



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

"Efecto de la estimulación catecolaminérgica en las alteraciones cognitivas y en la acumulación de beta-amiloide en modelos de la Enfermedad de Alzheimer"

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Velázquez Delgado Cintia

Dr. Federico Bermúdez Rattoni
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Dra. Goar Gevorkian Markosian
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Ciudad de México. Abril, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Le agradezco al Dr. Federico Bermúdez por haberme abierto las puertas de su laboratorio y brindarme asesoría y experiencia durante mi maestría, así mismo por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo como Ayudante de Investigador del Sistema nacional de Investigadores (SNI) nivel III.

A mi comité tutorial, la Dra. Clorinda Arias y la Dra. Gohar Gevorgyan por su valiosa labor en la revisión de mi proyecto durante toda la maestría.

A la Dra. Perla Moreno, que me ofreció su apoyo académico y técnico, por siempre aconsejarme y ayudarme a dirigir este proyecto.

Al técnico académico Dr. Luis Durán por el apoyo que me brindó durante el proyecto. A la Dra. Kioko Guzmán por su paciente apoyo académico y técnico.

A todos mis profesores del Posgrado de Ciencias Bioquímicas que aportaron mucho a mi conocimiento y a mi formación.

A mis padres, mi hermano, mi abuela y toda mi familia que siempre me han brindado el apoyo y amor necesario para que pudiera alcanzar mis sueños.

A todo el equipo del Laboratorio BL-201, en especial, Mildred, Donovan, Lucía, Eduardo, Lorelei, y Andrés por todo el apoyo técnico y amistad que me ofrecieron, gracias al cual pude concluir este proyecto.

A Inés y su familia por abrirme las puertas de su hogar y por su apoyo desde el momento en que las conocí.

A mis amigos Magali, Monse, Ana Laura, Elena, Gaby, Adri, Mitzi, Aby, Ulises, Sergio, Iván, Itzel y Erika que sin duda siempre me han ofrecido su amistad a lo largo de todos estos años y con quien siempre comparto mis logros. A Ismael que siempre me ofreció su apoyo y amor durante este tiempo.

Abreviaturas

A β	Beta amiloide
APP	Proteína precursora de amiloide
CA1	Cuerno de Amón 1
EA	Enfermedad de Alzheimer
FDG	Fluorodesoxiglucosa
fMRI	Imagenología por resonancia magnética nuclear funcional
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GSK3 β	Cinasa 3- β sintasa glucógeno
IE	Índice de exploración
LTP	Potenciación a largo plazo
MAO-B	Monoamino-oxidasa
MWM	Laberinto acuático de Morris
OLM	Memoria de Localización de Objetos
ORM	Memoria de Reconocimiento de objetos
PHFs	Filamentos helicoidales pareados de p-tau hiperfosforilada
PSN1/2	Presenilina 1/2
RIP	Proteólisis intramembranal regulada
TH	Tirosina Hidroxilasa
TTE	Tiempo total de exploración

Contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Enfermedad de Alzheimer	3
Enfermedad de Alzheimer Familiar y Esporádica	3
<i>Diagnóstico</i>	4
<i>Tratamiento para la Enfermedad de Alzheimer</i>	5
<i>Proteína Tau</i>	5
<i>Péptido Aβ</i>	6
Hipótesis de la cascada amiloide	8
Modelos animales para la Enfermedad de Alzheimer(EA)	9
Ambientes Enriquecidos en modelos de la Enfermedad de Alzheimer (EA)	10
Reserva cognitiva y la enfermedad de Alzheimer	13
El sistema Catecolaminérgico y la Enfermedad de Alzheimer	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
DISEÑO EXPERIMENTAL	20
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	20
EXPERIMENTO I	21
Cirugía estereotáxica	22
Laberinto Acuático de Morris (MWM)	22
<i>Equipo</i>	23
<i>Entrenamiento</i>	23
Cuantificación de terminales de TH+	24
<i>Sacrificio y análisis de tejido cerebral</i>	24
<i>Inmunofluorescencia</i>	24
<i>Cuantificación por estereología</i>	24
EXPERIMENTO II	26
Análisis de neurotransmisores	26
<i>Implantación de cánula para microdiálisis</i>	26
<i>Microdiálisis en libre movimiento</i>	26
<i>Derivatización química</i>	27
<i>Electroforesis capilar acoplada a fluorescencia inducida por láser (EC-FIL)</i>	27
<i>Cuantificación de neurotransmisores</i>	28
<i>Lisis y Extracción de Proteínas</i>	28
<i>Preparación de la muestra</i>	28
<i>Separación de la muestra</i>	28
<i>Inmunoblot</i>	29

RESULTADOS.....	30
EXPERIMENTO I. La exposición a novedad repetida mejora el desempeño en el MWM a pesar de la inyección Aβ	30
Aβ disminuye la longitud de las fibras catecolaminérgicas, efecto que no se observa en el grupo Nov+BA.	32
.....	33
EXPERIMENTO II. Los niveles de dopamina aumentan posterior a un protocolo de novedad repetida	34
Efecto de un ambiente con novedad sobre la expresión de BDNF	36
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIÓN	43
PERSPECTIVAS.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una condición neurodegenerativa que se manifiesta por disfunción sináptica y pérdida de memoria. Recientemente, estudios epidemiológicos han sugerido que la ocupación, el nivel educativo, los pasatiempos, las relaciones sociales y el ejercicio físico podrían reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades degenerativas, como la EA. La protección cerebral que produce actividades cognitivas repetidas para prevenir o retrasar patologías cerebrales como AD se ha denominado reserva cognitiva. Se ha sugerido que la reserva cognitiva consiste en sinapsis adicionales o un mayor número de redes neuronales redundantes (Stern et al., 2012). En modelos animales, la exposición a ambientes enriquecidos se ha utilizado para imitar la estimulación cognitiva social y física y para probar sus beneficios protectores en patologías degenerativas como la EA.

Se ha demostrado que la exposición repetida a un ambiente nuevo y el ejercicio aeróbico tienen un mayor efecto protector contra la administración de oligómeros de A β in vitro (Li et al., 2012; Lima et al., 2018). Asimismo en nuestro laboratorio, demostramos que la administración cortical de amiloide- β exógeno (β A) reduce los terminales TH +, afecta la memoria de reconocimiento de localización y convierte la potenciación a largo plazo (LTP) en la depresión a largo plazo (LTD). Curiosamente, cuando aumentamos los niveles de dopamina cortical y noradrenalina, nuevamente se logra inducir la LTP y la memoria de reconocimiento.

Sin embargo, hasta ahora, no se sabe cuál es el mecanismo molecular que subyace a la reserva cognitiva. Por lo tanto, en este trabajo, analizamos si la exposición repetida a nuevos objetos o la interacción social de los ambientes enriquecidos son las variables protectoras contra los efectos neurotóxicos de la administración en el hipocampo de los oligómeros A β 1-42. Además, para determinar el mecanismo molecular involucrado en la reserva cognitiva, medimos la liberación de catecolaminas por microdiálisis in vivo y la longitud de los terminales TH + en el hipocampo por estereología, y los relacionamos con el comportamiento de los animales en una memoria de tarea espacial.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative condition manifested by synaptic dysfunction and memory loss. Recently epidemiological studies have suggested that occupation, educational level, hobbies, social relationships and physical exercise could reduce the risk of suffering from certain degenerative diseases such as AD. The cerebral protection that produces repeated cognitive activities to prevent or delay brain pathology like AD has been called the cognitive reserve. It has been suggested that the cognitive reserve consists of additional synapses or a greater number of redundant neural networks (Stern et al., 2012). In animal models, exposure to enriched environments has been used to imitate the social and physical cognitive stimulation and to test their protective benefits in degenerative pathologies such as AD.

Recently, it has been shown that repeated exposure to a novel environment and aerobic exercise have a greater protective effect against the administration of A β oligomers in vitro (Li et al., 2012; Lima et al., 2018). Also, in our laboratory, we showed that cortical administration of exogenous amyloid- β (β A) reduced TH+ terminals, impaired recognition memory and converted long-term potentiation (LTP) in long-term depression (LTD). Interestingly, when we increased cortical dopamine and noradrenaline levels rescued the induced LTP and recognition memory.

However, until now, it is not known what is the molecular mechanism that underlies the cognitive reserve. Therefore, in this work, we analyze whether the repeated exposure to novel objects or social interaction of the enriched environments are the protective variables against the neurotoxic effects of the administration in the hippocampus of the A β 1-42 oligomers. In addition, to determine the molecular mechanism involved in the cognitive reserve, we measured the release of catecholamines by in vivo microdialysis and the length of the TH+ terminals in the hippocampus by stereology, and we related them to the behaviour of the animals in a memory spatial task.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Alzheimer

En 1907 Alois Alzheimer describió el caso de Auguste Deter, una mujer de 51 años de edad, que se encontraba en el asilo en Frankfurt, Alemania (Stelzmann et al., 1995); la paciente presentaba declive cognitivo, pérdida progresiva de la memoria, paranoia y fallas en el lenguaje. Al morir Auguste Deter, Alzheimer analizó su cerebro con técnicas histológicas, con las cuales detectó la presencia de placas neuríticas, estas se conforman en su mayoría por el péptido β -amiloide ($A\beta$) y ovillos neurofibrilares, que están compuestos de proteína tau hiperfosforilada (Mattson, 2004).

Posteriormente al cuadro clínico presentado por Auguste Deter, se le dio el nombre de Enfermedad de Alzheimer (EA). Esta enfermedad de tipo neurodegenerativo, se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria, desórdenes cognitivos, alteración del comportamiento y juicio, paranoia, alucinaciones, fallas en el lenguaje y en la orientación espacial (Selkoe D., 2017). Asimismo, estos síntomas clínicos suelen estar asociados a la acumulación en determinadas regiones cerebrales del péptido $A\beta$ que suele tener entre 40-42 residuos y de redes de proteína tau hiperfosforilada. Por otro lado, el declive de la memoria en la EA se manifiesta principalmente por la pérdida de la memoria episódica, que es considerada una sub-categoría de la memoria declarativa, esta disfunción impide la recolección de eventos recientes incluyendo acontecimientos autobiográficos (LaFerla et al., 2007).

En la actualidad, se considera que la EA es la forma más común de demencia en adultos mayores (Tom et al., 2015); esta enfermedad se destaca por ser un problema de salud pública, ya que actualmente no tiene cura o tratamiento eficiente. Además, la ONU ha calculado que más de 200 millones de personas sufrirán de una enfermedad neurodegenerativa para el 2050 (Hurd et al., 2013).

Enfermedad de Alzheimer Familiar y Esporádica

Existen dos tipos de enfermedad de Alzheimer, la de tipo esporádica y la familiar, la primera es la más común y se desconocen las causas que la originan, aunque se caracteriza por presentarse a una edad avanzada entre los 60 a 65 años de edad, conforme esta aumenta el riesgo de padecerla incrementa proporcionalmente. Por otro lado hablando de la de tipo esporádico, el mayor riesgo genético que se ha relacionado con esta enfermedad, es la sobreexpresión del alelo 4 de la apolipoproteína (ApoE) (Strittmatter et al., 1993). Cabe señalar, que esta proteína se ve involucrada en el transporte de colesterol y además se cree puede estar implicada en la limpieza del péptido βA (Kim et al., 2014).

En cuanto a la EA de tipo familiar, se sabe que se transmite de forma autosómica dominante, además suele presentarse en pacientes mas jóvenes, de alrededor de 40 años de edad, por lo que se suele decir que es entrada temprana (LaFerla y Green, 2012). Las mutaciones en los genes APP (Proteína Precursora de Amiloide), PSN1 (Presenilina 1) y PSN2 (Presenilina 2) son el mayor riesgo genético para este tipo de padecimiento (George-Hyslop y Petit, 2005).

Es importante señalar que la neuropatología y la clínica es casi indistinguible entre ambos tipos, la diferencia es la edad en que la enfermedad se hace presente (Selkoe, 2002).

Diagnóstico

La identificación de la neuropatología clínica, como son la acumulación A β y la proteína tau hiperfosforilada, en un análisis *post mortem* permite el diagnóstico definitivo de la EA. Sin embargo, aunque esta neuropatología es característica de la EA, no se sabe si la agregación anormal de estas proteínas es la causa de la neurodegeneración o sólo son marcadores que acompañan durante el transcurso de la enfermedad (Selkoe, D., 2001). Al tiempo en el que la demencia se hace presente, el daño cerebral es irreversible, por lo que un diagnóstico temprano de la enfermedad es urgente para su tratamiento (Ewers et al., 2011). Por ello con el uso de biomarcadores se han desarrollado técnicas de neuroimagenología que nos permiten la detección temprana de EA (Ewers et al., 2011).

Existen compuestos específicos que se unen a los depósitos de A β , como el reactivo de Pittsburgh (PiB), [18 F]flornetabeno y [18 F]flutemetamol que pueden ser detectados por Tomografía por Emisión de Positrones; esto nos permite la cuantificación y visualización anatómica *in vivo* de este marcador histopatológico de la EA (Quigley et al., 2010). Asimismo, mediante el FDG-PET donde se usa fluorodesoxiglucosa, para detectar cambios en el metabolismo de la glucosa y el flujo sanguíneo cerebral (Remy et al., 2005), se pueden detectar cambios en el patrón metabólico de algunas áreas cerebrales. Esto es importante ya que se ha reportado que existe un patrón hipometabólico en la región temporo-parietal de la corteza durante la EA, además de que dicha región se ve involucrada en la memoria episódica (Edison et al., 2007).

La Imagenología por Resonancia Magnética (IRM) en el cerebro, puede diferenciar entre la materia blanca y la materia gris, que entonces puede usarse para diagnosticar atrofia cerebral (Storandt et al., 2009), aunque no es específica de la EA, la IRM podría detectar una posible progresión hacia esta enfermedad.

Una clase de la IRM más especializada, es la Imagenología por Resonancia Magnética funcional (fMRI), esta se usa para observar las estructuras del cerebro y determinar qué áreas del cerebro se “activan”

(que se relaciona al aumento en el consumo en más oxígeno), en el transcurso de varias tareas cognitivas, pudiendo conocer el flujo de sangre y oxígeno cerebral; estos valores a su vez se encuentran relacionados con cambios en la actividad neuronal. Por lo cual, estudios con fMRI han arrojado resultados que presentan una disminución en la activación del hipocampo durante tareas que involucran la memoria episódica en pacientes con EA (Sperling et al., 2003).

Por otro lado, la Imagenología de Tensor de Difusión (DTI), constituye un método relativamente nuevo que es otro tipo de IRM. Esta técnica permite cuantificar el grado de anisotropía de los protones de agua en los tejidos; la anisotropía fraccional (AF), es una variable numérica. En la EA el daño de la corteza cerebral causa involución walleriana, que se refiere a una degeneración que causa disrupción entre el axón y el cuerpo celular, y por consiguiente presenta un valor menor de AF a nivel de la sustancia blanca (Romero et al., 2007).

Tratamiento para la Enfermedad de Alzheimer

A la fecha no hay tratamiento efectivo ni cura para la EA, pero se sabe que la acumulación de A β contribuye a la progresión de la EA, por lo cual varios fármacos se han enfocado a disminuir este péptido. Moléculas que modulen la actividad de la β -secretasa o la γ -secretasa, se han vuelto blancos terapéuticos ya que disminuyen la proteólisis de la APP por la vía amiloidogénica. Sin embargo, las pruebas clínicas han fallado por causas como, la permeabilidad de estos fármacos a la barrera hematoencefálica y solo han llegado a la fase clínica II (Fleisher et al., 2008).

Los principales medicamentos aprobados actualmente para el tratamiento de la EA son: donezepil, rivagstimina y galantamina, que promueven la señalización colinérgica, mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa, para mantener los niveles de acetilcolina en el espacio extracelular (Zhu et al., 2013), que se cree promueve la actividad neuronal. Asimismo, la memantina es un fármaco común para el tratamiento de esta enfermedad, por ser un antagonista de los receptores NMDA. Es el único fármaco aprobado para la fase tardía del Alzheimer y actúa contrarrestando los efectos de la hiperactividad excitatoria (Zhu et al., 2013).

Finalmente, se han desarrollado tratamientos con anticuerpos contra A β y la agregación de tau; pero aún se encuentran en fases de estudio (Pedersen & Sigurdsson, 2015).

Proteína Tau

La proteína Tau, es una proteína asociada a microtúbulo (MAP) y se expresa abundantemente en el Sistema Nervioso Central (SNC). En condiciones normales, tau juega un papel importante en la estabilización y mantenimiento de los microtúbulos en los axones de las neuronas, ayudando a

estabilizar el citoesqueleto neuronal (Haass et al., 2007). Asimismo, participa en el crecimiento y transporte axonal y en la plasticidad sináptica (Roy et al., 2005). Las funciones de tau son reguladas por la actividad de proteínas cinasas y fosfatasas (Higuchi et al., 2002).

En la EA, como ya se mencionó anteriormente, hay una hiperfosforilación y disociación de la proteína tau de los microtúbulos, resultando en la formación de redes neurofibrilares constituidas de agregados intracelulares de filamentos helicoidales pareados de proteína tau hiperfosforilada que producen disfunción neuronal (Maccioni y Cambiazo, 1995). Esta disfunción radica en la alteración de las funciones estructurales y regulatorias del citoesqueleto de la neurona (Lee et al., 1994). Por otro lado, la acumulación y hiperfosforilación de la proteína Tau en las neuronas es un proceso importante involucrado en la neurodegeneración que acompaña al proceso de la EA. Por lo tanto, la presencia de tau hiperfosforilada, es un marcador importante en la patogénesis de la EA.

Conviene subrayar que las redes neurofibrilares están presentes en otras demencias, llamadas taupatías y que no siempre se asocia con un declive cognitivo, además de que el gen que codifica para tau (MAPT) no se ha asociado genéticamente con la EA (Bekris et al., 2010).

Péptido A β

La EA esta asociada a la acumulación patogénica del péptido A β en el cerebro, y que resulta en la pérdida progresiva de sinapsis, circuitos y redes neuronales (Hsia et al., 1999); este péptido se genera a partir de una proteína intermembranal llamada APP, que es escindida por un proceso conocido como proteólisis intramembranal regulada. En este proceso, las proteínas intermembranales pueden ser escindidas para liberar hacia el citosol fragmentos que pueden actuar directamente en el núcleo y tener efectos sobre la transcripción génica.

La APP es procesada por un complejo de proteasas en diferentes secuencias de aminoácidos, que incluye: α -, β - y γ -secretasa, que actuarán dependiendo la vía por la que será procesada; el procesamiento de APP se puede dividir en la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, la α -secretasa escinde en el residuo 83 en el carboxilo-terminal (C83), de la APP, produciéndose el ectodominio N-aminoterminal (sAPP α) que es secretado al medio extracelular, mientras que el fragmento C83 es retenido en la membrana para su posterior escisión por la γ -secretasa, produciendo un fragmento corto llamado p3 (Haass et al., 1993); como el fragmento generado es muy corto, este proceso no se asocia con el desarrollo de la EA. Por otro lado, en la vía amiloidogénica la β -secretasa escinde en la posición 99 del carboxilo terminal (C99) de APP, liberándose el fragmento

sAPP β al espacio extracelular y dejando el fragmento C99 en el espacio intramembranal. Un corte subsecuente en los residuos 38 y 43 por la γ -secretasa produce el péptido A β (Selkoe, 1996).

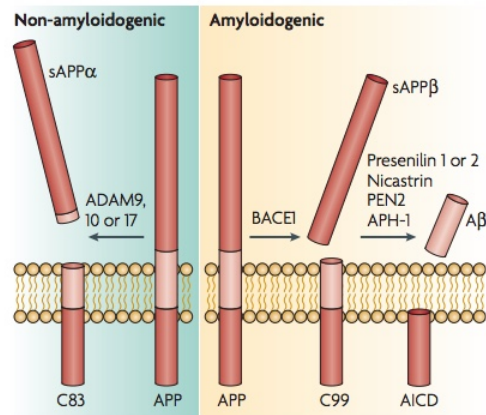


Figura 1. Proteólisis de APP, por la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica, que lleva a la subsecuente generación del péptido A β . Tomada de LaFerla et al., 2007.

En cuanto a la familia de las proteasas que actúan en estas vías de procesamiento de la APP: las α -secretasas son una familia de enzimas con actividad proteolítica que pertenecen a la familia ADAM (Familia de Enzimas, Desintegrina y Metaloproteínasa) (Allison et al., 2003). Mientras que la β -secretasa o BACE1, es una enzima ácido aspártico endopeptidasa transmembrana (Vassar et al., 1999). Y por último, el complejo de enzimas de la γ -secretasa incluye a la presenilina 1 y 2 (PSN1 y PSN2). La PSN1 está asociada directamente con el corte transmembranal; además que esta fue originalmente identificada por mapeo génico y fue asociada de manera autosómica dominante en pacientes con EA de tipo familiar. (Wolfe et al., 1999).

Por otra parte, A β puede variar en diversas formas de ensamblaje, como monómeros, dímeros, trímeros, tetrameros, dodecámeros, oligómeros, protofibrillas y fibrillas. A partir de las diferentes formas oligoméricas, se forman las protofibrillas y fibrillas maduras; éstas posteriormente pueden formar placas amiloides visibles microscópicamente en tejidos cerebrales humanos (Glabe, 2008). El péptido A β puede variar en longitud desde los 38 hasta los 43 residuos, siendo el de 40 el que se encuentra en mayor proporción. Aunque la variante del péptido de 42 residuos se produce muy poco en condiciones normales, se ha reportado que dicha variante es más hidrofóbica y más susceptible a oligomerizarse o formar fibrillas (Bekris et al., 2010).

Asimismo, se ha planteado en la EA como una falla sináptica, resultando de gran interés la relación que existe entre la acumulación aberrante de A β y la pérdida de las sinapsis neuronales. Se ha descrito que la producción de A β forma parte de un mecanismo regulado y que a su vez controla la actividad excitatoria. Está reportado que A β en bajas concentraciones induce facilitación presináptica, mientras que a altas concentraciones, se genera depresión postsináptica y disfunción GABAérgica, lo que a su vez contribuye al desarrollo de una sincronía aberrante en redes neuronales (Palop y Mucke, 2010).

Varios estudios reportan que la acumulación intracelular en hipocampo y corteza entorrinal de A β es un evento temprano en la EA y en el Síndrome de Down, y que además precede a la aparición extracelular de las placas de este péptido (Gyure et al., 2001).

Hipótesis de la cascada amiloide

La cantidad de A β ₄₂/ A β ₄₀ puede verse aumentada por mutaciones en tres diferentes genes APP, PSN1 y PSN2, este aumento a su vez favorece la formación de oligómeros, que causa cambios permanentes en la función sináptica. Conforme la acumulación de A β aumenta se presenta una respuesta inflamatoria (microgliosis y astrocitosis), pérdida de espinas dendríticas, estrés oxidativo, homeostasis iónica alterada y muerte celular. Esto conlleva a una disfunción sináptica generalizada, que se asocia con la presencia de demencia (Haass et al., 2007).

Igualmente, todas las mutaciones asociadas a la EA familiar tienen que ver con el metabolismo o fibrilación de A β . Así, las mutaciones que alteran la expresión de A β incrementan la producción de la isoforma A β ₁₋₄₂, mientras que las mutaciones dentro del péptido A β incrementan su oligomerización (Haass et al., 2007).

Inicialmente se consideraba que las fibrillas de A β eran las formas más tóxicas de este péptido, sin embargo, los resultados en las últimas décadas han señalado que el principal agente tóxico son las formas oligoméricas. Los oligómeros de A β , se han asociado con déficits cognitivos en la EA. El péptido A β forma oligómeros de diversos tamaños y estructuras, pero comparten la estructura de hoja β -plegada (Kayed et al., 2013). No obstante la toxicidad de los oligómeros parece no estar relacionada ni con su estructura ni con su tamaño. En cambio, se propone que su toxicidad se debe a la conformación tridimensional que adoptan los oligómeros y que dejan expuestos segmentos del péptido enriquecidos con residuos hidrofóbicos hacia el solvente, esto entonces permite que los oligómeros se pueden unir a macromoléculas o directamente a las membranas celulares, alterando la composición lipídica de la membrana; en comparación con los oligómeros que tienen expuestos residuos hidrofílicos (Ladiwala et al., 2012).

En consecuencia, en experimentos recientes donde se inyectan extractos de péptido A β de cerebro de pacientes con EA o sintéticos, nos ha permitido tener un modelo animal, con el cual se pueden identificar y caracterizar las propiedades tóxicas de A β (Meyer-Luehmann et al., 2006).

Modelos animales para la Enfermedad de Alzheimer(EA)

Los modelos animales para la EA han sido una de las herramientas más utilizadas e importantes para encontrar nuevos tratamientos para esta enfermedad. Se han utilizado dos importantes modelos, los modelos transgénicos y la administración directa en el área de interés de agentes neurotóxicos que generan lesiones parecidas a las relacionadas en la enfermedad de Alzheimer.

Los modelos transgénicos más comunes incluyen un mutante para el gen que codifica la proteína APP, estos modelos presentan patología amiloide y algunos presentan déficits cognitivos, aunque no presentan pérdida neuronal significativa (Harvey et al., 2013). El modelo transgénico APP, expresa A β y varios fragmentos de APP que son biológicamente activos, asimismo también presenta una fusión entre A β y BRI (Proteína Integral de Membrana 2B), una proteína involucrada en la Demencia Familiar Británica. Este modelo transgénico desarrolla patología amiloide, pero no presenta déficits cognitivos por lo que se ha puesto en duda su utilidad para estudiar la EA (McGowan et al., 2005). También se han desarrollado modelos transgénicos con mutaciones en PSN1, este modelo presenta niveles incrementados de A β 42, sin embargo no se ha reportado desarrollo de déficit cognitivo (Leutner et al., 2000).

El modelo triple transgénico 3xTgAD ha sido relevante para el estudio de la EA, este modelo murino posee tres mutaciones encontradas asociadas a esta enfermedad: APP_{swe}, PS1_{M146V}, Tau_{P301L}. El modelo 3xTgAD se caracteriza por presentar acumulación de A β y Tau hiperfosforilada. La progresión de la neuropatología es espacialmente y temporalmente parecida a la observada en humanos, ya que su acumulación aumenta conforme a la edad (Oddo et al., 2003). Asimismo se ha desarrollado el modelo 5xTg-AD que tiene las siguientes mutaciones: APP (Swe K670N/M670N), Florida (I716V), y Londres (V717I) y en PSN1 (M146L y L286V), y la ventaja que presenta es que acumula placas A β desde 1.5 meses de edad (Oakley et al., 2006).

Para la patología tau también se han desarrollado algunos modelos animales, como el de la mutación P301L en el gen de la proteína tau humana (MAPT), que favorece la acumulación de los PHFs (Oddo et al., 2003) y además en conjunción con la patología amiloide han resultado modelos animales como TAPP, JNPL3 y 3xTgAD (Hall & Roberson, 2012).

En torno a modelos no transgénicos se ha evaluado la administración directa en tejido cerebral de pre-agregados de $A\beta_{25-35}$ o $A\beta_{1-40/42}$. Dichos modelos permiten evaluar de manera morfológica y conductualmente la toxicidad amiloide sin la necesidad de la inserción de genética (Zussy et al., 2011). De sumo interés es el hecho de que estos modelos de toxicidad de $A\beta$ se han asociado con cambios histológicos en hipocampo, como la reducción de células granulares y piramidales (Stepanichev et al., 2006), otros estudios han demostrado que $A\beta$ induce apoptosis en un modelo *in vivo* (Xuan et al., 2012). En este sentido, Zussy y colaboradores demuestran que hay una activación de las proteínas cinasas JNK y P38, mediada por $A\beta$. Igualmente, estudios de microscopía electrónica evidencian que tras la administración de la fracción $A\beta_{25-35}$, el péptido puede adquirir la estructura proteica secundaria β , justo como en las fibrillas que aparecen en la EA (Zussy et al., 2011).

Ambientes Enriquecidos en modelos de la Enfermedad de Alzheimer (EA)

En los años 40's Hebb propuso el concepto experimental de ambiente enriquecido, cuando reportó un grupo de ratas que llevó a casa como mascotas, presentaban un mejor desempeño cognitivo que las ratas que se mantuvieron en el laboratorio (Hebb, D.O., 1949). Es decir, los ambientes enriquecidos se definen como una "combinación compleja de objetos inanimados e interacción social" (Rosenzweig et al., 1978), esto quiere decir que cada uno de los factores que los componen contribuyen a los efectos benéficos, lo cual dificulta estudiarlos de manera aislada (van Praag et al., 2000). Los ambientes enriquecidos incrementan los niveles de novedad y complejidad, induciendo estimulación cognitiva, sensorial y motora; los objetos que se usan en los ambientes enriquecidos incluyen varios "juguetes" que varían en forma, tamaño, colores, texturas e incluso olores, objetos que facilitan la actividad física, como los túneles y las ruedas para correr (Hannan, A.J., 2014). Los beneficios de los ambientes enriquecidos, van a ser dependientes de varios parámetros como la complejidad del ambiente, el tiempo de exposición al protocolo y el control de las condiciones que puedan intervenir (Hannan et al., 2015). Hay enormes diferencias en los protocolos de ambientes enriquecidos entre grupos de investigación, las variaciones van desde el acceso que tenga el experimentador a objetos de diferentes colores y formas, y por supuesto de las diferentes combinaciones entre estos; por lo cual ha sido complicado la estandarización de un protocolo de los ambientes enriquecidos (Olsson y Dahlborn, 2002).

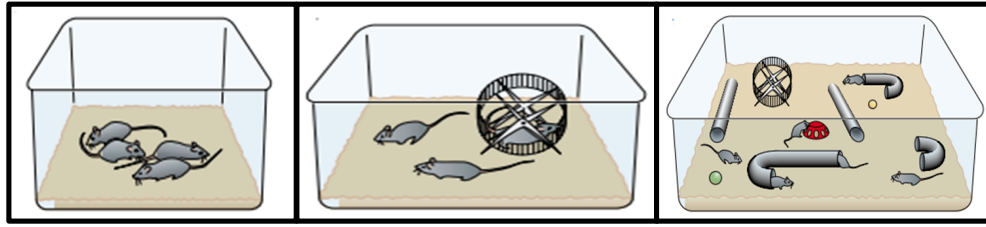


Figura 2. Factores que intervienen en el ambiente enriquecido. Modificada de van Praag et al., 2000.

Entre los beneficios reportados por la exposición a ambientes enriquecidos, se encuentra: el aumento en la neurogénesis, aumento de la plasticidad sináptica y de neurotrofinas, como por ejemplo el incremento de BDNF (Factor Neurotrófico derivado del cerebro) y en la densidad de espinas dendríticas y que pueden estar relacionados directamente con la mejora en desempeño cognitivo (Rampon et al., 2000), además hay prevención en procesos de apoptosis (Young et al., 1999).

En relación a la EA, se ha reportado que los ambientes enriquecidos producen cambios en el hipocampo en genes que se relacionan en el secuestro y disminución de placas A β (Lazarov et al., 2005), mejoras en la memoria y en la plasticidad sináptica (Jankowsky et al., 2005).

En estudios de ambientes enriquecidos en modelos animales para la EA, como el grupo de Potter y colaboradores, se sometió a un grupo de animales transgénicos que expresaba mutantes de PSN1 y la proteína precursora de amiloide (PS1/PDAPP) a un protocolo de ambiente enriquecido, que consistía en un contenedor en cuyo interior se encontraba una caja para roedores "CriticTrailTWO"®. Al final del protocolo se sometió a los animales a una prueba de memoria espacial, donde observaron mejoras en el desempeño cognitivo en el grupo de animales transgénicos expuestos al ambiente enriquecido, además de una reducción en la cantidad de placas amiloides (Potter et al., 2007).

Además, en modelos se relaciona la administración hipocampal de péptidos A β y el efecto que tiene el ejercicio aeróbico, el enriquecimiento social y el ambiente enriquecido completo, sobre el efecto tóxico de este péptido, Prado Lima y colaboradores (2018) concluyen que ratas sometidas a estos protocolos, presentan mejoras en una prueba de memoria de reconocimiento de objetos (ORM, por sus siglas en inglés), pero únicamente los sometidos al ambiente enriquecido y al ejercicio aeróbico, previenen la peroxidación lipídica (Prado Lima et al., 2018). Asimismo, Selkoe y colaboradores señalan que la exposición a un ambiente novedoso tiene un mayor efecto protector contra los efectos negativos de las placas A β ; incluso mayor al ejercicio aeróbico, en un estudio realizado en rebanadas, donde la expresión de la LTP es mayor en dicho grupo que en el grupo que no estuvo sometido a este protocolo (Selkoe et al., 2012).

Por otra parte, un parámetro electrofisiológico que se relaciona con procesos de memoria y aprendizaje es la potenciación a largo plazo (LTP), y se ha demostrado que A β puede inhibir el mantenimiento del LTP en hipocampo (Walsh et al., 2002). En este sentido, nuevamente la novedad, un factor importante de los ambientes enriquecidos, previene la inhibición de la LTP que producen los oligómeros de A β en rebanadas de hipocampo y mejoran la plasticidad sináptica. Selkoe y colaboradores, proponen que este mecanismo está mediado por los receptores adrenérgicos β_2 (Selkoe et al., 2013). Relacionado a esto, ya se ha reportado la implicación que tiene el sistema dopaminérgico en la experiencia de estímulos novedosos (Steinfels et al., 1983) y en la consecuente plasticidad neural de la LTP, que éstos inducen en el hipocampo. Se ha propuesto que la mejora en la plasticidad sináptica en hipocampo mediada por los estímulos novedosos depende de la activación de los receptores D1/D5 (Bethus et al., 2010).

Existen diversos resultados en investigaciones, que destacan a la novedad como un factor que logra incrementar el nivel de liberación de catecolaminas como dopamina y noradrenalina en diversas estructuras del cerebro (De Leonibus et al., 2006). En un estudio realizado en nuestro laboratorio se obtuvo un aumento en la liberación de catecolaminas en el hipocampo, durante una tarea de reconocimiento de localización de objetos (OLM, por sus siglas en inglés). Por otro lado, cuando se inyectó 6-hidroxidopamina (6-OHDA), que es un neurotóxico específico para eliminar neuronas de dopamina y noradrenalina, los animales no pudieron detectar el cambio en la ubicación nueva del objeto en la prueba de OLM (Moreno-Castilla, et al., 2017).

Relacionado a esto, Shiga y colaboradores, (2002) demostraron que existe un incremento de noradrenalina en la corteza parieto-temporal-occipital y en el cerebelo, cuando se expone a un grupo de ratones a un ambiente enriquecido por 40 días (Shiga et al., 2002). Asimismo, Mora y colaboradores (2010) en un estudio por microdiálisis, reportan un aumento de dopamina basal en ratas que fueron expuestas a un ambiente enriquecido durante un año (Mora et al., 2010). Probablemente, los efectos positivos de los ambientes enriquecidos estén mediados por la activación del sistema catecolaminérgico.

Por otra parte, en los experimentos realizados por Potter y colaboradores, se analizó el efecto que ejerce su protocolo de ambiente enriquecido en el desempeño de pruebas conductuales y se relacionó con el número de placas amiloides en el modelo transgénico PS1/PDAPP. Sus resultados mostraron una disminución de las placas amiloides en corteza e hipocampo, en el grupo de animales sometidos a un ambiente enriquecido, que además se sometían a pruebas conductuales. Sin embargo cuando solo se exponían a ambientes enriquecidos, sin pruebas conductuales, no se observaba una disminución significativa en el número de placas amiloides (Potter et al., 2007). Asimismo, Arendash y colaboradores, realizaron un protocolo de ambiente enriquecido, con una duración de 4 meses, en ratones transgénicos APP_{swe} de 16 meses, éstos mostraron una mejora en el desempeño cognitivo, en pruebas como MWM

(Laberinto Acuático de Morris, por sus siglas en inglés). Es importante señalar que los niveles en placas amiloides no se vieron disminuidos, en este mismo protocolo (Arendash et al., 2004).

Es por eso que es necesario estudiar con más profundidad los efectos que tienen los ambiente enriquecidos en la disminución de la toxicidad amiloidea en modelos transgénicos, ya que los resultados son contradictorios (Lazarov et al., 2005).

Reserva cognitiva y la enfermedad de Alzheimer

La reserva cognitiva se refiere a la adaptabilidad (eficiencia, capacidad o flexibilidad) de procesos cognitivos que ayudan a explicar la diferencia en la susceptibilidad de las habilidades cognitivas a daños, envejecimiento o patologías cerebrales (Stern et al., 2018). Es decir, a mayor reserva cognitiva, mayor desempeño cognitivo, aún cuando se presenta algún grado de patología cerebral.

Entonces de acuerdo con la teoría de la reserva cognitiva, es posible desarrollar factores que contribuyan a crear esta resiliencia cerebral. Asimismo, el concepto de resiliencia es usado en diversos campos (física, informática, economía, ecología, etc) y este se define como la estructura funcional y las propiedades de un sistema que le permiten recuperarse de un shock o alteración. En el contexto de las neurociencias la resiliencia cerebral está ligada a los aspectos funcionales y estructurales que le permiten actuar como un *buffer* contra algún daño neuropatológico (Petrosini et al., 2009).

En los humanos la reserva cognitiva puede ser influenciada por un sin fin de factores asociados con habilidades cognitivas, estilo de vida, nivel educacional y ocupacional. Estudiar los efectos benéficos que estos factores pueden tener en humanos resulta difícil por diversas razones. Por ejemplo, los estudios retrospectivos no pueden aislar entre factores que afectan el aprendizaje y la cognición a lo largo de la vida. Aunque se ha observado que periodos cortos de estimulación cognitiva en pacientes con Alzheimer llegan a presentar beneficios en su desempeño cognitivo (Loewenstein et al., 2004).

La reserva cognitiva está íntimamente relacionado con los criterios de neuroprotección, mecanismos compensatorios y de la reserva cerebral (Stern y Barulli, 2013). Para esto es importante mencionar que la reserva cerebral incluye diferentes factores cerebrales que podrían estar relacionados con las capacidades cognitivas, como el tamaño del cerebro y otros aspectos físicos cuantitativos que explican la diferencia entre individuos de ser susceptible a adquirir una enfermedad neurodegenerativa o algún daño neuronal (Stern y Barulli, 2013). Por tanto, coloquialmente se podría considerar a la reserva cognitiva como el “software” y a la reserva cerebral el “hardware”, esta analogía es conveniente para el entendimiento de los conceptos (Stern et al., 2018).

Asimismo, hay suficiente evidencia epidemiológica y experimental que avalan la existencia de la reserva cognitiva. En estos estudios se relaciona la ocupación, el nivel educacional, hobbies, interacción social y ejercicio físico, con el riesgo de padecer ciertas enfermedades neurodegenerativas como es el la Enfermedad de Alzheimer (Stern, Y., 2013). Así se ha demostrado que altos niveles de educación son asociados con la disminución de flurodesoxiglucosa en PET con resultados positivos para A β en pacientes con EA, lo que sugiere un mecanismo compensatorio de la reserva cognitiva (Ewers et al., 2013).

Por otro lado, en estudios *postmortem*, también se ha reportado que individuos con presencia de características neuropatológicas de la EA y que tenían más reserva cognitiva, presentan menos déficits cognitivos comparados con pacientes con el mismo grado de neuropatología pero con menor reserva cognitiva (Neuropathology Group, 2001). Estas investigaciones sugieren que la reserva cognitiva actúa de manera compensatoria, aún cuando la patología físicamente se hace presente, el daño cognitivo no es tan evidente, o el punto donde este daño se hace presente se encuentra desplazado hacia la derecha (Figura 3).

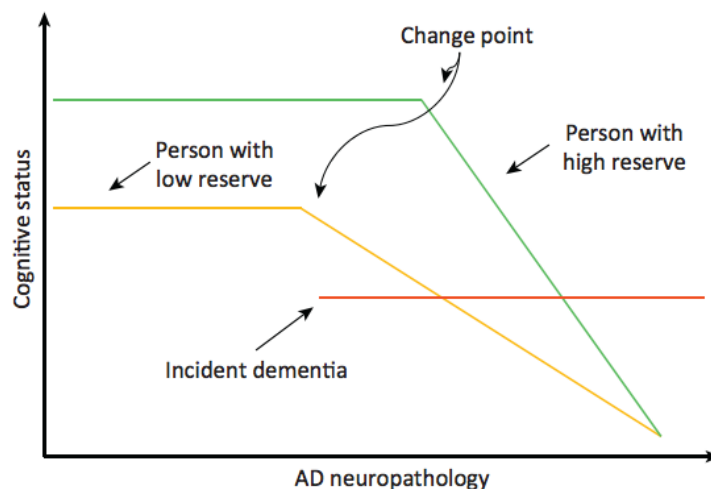


Figura 3. Representación de cómo actúa la Reserva Cognitiva. El eje de la "x" de patología EA y el eje de la "y" la función cognitiva. La cantidad de patología para que la función cognitiva se vea afectada es mayor para una persona con mayor reserva cognitiva. Tomada de Stern y Barulli., 2000.

Considerando lo anterior, se ha observado que el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer, está relacionado con factores ambientales, la interacción social y el ejercicio físico a lo largo de la vida de un individuo, en este sentido, el concepto de reserva cognitiva propone que la participación en actividades estimulantes-cognitivas disminuye el riesgo o retrasa la aparición de EA. En modelos animales, esto se

puede equiparar con los protocolos de ambientes enriquecidos (Stern Y, 2012). No se sabe cual es la aportación exacta de la estimulación cognitiva, social o física en la protección contra la EA en humanos, esto se debe a que estudios retrospectivos no pueden ser controlados y se debe confiar en lo que el individuo recuerda, además de que los estudios duran mucho tiempo, por lo que, no resultan prácticos y lo más relevante, los factores antes mencionados no pueden ser separados y ser estudiados de manera independiente (Arendash et al., 2007).

Por lo tanto, estudios en modelos animales pueden ser útiles para determinar los efectos positivos de los ambientes enriquecidos y como estos actúan, ya que se pueden comparar con la estimulación cognitiva en humanos. A través, de exponer a los animales a un ambiente complejo y novedoso, reemplazando objetos por unos nuevos, creando oportunidades para la estimulación cognitiva y mapas espaciales (Petrosini et al., 2009), podríamos entender como funciona la reserva cognitiva y como esta creando esta neuroprotección.

El sistema Catecolaminérgico y la Enfermedad de Alzheimer

Las catecolaminas son un grupo de monoaminas cuyo precursor es el aminoácido tirosina; dentro de este grupo están los neurotransmisores: dopamina, noradrenalina y epinefrina. El primer paso en la síntesis de catecolaminas es catalizado por la tirosina hidroxilasa (TH) para sintetizar L-DOPA, posteriormente esta es metabolizada por la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos, formando la dopamina. En las neuronas dopaminérgicas la síntesis de catecolaminas termina con la producción de dopamina. Pero en las neuronas noradrenérgicas, se continúa con la síntesis de noradrenalina a partir de dopamina, catalizada por la enzima β -hidroxilasa. La dopamina y noradrenalina son metabolizadas por DBH (Dopamina beta-hidroxilasa), en vías que involucran a MAO-B (Monoamino-oxidasa B) y COMT (Catecol-O-metiltransferasa) (Trillo et al., 2013).

De las catecolaminas presentes en el SNC, más del 50% es dopamina, existiendo principalmente en: los ganglios basales (en especial en el núcleo caudado y el núcleo accumbens), el bulbo olfatorio, el núcleo central de la amígdala, la eminencia media y en campos restringidos de la corteza frontal. En cuanto a la noradrenalina, el locus coeruleus (LC), es la principal fuente de liberación de esta catecolamina (Feinstein et al., 2017).

Con respecto a esto, al mecanismo de acción y el resultado que la dopamina ejerce a nivel celular, depende de la expresión del subtipo del receptor dopaminérgico que se este activando (Nestler et al., 2001; Cooper et al., 2003). De este modo, existen 5 tipos de receptores: D1, D2, D3, D4 y D5, los cuales se reagrupan en tipo D1 y D2, los receptores tipo D1 activan la adenililciclase y estimulando así la formación de AMP cíclico; mientras que los receptores tipo D2, se acoplan a múltiples sistemas efectores

que incluyen la inhibición de la actividad de adenilciclase, las corrientes de calcio y la activación de los canales de potasio (Brunton, et al., 2007). En relación al SNC, existen estudios biológicos y neurofarmacológicos que demuestran que las eferencias del Área Tegmental Ventral (VTA) hacia al hipocampo tienen proyecciones dopaminérgicas mediadas por receptores D1 que están implicados con la regulación transcripcional de genes relacionados con la plasticidad sináptica y la memoria (Dahlström y Fuxe, 1964). Por ejemplo, registros electrofisiológicos *in vivo* e *in vitro* señalan la relevancia del sistema dopaminérgico durante la formación de la LTP (Frey et al., 1990) y como se ve involucrado en el proceso de consolidación de la memoria al favorecer la expresión de la LTP (Jay, 2003).

Por otro lado, se ha comprobado que los receptores D1 modulan la consolidación durante la prueba de ORM (Balderas et al., 2013). Por lo cual, el bloqueo de los receptores D1 anterior a que el proceso de consolidación ocurra, tiene como resultado una alteración en la memoria a largo plazo sin producir efecto sobre la memoria a corto plazo (Guzmán-Ramos et al., 2010, Balderas et al., 2013).

Por lo que se refiere al estudio de la EA en relación al sistema catecolaminérgico, se ha comprobado que hay cambios en los sistemas de neurotransmisión noradrenérgico y dopaminérgico, en las vías que inervan hacia a hipocampo y en la neocorteza (Trillo et al., 2013). Por ejemplo, existe una marcada disminución de dopamina en regiones cerebrales como el hipocampo, giro cingulado, amígdala, estriado, núcleo de Raphe, caudado y LC en pacientes con EA (Martorana y Koch, 2014). También se ha reportado disminución en la población de receptores D1 y D2 en los lóbulos temporales y frontales (Kemppainen et al., 2003) y niveles significativamente bajos de dopamina, L-DOPA y su metabolito DOPAC, (Storga et al., 1996).

Asimismo, el sistema dopaminérgico juega un papel muy importante en el sistema de recompensa, las terminales dopaminérgicas junto con las glutamatérgicas proyectan hacia el hipocampo y corteza cerebral, que son áreas involucradas en el control de la voluntad y la recompensa (Haber y Knutson, 2010). En consecuencia es posible que por esta razón el 70 % de pacientes con EA, presenten síntomas como la apatía y que esto puede estar íntimamente ligado con la disfunción dopaminérgica (Mitchell et al., 2011).

Se ha demostrado que la administración directa del péptido $A\beta_{1-40}$ en el Nucleo Accumbens en ratas se liga con la disminución en la liberación de dopamina (Preda et al., 2008). Asimismo, el sistema dopaminérgico presenta alteraciones en modelos transgénicos de la EA, por ejemplo, en el modelo APP23, con la mutación sueca (K670 M/N671L), presenta una reducción en la densidad de fibras positivas de TH+ en el hipocampo y en la neocorteza y además el daño se presenta en la cercanía de la acumulación de $A\beta$ (Diez et al., 2003). Por otro lado, se ha reportado que hay una disminución en la

densidad de terminales positivas a TH y DBH en hipocampo en pacientes con EA (Iversen et al., 1983). Esto se relaciona, con estudios en el modelo de 5xFAD que muestra una disminución en la expresión de genes para DBH y TH (Kalinin et al., 2011).

Igualmente, se ha reportado que el sistema catecolaminérgico sufre daños en etapas tempranas de la EA, que resulta en pérdida de neuronas corticales e hipocampales (Zweig et al., 1988). También, durante el envejecimiento se ha demostrado que hay un daño considerable en el LC (Marien et al., 2004) y además este daño aumenta de manera significativa durante la EA, donde la pérdida neuronal es mayor a 80% en algunos pacientes. Por otro lado, Liu y colaboradores, concluyen en animales transgénicos para la EA, que hay pérdida de las neuronas catecolaminérgicas en LC (Liu et al., 2008). Además, en pacientes con EA se ha determinado una disminución en el volumen del LC, sin embargo, cuando hay un aumento en los niveles de liberación de noradrenalina se observa una disminución en el proceso de neurodegeneración en el LC, que como ya se había mencionado anteriormente es la principal fuente de noradrenalina (Grinberg et al., 2017).

Por otra parte, Mann y colaboradores reportaron una disminución significativa en el volumen del Núcleo Accumbens y en los niveles totales de RNA en neuronas noradrenérgicas en cerebro de pacientes con EA (Mann et al., 1982). Por consiguiente, se han explorado varias formas de restaurar los niveles de noradrenalina en el LC de ratones y se ha observado que la administración de inhibidores de la recaptura de noradrenalina (Simonini et al., 2010), inhibidores de la COMT (Polak et al., 2014) y del precursor de noradrenalina, droxidopa (Kalinin et al., 2012) producen beneficios en modelos con lesiones en el LC o en modelos animales con enfermedades neurodegenerativas que presentan daño en el LC. También se ha demostrado que la administración de Vindeburnol, un derivado del alcaloide de vincamina, incrementa los niveles de TH en el LC (Labatut et al., 1988); disminuyendo los efectos negativos asociados a A β en el LC; en un modelo 5xFAD, y conviene subrayar que aumenta también los niveles de BDNF (Feinstein et al., 2017).

Finalmente es importante señalar que la restauración de la transmisión dopaminérgica en un modelo triple transgénico de la EA con la administración de un inhibidor de la recaptura de dopamina, nomifensina (Guzmán-Ramos et al., 2012) y con un precursor de la dopamina, levodopa (Ambrée et al., 2009), muestra mejoras en el desempeño en tareas de memoria espacial, como el ORM y MWM, respectivamente (Ambrée et al., 2009; Reinholz et al., 2009). En relación a esto, un inhibidor de la MAO-B como selegilina, ha mostrado resultados positivos en el tratamiento de la EA. También, otro inhibidor de la recaptura de dopamina, metilfenidato, ha presentado mejoras en la evaluación de apatía en pacientes con EA (Herrmann et al., 2008). Además, la administración de L-DOPA, disminuye el número, y tamaño de placas amiloides, asimismo, incrementa la expresión de mRNA de enzimas que participan

en la degradación de A β , como la neprilisina. Por otro lado, aumenta neurotrofinas como BDNF, que se relaciona en la mejora en el desempeño en pruebas de memoria espacial en modelos para la EA (Kalinin et al., 2011). En resumen, la administración de agentes que potencien o restauren la transmisión catecolaminérgica tiene efectos positivos sobre el desempeño en pruebas de memoria y en la disgregación de placas amiloides en modelos transgénicos para la EA.

En conclusión, todos estos estudios sugieren que la acumulación de A β daña significativamente el sistema catecolaminérgico tanto en modelos animales, como en pacientes con EA (Trillo et al., 2013) y que una estimulación de este sistema de neurotransmisión, puede causar efectos benéficos sobre la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Gran parte de los estudios en ambientes enriquecidos proponen efectos benéficos en la disminución de placas A β y provocan mejoras en el desempeño en tareas de memoria en animales transgénicos para la EA. Sin embargo, no se sabe cual es el mecanismo de acción por el cual se generan estos efectos. Por otro lado, recientemente se ha propuesto la teoría de la reserva cognitiva, que explica que entre mas estimulación en la cognición, habrá un efecto amortiguador, que retrasará la aparición de enfermedades como el Alzheimer, a pesar de la presencia de marcadores neuropatológicos.

Asimismo en la EA hay una deficiencia en el sistema catecolaminérgico y con el fin de entender cual es su papel, se han realizado experimentos con fármacos que producen la activación de este sistema, que como ya se mencionó disminuyen los déficits cognitivos. Además, moléculas como: la dopamina, la levodopa y el grupo catecol, tienen un efecto disgregante y antioxidante sobre las placas amiloides. Adicional a estos planteamientos, ya se sabe que la presentación y procesamiento de estímulos novedosos, como un cambio de contexto, aumentan la liberación de las catecolaminas. En la presente investigación se propone que el componente por el cual los ambientes enriquecidos disgregan placas A β y provocan mejoras en el desempeño en tareas de memoria es la novedad.

Con todos estos planteamientos, sería plausible proponer un protocolo donde los animales se expongan a un ambiente novedoso de manera repetida, donde los objetos y la información contextual presentada, se cambien continuamente, esto aumentaría los niveles basales en la liberación de catecolaminas y en consecuencia se incrementen neurotrofinas, como BDNF, de manera que se obtenga una mejora en el desempeño de tareas cognitivas, como MWM y como resultado plantear un posible tratamiento eficaz para intentar prevenir y proteger contra los efectos tóxicos de β A.

HIPÓTESIS

La exposición a un protocolo con presencia de estímulos novedosos, aumenta la actividad catecolaminérgica reduciendo los efectos tóxicos de las fibrillas βA 1-42 y el desempeño cognitivo.

OBJETIVO

Determinar los efectos de un protocolo con presencia de estímulos novedosos, sobre el sistema catecolaminérgico en un grupo de ratones inyectados intrahipocampalmente con fibrillas de βA_{1-42} .

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto que tiene un protocolo con presencia de estímulos novedosos, sobre el desempeño en la prueba MWM, posterior a la inyección de las fibrillas de βA .
2. Determinar el efecto que tiene la administración de las fibrillas de βA sobre la neurotransmisión catecolaminérgica en el hipocampo dorsal en ratones, posterior a un protocolo con presencia de estímulos novedosos
3. Determinar el efecto que tiene un protocolo con presencia de estímulos novedosos, sobre la liberación basal de dopamina, noradrenalina, glutamato y GABA.
4. Determinar el efecto que tiene un protocolo con presencia de estímulos novedosos, sobre la expresión de BDNF.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Ratones macho de 4 meses de edad fueron divididos de la siguiente manera:

Grupo	Inyección de β A	Descripción del protocolo
CG	No	Condiciones estándares en el vivarium, sirvió como grupo control.
CG-BA	Si	
SH	No	Se colocó de 5 a 6 ratones, dentro de una caja de acrílico transparente 60x35x20cm. En el interior no había objetos y los animales permanecían por 20 min, para regresar a su caja individualmente por otros 20 min, este proceso se repitió 3 veces al día, durante un mes..
SH-BA	Si	
Nov	No	Se colocaron de 5 a 6 ratones, dentro de una caja "CrittterTrail TWO®". En el interior de la caja se colocaban objetos de diferentes tamaños, colores , textura y formas. Los animales permanecían por 20 min, para regresar a su casa individualmente por otros 20 min, este proceso se repitió 3 veces al día, durante un mes. Los tres lapsos que los animales entraban a la caja, encontraban objetos diferentes y el contexto espacial también cambiaba
Nov-BA	Si	

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-CZOO-199) y con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, del Protocolo Número, FBR30-14, "Alteraciones de los mecanismos de la memoria en la patología relacionada a la Enfermedad de Alzheimer". Cuando no se realizaban protocolos conductuales, los ratones eran alojados individualmente en cajas de acrílico a una temperatura entre 22 y 24°C con ciclos controlados de luz/oscuridad de 12h/12h cada uno, y con acceso a agua y alimento *ad libitum* dentro del *vivarium* del Instituto de Fisiología Celular.

EXPERIMENTO I

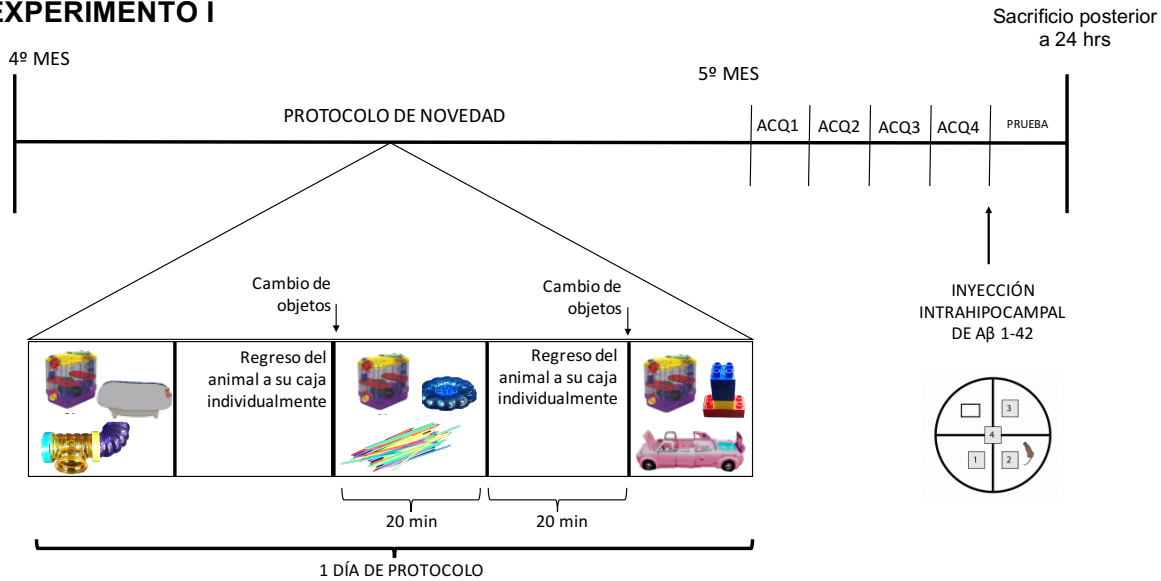
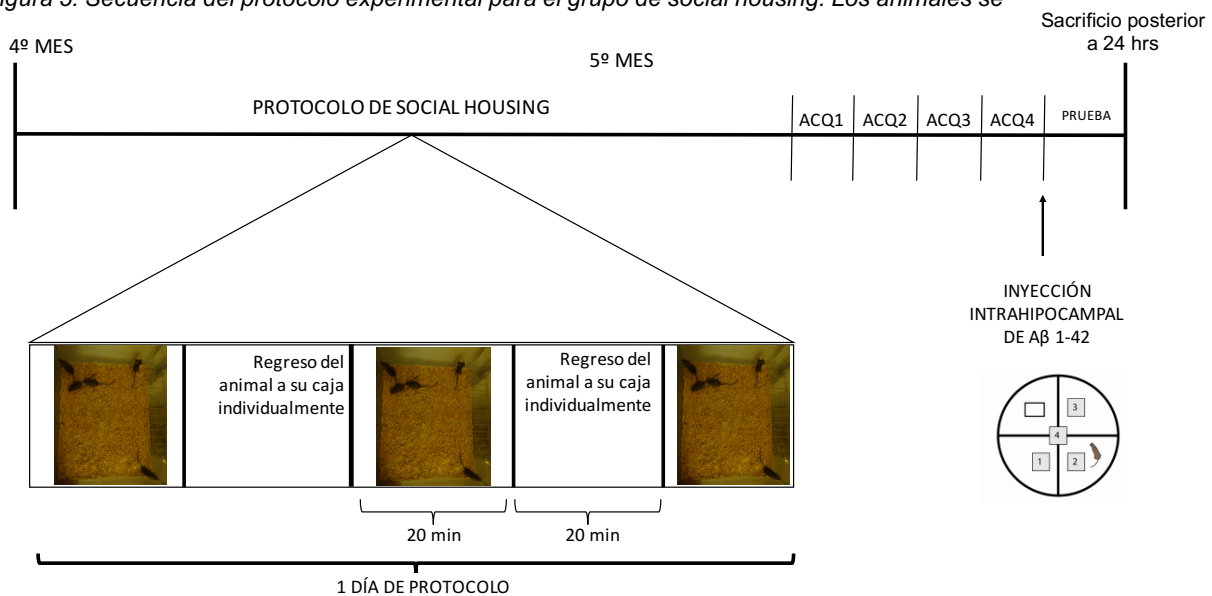


Figura 4. Secuencia del protocolo experimental para el grupo de ambiente enriquecido con novedad. Los animales se expondrán nuevos objetos de diferente tamaño, color y textura. Posterior a la prueba de MWM, se realizó el análisis histológico.

Figura 5. Secuencia del protocolo experimental para el grupo de social housing. Los animales se colocan



en grupo en una caja estándar para rata, interactuando con otros animales. Posterior a la prueba de MWM, se realizó el análisis histológico.

Es importante señalar que cada animal del grupo CG se mantuvo en el vivarium de manera individual durante un mes y después se realizó la prueba de MWM.

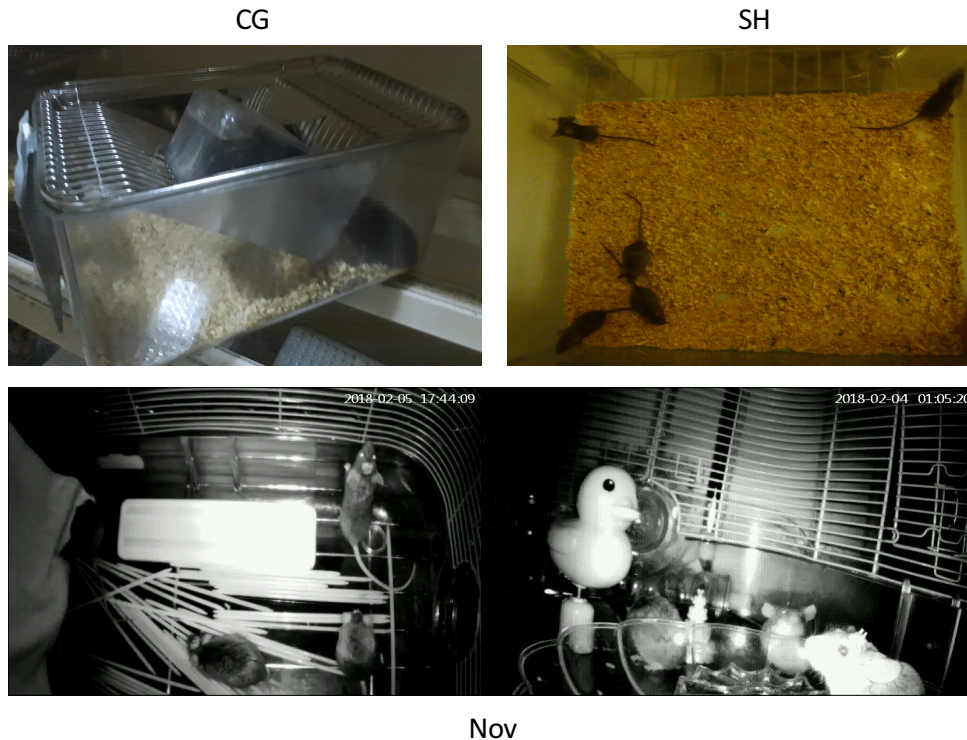


Figura 6. Imágenes representativas de los grupos: CG, SH y Nov.

Cirugía estereotáxica

Se anestesió al ratón con isoflurano (anestésico inhalado), se monta al animal en el equipo estereotáxico, se realiza una pequeña incisión medial y así poder exponer el cráneo y ubicar las fusiones de los huesos craneales. Se les realizó una trepanación bilateral, en cada hemisferio, a la altura del hipocampo (CA1) con las siguientes coordenadas: con respecto a bregma AP= +2.5, ML= +/-0.5, DV=0.5 (Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th Edition; 2012). Se colocaron cánulas de 6 mm de longitud de inyección. En ambos hemisferios y se realizó un casco hecho con pegamento dental.

Laberinto Acuático de Morris (MWM)

El laberinto acuático de Morris (Morris Water Maze, MWM) es una prueba que evalúa memoria espacial, fue desarrollada por Richard Morris en 1984.

El animal es colocado dentro de un tanque lleno de agua a 20-22 °C, donde se tiene que encontrar una plataforma sumergida que no se ve a simple vista. Con cuatro días de entrenamiento, los animales aprenden a encontrar la ubicación de la plataforma a través de claves espaciales que se encuentran tanto en el interior como en el exterior del tanque. El día de la prueba se remueve del tanque la plataforma

y se espera que los animales naden sobre el área donde se suponía estaba la plataforma. Nos permite entonces evaluar la eficiencia de la memoria espacial y su retención, esta tarea se procesa principalmente en el hipocampo.

Equipo

La arena es un tanque circular de plástico con un diámetro de 110 cm y 65 cm de altura, que se llena con 237.6 L de agua a 20-22°C, se agregó 0.01% de cloro y fue opacada con pintura blanca no tóxica y soluble, para poder ocultar la plataforma de la vista de los animales. La plataforma tenía un área de 12x12 cm y se encontraba a una profundidad de 1.5 cm. Dentro del tanque encontrábamos dos claves espaciales, dos cruces y en el exterior del tanque el experimentador fue ubicado como clave espacial.

Entrenamiento

La plataforma se colocó en uno de los cuadrantes virtuales del tanque y no se movió hasta el día de prueba. En cada día de sesión el animal fue colocado en las diferentes cuatro posiciones virtuales del tanque en la misma secuencia. El animal nadó libremente hasta escapar y encontrar la plataforma se le dejaba permanecer ahí durante 20 sec, sino encontraba la plataforma se le guiaba con una mano y se le dejaba permanecer el mismo tiempo. Después de cada ensayo los animales se regresaban a su caja donde eran colocados con calefacción entre cada ensayo. Por lo tanto, cada animal llevo a cabo 4 ensayos durante 4 días de entrenamiento.

El día de la fase de prueba que fue el día 5, se retiró la plataforma del tanque, el ratón fue colocado en el cuadrante opuesto al que se encontraba la plataforma (cuadrante blanco) y se le permitió nadar libremente al ratón durante 60 sec, durante la prueba se obtuvo un video de todos los sujetos de entrenamiento. Los parámetros que obtuvimos fueron: latencia a la plataforma (sec) durante los días de entrenamiento, latencia en tocar el perímetro donde se encontraba la plataforma (sec), número de cruces que realizó el ratón en el perímetro donde se encontraba la plataforma, tiempo que pasa el ratón en el cuadrante donde se encontraba la plataforma, tiempo en cuadrante blanco (sec), tiempo que pasa el ratón en el cuadrante opuesto donde se encontraba la plataforma, tiempo en cuadrante opuesto (sec), velocidad media (cm/sec) y distancia total recorrida (cm). Estos parámetros fueron determinados con el complemento *Animal Tracker* del software *Fiji*.

Inyección de A β

El A β ₁₋₄₂ Millipore (Temecula, CA) se incubó a 37° C durante 4 días anteriores a la administración (Ghasemi et al., 2014). En el momento correspondiente al protocolo, se le administró a cada animal, con

jeringa y bomba Hamilton, 0.5 μL de fibrillas de $\text{A}\beta_{1-42}$ a una velocidad de 0.25 μL , a una concentración de 7 μM , en ambos hemisferios.

Cuantificación de terminales de TH+

Sacrificio y análisis de tejido cerebral

Los animales fueron anestesiados con una dosis de 210 mg/kg de pentobarbital, se sacrificaron 24 hrs posterior a la prueba de MWM. Posteriormente se perfundieron intracardialmente con 10 ml de solución salina al 9%, inmediatamente fueron perfundidos con solución de fijación (Paraformaldehído al 4% y PBS 0.2M pH 7.4). Los cerebros fueron extraídos y almacenados en solución de fijación por 24 hrs, para después pasarlas a un medio en solución de sacarosa al 30% por 48 hrs, para después obtener cortes de tejidos coronales de 40 μm en un criostato (Leica; Wetzlar, Alemania).

Inmunofluorescencia

Se utilizaron los cortes de tejidos coronales previamente obtenidos, se selecciono un corte 0 donde la inyección de los péptidos $\text{A}\beta$ fue realizada, con una periodicidad de 5, se selecciono dos cortes adelante +1 y +2 y dos cortes hacia atrás -1 y -2.

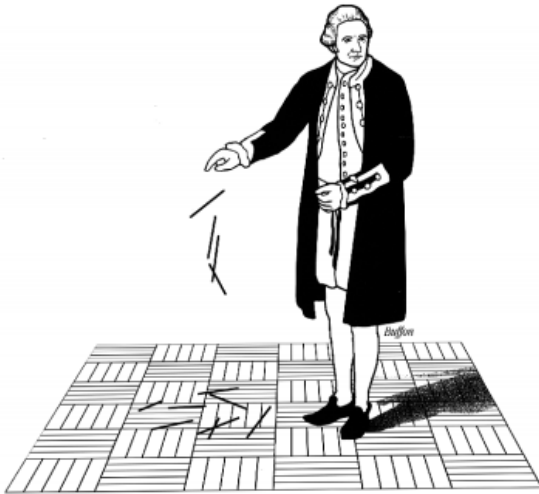
A estos cortes se les realizaron 3 lavados con buffer Trizma al 0.1 M y NaCl al 0.9% pH 7.4 (TBS 1x), durante 10 min con agitación constante (agitador orbital), después se realizó un lavado con TBS con Tritón 0.03% durante 30 min con agitación constante. Posteriormente se realiza la incubación del anticuerpo primario TH (Anti-Tyrosine hydroxylase Antibody, Pel-Freez, U.S.A.) a una concentración de 1:1000 μL , en TBS 1X, Tritón 0.03% y BSA (Albúmina de Suero Bovina) 5%, durante 24 hrs a 4 °C, con agitación constante. Pasadas las 24 hrs se realizaron 3 lavados de 10 min, se incubó el anticuerpo secundario (Goat, Anti-Rabbit IgG Antibody, Cy3 conjugate, Species Adsorbed, Millipore, U.S.A.) a una concentración de 1:250 μL , durante 1 hora y media, a temperatura ambiente con agitación constante, se realizan otros 3 lavados más con TBS 1x y se agrega DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) un marcados de ADN, durante 30 sec. El montaje de los cortes se lleva a cabo en laminillas silanizadas (VWR, Leuven, Bélgica), con medio de montaje para inmunofluorescencia Dako (Dako, USA).

Cuantificación por estereología

La estereología está basada en la intersección entre una sonda geométrica y el objeto de interés, la probabilidad de que esta intersección suceda al azar fue cuestionada por George Leclerc Buffon en 1777 y en los 80's el mismo resolvió el problema. Cada que una "aguja" intersekte con cierta probabilidad, el número de intersecciones será directamente proporcional a la longitud de la "aguja" e inversamente

proporcional a la distancia entre las líneas del piso. Todos los parámetros estimados en la estereología moderna como: densidad de volumen, de superficie, numérica y de longitud, de la sección a cuantificar, están basados en el principio de Buffon que nos indica la probabilidad de intersección entre sonda-objeto (Calhoun y Mouton, 2011).

A)



B)

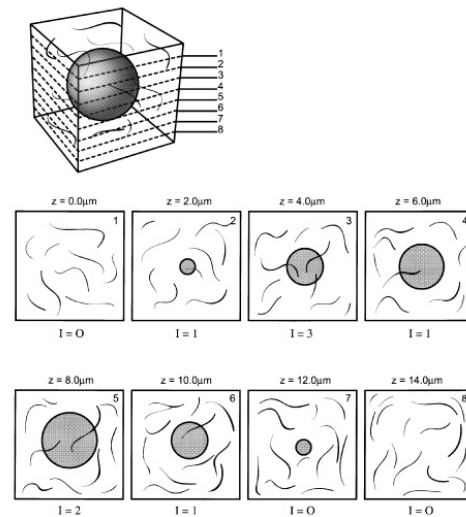


Figura 7. A.Principio de Buffon. B.Representación esquemática de un plano focal usando Spaceballs; en la figura se representa una esfera en 3D y después se parte en planos de 2D, el número total de intersecciones (8) es proporcional a la longitud total de las fibras lineares en el tejido. Imágenes tomadas de Mouton et al., 2002.

Se hizo una cuantificación de la longitud de las terminales marcadas con TH+, con *Spaceballs* (sondas esféricas). Para llevar a cabo esta técnica, la estructura de interés tiene que ser seccionada de manera que todas las partes de esta tengan las mismas probabilidades de ser muestreadas (Mouton, 2002).

La cuantificación de las terminales fue posible gracias a un software llamado “Stereo Investigator®”, que nos sirve para contar objetos en 3D. En la Figura 7, se puede observar que el programa efectivamente utiliza tres planos dimensionales, donde se asigna número de cortes a cuantificar, así como su grosor y el tamaño de la malla. En el presente estudio se realizó la determinación cuantitativa de las terminales marcadas con TH+ en el CA1 del hipocampo. Para trazar el tamaño de la malla se utilizó el objetivo 4x y para la cuantificación un objetivo de 60x. El tamaño de la malla fue de 150x150 μm , el número de cortes que se contó fue de 5, con una periodicidad de 5 y el coeficiente de Gundersen en todos los casos fue menos a 0.12.

EXPERIMENTO II

Análisis de neurotransmisores

La realización del análisis neuroquímico requirió de tres procedimientos: implantación por cánula con cirugía, obtención de muestras de microdiálisis de libre movimiento, y el procesamiento de estas por el método de electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser (EC-FIL). El proceso realizado tuvo como propósito analizar la liberación de neurotransmisores comparando el grupo de ambiente novedoso con el Social Housing.

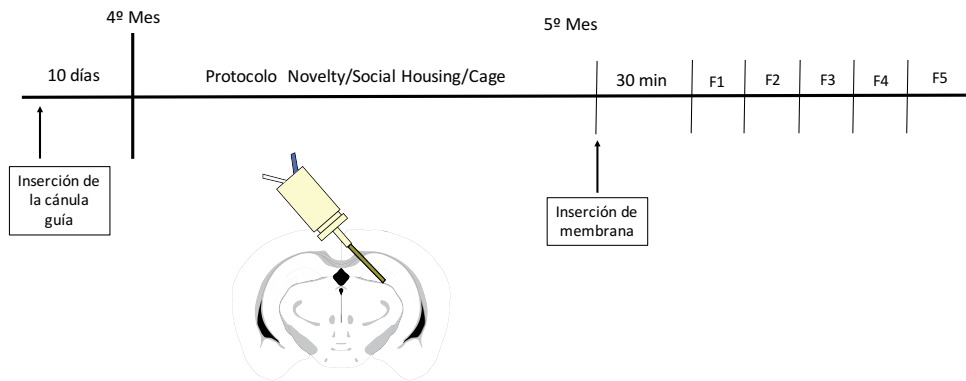


Figura 8. Secuencia del protocolo experimental para Novelty/Social Housing/Cage. La inserción de la cánula guía se colocó 10 días antes del inicio del protocolo. Al final del mes, se realizó la microdiálisis en libre movimiento donde se insertó la membrana y 30 min después se recolectaron 5 fracciones cada 15 min.

Implantación de cánula para microdiálisis

Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (0.5-1%) y montados en el estereotáxico. Se removió una porción de piel de la cabeza de ratón para poder observar el 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 hipocampo (DV -1.0 mm, AP -2.35 mm, ML -0.5). Al finalizar la cirugía se aplicaron antibióticos locales en las heridas (Terramicina y Ketoconazol). Antes del inicio del protocolo conductual, se dejó a los animales en recuperación 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 $MgCl_2$, 12mM, NaCl 1.44 M, $CaCl_2$ 17mM y KCl 48mM) y la salida de moléculas que se encuentran en la sinapsis de la región donde se implantó 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 6000 Da) 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. Las muestras recolectadas son representativas de los neurotransmisores que son liberados en tiempo real en esa región.

Para que la solución Ringer difundiera en hipocampo, se utilizaron jeringas para microdiálisis (1mL) 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, USA). 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 todo el proceso. Las fracciones fueron depositadas en viales conteniendo 1 μL de mezcla antioxidante (ácido L-ascórbico 25 mM de Na₂EDTA 27 mM y ácido acético 1M) y fueron almacenados a -70°C hasta el día de análisis.

Derivatización química

La detección de aminoácidos y neurotransmisores por el equipo de EC-FIL requiere de una derivatización química. Se añadió el compuesto FQ ([3-(2-furoil)quinolina-2-carboxialdehído), Molecular Porbes; Invitrogen, Carlsbad, USA) a la muestra. El FQ reacciona específicamente con aminas primarias para formar conjugados altamente fluorescentes que son excitables por el láser. Esta reacción es 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, USA)] como un estándar interno para verificar la reacción.

Electroforesis capilar acoplada a fluorescencia inducida por láser (EC-FIL)

Las muestras que fueron recolectadas fueron procesadas a través de la técnica de electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser (EC-FIL) para la determinación de dopamina, norepinefrina, glutamato y GABA. Una vez derivatizadas las muestras, éstas fueron procesadas en el equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ (Beckman Coulter; Pasadena, USA). 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 fluorescente son detectadas por la excitación producida por el láser a la longitud de onda de 488

nm. El detector de 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 el tiempo de migración. Estos fueron procesados en el software 32 Karat™ 8.0 (Beckman Coulter; Pasadena, USA). La concentración de los neurotransmisores fueron determinados al comparar los patrones en los electroferogramas y determinando el área bajo la curva.

Cuantificación de neurotransmisores

El área bajo la curva obtenida de dopamina, norepinefrina, glutamato y GABA, 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 de dopamina fue obtenida a través de una curva de calibración específica para el neurotransmisor.

Western Blot

Lisis y Extracción de Proteínas

Se obtuvieron tejidos cerebrales mediante dislocación cervical, se extrajo hipocampo, corteza motora, corteza insular y estriado. Se lavaron con solución salina 0.9%, se pesaron, se sonicó en 4 pulsos y se agregó lo equivalente de muestra de solución RIPA (150µL de NaCl, 1.0% Tritón X-100, 0.5% SDC, 01% SDS y 50 mM Buffer TBS pH 8.0, 1 tableta de inhibidor de proteasas (Roche Applied Biosystems, USA)). Las muestras se almacenaron a -20°C.

Preparación de la muestra

La concentración de la proteína se determinó por ensayo BCA (Thermo), se determinó el volumen que se tenía que agregar a lo equivalente de 10µg de muestra, la misma cantidad de solución RIPA y el doble de esta de solución Laemli 2X.

Separación de la muestra

Para la separación de la muestra se corrió en gel separador (4ml de Acrilamida 30%-Bisacrilamida 0.8%, 2ml Tris/HCl 2M pH 8.8, 100µl SDS 10%, 10 µl TEMED, 80µl 10% Persulfato de Sodio) y gel de concentrador (0.66ml de Acrilamida 30%-Bisacrilamida 0.8%, 2ml Tris/HCl 0.5M pH 8, 50µl SDS 10%, 10 µl TEMED, 80µl 10% Persulfato de Sodio) a 60 V durante 15 minutos con Buffer de corrida (Tris-Glicina, SDS) pH 8.3, posteriormente se aumentó a 110 V durante 90 minutos, se transfirió a membrana de PVDF mediante transferencia semi-húmeda durante 45 minutos 25 V y se almaceno en solución TBS-T 0.1% pH 7.4.

Inmunoblot

Se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4, se incubó con TBS-T 0.1% pH 7.4 y BSA 5% con anticuerpo primario α -BDNF (1:2000, Synaptic Systems, USA) durante una noche a 4°C en agitación constante. Posteriormente se lavó con TBS-T 0.1% pH 7.4 y se agregó anticuerpo secundario HRP-Goat-Anti-rabbit IgG (1:5000, Invitrogen, USA) en TBS-T 0.1% + BSA 5%, durante 1 h a TA en agitación constante. Se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4 y se reveló con sustrato de quimioluminiscencia HRP Immobilon Western (Milipore, USA). Control de carga, se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4 y se incubó con anticuerpo primario Anti.GAPDH rabbit (1:2000, Sigma Aldrich, USA en TBS-T 0.1% + BSA 5% durante 2 h a TA en agitación constante, se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4 y se agregó anticuerpo secundario HRP-Goat-Anti-rabbit IgG (1:5000, Invitrogen, USA) en TBS-T 0.1% + BSA 5%, durante 1 h a TA en agitación constante. Se realizaron lavados con TBS-T 0.1% pH 7.4 y se reveló con Sustrato de Quimioluminiscencia HRP Immobilon Western (Milipore, USA).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de todos los experimentos realizados se utilizó el software Prisma (GraphPad, versión 7). Para determinar si existían diferencias significativas en las adquisiciones durante el MWM se realizó una ANOVA de 2 vías con medidas repetidas, en cambio, para determinar si había diferencia en los demás parámetros como latencia a la plataforma y número de cruces, se utilizó una ANOVA de 1 vía, con prueba post hoc Bonferroni.

En cuanto a las variaciones a la longitud de las fibras positivas a TH determinada por estereología, nuevamente se realizó una ANOVA de 1 vía, con posterior post hoc Bonferroni.

Los cambios en la liberación de dopamina, noradrenalina, GABA y glutamato se analizaron igualmente con una ANOVA de 1 vía y para determinar entre que grupos se observó el cambio se realizó un post hoc Bonferroni.

Por último, para medir los cambios en la expresión de BDNF, se normalizó para después analizarse con una prueba *t de Student*.

RESULTADOS.

EXPERIMENTO I. La exposición a novedad repetida mejora el desempeño en el MWM a pesar de la inyección A β

Con el fin de evaluar si un protocolo de novedad repetida tenía efectos positivos sobre el desempeño cognitivo, se evaluó la ejecución de los animales en una prueba de memoria espacial como es el MWM. Se determinó el tiempo que le tomo a cada animal llegar a la plataforma en cada ensayo y se realizó un promedio de todos los ensayos por cada día de entrenamiento. Los resultados obtenidos indican que no hay diferencias significativas entre los grupos. Los cuatro grupos mostraron una curva de aprendizaje muy similar y se observa que con el transcurso de ensayos y días de entrenamiento, hay una disminución en el tiempo de llegada a la plataforma (Figura 9A). El día de la prueba final donde se retira la plataforma, se evalúa que tanto se recordaba la localización de la plataforma, por lo que los animales nadaron durante 60 s libremente. Se grabó cada una de las pruebas para determinar: latencia de llegada a la plataforma, no. de cruces, tiempo en el cuadrante opuesto, tiempo en el cuadrante blanco, velocidad de nada y distancia recorrida. Se puede observar en los resultados obtenidos, que la latencia de llegada a la plataforma se ve disminuída en el grupo CG y Nov+BA respecto a los grupos CG+BA y SH+BA, que es estadísticamente significativo (Figura 9B). Respecto al no. de cruces, los grupos CG y Nov+BA presentan un número mayor en comparación con los grupos restantes (Figura 9C). Con estos resultados podemos plantear que el protocolo de novedad repetida mejora el desempeño en el MWM. Además ni la inyección de A β_{1-42} ni el protocolo aplicado tuvo efectos sobre la velocidad de nado y la distancia recorrida, ya que no hubo diferencias significativas. El tiempo en el cuadrante blanco fue significativamente diferente entre el grupo CG y Nov+BA. Mientras que el tiempo en el cuadrante opuesto no presenta diferencias significativas entre ningún grupo.

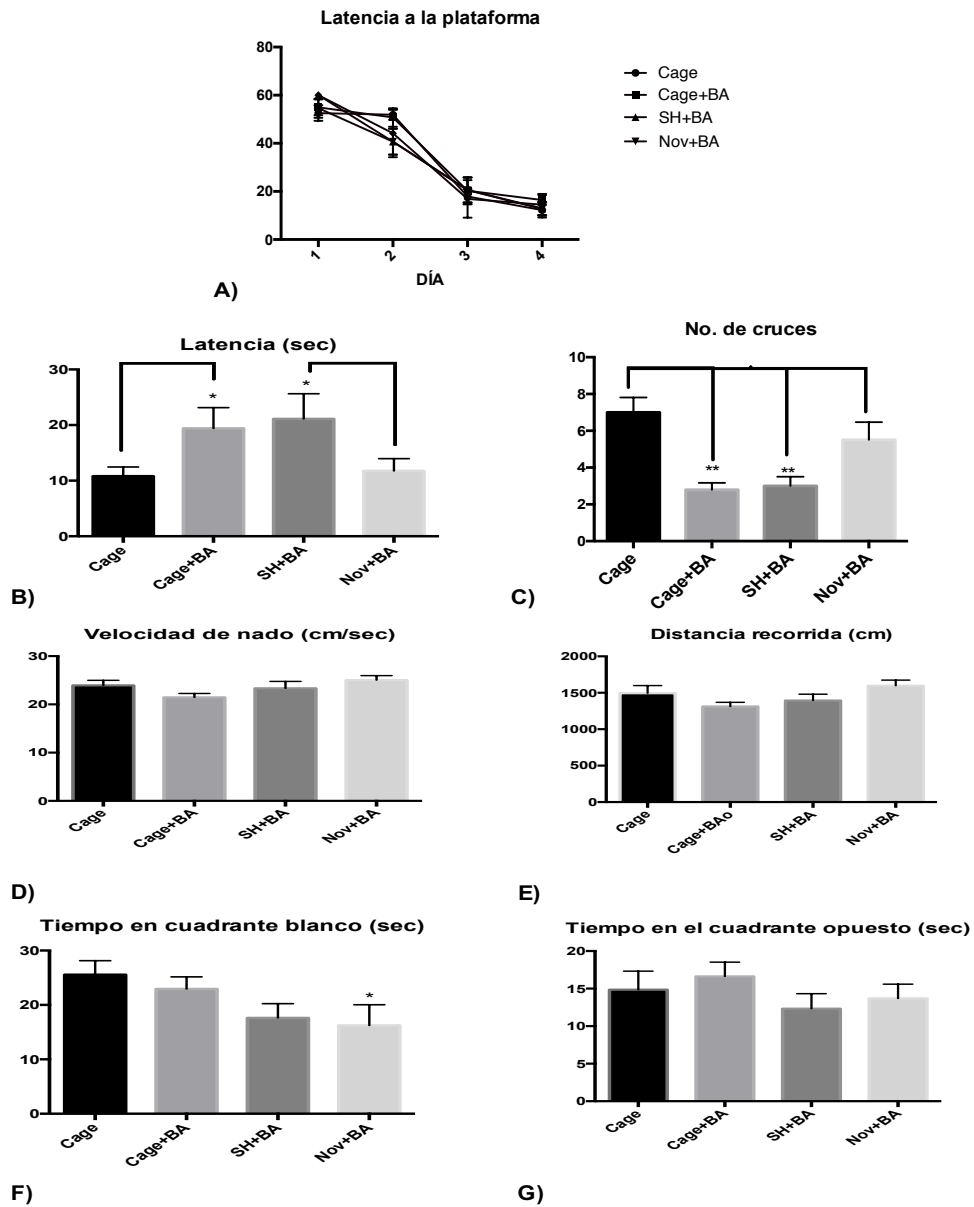


Figura 9. A) Los grupos presentan una disminución en la latencia a la plataforma conforme los 4 días de adquisiciones transcurren, pero no hay diferencia significativa entre los grupos, debido a que como ya se mencionó la $A\beta$ se inyecta posterior a que el proceso de consolidación ocurra. B) Tiempo de latencia a la plataforma, es diferente significativamente entre los grupos Nov y CG en comparación con los grupos CG-BA y SH-BA (* $p=0.0143$). C) El no. de cruces por el lugar donde estaba la plataforma, es significativamente diferente entre los grupos Nov y CG comparado con los grupos CG-BA y SH-BA (* $p=0.0017$). D) Velocidad de nado (cm/sec), no hay diferencias significativas entre ningún grupo. E) Distancia recorrida (cm), no hay diferencias significativas. F) Tiempo en cuadrante blanco (sec), hay una diferencia significativa entre el grupo Nov+BA y el grupo Cage (* $p=0.0135$). G) Tiempo en cuadrante opuesto, no hay diferencias significativas.

A β disminuye la longitud de las fibras catecolaminérgicas, efecto que no se observa en el grupo Nov+BA.

De acuerdo a la bibliografía, el sistema catecolaminérgico juega un papel importante en el procesamiento de estímulos novedosos. Con la finalidad de determinar porque la novedad repetida tiene un efecto neuroprotector durante la prueba de MWM, posterior a la administración directa de A β_{1-42} en el hipocampo dorsal en todos los grupos, se decidió evaluar la longitud de las fibras catecolaminérgicas, por estereología. Encontramos que tanto en las micrografías como en la cuantificación, se puede observar que el péptido tiene un efecto neurotóxico en la longitud de las terminales catecolaminérgicas (Figura 10). El grupo Nov+BA presenta diferencias significativas solo con los grupos SH+BA y CG+BA, mas no con el grupo CG. Asimismo los grupos SH+BA y CG+BA no presenta diferencias entre estos ellos. El hecho de que en los grupos CG y Nov+BA no se disminuya la longitud de las fibras catecolaminérgicas pudiera establecer una correlación con un óptimo desempeño en el MWM. Mientras que una disminución en la longitud de las fibras en los grupos SH+BA y CG+BA, por el contrario, se ve corelacionado con una disminución en el desempeño comparado con los grupos CG y Nov+BA, en la misma prueba.

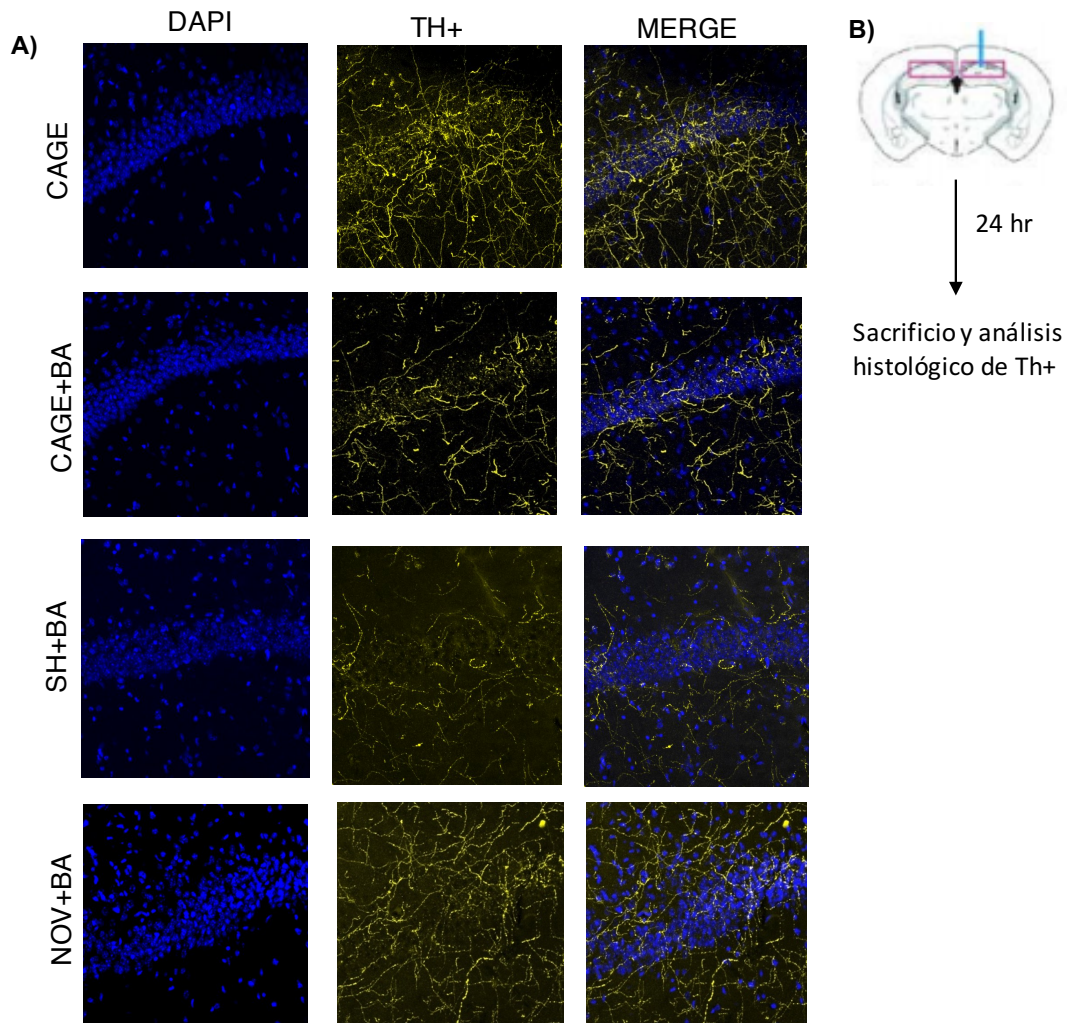
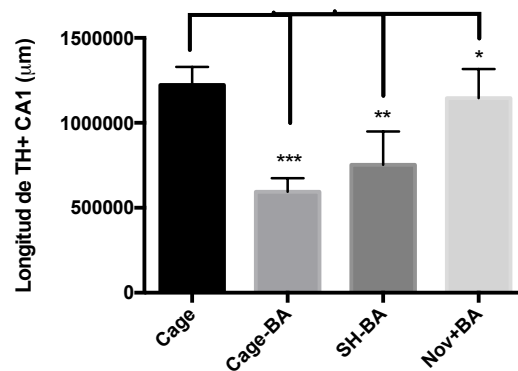


Figura 10. A. Micrografías de CA1 del grupo Cage con y sin inyección de $A\beta 1-42$, grupo SH con inyección de $A\beta 1-42$, grupo Nov con inyección de $A\beta 1-42$. C. Conteo por estereología de la longitud de TH+ del grupo Cage con y sin inyección de $A\beta 1-42$, donde solo en este último grupo la longitud disminuye, grupo SH con inyección de $A\beta 1-42$, grupo Nov con inyección de $A\beta 1-42$. Cage (n=4), Cage+BA (n=4), SH (n=4), Nov+BA (n=4). B. Esquema de la inyección intrahipocampal de $A\beta 1-42$ y posterior a las 24 hrs se sacrificó para análisis histológico.



EXPERIMENTO II. Los niveles de dopamina aumentan posterior a un protocolo de novedad repetida

Respecto a la correlación observada entre un buen desempeño en el MWM y el mantenimiento en la longitud de las fibras catecolaminérgicas, se decidió evaluar si este mismo protocolo producía un aumento sobre la liberación extracelular de las catecolaminas. Con las muestras obtenidas por microdiálisis, después del protocolo de novedad repetida, se evaluaron posteriormente con EC-FIL, se observó un cambio significativo en la liberación de la dopamina (Figura 11A), respecto a la noradrenalina solo presentó una tendencia a aumentar que no es significativa (Figura 11B). En este experimento no se puede hablar de un efecto protector de las catecolaminas, ya que no se inyectó $A\beta_{1-42}$ y además un grupo poblacional mas grande nos permitiría concluir.

En cuanto a GABA y Glutamato no se observan cambios significativos o alguna tendencia en ninguno de los grupos (Figura 11C y D). Por lo que un protocolo de novedad repetida no tiene efectos sobre la concentración extracelular de dichos neurotransmisores.

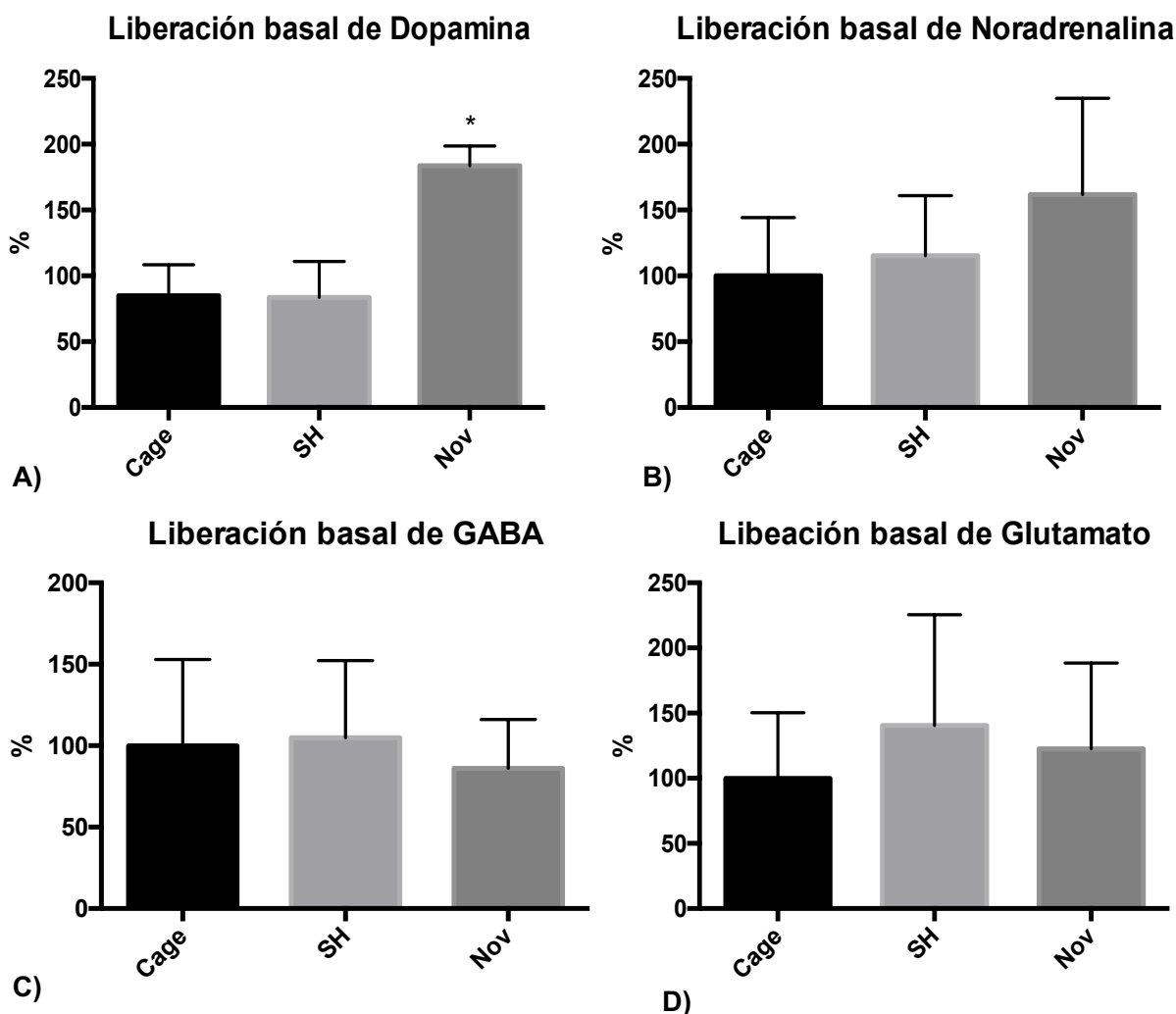


Figura 11. A) Promedio de la concentración en la liberación basal de dopamina, de las muestras recolectadas en la línea base de todos los animales, Cage (n=3), SH (n=3), Nov (n=4). Los animales del grupo Novedad presentan un aumento en la liberación basal (* $p=0.0156$). B) Promedio de la concentración basal en la liberación de norepinefrina, de las muestras recolectadas en la línea base de todos los animales, Cage (n=3), SH (n=3), Nov (n=4). Los animales del grupo Nov presentan una tendencia a aumentar liberación basal de noradrenalina pero no es significativa ($p=0.7319$). C) Promedio de la concentración en la liberación basal de glutamato, de las muestras recolectadas en la línea base de todos los animales, Cage (n=3), SH (n=3), Nov (n=4). Los animales del grupo Novedad no aumentan la liberación de basal de glutamato respecto al grupo control ($p=0.9126$). D) Promedio de la concentración en la liberación basal de GABA, de las muestras recolectadas en la línea base de todos los animales, Cage (n=3), SH (n=3), Nov (n=4). Los animales del grupo Novedad no aumentan la liberación basal de GABA respecto al grupo control ($p=0.9531$).

Efecto de un ambiente con novedad sobre la expresión de BDNF

El efecto de un protocolo de novedad repetida sobre la liberación de dopamina podría estar aumentando BDNF únicamente en hipocampo. Nuestros resultados muestran que posterior a la novedad repetida hay una tendencia de esta neurotrofina a aumentar únicamente en hipocampo, pero que no es significativa (Figura 12). Resulta interesante que esta tendencia solo se presenta en hipocampo y no en corteza motora (Figura 13). Nuestro protocolo está basado en el cambio de objetos y de contexto, es importante mencionar que los cambios contextuales parecen estar procesados en el hipocampo. Posiblemente, por esta razón BDNF pudiera estar aumentado únicamente en esta estructura. Sin embargo, probablemente con un aumento en el número de muestras se podría estar confirmando esta proposición.

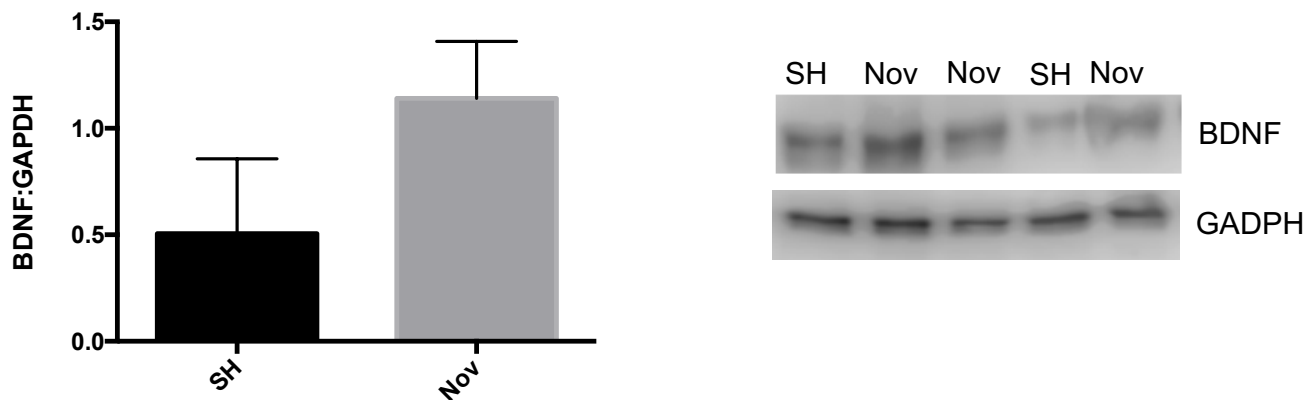


Figura 12. Relación de BDNF/GAPDH en Hipocampo de ambos grupos SH(n=2)/ Nov(n=3). Hay una mayor expresión de BDNF en el grupo Novedad respecto al control ($p=0.0727$).

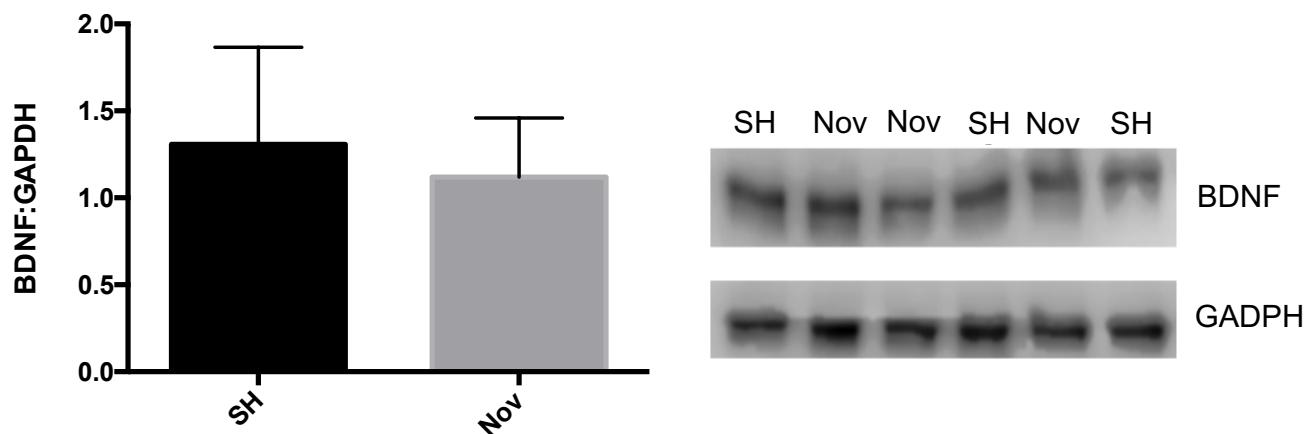


Figura 13. Relación de BDNF/GAPDH en Corteza Motora en ambos grupos SHN(n=3)/Nov(n=3). No hay un cambio de la expresión de BDNF en la Corteza Motora ($p=0.6456$).

DISCUSIÓN

Los resultados de la presente investigación proponen que el protocolo usado de ambiente enriquecido con estímulos novedosos repetidos, presenta un efecto protector en contra del efecto tóxico de las fibrillas de $A\beta_{1-42}$, que se manifiesta en un incremento de la longitud de las terminales catecolaminérgicas y en una mejora en el desempeño cognitivo en la prueba de MWM.

En este sentido, recientemente Prado-Lima y colaboradores (2018), mostraron que la exposición a un ambiente enriquecido tiene efectos neuroprotectores y una mejora en el desempeño cognitivo contra la administración del péptido $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo dorsal en comparación con un ambiente social (Prado-Lima et al., 2018). Sin embargo, el desempeño cognitivo fue evaluado con la prueba ORM y se ha propuesto que el hipocampo podría tener una limitada participación en este tipo de tarea (Balderas et al., 2013) Además de que en dicha investigación no propone el mecanismo que subyace a dicha recuperación. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la administración de 6-OHDA, un neurotóxico selectivo para las terminales dopaminérgicas y noradrenérgicas afecta el desempeño durante el OLM pero no para ORM, cuando se administra en el dorso del hipocampo. Por lo que destaca que el hipocampo tiene participación en la procesamiento de cambios contextuales, sin embargo no participa en el reconocimiento de objetos. Además de que cuando hay un cambio en el contexto hay un aumento en la liberación de noradrenalina y dopamina (Moreno-Castilla et al., 2017).

Con estas evidencias es posible proponer que el hipocampo estaría involucrado en tareas de reconocimiento contextual y no tanto en el reconocimiento de objetos. Tomando en cuenta estos argumentos, se decidió determinar si nuestro protocolo tenía una mejora en el desempeño cognitivo en una tarea espacial y contextual como es el MWM. Se empleó esta tarea porque los animales basan su búsqueda de la plataforma sumergida en movimientos aprendidos a lo largo de las adquisiciones y además porque aprenden a aproximarse a la plataforma desde diferentes direcciones gracias a las claves espaciales externas e internas. Asimismo, se ha comprobado que una sola inyección de $A\beta$ produce un mal desempeño en MWM (Zussy et al., 2011).

Posterior al protocolo, nuestros resultados muestran que en la prueba de MWM todos los grupos tuvieron una latencia a la plataforma sin diferencias significativas entre ellos (Figura 9A) durante las adquisiciones, esto es porque la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ en el dorso del hipocampo se hizo 3 horas después de la última adquisición en el día 4. Por lo tanto no se afectó la consolidación, entonces los efectos solo se verán durante la ejecución, representados por el número de cruces y la latencia a la plataforma. Con estos parámetros se pudo evaluar el desempeño cognitivo de cada grupo y el efecto que el protocolo al que se sometieron ejerció. En resumen, al no afectar la consolidación y al realizar la

prueba de memoria posterior a 24 horas de la inyección, se evalúa únicamente la evocación de la memoria.

Así el grupo CG, presentó una baja latencia a la plataforma y un número de cruces considerablemente bueno, al lugar donde se ubicaba la plataforma (Figura 9B, C). En cambio el grupo CG-BA, al cual se le administro el péptido $A\beta_{1-42}$ en el dorso del hipocampo, se observa que su desempeño se vio afectado y el número de cruces se disminuye a la mitad y el tiempo de latencia se elevó aproximadamente un 50% (Figura 9B, C), por lo tanto se demuestra y se comprueba que una sola administración del péptido $A\beta_{1-42}$ afecta el desempeño durante en el MWM.

Asimismo, se evaluó si nuestros protocolos: de ambiente enriquecido con novedad repetida o un ambiente social tenía efectos neuroprotectores contra los efectos negativos del péptido $A\beta_{1-42}$, previamente observados en el grupo CG-BA, sobre el desempeño en MWM. En efecto, nuestros resultados muestran que en el caso del grupo Nov el número de cruces y el tiempo de latencia, no fue significativamente diferente al grupo CG, pero si presenta una diferencia significativa respecto al grupo SH-BA y CG-BA (Figura 9B, C), es importante señalar que estos dos últimos grupos no presentan diferencias significativas entre ellos.

Es posible con los resultados de nuestra investigación plantear que los estímulos novedosos repetidos ejercen un efecto protector, permitiendo que el grupo que se sometió al protocolo de novedad tuviera un desempeño normal comparado con el grupo CG en el MWM. Por el contrario, nuestro protocolo de ambiente social reflejado en el grupo SH-BA se vio afectado al igual que el CG-BA, por lo que podemos concluir que la interacción social no protege contra el efecto tóxico del péptido $A\beta$.

Los resultados obtenidos coinciden con investigaciones, en las que con un protocolo de ambiente enriquecido, al que fueron expuestos un grupo de ratones transgénicos para la EA, muestran una disminución en la latencia a la plataforma, tanto en las adquisiciones, como en el día de la prueba en el MWM, respecto al grupo que solo fue expuesto a un ambiente social (Potter et al., 2007). Consistentemente con esta investigación y la realizada en nuestro laboratorio, es plausible proponer que el factor social no es el que esta aportando esta protección contra algún daño neurotóxico como lo es la administración del péptido $A\beta$.

Además, se determinó el tiempo que el ratón pasó en el cuadrante blanco y en el opuesto. Observamos una diferencia significativa del grupo Nov-BA respecto a los demás grupos, mientras que el tiempo que permanece en el cuadrante blanco, es menor. Esto puede explicarse, probablemente porque el animal se redirigiera desde el cuadrante donde fue colocado y de ahí trazar la ruta que adquirió días antes (Figura 9F). En cuanto a la distancia recorrida y la velocidad no se observa diferencias significativas

entre los grupos (Figura 13E D), por lo que nos es posible concluir que nuestro protocolo de novedad repetida, no causa alteraciones en la conducta exploratoria ni en la locomoción en el MWM (Van Waas y Soffié, 1996).

Por otro lado, Moreno-Castilla y colaboradores en el 2016, reportaron que en ratones 3xTgAD de 10 meses de edad, la señal positiva para TH se encuentra significativamente disminuída, en comparación con animales silvestres de la misma edad, esto en corteza insular. Además de que esta señal se encuentra reducida, adyacente a la señal en la acumulación amiloide (Moreno-Castilla et al., 2016).

El protocolo de novedad repetida tuvo un efecto protector en contra del péptido A β durante la prueba de MWM, con este resultado se propusó corroborar si posterior al protocolo este efecto de protección se observaba sobre la longitud de las terminales catecolaminérgicas. En relación a esto, es que decidimos determinar si la administración del péptido A β en el dorso del hipocampo tiene efectos sobre la longitud de las terminales positivas a TH. Así, nuestros resultados mostraron que la administración de fibrillas de A β , disminuyó la longitud de las neuronas que expresan TH+, en el grupo CG-BA respecto a nuestro control el grupo CG (Figura 10). Probablemente, la administración del péptido A β podría estar teniendo un efecto negativo sobre la longitud de las terminales catecolaminérgicas en el hipocampo; esta idea es consistente con la pérdida de las terminales TH+ en pacientes con EA (Booze et al., 1993) y en modelos transgénicos para la EA (Liu et al., 2008).

El trabajo en la presente tesis mostró que el grupo Nov presenta diferencias significativas únicamente con los grupos: CG-BA y SH-BA. Mientras que en el grupo SH-BA se ve disminuída la longitud de las terminales catecolaminérgicas, respecto a los demás grupos, teniendo diferencias significativas con los grupos: CG y Nov. Por lo cual podemos concluir que nuevamente nuestro protocolo tiene un efecto neuroprotector contra los efectos tóxicos de A β y que el factor de el ambiente enriquecido: la novedad repetida, probablemente es el que este mediando estos beneficios (Figura 10).

Asimismo, en ratones 3xTg-AD, se presenta alteraciones en la liberación de dopamina en la corteza insular durante el procesamiento en el cambio de un objeto durante la prueba ORM, y esta es recuperada cuando se administra inhibidores de la recaptura de dopamina. Esto en comparación con ratones silvestres de la misma edad que presenta un aumento en la liberación de dopamina, ante la presencia de un estímulo novedoso (Guzmán-Ramos et al., 2012). Asimismo, Moreno-Castilla y colaboradores reportaron que durante la prueba de OLM hay liberación de dopamina y noradrenalina en el hipocampo y no en la corteza (Moreno-Castilla et al., 2017), cuando se presenta un cambio en el contexto espacial. Con estos antecedentes, decidimos evaluar si nuestro protocolo de novedad repetida podría elevar los niveles basales de dopamina y noradrenalina. Se propone esto a partir de que se sabe que la liberación

de las catecolaminas se elevan durante la exposición a la novedad, ya sea por un cambio de objeto o en el contexto. Por lo que nos planteamos que un aumento en la liberación de las catecolaminas o en una mejora en la transmisión catecolaminérgica, pudiera ser el posible sistema de neurotransmisión por el cual el mecanismo de protección de nuestro protocolo esta actuando. Adicionalmente se demostró que en animales 3xTgAD de 10 meses no hay liberación de noradrenalina ni de dopamina con estimulación a alto potasio (Moreno-Castilla et al., 2016). En nuestro laboratorio se determinó que la LTP se convierte a LTD (Depresión a Largo Plazo) en la vía de la Amígdala Basolateral- Corteza Insular (BLA- IC), tanto con la administración directa del péptido $A\beta_{1-42}$, como en animales 3xTgAD, ambos de 10 meses de edad. Cabe señalar, que cuando se bloquea la recaptura de noradrenalina y dopamina, con nomifensina en el grupo de los animales 3xTgAD, se recupera tanto la inducción de la LTP como la adquisición de la memoria de reconocimiento de objetos.

Por otra parte, Selkoe y colaboradores demostraron que un protocolo de ambiente enriquecido, el factor de la novedad es más efectiva que el ejercicio aeróbico contra los efectos sinaptotóxicos del péptido $A\beta$. En este mismo trabajo de investigación, la novedad aumenta la inducción de la LTP, en rebanadas que se embebieron en oligómeros de péptido $A\beta$, que se obtuvieron de animales sometidos a ambos protocolos. Además es importante señalar, que este grupo de investigación propone que este mecanismo pudiera estar mediado por la activación de receptores β_2 adrenérgicos, ya que en el grupo de novedad se ve aumentada la expresión de este receptor (Selkoe et al., 2013). Mas adelante, Xu y colaboradores demuestran que con este mismo protocolo de novedad, se obtiene un efecto antiinflamatorio en la microglia producido por $A\beta$ y se propone que nuevamente este mediado por receptores β_2 adrenérgicos (Xu et al., 2018).

En este sentido, con estos argumentos presentados, decidimos realizar la microdialisis en libre movimiento en los tres grupos, posterior a los protocolos de nuestra investigación. Así, se observó en nuestros resultados preliminares que la liberación basal de dopamina es diferente significativamente entre el grupo Nov y los grupos: CG y SH, mientras que entre estos últimos no se presenta diferencia significativa (Figura 11A). Asimismo, la noradrenalina presentan una tendencia a aumentar, que no es significativa en el grupo Nov en comparación con el grupo SH y CG (Figura 11B). Mientras que en la liberación basal de glutamato y GABA, no se observan diferencias significativas entre los grupos (Figura 11C, D).

Con base en los resultados presentados en esta tesis y en las investigaciones pasadas, es posible plantear que los efectos de protección de la novedad en contra de la neurotoxicidad del péptido $A\beta$, estén mediados por el sistema catecolaminérgico. Por un lado la novedad aumenta la liberación de las

catecolaminas y por otro no se sabe cual es el mecanismo que subyace los efectos positivos de los ambientes enriquecidos o cual es el factor que lo determina. Así es que podemos plantear que nuestro protocolo de novedad repetida, aumenta la transmisión catecolaminérgica, pero aún sigue la interrogante de como ésta protege de los efectos tóxicos del péptido β . Asimismo, la novedad pudiera estar ejerciendo sus efectos protectores aumentando la expresión de BDNF, que como ya se ha reportado favorece la sobrevivencia, desarrollo y función de las neuronas. Por otra parte, ya se ha comprobado el incremento de BDNF en animales sometidos a ambientes enriquecidos (Kemperman et al., 2006).

En este sentido, cuando se administra rotigotina por 7 días, un agonista dopaminérgico no-ergot, se incrementan los niveles de BDNF en corteza e hipocampo. Un posible mecanismo que tal vez se relacione con el sistema dopaminérgico, ya que cuando se administró haloperidol (antagonista no selectivo de receptores dopaminérgicos) y rotigotina, no se observó un incremento en los niveles de BDNF. Asimismo, es importante señalar que la administración de rotigotina tiene mejoras en el tratamiento contra la depresión en humanos (Kunugi et al., 2017).

Por otro lado, además ya se sabe que la noradrenalina tiene efectos protectores contra la toxicidad amiloidea, activando los receptores β_1 y β_2 adrenérgicos, y estos a su vez tiene como consecuencia el aumento en la concentración de cAMP. Por consiguiente se incrementen las concentraciones del factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Counts y Mufson, 2010). Entonces con todas estas investigaciones es probable que la exposición repetida a objetos novedosos este aumentando la transmisión catecolaminérgica, en consecuencia, la expresión de BDNF pudiera incrementarse y teniendo como resultado final un efecto protector contra la neurotoxicidad de $A\beta$.

Con este planteamiento, se determinó analizar la expresión de BDNF en el grupo Nov y SH, en corteza e hipocampo. Lo que se observó fue un incremento en la expresión de BDNF en el grupo Nov (Figura 12) en hipocampo, pero no así en Corteza Motora (Figura 12). En el grupo SH no se observaron cambios en la expresión de BDNF, en ninguna de las estructuras (Figura 13). Posiblemente, nuestro protocolo de novedad ejerce sus efectos positivos directamente en el hipocampo. Aunque estos son resultados preliminares y se propone aumentar el número de muestras, para corroborar la información que se obtuvo. En este sentido, Baquet y colaboradores, observaron en un ratón BDNF^{NO}, que carece totalmente de esta neurotrofina en el cerebro, presenta una reducción en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (Baquet et al., 2005). En efecto, varias investigaciones han reportado que la administración de BDNF ejerce efectos positivos que previenen la muerte celular y atrofia neuronal, disminuyendo el daño que estas causan en el desempeño en pruebas de memoria y aprendizaje en la EA (Nagahara et al., 2009). Además, de tener efectos neuroprotectores contra el daño causado por la

toxicidad amiloidea en modelos *in vivo* e *in vitro* (Zucatto y Cattaneo, 2009). Es posible que BDNF aumentado por la transmisión catecolaminérgica evite la disminución de las fibras positivas a TH y así mejorando el desempeño en el MWM.

Finalmente, es importante seguir estudiando el mecanismo molecular por el cual actúa la novedad en el hipocampo, ejerciendo sus efectos protectores contra la toxicidad amiloide, y el papel que el sistema catecolaminérgico pueda estar ejerciendo sobre el aumento de BDNF y por consiguiente la plasticidad sináptica. Aunque también esta protección se pueda deber a la disminución en la inflamación de la microglia mediada por igual por el sistema catecolaminérgico (Xu et al., 2018). Posiblemente con estos planteamientos se pueda desarrollar un tratamiento preventivo contra la EA.

CONCLUSIÓN

Una de las conclusiones del presente trabajo es que la presentación repetida de objetos novedosos tiene un efecto protector contra el daño de A β 1-42, en la tarea de memorias espacial que es dependiente del hipocampo. Se comprobó, que las presentación repetidas de objetos novedosos protege contra los daños de la administración intrahipocampales de A β 1-42 y mejora sustancialmente el desempeño cognitivo pues los animales recuerdan mucho mejor donde se encontraba la plataforma en la prueba de MWM, en comparación con los animales que recibieron solamente ambientes sociales, grupo SH, o permanecieron en sus cajas en el vivario (Cage). Los resultados bioquímicos mostraron que la liberación basal de las catecolaminas presentan una tendencia a aumentar por la exposición constante a estímulos novedosos, y lo anterior previno al grupo Nov-BA que no sufriera disminución en la longitud de las terminales TH+ y así poder ejercer un buen desempeño durante MWM. Esto último, podría estar relacionado con la tendencia a aumentar de BDNF en hipocampo que se observó, que se puede deber a la exposición constante a la novedad, pero esto se podría concluir con un aumento en el número de animales.

Todos los efectos positivos que se ejercen durante la presentación repetida de un ambiente enriquecido pudieran estar mediados por las experiencias repetidas a la novedad, lo cual pudiera aumentar la liberación de las catecolaminas y por ello la exposición al péptido A β 1-42 previene sus efectos, pues la longitud de las fibras TH+ no disminuyen. En conclusión, la exposición repetida a la novedad podría aumentar la actividad catecolaminérgica, ejerciendo un efecto protector de la toxicidad amiloide a través del aumento de la expresión de BDNF y este a su vez ser el efector que mejora en el desempeño cognitivo.

PERSPECTIVAS

El componente de la Novedad en los ambientes enriquecidos, podría estar estimulando la liberación basal de catecolaminas que podrían tener un efecto protector en las neuronas marcadas con TH+ respecto a la acumulación intracelular y extracelular de A β en el modelo 3xTgAD, que se sometieran al mismo protocolo de Novedad antes expuesto (Figura 21). Hemos propuesto realizar estos experimentos, para ver cuál es el papel que juega la Novedad, en el efecto disgregante sobre el A β y en la mejora en desempeño conductual, de los ambientes novedosos en el estudio de la EA.

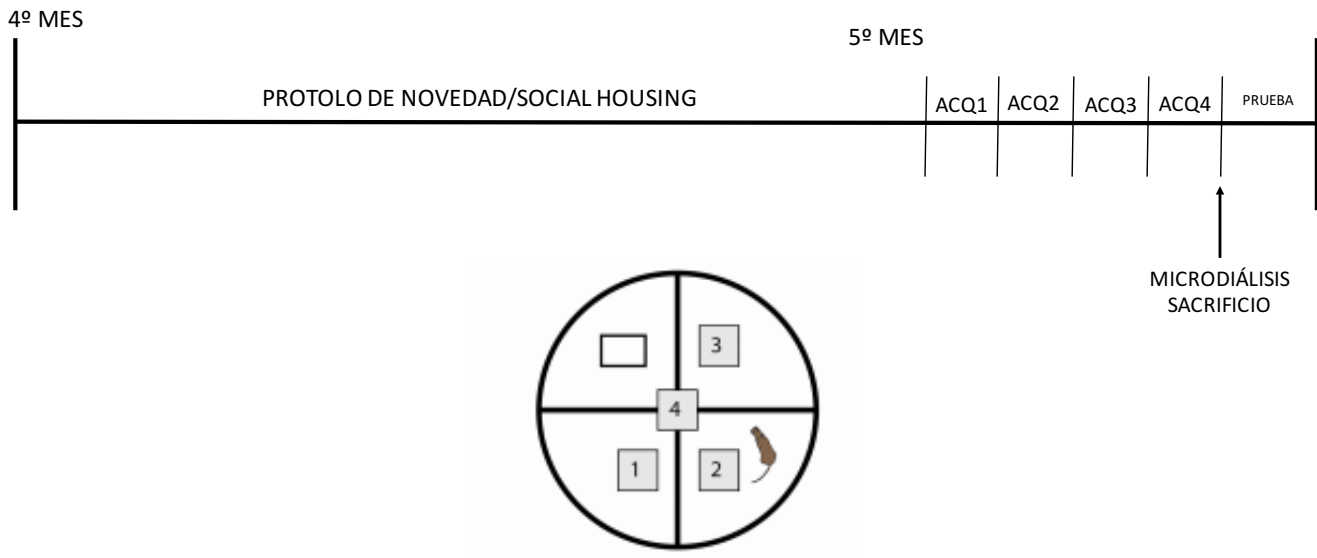


Figura 19. Secuencia del protocolo experimental para el grupo de novelty/social housing en un modelo 3xTgAD, evaluando el efecto que tiene un ambiente novedoso sobre el desempeño en MWM.

BIBLIOGRAFÍA

- Allison, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J., Hooper, N.M. (2003) ADAMs family as amyloid precursor protein α -secretases. *J. Neurosci Res* 74, 342-352.
- Ambrée, O., Richter, H, Sachser, N., Lewejohann, L., Dere, E., Souza de Silva, M., Herring, A., Keyvani, K., Paulus, W., Schäbitz, W. (2009) Levodopa ameliorates learning and memory deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 30, 1192-1204.
- Arendash, G., Cracchiolo, J., Mori, T., Nazian, S., Tan, J., Potter, H. (2007). Enhanced cognitive activity-over and above social against cognitive impairment, reduce A β deposition, and increase synaptic immunoreactivity. *Neurobiology of Learning and Memory* 88, 277-294.
- 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. *Wiley Periodicals*.
- Ballatore C, Lee V-Y, Trojanowski J. (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8, 663-672.
- Baquet, Z.C., Gorski, J.A. y Jones, K.R. Early striatal dendrite deficits followed by neurons loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 24, 4250-4258.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M. y Medina, J.H. (2014) BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 76, 677-683.
- Bethus, I., Tse, D., Morris, R. (2010) Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA Receptor-dependent paired associates. *The Journal Neuroscience*, 30(5), 1610-1618.
- Blázquez, G., Cañete, T., Tobeña, A., Giménez-Llort, Fernández-Teruel, A. (2014) Cognitive and emotional profiles of aged Alzheimer's disease (3xTgAD) mice: Effects of environmental enrichment and sexual dimorphism. *Behavioural Brain Research* 268, 185-201.
- Bondi, M., Edmonds, E., Salmon, D. (2017) Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *Journal of the International Neuropsychological Society* 23, 818-831.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., Goldstein, J.L. (2000) Regulated intramembrane proteolysis a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391-398.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. (2007). Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica. *Mc Graw Hill*. 11:401-406.

Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof P. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 33,95-130.

P.V., Growdon J. H., Hedley-Whyte E. T. y Hyman B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 631-639.

Calhoun, M.E. y Mouton, P.R. (2000) Length measurement: new developments in neurostereology and 3D imagery. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 10, 61-69.

Citron M., Oltersdorf T., Hass C., McConlogue L., Hung A. Y., Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Lieberburg I. y Selkoe D. J. (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674.

Chan, S. L., Furukawa, K., y Mattson M.P. (2002). Presenilins and APP in neuritic and synaptic plasticity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease *Neuromolecular medicine*, 2(2), 167-96.

Costa, D., Cracchiolo, JJ., Bachstetter, A., Hughes, T., Bales, K., Paul, S., et al. (2007) Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. *Neurobiology of Aging* 28, 831-844.

Dahlström, A. y Fuxe, K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20, 398-399.

De Leonibus, E., Verheij, M., Mele, A., Cools, A. (2006) Distinct kinds of novelty processing differentially increase extracellular dopamine in different brain regions. *Eur Journal of Neuroscience*, 23, 1027-1035.

Diez, M., Danner, S., Frey, P., Sommer, B., Staufenbiel, M., Wiederhold, K.H., Hokfelt, 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.

Ewers, M., Sperling, R.A., Klunk, W.E., Weiner, M.W., Hampel, H. (2011) Neuroimaging markers for the prediction and early diagnosis of Alzheimer's disease dementia. *Cell* 34, 430-442.

Feinstein, D. and Braun, D. (2017) The locus coeruleus neuroprotective drug vindeburnol normalizes behavior in the 5xFAD transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Research*.

Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Sczufca, M., 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112–2117.

Fischer, A. (2016) Environmental enrichment as a method to improve cognitive function. What can we learn from animal models?. *NeuroImage* 13, 42-47.

Fleisher, A.S., Raman, R., Siemers, E.R., Becerra, L., Clark, C.M., Dean, R.A., Farlow, M.R., Galvin, J.E., Peskind, E.R., Quinn, J.F., Shercai, A., Sowell, B.B., Aisen, P.S., Thal, L., J. (2008) Phase 2 safety trial targeting amyloid beta production with a gamma-secretase inhibitor in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 65, 1031-1038.

Frey, U., Morris, R.G.M. (1998) Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385, 533-536.

Fundación Alzheimer, 2014. <http://alzheimer.org.mx/noticias.html>

Ghasemi, R., Zaarifkar, A., Rastegar, K., Maghsoudi, N., Moosavi, M. (2014) Repeated intrahippocampal injection of beta-amyloid 25-35 induces a reproducible impairment of learning and memory: Considering caspase-3 and MAPKs activity. *Eur J Pharmacol* 726, 33-40.

Giménez-Llort, L., Blázquez, G., Cañete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobeña, A., La Ferla, F. M., Fernández-Teruel, A. (2007). Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31, 125-147.

Glabe, C. G. (2008) Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* 283, 29639-29643

Gluck, M.A., Mercado E., Myers, C. E., 2009. *Aprendizaje y Memoria, Del cerebro al comportamiento.* Mc Graw Hill. 1, 492-493.

Guzmán-Ramos, K., Moreno-Castilla, P., Castro-Cruz, M., McGaugh, J.L., Martínez-Coria, H., LaFerla, F., Bermúdez-Rattoni, F. (2015) Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in triple transgenic mice modelo f Alzheimers disease. *Learning & Memory* 19, 453-460.

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. *Journal of Neurochemistry* 114, 226-236.

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

Haber, S.N. y Knutson, B. (2010). The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology* 35, 4-26.

Hannan, A. (2014) Review: Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 40, 13-25.

Hannan, A., Nithianantharajah, J. (2009) The neurobiology of brain and cognitive reserve: Mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Progress in Neurobiology* 89, 369-382.

Hannan, A., Mo, C., Renoir, T. (2015) What's wrong with my mouse cage? Methodological considerations for modelling lifestyle factors and gene-environment interactions in mice. *Journal of Neuroscience Methods* 265, 99-108

Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B., Selkoe, D.J. (1993) β -amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J. Biol. Chem.* 268, 3021-3024.

Haass, C. y Selkoe, D. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 8, 101-112.

Hebb, D.O. (1949) The effects of early experience on problem solving at maturity. *Am. Psychol* 2, 306-307.

Herrmann, N., Rothenburg, L.S., Black, S.E., Ryan, M., Liu, B.A., Busto, U.E., Lanctot, K.L. (2008) Methylphenidate for the treatment of apathy in Alzheimer disease: prediction of response using dextroamphetamine challenge. *J. Clin. Psychopharmacol.* 28, 296-301.

Himeno, E., Ohyagi, Y., Ma L., Nakamura, N., Miyoshi, K., Sakae, N., Motomura, K., Soejima, N., Yamasaki, R., Hashimoto, T., Tabira, T., LaFerla F., y Kira, J. (2011) Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting Amyloid- β degradation. *American Neurological Association* 69, 248-256.

Hurd, MD, Martorell, P., Langa, KM. (2013) Monetary costs of dementia in the United States. *N Engl J Med.*, 369, 489-490.

Jankowsky, J., Zu, G., Fromholt, D., Gonzales, V. y Borchelt, D. (2003). Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 25, 5217-5224.

Jarret, J.T., Berger, E.P., Lansbury, P.T. (1993) The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4963-4697.

Jay, TM. (2003) Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog Neurobiol* 69, 375-390.

Kalinin, S., Gavriluk, V., Polak, P.E., Vasser, R., Zhao, J., Heneka, M.T., Feinstein, D.L. (2007) Noradrenaline deficiency in brain increases beta-amyloid plaque burden in an animal model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 28, 1206-1214.

Kalinin, S. Polak, P.E., Lin, S.X., Sakharkar, A.J., Pandey, S.C., Feinstein, D.L. (2012) The noradrenaline precursor L-DOPS reduces pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol, Aging* 33, 1651-1663.

Klementiev, B., Novikova, T., Novitskaya, V., Walmod, P., Dmytriyeva, O., Pakkeenberg, B., Berezin, V., Bock, E. (2007) A neural cell adhesion molecule-derived peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by Abeta 25-35. *Neuroscience* 145, 209-224.

Kim, D.H., Yeo, S.H., Park, J.-M., Choi, J.Y., Lee, T.-H., Park, S.Y., Cha, H.-J. (2014) Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Gene* 542(2), 185-193.

Kunugi, H., Ogawa, S., Chiba, S., Yoshimura, A., Adachi, N. (2018) Rotigotine, a dopamine receptor agonist, increased BDNF protein levels in the rat cortex and hippocampus. *Neuroscience Letters* 662, 44-50.

Labatut, R. Richard, F., Milne, B., Quintin, L., Lecestr,e D., Pujol, J.F. (1988) Long-term effects of RU24722 on tyrosine hydroxylase of the rat brain. *J. Neurochem* 51, 1367-1374.

LaFerla, F.M. y Green, K. (2012) Animal Models of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1-13.

LaFerla, F.M., Green, K., y Oddo, S. (2007) Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 499-509.

Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y., P., Hairston., Korade-Mirnic, Z., Lee, V., et al. (2005) Environmental enrichment reduces A β levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*, 120, 701-713.

Lee, V.M-Y., Daughenbaugh, R., Trojanowski, J.Q. (1994) Microtubule stabilizing drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 15, S87-S89.

Leutner S, Czech C, Schindowski K, Touchet N, Eckert A, Müller WE. (2000) Reduced antioxidant enzyme activity in brains of mice transgenic for human presenilin-1 with single or multiple mutations. *Neurosci Lett.* 292(2), 87-90.

Lewis, J, McGowan, E, Rockwood, J, Melrose, H, Nacharaju, P, Van Slegtenhorst, M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M. (2000) Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 26, 127-134.

Li, J., Zhu, M., Manning-Bog, M., Di-Monte D. y Fink, A. (2004) Dopamine and L-dopa disaggregate amyloid fibrils: implications for Parkinson ' s and Alzheimer ' s disease. *The Jaseb Journal* 18, 962-964.

Li, S., Jin, M., Zhang, D., Yang, T., Koeglsperger, T., Fu, H. y Selkoe, D. (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.

Loewenstein, D.A., Acevedo, A., Czaja, S.J., Duara, R. (2007) Cognitive rehabilitation of mildly impaired Alzheimer disease patients on cholinesterase inhibitors. *Am J. Geriatr Psychiatry* 12(4), 395-402.

Mann, D.M., Yates, P.O., Hawkes, J. (1982) The noradrenergic system in Alzheimer and multi-infarct dementias. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 45, 113-119.

Martorana, A. y Koch, G. (2014) Is dopamine involved in Alzheimer's disease?. *Frontiers in Aging Neuroscience* 6, 1-6.

Marien, M.R., Colpaert, F.C., Rosenquist, A.C. (2004) Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Res Rev* 45, 38-78.

Mattson, M.P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430, 631-639.

McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, Skipper L, Murphy MP, Beard J, Das P, Jansen K, DeLucia M, Lin WL, Dolios G, Wang R, Eckman CB, Dickson DW, Hutton M, Hardy J, Golde T. (2005) Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron* 47(2), 191-199.

Meyer-Luehmann, M., Coomaraswamy, J., Bolmont, T., Kaeser, S., Schaefer, C., Kilger, E., Neuenschwander, A., Abramowski, D., Frey, P., Jaton, A.L., Vigouret, J.M., Paganetti, P., Walsh, D.M.,

Mathews, P.M., Ghiso, J., Staufenbiel, M., Walker, L.C., Jucker, M. (2006) Exogenous induction of cerebral β -amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313, 1781-1784.

Mitchell, R.A., Herrmann, N., Lancot, K.L. (2011) The role of dopamine in symptoms and treatment of aphathy in Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* 17, 411-427

Mora, F., Segovia, G. Y Del Arco, A. (2007) Aging, plasticity and environmental enrichment: Structural changes and neurotransmitter dynamics in several áreas of the brain. *Brain Research Review* 55, 78-88.

Mora, F., Garrido, P., De Blas, M., Del Arco, A., Segovia, G. (2010) Environmental enrichment increases the in vivo extracellular concentration of dopamine in the nucleus acumbes: a microdialysis study. *J Neural Transm* 117, 1123-1130.

Moreno-Castilla, P., Rodriguez-Duran, L., Guzman-Ramos, K., Barcenas-Femat, A., Escobar, M.L., Bermudez-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.

Mouton, P.R., Gokhale, A.M., Ward, N.L., West, M.J. (2002) Stereological length estimation using spherical probes. *Journal f Microscopy* 206, 54-64.

Mufson, E. and Counts, S. (2010) Noradrenaline activation of neurothropic pathways protects against neuronal amyloid toxicity. *Journal of Neurochemistry* 113, 649-660.

Nagahara, A.H., Merrill, D.A., Coppola, G., Tsukada, S., Schroeder, B.E., Shaked, G.M., Wang, L., Blesch, A., Kim, A., Conner, J.M., Rockenstein, E., Chao, M.V., Koo, E.H., Geschwind, D., Masliah, E., Chiba, A.A., Tuszynski, M.H. (2009).

National Institutes of Health, 2010. Instituto Nacional Sobre el Envejecimiento. 08-6423S, 1.

Nava-Mesa, M.O., Jiménez-Díaz, L., Yajeya, J. y Navarro-Lopez, J. D. (2014) GABAergic neurotransmission and new strategies of neuromodulation to compensate synaptic dysfunction in early stages of Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8, 1-14.

Näslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K.L., Davies, P., Greengard, P., Buxbaum, J.D. (2000) Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283, 1571-1577.

Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (MRC CFAS). (2001) Pathological correlates of late-onset dementia in a multicenter community-based population in England and Wales. *Lancet* 357, 1442-1450.

Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. (2003) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 8,1063-1070.

Olsson, IAS, Dahlborn, K. (2002) Improving housing conditions for laboratory mice: review of environmental enrichment. *Lab Anim* 36, 243-270.

Oomen, C., Bekinschtein, P., Kent, B., Saksida, L., Bussey, T. (2014) Adult hippocampal neurogenesis and its role in cognition. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci* 5(5), 573-587.

Ono, K., Takasaki, J., Takahashi, R., Ikeda T. y Yamada, M. (2013) Effects of antiparkinsonian agents on β -Amyloid and α -Synuclein oligomer formation in vitro. *Journal of Neuroscience Research* 91, 1371-1381.

Palop, J.J. y Mucke, L. (2010) Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nature Neuroscience* 13, 812-818.

Pedersen, J.T. & Sigurdsson, E.M. (2015) Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. *Trends Mol* 21, 394-402.

Petrosini, L., De Bartolo, P., Foti, F., Gelfo, F., Cutuli, D., Leggio, M. G., Mandolesi, L. (2009) On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. *Brain Research Reviews* 61, 221-239.

Polak, P.E., Kalinin, S., Feinstein, D.L. (2011) Locus coeruleus damage and noradrenaline reductions in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 134, 665-677.

Potter, H., Costa, D.A., Cracchiolo, J.R., Bachstetter, A.D., Hughes, T.F., Bales, K.R., Paul, S.M., Mervis, R.F. Arendash, G.W. (2007) Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. *Neurobiology of Aging* 28, 831-844.

Prado Lima, M.G., Schimidt, H.L., Garcia, A., Daré, L.R., Carpes, F.P., Izquierdo, I., Mello-Carpes, P.B. Environmental enrichment and exercise are better than social enrichment to reduce memory deficits in amyloid beta neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 115, 2403-2409.

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

- Reinholz, J., Skoop, O., Breitenstein, C., Winterhoff, H., Knecht, S. (2009) Better than normal: improved formation of long-term spatial memory in healthy rats treated with levodopa. *Exp Brain Res* 192, 745-749.
- Roberson, E. y Hall, A. (2012) Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Brain Res Bull* 88(1), 3-12.
- Romero, C., Ghisi, J., Mazzucco, J., Ternak, A. (2007) Imágenes con Tensor de Difusión en Resonancia Magnética. *Rev Argent Neuroc*, 21, 49-52.
- Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., Hebert, M., Morimoto, H. (1978) Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res* 153, 563-576.
- Roy, S., Zhang, B., Lee, V., Trojanowski, J. (2005) Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol* 109, 5-13.
- Sato, M., Murakami, K., Uno, M., Nakagawa, Y., Katayama, S., Akagi, K., Masuda, Y., Takegoshi, K. y Irie, K. (2013) Site-specific inhibitory mechanism for amyloid β 42 aggregation by catechol-type flavonoids targeting the Lys residues. *The Journal Biological Chemistry* 32, 23212-23234.
- Segovia, G., Del Arco, A., De Blas, M., Garrido, P., Mora, F. (2010) Environmental enrichment increases the in vivo extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. *J Neural Transm* 117, 1123-1130.
- Selkoe, D.J. (2001). Presenilins, β -amyloid precursor protein and the molecular basis of Alzheimer's disease. *Clinical Neuroscience Research*, 1, 91-103.
- Selkoe, D. J. (2008) Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res*. 192, 106-113.
- Shiga, T., Yaguchi, M., Okado, N., Naka, F. (2002) An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. *Brain Research* 924, 124-126.
- Simonini, M.V., Polak, P.E., Sharp, A., McGuire, S., Galea, E., Feinstein, D.L. (2010) Increasing CNS noradrenaline reduces EAE severity. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 5, 252-259.
- Sperling, R. A., Dickerson, B. C., Pihlajamaki, M., Vannini, P., LaViolette, P. S., Vitolo, O. V. (2010) Functional alterations in memory networks in early Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* 12, 27-43.
- Stern, Y. y Steffener, J. (2012) Exploring the neural basis of cognitive reserve in aging. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822, 467-473.

- Stern, Y. (2009) Cognitive Reserve. *Neuropsychologia* 47(10), 2015-2028.
- Steinfels, G. F., Heym, J., Strecker, R. E., Jacobs, B.L. (1983) Behavioral correlates of dopaminergic unit activity in freely moving cats. *Brain Res* 258, 217-228.
- Stelzmann, RA., Schnitzlein, N., Murtagh, F.R. (1995) An English translation of Alzheimer's paper, "über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clinical Anatomy* 8, 429-431.
- Storga, D., Vrecko, K., Birkmayer, J.G., Reibnegger, G. (1996) Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients. *Neurosci. Lett*, 203, 29-32.
- Tan, L., Guan, J., Jiang, H., Ma, T., Wang, N., Yu, J. (2011) Roles of β -adrenergic receptors in Alzheimer's disease: Implications for novel therapeutics. *Brain Research Bulletin* 84, 111-117.
- Trillo, L., Das, D., Hsieh, W., Medina, B., Moghadam, S., Lin, B. (2013) Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. *Neurosci.Biobehav. Rev.* 37, 1363-1379.
- Van Praag, H., Kempermann, G. Y Cage, F.H. (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience* 1, 191-196.
- Varty, G.B., Paulus, M.P., Braff, D.L., Geyer, M.A. (2000) Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: Effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol Psychiatry* 47, 864-873.
- Van Wass, M., Sofié, M. (1996) Differential environmental modulations on locomotor activity, exploration and spatial behaviour in young and old rats. *Physiol Behav* 59, 265-271.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M. (1999) β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.
- Verghese, J., Lipton, R., Katz, M., Hall, C., Derby, C., Kuslansky, G., et al. (2003). Leisure activities and the risk of dementia in the elderly. *New England Journal of Medicine*, 348, 2508-2516.
- 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 β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* 416, 535-539.
- West, A.E., Pruunsild, P., Timmusk, T. (2014) Neurotrophins: Transcription and Translation. *Handbook of Experimental Pharmacology* 220, 67-100.

- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., Selkoe, D.J. (1999) Two transmembrane aspartases in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* 398, 513-517.
- Xu, H., Rajsombath, M.M., Weikop, P., Selkoe, D. (2018) Enriched environment enhances beta-adrenergic signaling to prevent microglia inflammation by amyloid-beta. *EMBO Molecular Medicine* 10, 1-17.
- Xuan, A., Long, D., Li, J., Ji, W., Zhang, M., Hong, L., Liu, J. (2012) Hydrogen sulfide protects hippocampal neurons from apoptosis induced by beta-amyloid 25-35 partly via up-regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuropharmacology* 63, 349-361.
- Young, D., Lawlor, P., Leone, M., Dragunow, M.J. (1999) During Environmental Enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med* 5, 448-453.
- Zhu, C.W., Livote, E.E., Scarmeas, N., Albert, M., Brandt, J., Blacker, D., Sano, M., Stern, Y. (2013) Long-term associations between cholinesterase inhibitors and memantine use and health outcomes among patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 9, 733-740.
- Zweig, R.M., Ross, C.A., Hedreen, J.C., Steele, C., Cardillo, J.E., Whitehouse, P.J., Folstein, M.F., Price, D.L. (1988) The neuropathology of aminergic nuclei in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 24, 233-242.
- Zuccato, C. and Cattaneo, E. (2009) Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews* 5, 311-322.
- Zussy, C., Brureau, A., Delair, B., Marchal, S., Keller, E., Ixart, G., Naert, G., Meunier, J., Chevallier, N., Maurice, T., Givalois, L. (2011) Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid beta fragment in rats. *Am. J. Pathol.* 179, 315-334.