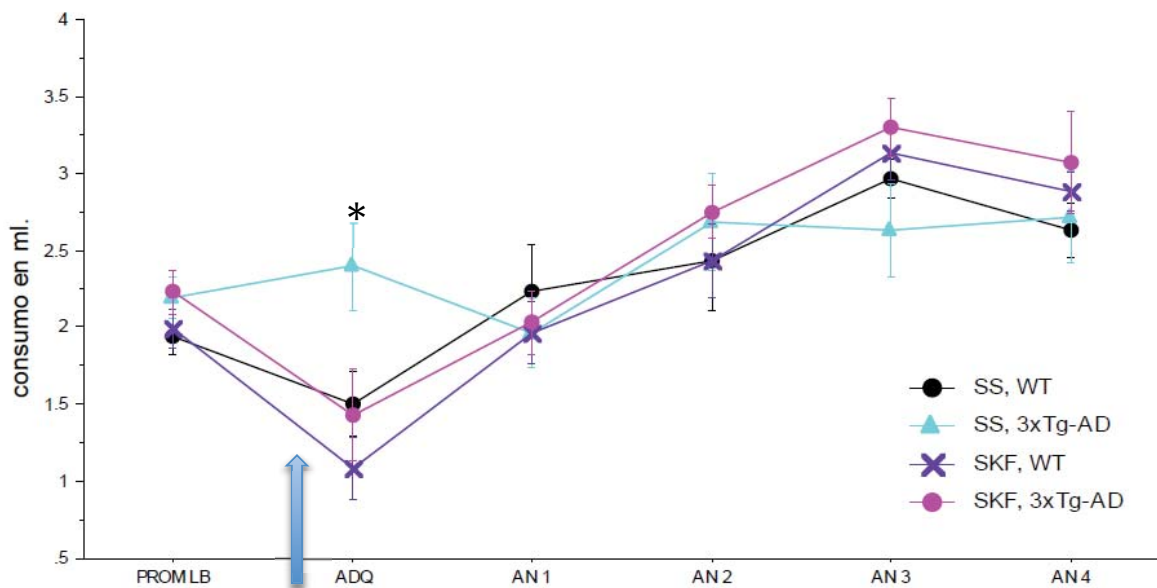


Fig. 16 Efecto de la inyección i.p. de SS o SKF en ratones 3xTg-AD y WT de 6-8 meses de edad. La flecha muestra el momento de la inyección. Existe una diferencia significativa del grupo 3xTg-AD inyectado con SS comparado con los demás grupos (\* $p < 0.05$ ) el día de la adquisición.

El análisis estadístico muestra, en primer lugar, que en los animales WT no existen diferencias entre el grupo inyectado con SS y el inyectado con SKF el día de la adquisición. Ambos grupos muestran un consumo reducido del el sabor nuevo, es decir, tienen neofobia ( $t = 1.7$ ;  $p < 0.05$  y  $t = 3.3$ ;  $p < 0.05$  respectivamente).

Además, se encontró una diferencia significativa el día de la inyección entre el grupo de ratones transgénicos inyectado con SS comparado con los demás grupos (\* $t = -2.5$ ;  $p < .05$ ).

También existe una diferencia significativa en el grupo 3xTg-AD inyectado con SKF el día de la adquisición comparado con su promedio de línea basal ( $t = 2.6$ ;  $p < 0.05$ ) parece entonces,

que la inyección de SKF genera una recuperación de la respuesta neofóbica en los animales transgénicos.

En los días siguientes de atenuación no existen diferencias significativas entre ningún grupo, aunque se observa que el grupo de animales 3xTg-AD inyectados con SKF tiene un comportamiento similar a los grupos de animales WT en cuanto a un aumento en el consumo del sabor llegando a una asíntota de consumo.

### ***Efecto de la estimulación de receptores dopaminérgicos tipo D1 en ratones de 11 a 13 meses de edad.***

Una vez que observamos efecto sobre la neofobia en ratones de 6-8 meses de edad con la estimulación de los receptores a dopamina tipo D1, quisimos probar que sucedía si inyectábamos el mismo fármaco en la misma dosis pero en animales de entre 11 y 13 meses de edad.

En la figura 17 se grafica el consumo del sabor novedoso (quinina 0.05%) en el día de la adquisición en porcentaje de línea basal de consumo. Los resultados se muestran de esta manera debido a que, probablemente por la edad de los ratones en ambos grupos, sus consumos basales de agua fueron bastante desiguales.

Los resultados muestran, en primer lugar, que los animales WT de 11-13 meses de edad inyectados con SS, no muestran una respuesta neofóbica a la quinina, teniendo un consumo de este muy similar al consumo mostrado en la línea basal.

En segundo lugar, y como era esperado, los animales 3xTg-AD inyectados con SS tampoco tienen una respuesta neofóbica en la primera presentación del sabor, consumiendo incluso más de este que su línea basal de agua, aunque no es significativamente distinto del 100% de LB.

Además, los animales transgénicos inyectados con SKF muestran una tendencia a la disminución del consumo en su primer encuentro con el sabor nuevo, sin embargo, no es significativamente diferente de su consumo de LB.

Sorprendentemente, los animales WT que tuvieron la inyección del agonista de receptores dopaminérgicos, muestran una baja considerable en el consumo del sabor, comparado con su consumo de LB (\* $t=-1.73$ ,  $p<.001$ ).

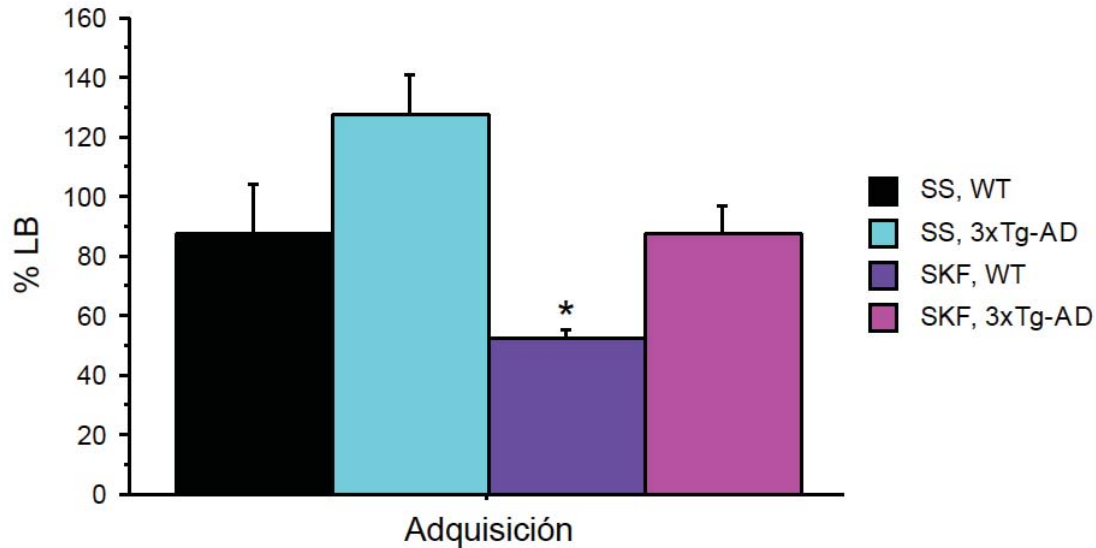


Fig 17. Gráfica que muestra el efecto de la inyección *i.p.* de SS o SKF en ratones 3xTg-AD y WT de 11-13 meses de edad. Los resultados se muestran en porcentaje de línea basal de consumo el día de la primera presentación del sabor novedoso. Existe una diferencia significativa del grupo WT inyectado con SKF comparado con su consumo de LB (\* $p<0.001$ ).

### **Efectos del SKF sobre el consumo de líquido.**

El efecto de la activación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 en animales 3xTg-AD sobre la neofobia parece muy claro, sin embargo, observamos que en los animales WT tanto de 6-8 meses como de 11-13 meses tratados con el agonista dopaminérgico SKF también existía una baja en el consumo y aunque, en el primer grupo de edad, esta no es significativamente diferente de los otros grupos, quisimos descartar que el fármaco estuviese generando ya sea una aversión al sabor o bien un efecto de dependencia de estado (la memoria y la expresión de comportamientos aprendidos por un organismo son, a menudo, disparados por pistas espaciales que semejan aquellas que estaban presentes mientras el aprendizaje inicial ocurrió). En el aprendizaje dependiente de estado, lo que

condiciona a dicho aprendizaje es un compuesto neuroactivo. Una conducta que se aprendió durante la exposición a dicho compuesto (podría tratarse de alguna droga, o algún fármaco), puede ser evocada con mejores resultados si, durante la prueba, el animal está expuesto al mismo compuesto (Bettinger & McIntire, 2004).

En dos grupos de animales transgénicos de 6-8 meses de edad, realizamos un protocolo de AN e inyectamos durante tres días consecutivos el agonista dopaminérgico (SKF, 12mg/kg) o bien solución salina (SS) y 10 minutos después de cada inyección presentamos el sabor novedoso.

En la figura 18 se muestra el consumo en ml de ambos grupos, las flechas señalan los momentos de la inyección del fármaco. Como se puede observar, en la primera inyección ocurre lo que ya habíamos visto en el experimento anterior, los animales a los que se les inyectó SKF tienen una respuesta de neofobia ante la presentación del sabor novedoso (en este caso utilizamos sacarina al 0.3%), que es significativamente diferente tanto de su consumo de línea basal ( $t= 4.35$ ,  $p<0.05$ ) como del consumo de los animales control. Esta respuesta no la muestran los animales inyectados con SS.

En la segunda inyección, que se aplicó 10 minutos antes de la segunda presentación del sabor, se puede observar que ambos grupos tienen tendencia a mostrar una baja en el consumo, que no alcanza a ser significativamente diferente entre ellos ni entre sus consumos del día de la primera inyección; sin embargo, el día de la tercera inyección pareciera que el consumo de los animales inyectados con SKF se recuperara, aunque sigue sin ser estadísticamente diferente de los consumos anteriores.

Estos resultados indican que el fármaco no está generando un efecto de condicionamiento de aversión al sabor, ya que en ninguno de los tres días de inyección encontramos diferencias significativas entre grupos ni entre consumos, es decir, el consumo no disminuye más allá de la neofobia.

Sin embargo también se observa que, mientras los animales se encuentran bajo el efecto del SKF, mantienen un consumo parecido durante los tres días de inyección, y aunque no es diferente del consumo que muestran los animales inyectados con SS, tampoco se atenúa el sabor en esos días. El día de la prueba, en el que no se estimulan los receptores



dopaminérgicos D1 con el fármaco, el consumo aumenta, lo cual podría estar indicando que, por si mismo el SKF está generando disminución del consumo o bien que nos encontramos ante un aprendizaje dependiente de estado.

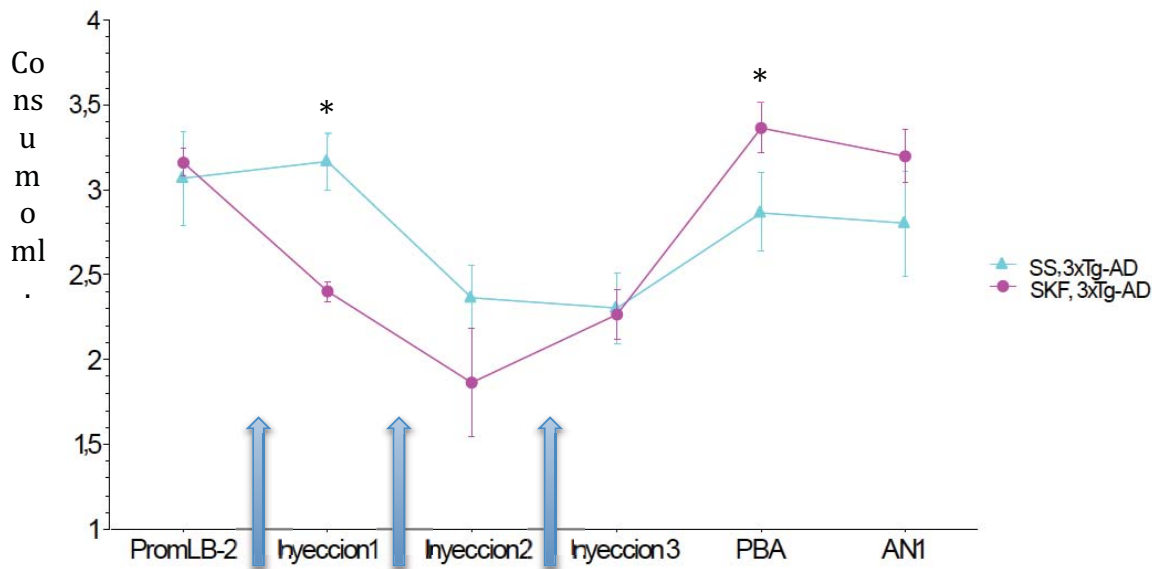


Fig 18. Gráfica que muestra el efecto de la inyección de SKF o SS durante tres días consecutivos en ratones 3xTg-AD de 6-8 meses de edad. Las flechas muestran los momentos de la inyección. El día de la primera inyección existe una diferencia significativa entre los grupos (\* $t=4.35$ ,  $p<0.05$ ) y el día de la prueba hay una diferencia significativa entre el consumo del día anterior (Inyección 3) y el consumo en la PBA en el grupo inyectado con SKF ( $t= -4.83$ ,  $p<0.05$ ). Tiene relevancia la diferencia que se observa entre los dos primeros puntos rosas?

### **Efecto de la estimulación de receptores dopaminérgicos tipo D1 en una tarea de memoria espacial.**

Por último, probamos a los animales de 6-8 meses de edad en una tarea de laberinto acuático de morris (WM).

Realizamos cuatro ensayos diarios durante tres días, al inicio del cuarto y quinto días realizamos la inyección del fármaco o de la solución vehículo y continuamos con el

entrenamiento. El día seis realizamos la prueba, en la cual se retira la plataforma y se mide el tiempo que tardan los animales en llegar a donde se encontraba esta.

Los resultados muestran que los ratones WT, tanto el grupo inyectado con SS como el grupo inyectado con SKF adquieren bien la tarea, ya que, a medida que pasan los ensayos, tardan menos tiempo en alcanzar la plataforma.

El grupo de animales transgénicos inyectado con SS no aprenden la tarea ya que no disminuye el tiempo que tardan en llegar a la plataforma con el paso de los días de ensayos y muestran además un comportamiento que se podría describir como azaroso (\* $t=-1.88$ ,  $p<0.05$  para el día 4, \* $t=-1.57$ ,  $p<0.05$  para el día 5); sin embargo, cuando se estimulan los receptores dopaminérgicos por medio de la inyección del SKF, los animales transgénicos se comportan más similarmente a los animales WT, y aprenden la tarea, mostrando un mejor desempeño a través de los ensayos y en el día de la prueba.

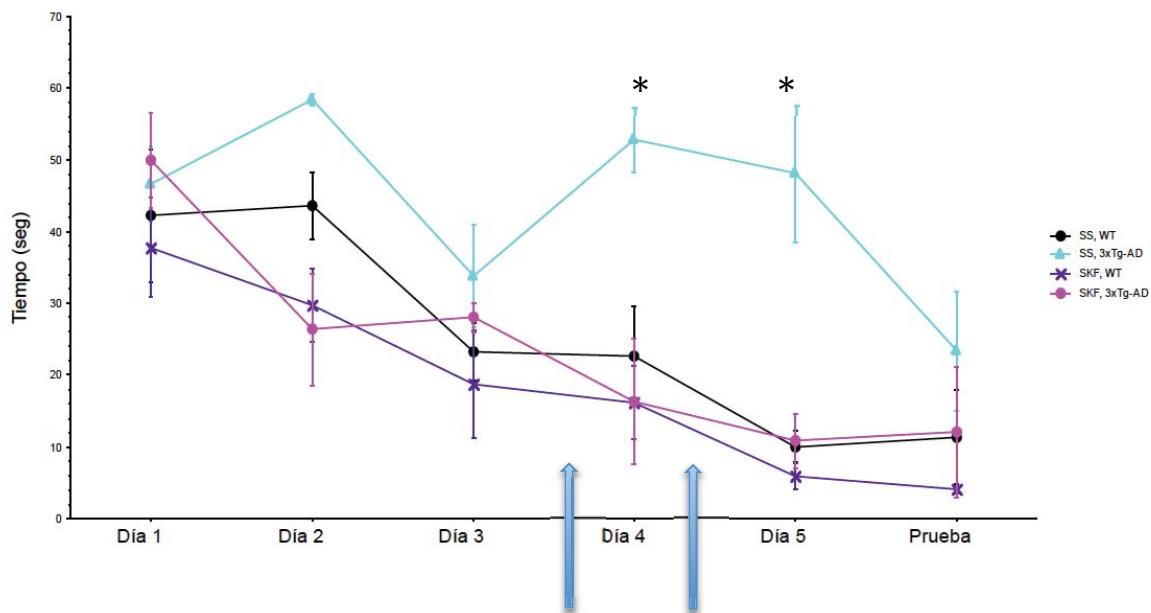


Fig. 19. Efecto de la inyección de SKF o SS a ratones 3xTg-AD o WT de 6-8 meses de edad sobre la memoria espacial. Los datos se grafican como el tiempo en segundos que tardan los animales en llegar a la plataforma.

Las flechas indican el momento de la inyección de los fármacos (\* $p<0.05$ ).

## Discusión

La mayoría de los trabajos dedicados a la EA están enfocados en explicarla a partir de las neuropatologías características de esta, ya sea por causa o efecto tanto de la acumulación de  $\beta$ -amiloide como de tau hiperfosforilada. Sin embargo se ha comenzado a acumular evidencia que indica que existen otros eventos neuronales que podrían estar afectando de alguna manera la misma acumulación de dichas proteínas o bien que aportan a la degeneración del sistema nervioso durante la EA.

Uno de esos eventos tiene que ver con fallas en algunos sistemas de neurotransmisión. En el caso de la dopamina, se ha encontrado en estudios postmortem que, en pacientes con la enfermedad existe una reducción importante en los niveles de su precursor (L-DOPA), de su metabolito DOPAC, así como en los niveles de dopamina, esto en el giro cingulata, en la amígdala, el estriado y en el núcleo de raphe (Storga et al., 1996). Además estos bajos niveles han podido ser medidos directamente el líquido cefaloraquídeo (Tohgi et al., 1992) y en orina en pacientes con la enfermedad (Liu, Yang, Chang, Liu, & Chi, 1991).

Nosotros contamos con un modelo murino triple transgénico (3xTg-AD) que desarrolla ambas patologías a través del tiempo, muy similarmente a los casos de EA humana familiar. No se cuenta con mucha información sobre otros aspectos del modelo, por ejemplo, qué sucede con los sistemas de neurotransmisión y si existe una correlación entre el déficit cognitivo que se observa en estos animales a partir de los 5 meses de edad, y otras fallas del SNC además de la acumulación de las proteínas características.

Por medio de este trabajo pudimos primero corroborar que, animales de más de 6 meses de edad ya muestran un déficit en la liberación de DA en la CI, que continúa hasta los 13 meses que fue nuestro grupo más viejo analizado. Además encontramos que ambos grupos muestran problemas para la detección de un estímulo gustativo novedoso medido a través de la falta de baja en el consumo de este (neofobia).

Podríamos hablar entonces de que existe una correlación entre la falta de liberación de DA en la CI con el déficit de detección de un estímulo gustativo novedoso.

Ya antes se había hablado de una correlación entre la deficiencia del sistema dopaminérgico y los problemas para detectar un objeto novedoso en una tarea de

reconocimiento de objetos en los animales 3xTg-AD (Guzmán-Ramos et al., 2012). Nosotros demostramos que los animales también tienen esta falta de detección de un estímulo gustativo nuevo.

Para tratar de revertir esta falla en la detección de la novedad en un estímulo, decidimos activar los receptores dopaminérgicos D1 por medio de la inyección intraperitoneal de un agonista selectivo para dichos receptores (SKF 38393) en una dosis de 12 mg/kg de peso del ratón. Utilizamos al agonista de D1 debido a que resultados previos del laboratorio en el que se desarrolló este trabajo muestran que dichos receptores son importantes para la codificación una memoria gustativa, específicamente en la CI, y que ratas inyectadas con un antagonista de receptores dopaminérgicos D1 (SCH23390) mostraban un déficit en la consolidación de una memoria de aversión a un sabor (Fig 20) (Guzmán-Ramos & Bermúdez-Rattoni, 2011).

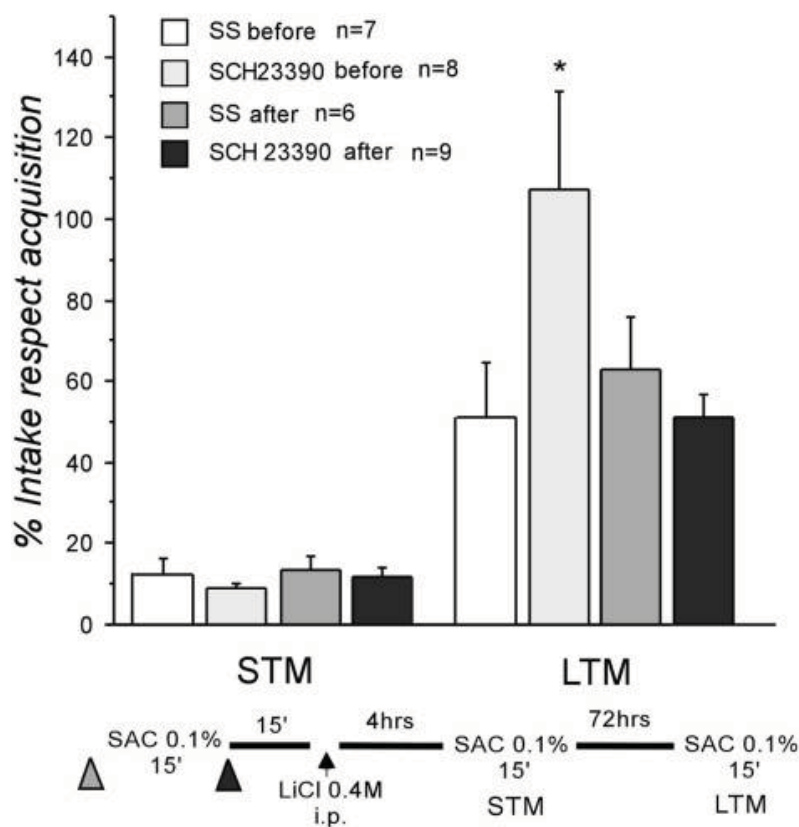


Fig 20. Efectos de la infusión intracortical de un antagonista (SCH23390) en la memoria de corto plazo y de largo (STM y LTM) El grupo "SCH23390 antes" y un grupo control que recibieron inyecciones de solución salina (SS antes) se inyectaron 15 minutos antes del entrenamiento en el condicionamiento de aversión al sabor, seguido de la inyección i.p. de LiCl (0.4 M, 7.5 mL/kg). Los grupos "SCH 23390 después" and SS después

*recibieron las inyecciones inmediatamente después de la presentación de sacarina (triángulo negro). Todos los grupos muestran aversión en la STM, mientras que en la LTM solo el grupo inyectado con el antagonista D1 tiene déficit en la consolidación de la tarea. El consumo de sacarina durante las pruebas de memoria se expresa como porcentaje del consumo durante la fase de adquisición  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ .*

Más importante aún, se encontró que un tratamiento con apomorfina (agonista no selectivo de receptores dopaminérgicos) durante una semana a ratones 3xTg-AD de 6 meses de edad, mejoraba la ejecución de una tarea espacial, además de que promovía la disminución del estrés oxidativo, de marcadores de apoptosis y la disminución de las placas de  $\beta$ -amiloide y de los ovillos de tau, esto último visto in vitro (Himeno et al., 2011).

Cuando estimulamos el sistema dopaminérgico mediante la inyección intraperitoneal de un agonista de receptores D1 en animales que ya muestran un déficit en la liberación de DA y los enfrentamos a un sabor nuevo, observamos que existe una disminución en el consumo de este sabor, lo que podría indicar que, hasta cierto punto, existe un rescate de la detección del sabor y de su codificación como un sabor novedoso. Esto se observa claramente en nuestro grupo de 6-8 meses de edad, en donde encontramos diferencias significativas contra los animales WT y los 3xTg-AD inyectados con SS. En el grupo de 11-13 meses de edad, no se alcanzan a ver diferencias significativas, sin embargo podríamos hablar de que existe una tendencia hacia dicho resultado, aunque podría ser ya muy tarde en el avance de la enfermedad para poder observar un cambio significativo.

Se ha encontrado que los pacientes con la EA muestran una reducción significativa en el número de receptores D1 y D2 a dopamina en el estriado (Kemppainen et al., 2000) y particularmente de tipo D1 en el núcleo acumbens, que correlaciona con un declive cognitivo en pacientes con la enfermedad de Parkinson (Mattila et al., n.d.).

Existen, en cambio, otros trabajos en los que se mide la cantidad de receptores dopaminérgicos en tejido cerebral de pacientes con Alzheimer, y muestran que no existe un cambio en cuanto a la cantidad de receptores que se localizan en estas células (Fig. 20-A) sin embargo, al medir la afinidad de estos receptores, los tejidos de pacientes con

Alzheimer resultaron con mayor afinidad a su sustrato que los de pacientes control (Fig. 20-B) (Sweet et al., 2001). Entonces es posible que las diferencias encontradas entre los ratones 3xTg-AD viejos y los WT se deban no a una mayor cantidad de receptores activados si no a un aumento en la afinidad de los receptores pre-existentes en la post-sinapsis.

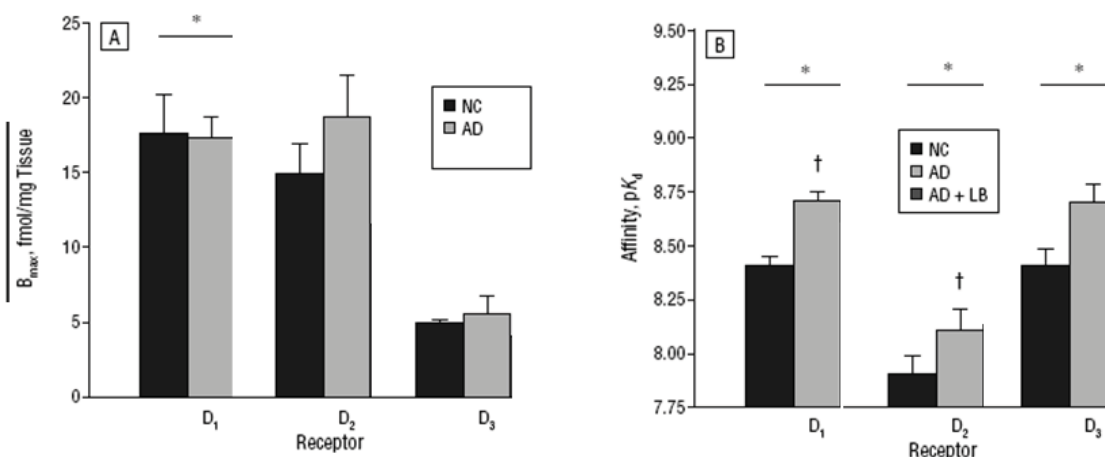


Fig 20. Afinidad de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> a su sustrato, en células nerviosas de pacientes con la EA. Que es NC, AD, LB?

En 2011 se realizó un trabajo en el cual inyectaban el péptido β-amiloide en rebanadas de cerebro de ratón y observaban que estas tenían deficiencias para formar LTP (potenciación a largo plazo), después estimulaban a los receptores D<sub>1</sub> y eran capaces de recuperar el LTP en estas rebanadas, y esto lo correlacionaban con la disminución de las placas formadas por β-amiloide debido a la actividad de la vía activada por medio de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> (Jurgensen et al., 2011).

Probablemente el rescate de la respuesta neofóbica y la mejoría en la ejecución de la tarea de water maze que se observó en nuestros ratones transgénicos viejos sea debido a que, al estimular los receptores D<sub>1</sub>, que de por sí se encuentran disminuidos en estos animales, haya una disminución en las placas ya formadas, y si es así, este rescate del aprendizaje podría ser visto también en otro tipo de tareas.

Esto indica que por medio de la estimulación del sistema dopaminérgico, los ratones con la histopatología característica de la EA muestran mejorías tanto durante el reconocimiento de un sabor como en tareas espaciales.

## Bibliografía

- Ahn, S., & Phillips, A. G. (1999). Dopaminergic correlates of sensory-specific satiety in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of the rat. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(19), RC29.
- Albert, M. S. (1996). Cognitive and neurobiologic markers of early Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(24), 13547–13551. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13547>
- Avila, J., Perez, M., Lucas, J., Gomez-Ramos, A., Maria, I., Moreno, F., ... Hernandez, F. (2004). Assembly In Vitro of Tau Protein and its Implications in Alzheimers Disease. *Current Alzheimer Research*, *1*(2), 97–101. <https://doi.org/10.2174/1567205043332207>
- Bartus, R. T., Dean III, R. L., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction. *Science*, *217*.
- Benilova, I., Karran, E., & De Strooper, B. (2012). The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nature Neuroscience*, *15*(3), 349–357. <https://doi.org/10.1038/nn.3028>
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(3), 209–217. <https://doi.org/10.1038/nrn1344>
- Bernstein, I. L., & Koh, M. T. (2007). Molecular Signaling during Taste Aversion Learning. *Chemical Senses*, *32*(1), 99–103. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjj032>
- Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2005). Intraneuronal A $\beta$  Causes the Onset of Early Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice. *Neuron*, *45*(5), 675–688. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.040>
- Bonthuis, D. J., Solodkin, A., & Van Hoesen, G. W. (2005). Pathology of the insular cortex in Alzheimer disease depends on cortical architecture. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *64*(10), 910–22.
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, *82*(4), 239–259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Bures, J., Fenton, A. ., Kaminsky, Y., Wesierska, M., & Zahalka, A. (1998). Rodent navigation after dissociation of the allocentric and idiothetic representations of space. *Neuropharmacology*, *37*(4), 689–699. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(98\)00031-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(98)00031-8)
- Chen, S., Li, L., Xu, B., & Liu, J. (2009). Insular cortex involvement in declarative memory deficits in patients with post-traumatic stress disorder. *BMC Psychiatry*, *9*, 39. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-9-39>
- Cortés, R., Probst, A., & Palacios, J. (1988). Decreased densities of dopamine D1 receptors in the putamen and hippocampus in senile dementia of the Alzheimer type. *Brain*

- Research*, 475(1), 164–167. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90212-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90212-0)
- Cortés, R., Probst, A., & Palacios, J. M. (1988). Decreased densities of dopamine D1 receptors in the putamen and hippocampus in senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Research*, 475(1), 164–7.
- DeKosky, S. T., Ikonovic, M. D., Styren, S. D., Beckett, L., Wisniewski, S., Bennett, D. A., ... Mufson, E. J. (2002). Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 51(2), 145–55.
- Dubois, A., Savasta, M., Curet, O., & Scatton, B. (1986). Autoradiographic distribution of the D1 agonist [3H]SKF 38393, in the rat brain and spinal cord. Comparison with the distribution of D2 dopamine receptors. *Neuroscience*, 19(1), 125–137. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90010-2)
- Ferreira, G., Gutiérrez, R., De La Cruz, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (2002). Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *The European Journal of Neuroscience*, 16(6), 1139–45.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., ... Alzheimer's Disease International, A. D. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet (London, England)*, 366(9503), 2112–7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67889-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67889-0)
- Fiorino, D. F., Cury, A., & Phillips, A. G. (1997). Dynamic changes in nucleus accumbens dopamine efflux during the Coolidge effect in male rats. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(12), 4849–55.
- Guzmán-Ramos, K., & Bermúdez-Rattoni, F. (2011). Post-learning molecular reactivation underlies taste memory consolidation. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5, 79. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00079>
- Guzmán-Ramos, K., Moreno-Castilla, P., Castro-Cruz, M., McGaugh, 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 (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 19(10), 453–60. <https://doi.org/10.1101/lm.026070.112>
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Himeno, E., Ohyagi, Y., Ma, L., Nakamura, N., Miyoshi, K., Sakae, N., ... Kira, J. I. (2011). Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid-?? degradation. *Annals of Neurology*, 69(2), 248–256. <https://doi.org/10.1002/ana.22319>
- Jurgensen, S., Antonio, L. L., Mussi, G. E. A., Brito-Moreira, J., Bomfim, T. R., De Felice, F. G., ... Ferreira, S. T. (2011). Activation of D1/D5 Dopamine Receptors Protects Neurons from Synapse Dysfunction Induced by Amyloid- Oligomers. *Journal of*



- Biological Chemistry*, 286(5), 3270–3276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.177790>
- Kemppainen, N., Laine, M., Laakso, M. P., Kaasinen, V., N?gren, K., Vahlberg, T., ... Rinne, J. O. (2003). Hippocampal dopamine D2 receptors correlate with memory functions in Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, 18(1), 149–154. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02716.x>
- Kemppainen, N., Ruottinen, H., N?gren, K., & Rinne, J. O. (2000). PET shows that striatal dopamine D1 and D2 receptors are differentially affected in AD. *Neurology*, 55(2), 205–9.
- Liu, H. C., Yang, J. C., Chang, Y. F., Liu, T. Y., & Chi, C. W. (1991). Analysis of monoamines in the cerebrospinal fluid of Chinese patients with Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 640, 215–8.
- Mattila, P. M., R?ytt? M., L?nnberg, P., Marjam?ki, P., Helenius, H., & Rinne, J. O. (n.d.). Choline acetyltransferase activity and striatal dopamine receptors in Parkinson's disease in relation to cognitive impairment. *Acta Neuropathologica*, 102(2), 160–166. <https://doi.org/10.1007/s004010100372>
- Maurer, K., Maurer, U., & Ruiz Ezquerro, J. J. (2006). *Alzheimer : la vida de un m?dico. La historia de una enfermedad*. D?az de Santos.
- Miranda, M. I., Ram?rez-Lugo, L., & Berm?dez-Rattoni, F. (2000). Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Research*, 882(1–2), 230–5.
- Nachman, M., & Jones, D. R. (1974). Learned taste aversions over long delays in rats: The role of learned safety. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 86(5), 949–956. <https://doi.org/10.1037/h0036409>
- Naor, C., & Dudai, Y. (1996). Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behavioural Brain Research*, 79(1), 61–67. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(95\)00262-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(95)00262-6)
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., ... LaFerla, F. M. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron*, 39(3), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- Ogawa, H., Hasegawa, K., & Murayama, N. (1992). Difference in taste quality coding between two cortical taste areas, granular and dysgranular insular areas, in rats. *Experimental Brain Research*, 91(3), 415–24.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H. A., & Herms, J. (2006). Synapse Formation and Function Is Modulated by the Amyloid Precursor Protein. *Journal of Neuroscience*, 26(27).
- Riley, M. (2014). The art of Alois Alzheimer and Gaetano Perusini | Becker Medical Library. Retrieved April 7, 2017, from <https://becker.wustl.edu/about/news/art-alois-alzheimer>
- Rosenblum, K., Meiri, N., & Dudai, Y. (1993). Taste memory: The role of protein synthesis

- in gustatory cortex. *Behavioral and Neural Biology*, 59(1), 49–56.  
[https://doi.org/10.1016/0163-1047\(93\)91145-D](https://doi.org/10.1016/0163-1047(93)91145-D)
- Schultz, W., Apicella, P., & Ljungberg, T. (1993). Responses of Monkey Dopamine Neurons to Reward and Conditioned Stimuli during Successive Steps of Learning a Delayed Response Task. *The Journal of Neuroscience*, 13(3), 900–913.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews*, 81(2), 741–66.
- Shearman, E., Rossi, S., Szasz, B., Juranyi, Z., Fallon, S., Pomara, N., ... Lajtha, A. (2006). Changes in cerebral neurotransmitters and metabolites induced by acute donepezil and memantine administrations: A microdialysis study. *Brain Research Bulletin*, 69(2), 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.12.001>
- Small, D. H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., & Masters, C. L. (1994). A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(4), 2117–27.
- Storga, D., Vrecko, K., Birkmayer, J. G. D., & Reibnegger, G. (1996). Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients. *Neuroscience Letters*, 203(1), 29–32. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12256-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12256-7)
- Sweet, R. A., Hamilton, R. L., Healy, M. T., Wisniewski, S. R., Hentleff, R., Pollock, B. G., ... DeKosky, S. T. (2001). Alterations of Striatal Dopamine Receptor Binding in Alzheimer Disease Are Associated With Lewy Body Pathology and Antemortem Psychosis. *Archives of Neurology*, 58(3), 561–569.  
<https://doi.org/10.1001/archneur.58.3.466>
- Tian, H., Davidowitz, E., Lopez, P., Emadi, S., Moe, J., & Sierks, M. (2013). Trimeric Tau Is Toxic to Human Neuronal Cells at Low Nanomolar Concentrations. *International Journal of Cell Biology*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/260787>
- Tohgi, H., Ueno, M., Abe, T., Takahashi, S., & Nozaki, Y. (1992). Concentration of monoamines and their metabolites in the cerebrospinal fluid from patients with senile dementia of the Alzheimer type and vascular dementia of the Binswanger type. *Journal of Neural Transmission - Parkinson's Disease and Dementia Section*, 4(1), 69–77. <https://doi.org/10.1007/BF02257623>
- Trillo, L., Das, D., Hsieh, W., Medina, B., Moghadam, S., Lin, B., ... Salehi, A. (2013). Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. Translating basic science into clinical care. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(8), 1363–1379. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.05.008>
- Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2004). Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 44(1), 181–193.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.010>
- Wolfe, M. S., Selkoe, D. J., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., & Kimberly, W. T.

(1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*, 398(6727), 513–517. <https://doi.org/10.1038/19077>

Young-Pearse, T. L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J. B., LoTurco, J. J., & Selkoe, D. J. (2007). A Critical Function for  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in Neuronal Migration Revealed by In Utero RNA Interference. *Journal of Neuroscience*, 27(52).

Ziegler-Graham, K., Brookmeyer, R., Johnson, E., & Arrighi, H. M. (2008). Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer's disease incidence rates. *Alzheimer's & Dementia*, 4(5), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2008.05.2479>