



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**AMYLOVIS RECUPERA LA MEMORIA Y LA FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES
NICOTÍNICOS EN EL HIPOCAMPO DEL MODELO 3XTG-AD**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
ING. EN BIOTECNOLOGÍA PAOLA RODRÍGUEZ ARELLANO**

**DIRECTOR DE TESIS
Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda (INB)**

**COMITÉ TUTOR
Dr. José Jesús García Colunga (INB)
Dra. Hilda Martínez Coria (Facultad de Medicina, UNAM)**

Juriquilla, Querétaro.

Noviembre, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

Sé que mi abuelo Fausto Arellano estaría orgulloso de ver cómo he crecido profesionalmente y de los logros que he alcanzado.

Todos los días sé que sigues acompañándome en este camino.

A tu memoria como una muestra del profundo amor que siento por ti.

Descansa en paz, Tito.

Agradecimientos Institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad y las herramientas para seguir desarrollándome profesionalmente. En específico al Instituto de Neurobiología por abrirme sus puertas y regalarme todo el conocimiento que pude recibir de su parte.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de beca No. CVU 114609 para la realización del posgrado y por el apoyo al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) que me permitió acudir a presentar mi trabajo en el congreso de la Sociedad de Neurociencias llevado a cabo en San Diego California en noviembre del 2022.

Al personal de las Unidades de Apoyo del INB-UNAM:

- Bioterio (MVZ Martín García Servín y Dra. Alejandra Castilla León)
- Unidad de Protegenómica (M. en C. Adriana González Gallardo)
- Microscopía (M en C. Elsa Nydia Hernández Ríos)
- Análisis conductual (Dra. Deisy Gasca Martínez)
- Asistencia técnica a la M. en C. Azucena Aguilar Vázquez.

Agradezco de manera específica al Departamento del Desarrollo y Neurofisiología y al Departamento de Neurobiología Celular y molecular del Instituto de Neurobiología, pero en específico a los laboratorios de Neuromorfometría a cargo de la Dra. Sofía Y. Díaz Miranda y al laboratorio de Comunicación intercelular y Neurotransmisión a cargo del Dr. José de Jesús García Colunga por permitirme formar parte de sus equipos de trabajo, así como usar todas las herramientas que me fueron proporcionadas.

Agradecimientos Personales

A la Dra. Sofía Y. Díaz Miranda y al Dr. José de Jesús García Colunga por brindarme su confianza y apoyo para la realización de mi trabajo de investigación y por facilitarme todas las herramientas necesarias para el desarrollo de los protocolos. Gracias Doctores por abrirme las puertas de sus laboratorios, por formar parte de mi formación profesional, por sus asesorías personales y por compartirme su conocimiento. Gracias Dra. Sofía por su apoyo, sus consejos, sus pláticas y su energía positiva que contagia a todos.

También agradezco al Dr. Luis Oskar Rojas por aceptarme en sus seminarios los cuales enriquecieron mi conocimiento y por haberme permitido presentar ante su laboratorio, ya que esto ayudo sumamente para la mejora del presente trabajo.

Agradezco a mis compañeros del Instituto de Neurobiología, Dra. Erika Orta, Dr. Isaac Vargas, M. Sc. Andy Brian Hernández Abrego, Jesús Andrade y Oswaldo por su amistad, por su apoyo, guía, conocimiento y buenos momentos.

Por supuesto, no puedo dejar de expresar mi profundo agradecimiento hacia mi familia y seres queridos a lo largo de estos dos años. Los logros alcanzados en este tiempo son el resultado de un esfuerzo conjunto, tanto de ellos como míos.

Agradezco de manera especial a mis amigos personales por su inquebrantable apoyo. Siempre estuvieron dispuestos a escucharme cuando más los necesitaba, acompañándome en momentos difíciles y brindándome valiosos consejos. Quiero extender un agradecimiento especial a Emilio Sánchez, quien nunca dudó en estar a mi lado, ofreciéndome innumerables consejos y respaldo incondicional.

Mis padres merecen un reconocimiento especial por su comprensión y por el incansable esfuerzo que realizan día tras día para proporcionar apoyo y sustento a nuestra familia. No tengo palabras suficientes para expresar mi gratitud por ese sacrificio constante. Agradezco también a mi hermana Andrea por siempre escucharme y aconsejarme y a Roberto por su amistad.

Por último, un agradecimiento muy especial a todos mis abuelos por acogerme muchas veces en sus hogares, pero en específico a mi abuela Elvira Araujo por permitirme estar a su lado y acompañarme a lo largo de este viaje.

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa y el tipo más común de demencia, caracterizada por deterioro cognitivo. Sus dos características histopatológicas principales son placas neuríticas compuestas por el péptido β -amiloide de 42 aminoácidos ($A\beta_{1-42}$) y ovillos neurofibrilares. Se ha demostrado que los oligómeros de β -amiloide ($\alpha\beta$) son más tóxicos que las placas neuríticas debido a sus interacciones con otras moléculas. Además de sus dos características principales, algunos elementos del sistema colinérgico también se ven afectados. Por ejemplo, la unión entre $\alpha\beta$ y el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$) es de gran importancia. El $\alpha 7nAChR$ desempeña un papel crítico en el aprendizaje y la memoria, y su interacción con $\alpha\beta$ se regula a la baja durante la patología. Amylovis es un derivado de naftaleno que se une a $A\beta_{1-42}$ e inhibe su oligomerización y agregación, dificultando su unión a otras moléculas. Amylovis se une a $A\beta$ y evita su oligomerización y la formación de placas de amiloide. Además, se une al péptido en la misma región en la que $A\beta_{1-42}$ se une a $\alpha 7nAChR$.

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de Amylovis en el aprendizaje y la memoria, así como en la expresión y función de la proteína $\alpha 7nAChR$. Utilizamos el modelo de triple transgénico (3xTg-AD). Se utilizaron un total de 40 ratones hembra de 4 meses de edad (3xTg-AD $n=20$, NoTg $n=20$), y cada grupo se dividió en un grupo sin tratamiento y un grupo de tratamiento. Se administró Amylovis durante ocho semanas a una dosis diaria de 1 mg/kg de peso corporal. Al final de la administración, evaluamos el aprendizaje espacial y la memoria de los animales mediante la tarea del laberinto de Barnes y los comparamos con los controles tratados. Después de la tarea cognitiva, realizamos un análisis de proteínas mediante Western Blot en una SDS-PAGE del hipocampo. Para el análisis de la modulación nicotínica, utilizamos la técnica de Patch Clamp en interneuronas de CA1 del hipocampo de ratones hembra 3xTg-AD de 6 meses de edad. Para evaluar el efecto de Amylovis, preincubamos las rebanadas durante 2 horas o agregamos Amylovis a 1 μM al baño.

En la evaluación conductual, encontramos déficits en los ratones 3xTg no tratados, pero una mejora en los días de entrenamiento y en el día de retención de los animales tratados con Amylovis. Esto demuestra el efecto beneficioso de Amylovis en el aprendizaje y la memoria. Para dilucidar el mecanismo por el cual esto ocurrió, evaluamos cambios en la expresión de $\alpha 7nAChR$ después del tratamiento con Amylovis en el hipocampo. Sin embargo, no encontramos ninguna diferencia entre los grupos. No obstante, cuando evaluamos la función de $\alpha 7nAChR$, encontramos que Amylovis influye en las corrientes producidas por este receptor, lo que puede deberse a su capacidad para prevenir la interacción de $A\beta$ con los receptores nicotínicos.

Palabras claves: β -Amiloide, Receptores nicotínicos, Alzheimer

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease and the most common type of dementia, characterized by cognitive impairment. Its two major histopathological features are neuritic plaques composed of β -amyloid peptide of 42 amino acids ($A\beta_{1-42}$) and neurofibrillary tangles. β -amyloid oligomers ($\alpha A\beta$) have been proven to be more toxic than neuritic plaques due to their interactions with other molecules. In addition to its two main features, some elements of the cholinergic system are also affected. For instance, the binding between $\alpha A\beta$ and the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7nAChR$) is of great importance. The $\alpha 7nAChR$ plays a critical role in learning and memory, and its interaction with $\alpha A\beta$ is downregulated during the pathology. Amylovis is a naphthalene derivative that binds to $A\beta_{1-42}$ and inhibits its oligomerization and aggregation, hindering its binding with other molecules. Amylovis binds to $A\beta$ and prevents its oligomerization and the formation of amyloid plaques. Additionally, it binds to the peptide in the same region that $A\beta_{1-42}$ binds to the $\alpha 7nAChR$.

The aim of this study was to analyze the effect of Amylovis on learning and memory, as well as on the protein expression and function of $\alpha 7nAChR$. We used the triple transgenic model (3xTg-AD). A total of 40 4-month-old female mice (3xTg-AD $n=20$, NoTg $n=20$) were used, and each group was divided into a no-treatment and a treatment group. Amylovis was administered for eight weeks at a daily dose of 1mg/kg of body weight. At the end of the administration, we assessed the spatial learning and memory of the animals using the Barnes maze task and compared the treated animals with their controls. After the cognitive task, we conducted a protein analysis by Western Blot on an SDS-Page of the hippocampus. For the analysis of nicotinic modulation, we used the Patch Clamp technique in interneurons of CA1 of the hippocampus of 6-month-old female 3xTg-AD mice. To assess the effect of Amylovis, we pre-incubated the slices for 2 hours or added Amylovis at 1 μM to the bath.

In the behavioral assessment, we found deficits in the non-treated 3xTg mice but an improvement in the training days and in the retention day of the animals treated with Amylovis. This demonstrates the beneficial effect of Amylovis on learning and memory. To elucidate the mechanism by which this occurred, we evaluated changes in the expression of $\alpha 7nAChR$ after treatment with Amylovis in the hippocampus. However, we didn't find any difference between the groups. Nevertheless, when we assessed the function of $\alpha 7nAChR$, we found that Amylovis influences the currents produced by this receptor, which may be due to its ability to prevent the interaction of $A\beta$ with nicotinic receptors.

Key word: β -Amyloid, nicotinic receptors, Alzheimer

Índice

GLOSARIO.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. ANTECEDENTES.....	12
2.1 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	12
2.2. MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS DE LA EA.....	12
2.2.1. <i>Tau hiperfosforilada</i>	12
2.2.2. <i>Péptido β-amiloide: monómeros, oligómeros, y placas</i>	13
2.2.3. <i>Neurodegeneración colinérgica</i>	16
2.3. RECEPTORES DE ACETILCOLINA.....	18
2.3.1. <i>Receptor nicotínico: $\alpha 7$</i>	20
2.3.2. <i>Unión de $\alpha 7$-nAChR con el péptido $A\beta$</i>	21
2.3.3. <i>Expresión de $\alpha 7$ en la EA</i>	23
2.4. REGIONES DE IMPORTANCIA.....	26
2.4.1. FORMACIÓN HIPOCAMPAL.....	26
2.5. TRATAMIENTOS ACTUALES PARA LA EA.....	28
2.5.1. <i>Tratamientos contra el sistema colinérgico</i>	28
2.5.2. <i>Tratamientos contra el péptido $A\beta$</i>	29
2.6. AMYLOVIS.....	30
2.7. MODELOS DE MURINOS PARA LA EA.....	31
2.7.1. <i>Modelos con placas extracelulares</i>	31
2.7.2. <i>Modelos que expresan marañas neurofibrilares</i>	32
2.7.3. <i>Modelos que expresan placas y marañas</i>	32
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVOS.....	34
5.2. OBJETIVOS GENERALES.....	34
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
6. METODOLOGÍA.....	34
6.1. ANIMALES.....	34
6.2. ADMINISTRACIÓN.....	35
6.3. LABERINTO DE BARNES.....	36
6.4. GENOTIPIFICACIÓN.....	37
6.5. OBTENCIÓN DE HIPOCAMPO.....	38
6.6. NIVELES DE LA SUBUNIDAD A-7.....	38
6.6.1. <i>Obtención de proteínas</i>	38
6.6.2. <i>Cuantificación de proteínas</i>	39
6.6.3. <i>Preparación de muestras</i>	39
6.6.4. <i>Electroforesis SDS</i>	39
6.6.5. <i>Transferencia</i>	39
6.6.6. <i>Revelado</i>	40
6.7. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	41

6.8.	ESTADÍSTICA	42
7.	RESULTADOS.....	42
7.1.	ADMINISTRACIÓN	42
7.1.1.	<i>Amylovis no afectó el peso de los ratones.....</i>	42
7.2.	LABERINTO DE BARNES	43
7.2.1.	<i>Amylovis mejora la memoria y aprendizaje del 3xTg-AD en el laberinto de Barnes</i>	43
7.3.	WESTERN BLOT	45
7.3.1.	<i>No se encuentran diferencias en la cantidad relativa de la subunidad $\alpha 7$</i>	45
7.4.	ELECTROFISIOLOGÍA	46
7.4.1.	<i>Amylovis aumenta la respuesta de receptores nicotínicos</i>	46
7.5.	GENOTIPIFICACIÓN	49
8.	DISCUSIÓN	49
9.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	54
10.	REFERENCIAS.....	56

GLOSARIO

3xTg-AD	Modelo triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer
α-BGT	α -bungarotoxina
Aβ	β -amiloide
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AChT	Acetiltransferasa
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
APH-1	Proteína faríngea defectiva 1
APOE	Receptor de apolipoproteína E
CHT1	Transportador de Colina
EA	Enfermedad de Alzheimer
FDA	Food Drug Administration
FPRL1	Receptor formil peptídico tipo 1
MARK	Quinasa regulada por la afinidad al microtúbulo
mEPSCs	Corrientes posinápticas excitadoras miniatura
MLA	Metilcaconitina
nAChR	Receptores de acetilcolina nicotínicos
NBM	Núcleo Basal de Meynert
NoTg	No transgénicos
NRSF	Factor silenciador restrictivo neuronal
LRP	Lipoproteína de baja densidad
LTP	Potenciación a largo plazo
LTD	Depresión a largo plazo
PPA	Proteína precursora amiloide
PTP	Potenciación post-tetánica
PSA	Persulfato amónico
PSEN1	Presinilina 1
RE	Retículo endoplásmico

REST	Factor de transcripción silenciador del elemento represor 1
SDS	Sodio duodecil Sulfato
SNC	Sistema Nervioso Central
Sb	Subiculum
sIPSC	Corrientes posinápticas inhibitorias espontáneas
SLM	Stratum Locomosum-Moleculare
SO	Stratum Oriens
SR	Stratum Radiatum
STP	Potenciación de corto plazo
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TTBK	Quinasa Tau-tubulina
TTX	Tetrodotoxina
VACHT	Transportador vesicular de acetilcolina

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que afecta progresivamente la memoria, el pensamiento y la habilidad para realizar actividades de la vida diaria, es el tipo de demencia más común el cual por su alta incidencia supone un problema mundial de salud y económica (Livingston et al., 2020; Sosa-Ortiz et al., 2019). La fisiopatología de la enfermedad se centra en las marañas neurofibrilares (MNFs) constituidas de la proteína Tau, las placas extracelulares por el péptido beta amiloide ($A\beta$) y el deterioro al sistema colinérgico. En este último, hay disminución de las neuronas colinérgicas y del neurotransmisor de acetilcolina (ACh) asociado a la desregulación de la expresión y función de sus receptores nicotínicos, en particular la subunidad $\alpha 7$ que juegan un papel importante en los procesos de plasticidad sináptica y en la cognición (Fabiani & Antollini, 2019; Xia et al., 2021). Durante la patología estos receptores se ven afectados debido a que el péptido $A\beta$ pueden unírseles formando un complejo $A\beta$ - $\alpha 7nAChR$ el cual bloquea la función del receptor (modificando su expresión) y llevando a una pérdida de la transmisión sináptica y declives cognitivos (Lombardo & Maskos, 2015; Puzzo et al., 2012).

Por otra parte, los fármacos que se encuentran disponibles en el mercado solo ayudan a aliviar algunos síntomas, pero no modifican el curso de la enfermedad. El compuesto Amylovis es un derivado naftaleno capaz de unirse a péptidos y fibrillas $A\beta$, el cual se ha demostrado impide la formación de placas extracelulares y mejora la cognición en el modelo murino que desarrolla la patología (3xTg-AD), este compuesto al unirse al péptido $A\beta$ en etapas tempranas de la patología podría impedir la formación del complejo $A\beta$ - $\alpha 7nAChR$ y así prevenir las consecuencias que esto conlleva (Folch et al., 2016; Rivera-Marrero et al., 2020).

En este trabajo se planteó utilizar al modelo 3xTg-AD, que desarrolla la fisiopatología de la EA porque presenta deterioros en la transmisión sináptica desde etapas presintomáticas. La administración oral del compuesto Amylovis se propone como un agente terapéutico dada su capacidad de evitar plegamientos incorrectos o agregación de proteínas. En los animales tratados (durante 8 semanas) se evaluó su desempeño en la tarea de aprendizaje y memoria de tipo espacial. Después de la prueba conductual, de estos animales tratados, se obtuvieron los cerebros y por medio de Western Blot se observó si existen modificaciones en la cantidad de los receptores $\alpha 7$ en el hipocampo (que regula esta conducta). Además, se evaluó in vitro, en esta misma región, las corrientes iónicas inducidas por estos receptores en presencia del compuesto Amylovis.

2. ANTECEDENTES

2.1 La enfermedad de Alzheimer

La EA es un padecimiento crónico, neurodegenerativo irreversible y considerado la principal forma de demencia, se presenta después de los 60 años y aumenta conforme la edad. Según datos de la organización mundial de la salud (OMS) afecta a 47 millones de personas y se estima que este número llegue a 132 millones para el año 2050 (Stanciu et al., 2021). En México se calculan 13 millones de adultos mayores y de éstos 1.5 millones cursan con la EA, cuya prevalencia es del 7.3% (Reyna et al., 2014). Además, y considerando que la pirámide de envejecimiento poblacional en México va en aumento, se calcula que para el año 2050 uno de cada 4 mexicanos será mayores de 60 años (Sosa-Ortiz et al., 2019) por lo que la cifra podría llegar a 3.5 millones de casos en el país (Reyna et al., 2014).

Este padecimiento se caracteriza por un declive cognitivo que provoca alteraciones en la memoria, el pensamiento, la conducta, la orientación y el juicio, lo que a su vez desemboca en problemas de la vida cotidiana que llevarán a la pérdida de la independencia y necesidad de asistencia, lo cual implica una pesada carga económica y social (Gutiérrez et al., 2017)

La fisiopatología cerebral de la EA se caracteriza por los depósitos de proteínas β -amiloide ($A\beta$) que terminan en la formación de placas, la proteína Tau hiperfosforilada que forma MNFs intracelulares (Gutiérrez et al., 2017) y el daño en el sistema colinérgico.

2.2. Marcadores histopatológicos de la EA

2.2.1. *Tau hiperfosforilada*

La proteína Tau tiene el rol fisiológico de unirse a los microtúbulos axonales para estabilizarlos. Esta proteína durante la patología los procesos de fosforilación se ven alterados y provocan su hiperfosforilación. Este fenómeno ocasiona desensambles en los microtúbulos de la proteína Tau hiperfosforilada y provoca su desestabilización. Por otro lado, la proteína Tau hiperfosforilada se pliega mal y se ensambla entre sí formando estructuras filamentosas conocidas como filamentos pareados helicoidales, los cuales tienden a agregarse en formas insolubles neurofibrilares. Estos sucesos tienen como consecuencia daños estructurales en la célula que interfieren con el transporte axonal y llevan a la muerte celular y neurodegeneración (Calabrò et al., 2021; Liu et al., 2019).

La proteína Tau es fosforilada por diversas enzimas, entre las más importantes se encuentran: quinasa sintasa de glucógeno 3 (GSK3, por sus siglas en inglés), la cual fosforila hasta 15 residuos de la proteína, quinasa tau-tubulina (TTBK, por sus siglas en inglés) y quinasa regulada por la afinidad al microtúbulo (MARK, por sus siglas en inglés) (Xia et al., 2021).

Se han propuesto diversos mecanismos por los cuales GSK3 es activada, provocando la hiperfosforilación de Tau, por ejemplo, la promoción del Ca^{2+} intracelular que induce la disfunción mitocondrial y estrés del retículo endoplásmico (RE), la unión del péptido A β con el receptor n $\alpha 7$ nAChR, que induce también la fosforilación de Tau y la vuelve susceptible a la subsecuente acción de la GSK3 (Asik et al., 2021).

La proteína Tau hiperfosforilada media la neurodegeneración, esto ocurre por la unión de ésta con las proteínas de asociación al microtúbulo (MAP1 y MAP2), que actúan disrumpiendo el ensamblado de los microtúbulos y provocando alteración de la membrana (zeiosis) que finalmente llega a la neurodegeneración. Los niveles de Tau hiperfosforilada incrementan en neuronas con la progresión de la enfermedad lo que provoca la desestabilización de los microtúbulos y lleva a daños en los componentes del citoesqueleto e induce la neurodegeneración (Calabrò et al., 2021; Xia et al., 2021).

Se ha observado que la citotoxicidad de los oligómeros A β es promovida por la proteína Tau, y que por otro lado A β dispara la patología de Tau, actuando ambas de forma sinérgica promueven la patología de la EA (Asik et al., 2021).

2.2.2. Péptido β -amiloide: monómeros, oligómeros, y placas

La agregación o plegamiento incorrecto del péptico beta amiloide (A β), conduce a la formación de especies tóxicas. En el caso de la EA, ésta proviene de la proteína transmembrana precursora de amiloide PPA (695 a 770 aminoácidos), que en condiciones patológicas es escindida por dos proteasas (Figura 1). La A β constituye una familia de moléculas que contienen secuencias peptídicas de 39 a 43 aminoácidos, siendo la más tóxica la de 42 aminoácidos, es decir A β_{1-42} . En condiciones fisiológicas, los monómeros de A β son solubles, pero en condiciones patológicas su conformación cambia a lámina plegada. Los monómeros se pliegan de manera incorrecta, se auto agregan y dan origen a agregados tóxicos. En este proceso, junto con la agregación de A β , se pueden encontrar intermediarios neurotóxicos como oligómeros no fibrilares pequeños, solubles y difusibles (las protofibrillas) amilo esferoidales y fibras amiloides, que en conjunto dan origen a las

placas amiloides. Por lo tanto, la hipótesis amiloide expone que los depósitos extracelulares en forma de placas amiloides son los principales responsables de la patología (Liu et al., 2019). Así, el cambio en la conformación de la beta amiloide ($A\beta$), forma los agregados tóxicos que tienen un efecto neurodegenerativo. En roedores la concentración del péptido $A\beta$ se encuentra en picomoles y en humanos, en específico los péptidos $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$, se encuentran en el líquido cefalorraquídeo alrededor de 1500 pM y de 200 pM respectivamente. Sin embargo, en estados patológicos, como en la EA, estas concentraciones incrementan facilitando su agregación y toxicidad neuronal (Puzzo & Arancio, 2013).

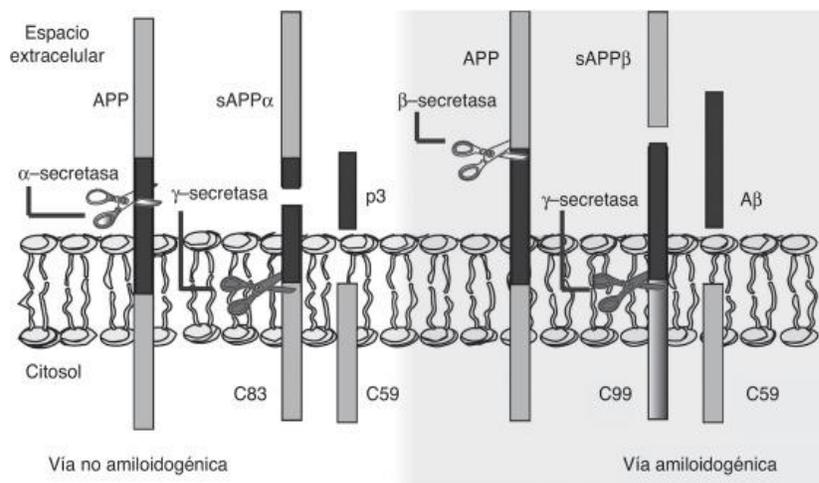


Figura 1. Vía amiloidogénica y no amiloidogénica, imagen obtenida de (Rius-Pérez et al., 2018)

La *PPA* pertenece a la familia tipo I de proteínas de membrana la cual cuenta con un dominio extracelular largo y un dominio citoplasmático pequeño. Existen dos vías para el corte de ésta la vía no amiloidogénica en la cual ocurre el corte por medio de una enzima, la α -secretasa, formando un péptido soluble, sin embargo, la segunda, la amiloidogénica, se da por el corte de dos secretasas, la enzima de escisión de *PPA* en el sitio β (BACE1) que primero hace un corte formando un fragmento C-terminal que queda unido a la membrana y posteriormente el complejo de la γ -secretasa, formado por la presenilina 1 y 2 (*PSEN1* y *PSEN2*), la nicastrina y la proteína faríngea-defectiva anterior 1 (*APH-1*), realiza el corte del fragmento adherido a la membrana formando segmentos insolubles $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ (Figura 1). Estas formas insolubles que en un principio de la patología tienden a internalizarse y encontrarse de manera intracelular (Liu et al., 2019) después comienzan a agregarse y formar oligómeros o fibrillas. Además, estos oligómeros y protofibrillas

desencadenan eventos posteriores de la patología como la hiperfosforilación de Tau, la desregulación de la homeostasis del calcio, fallas sinápticas, cognitivas, la alteración de la proteasoma, disfunción mitocondrial, microgliosis, astrogliosis y estrés al RE (Asik et al., 2021; Mohandas, 2009).

Se tiene amplia evidencia que propone que la toxicidad de A β es dada por las formas solubles y fibrilares del péptido A β más allá que por las placas que se observan en estadios tardíos de la enfermedad (Asik et al., 2021; Calabrò et al., 2021).

La unión del péptido A β con diversas estructuras neuronales puede explicar el daño neuronal y celular subsecuentes que ocurren a inicios de la patología. Alrededor del 60% de esta unión se da por interacciones hidrofílicas de los residuos D1-K16 del péptido a otras proteínas del medio, además por esta región, en específico por el aminoácido K16 se da la unión con otros péptidos A β ocurriendo la formación de oligómeros y fibrillas que llevan a las placas extracelulares (Espinoza-Fonseca, 2004b; Lührs et al., 2005).

Entre los eventos que desencadena el péptido A β en sus diferentes formas esta además de la hiperfosforilación de Tau, el estrés del RE, la disrupción en la homeostasis de calcio, disfunción mitocondrial, microgliosis, astrogliosis e inflamación eventos que llevan a la muerte neuronal (LaFerla et al., 2007; T. Yang et al., 2017).

Es importante recalcar que el péptido A β en etapas tempranas de la EA se encuentra de forma intracelular, y que para ser internalizada requiere de diferentes receptores como el de lipoproteínas de baja densidad (LRP), receptor de apolipoproteína E (APOE), receptor formil peptídico tipo 1 FPRL1 y el receptor de acetilcolina nicotínico $\alpha 7$ (Asik et al., 2021; Sharma et al., 2021). Se ha observado que ratones jóvenes 3xTg-AD acumulan más A β soluble y en forma de oligómeros de manera intracelular y mientras se alcanza una edad más avanzada el A β interneuronal disminuye y las placas extracelulares aumentan. Estos cambios se han observado en pacientes con EA, los cuales en etapas tempranas de la patología presentan A β intraneuronal de forma más abundante y con el progreso de la enfermedad se presenta de forma extracelular, concomitante con la muerte y lisis neuronal (LaFerla et al., 2007). Las consecuencias de A β internalizado son muy variadas, pero se ha visto que actúa como inhibidor de la proteasoma, interfiere con algunas enzimas de la cadena respiratoria dentro de la mitocondria y provoca déficits en la transmisión sináptica, específicamente en el LTP (LaFerla et al., 2007).

2.2.3. Neurodegeneración colinérgica

La ACh fue el primer neurotransmisor en ser identificado, es sintetizado por la enzima acetiltransferasa (AChT) a partir de la colina y de la acetil-coenzima A (acetil-CoA) y transportada a las vesículas sinápticas por el transportador vesicular de acetilcolina (VAChT por sus siglas en inglés). Al despolarizarse las neuronas colinérgicas, la ACh es liberada de las vesículas sinápticas al espacio sináptico donde activa a sus receptores nicotínicos o muscarínicos y además la ACh puede ser inactivada de manera rápida por su enzima degradadora, la acetilcolinesterasa (AChE) que al romper la acetilcolina forma colina, que es recapturada por el transportador de colina (CHT1) en la neurona presináptica (Ferreira-Vieira et al., 2016; Hampel et al., 2018)(Figura 2).

El sistema colinérgico juega un papel fisiológico significativo en procesos de memoria, aprendizaje, atención, estrés, sueño y recepción de información sensorial (Terry & Buccafusco, 2003; Ferreira-Vieira et al., 2016). La ACh es importante para el proceso de la memoria a largo plazo, desde la adquisición, decodificación, consolidación hasta la reconsolidación y extinción (Ferreira-Vieira et al., 2016). Los déficits en la transmisión colinérgica tienen relación con los procesos cognitivos y conductuales, así como en el procesamiento de la información en el hipocampo y la interrupción de inervaciones colinérgicas a la corteza, está relacionado con deficiencias en la atención (Koulousakis et al., 2019). Además, el uso de agonistas al sistema colinérgico tiene un efecto positivo en la memoria y aprendizaje, mientras que el uso de antagonistas tiene el efecto opuesto (Hampel et al., 2018; Albuquerque et al., 2009).

Partiendo de los datos anteriores e investigando la síntesis de diversos neurotransmisores, fue como dos grupos de investigadores de manera simultánea en 1976, reportaron que la EA, se asociaba con la pérdida severa de los marcadores colinérgicos en la corteza cerebral y propusieron el deterioro colinérgico, ellos se dieron cuenta que la actividad de la enzima acetiltransferasa, se encontraba disminuida en cerebros con la EA y por ende también las concentraciones de ACh (Bowen et al., 1976; Davies & Maloney, 1976).

Tomado en consideración las fallas en este sistema, la mayoría de las terapias farmacológicas actualmente aprobadas por la FDA: conocidas como tacrina, donepecilo, rivastigmina y galantamina (Terry & Buccafusco, 2003), estos fármacos buscan aumentar los niveles de la ACh mediante la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y aunque han demostrado una eficacia clínica por su administración constante, sin embargo, su efecto es modesto contra el deterioro cognitivo (Lanctôt et al., 2003).

Han sido numerosas las investigaciones a nivel experimental, centradas en el estudio del papel del sistema colinérgico, en donde se ha demostrado que las sinapsis colinérgicas se ven afectadas por los oligómeros A β y que las neuronas más afectadas son las que se encuentran en el Núcleo Basal de Meynert (NBM) por su pérdida significativa (Ferreira-Vieira et al., 2016; Maurer & Williams, 2017). Este hecho, trae consigo la subsecuente pérdida de conexiones sinápticas colinérgicas a la corteza, al hipocampo y a la amígdala lo que contribuye al deterioro cognitivo (Maurer & Williams, 2017). El estudio de los sistemas y receptores colinérgicos del sistema nervioso central (SNC) han sido de relevancia dado por las diversas alteraciones en la trasmisión colinérgica que se integran desde el *septum*, la banda diagonal de Broca, el *pallium ventral* y el NBM, que se extiende hasta el bulbo olfatorio, corteza, amígdala e hipocampo, estructuras que se relacionan directa e indirectamente con la EA (Mesulam et al., 1983; Woolf, 1991; Yu et al., 2019).

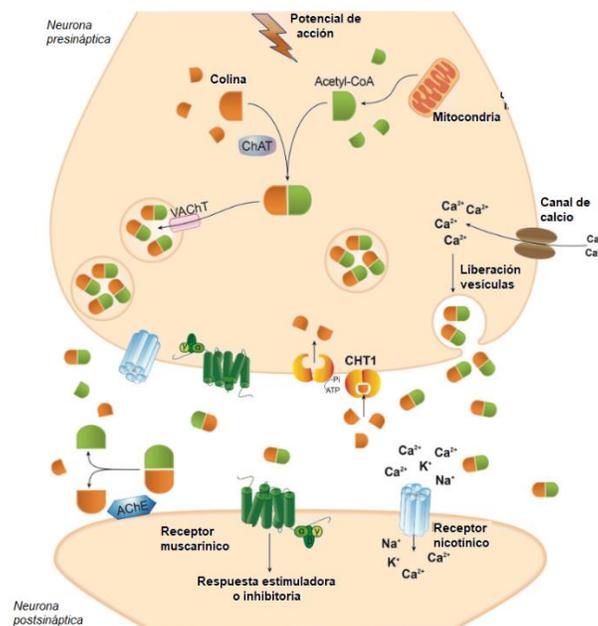


Figura 2. Representación esquemática de aspectos importantes en la neurotransmisión de acetilcolina. Adaptación (Ferreira-Vieira et al., 2016)

En el humano, el NBM se localiza en la parte posterior del procencéfalo basal (PB) y el 90% de sus neuronas son del tipo colinérgicas, y se caracterizan como multipolares, con largos axones y extensos árboles dendríticos. El declive cognitivo en la EA se relaciona a la pérdida en el número de conexiones, tamaño y función de estas neuronas en el NBM

en particular las que inervan al hipocampo, siendo una de las principales razones ligadas a ésta y otro tipo de demencias (Davies & Maloney, 1976; Koulousakis et al., 2019; Mesulam, 2004; Mesulam et al., 1983).

La pérdida de las neuronas colinérgicas está asociada a las MNFs y estas anormalidades ocurren desde etapas asintomáticas de la enfermedad. El declive de las neuronas colinérgicas trae consigo disminución en la liberación de ACh y decremento en la actividad de ChAT y de AChE (Bowen et al., 1976; Davies & Maloney, 1976; Etienne et al., 1986; Mesulam, 2004).

En el modelo murino del homocigoto para la EA, el triple transgénico (3xTg-AD) se han descrito que las alteraciones colinotrópicas que son dependientes de la edad y del sexo, son más pronunciadas en el hipocampo, en donde el péptido A β se desarrolla primero (Orta-Salazar, Cuellar-Lemus, et al., 2014). Además, existe un decremento en la expresión de la enzima ChAT en la corteza motora, hipocampo y NBM explicado por el incremento de la expresión del factor de transcripción silenciador del elemento represor 1 (REST, por sus siglas en inglés) y el factor silenciador restrictivo neuronal (NRSF, por sus siglas en inglés). Lo anterior es consistente con la reducción de las fibras que proyectan del NBM a la corteza motora e hipocampo del 3xTg-AD (Orta-Salazar, et al., 2014).

En la EA se ha sugerido una disfunción de receptores de ACh; los muscarínicos y nicotínicos. Además, la acumulación del péptido A β en etapas tempranas de la patología podría suprimir la liberación de ACh, así como interferir con la señalización colinérgica a través de sus receptores como se describe más adelante. Así mismo, durante la patología se ha observado un decremento en la expresión de ambos receptores (muscarínicos y nicotínicos) (Ferreira-Vieira et al., 2016; Terry & Buccafusco, 2003).

2.3. Receptores de Acetilcolina

Los receptores de ACh se dividen en dos tipos, los muscarínicos metabotrópicos que son receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G, fosfolipasas o adenilato ciclasa y los receptores nicotínicos (nAChR) que reciben su nombre porque además de ser activados por ACh la nicotina es uno de sus principales agonistas (Albuquerque et al., 2009), éstos son del tipo ionotrópico rápido selectivos a cationes (K⁺, Na⁺, Ca²⁺) (Ferreira-Vieira et al., 2016).

Los receptores muscarínicos se dividen en cinco tipos diferentes M1-M5 que son categorizados en dos grupos: la subfamilia tipo M1 (M1, M3 y M5) que esta acoplada a proteína G α q/11 la cual causa la activación de la fosfolipasa C que resulta en la movilización de Ca²⁺ intracelular y la activación de proteína quinasas C y la subfamilia inhibitoria tipo M2

(M2 y M4) acoplada a la proteína Gi/o que inhibe el adenilato ciclasa y reduce los niveles de cAMP citosólico. Estos receptores juegan papeles importantes la regulación de procesos sensoriales, motores y autonómicos, pero además en algunos procesos de aprendizaje y memoria (Ahmed et al., 2016; Chen et al., 2022). En la EA se ha observado que estos receptores juegan papeles en el procesamiento de la APP, los tipos M1 y M3 modifican la vía no amiloidogénica, mientras que los tipos M2 y M4 promueven la vía amiloidogénica (Ahmed et al., 2016).

Por otro lado, para los receptores nicotínicos existen 16 subunidades estructuralmente homólogas (Ma & Qian, 2019) (α 1- α 10 excepto α 8, β 1- β 4, δ , γ y ϵ) las cuales contienen 1) un dominio extracelular NH₂- terminal, 2) tres dominios transmembranales, 3) un bucle o lazo citoplasmático y 4) un cuarto dominio transmembranal (Albuquerque et al., 2009), todo esto en conjunto forma el poro selectivo para cationes y con la combinación de estas subunidades se pueden diferenciar a los nAChR en musculares o neuronales (Ferreira-Vieira et al., 2016).

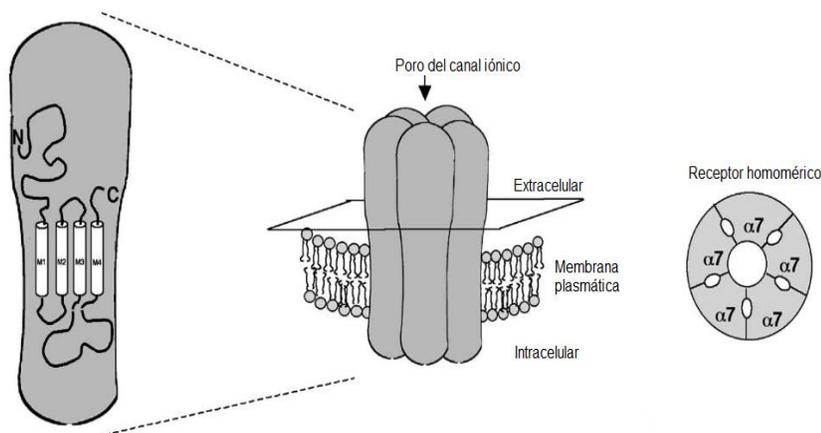


Figura 3. Representación del receptor nicotínico homomérico alfa 7. Adaptación de figura en (Gotti & Clementi, 2004)

La estructura de los nAChR en el músculo está dada por la combinación de cinco diferentes subunidades: dos de éstas en: α 1 y tres no alfa (β 1, δ , γ y ϵ). Además, en el SNC se encuentran receptores homoméricos compuestos únicamente por alfa (α 2- α 10) y heteroméricos compuestos por la combinación de subunidades alfa y beta (β 2- β 4).

El sitio de unión del ligando se encuentra en las subunidades α y su subunidad trasera adyacente, es importante recalcar que el sitio de unión de la subunidad alfa, al que se conoce por sitio positivo, determina la afinidad por el ligando, mientras el sitio de la subunidad adyacente (negativo), determina la selectividad del ligando. La unión del ligando

al receptor provocará un cambio conformacional de la proteína que permitirá la apertura del canal iónico (Albuquerque et al., 2009).

Los receptores nicotínicos en el SNC se pueden encontrar tanto en el soma, como en la sinapsis y en el axón (Hurst et al., 2013), sin embargo aquellos localizados en la presinapsis juegan un papel fundamental ya que debido a su gran permeabilidad a Ca^{2+} facilitan la liberación de diversos neurotransmisores como: GABA, dopamina, serotonina, norepinefrina, ACh y glutamato, siendo este último de gran importancia porque el rol de la ACh en la memoria y aprendizaje está relacionada con la regulación de la transmisión de glutamato (Ferreira-Vieira et al., 2016). Los receptores nicotínicos más importantes a nivel del SNC son el receptor homoméricos $\alpha 7$ (Figura 3) y heteroméricos $\alpha 4\beta 2$ debido a que estos son los que se expresan más en zonas como el hipocampo y la corteza donde juegan papeles importantes en el aprendizaje y memoria, estos receptores además se relacionan con la EA por su unión con los péptidos A β (Albuquerque et al., 2009).

2.3.1. Receptor nicotínico: $\alpha 7$

El receptor $\alpha 7$ nicotínico está conformado únicamente por subunidades $\alpha 7$ por lo cual se considera un homopentámero, y el poro que forma cuenta con residuos polares que presentan un alto nivel de ácido glutámico permitiendo una alta permeabilidad al Ca^{2+} (Albuquerque et al., 2009) (Figura 3). Este receptor puede ser activado por diversos agonistas, como la nicotina y la ACh, sin embargo ambas tienden a desensibilizarlo de forma muy rápida, por otro lado el metabolito de la ACh, la colina, se disocia rápido del receptor, lo que induce un estado desensibilizado menos estable y lo hace un mejor agonista (Albuquerque *et al.*, 2009). Además, tiene una alta afinidad por la α -bungarotoxina (α -BGT) y la metilcaconitina (MLA), ambos actúan inhibiendo al receptor, siendo por ello, sus antagonistas (Pohanka, 2012a).

En el SNC, el $\alpha 7$ -nAChR es el subtipo de receptor nicotínico que se expresa de manera amplia, en regiones relacionadas con la cognición como son: los subcampos del hipocampo (CA1, CA3) y el giro dentado en las células piramidales y en las interneuronas, así como las neuronas de las capas I y VI de la corteza (Ma & Qian, 2019; Gotti & Clementi, 2004). También, se encuentra en los núcleos NBM, y talámico reticular, así como en la sustancia negra (Ma & Qian, 2019), en el Sb, en los ganglios basales, en la corteza entorrinal y en el cerebelo (Hurst et al., 2013). Este receptor está implicado en funciones diversas (diferenciación neuronal, proliferación, apoptosis, y eliminación de células viejas), sin embargo, sus roles principales están en la plasticidad de circuitos neuronales

promoviendo la liberación de neurotransmisores (cognición, dolor, liberación de neurotransmisores) y en funciones protectoras ante la neuroinflamación (Ma & Qian, 2019).

Cuando el receptor se encuentra expresado en la neurona presináptica su función principal es modular la liberación de neurotransmisores como glutamato, norepinefrina, ACh, dopamina, GABA o glutamato, esto ocurre debido a su gran permeabilidad a Ca^{2+} , al activarse el receptor permite la entrada de Ca^{2+} a la neurona presináptica, lo que provoca la despolarización de la membrana y la movilización de vesículas a terminal sináptica generando su liberación (Kai-Ge & Yi-Hua, 2018). Se ha demostrado que la aplicación de agonistas al receptor $\alpha 7$ facilita la liberación de glutamato, ayudando a la transmisión glutamatérgica (Findley et al., 2019; Hurst et al., 2013) que a su vez conlleva al desarrollo de la memoria y aprendizaje (Ferreira-vieira, et al., 2016).

En cuanto a los receptores localizados en las neuronas posinápticas, por la despolarización que provoca la apertura del poro y entrada de Ca^{2+} se puede promover la potenciación a largo plazo en el hipocampo (Hempel et al., 2018) y provocar cambios de largo plazo en la cognición (Ma & Qian, 2019). De igual forma la permeabilidad a Ca^{2+} y la subsecuente despolarización de la membrana origina la apertura de canales iónicos de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que permite más entrada de Ca^{2+} a la célula que al activar las proteínas cinasas regulará la expresión de genes y la producción de proteínas llevando finalmente a cambios estructurales (Ma & Qian, 2019).

En cuanto a los niveles de expresión de este tipo de receptores, se sabe que cambian conforme la edad, porque se ha observado su expresión desde edades tempranas y va decreciendo, conforme avanza la edad, además en pacientes con lesiones neurodegenerativas también se encuentra disminuido (Ma & Qian, 2019).

2.3.2. Unión de $\alpha 7$ -nAChR con el péptido $A\beta$

En la EA el sistema colinérgico se encuentra afectado, en especial el NBM y el septum medial (Terry & Buccafusco, 2003) por ser susceptibles a la muerte neuronal y a la degeneración, demostrado en diversos estudios en donde las células vulnerables son aquellas que expresan al receptor $\alpha 7$ -nAChR debido a su alta afinidad con el péptido amiloide representativos de la EA (Buckingham et al., 2009; Ma & Qian, 2019; Wang et al., 2000).

Diversos autores han discutido acerca de la unión de alta afinidad que ocurre entre el péptido A β 1-40 y 1-42 con los receptores α 7 (Cecon et al., 2019; Nagele et al., 2002; Wang et al., 2000; Wang et al., 2000). Además, discuten que esta unión puede estar implicada en otros procesos celulares, por ejemplo, Terry & Buccafusco reportan un decremento de la cognición en etapas tempranas de la patología por el bloqueo del receptor con sus agonistas, y también sobre cómo esta interacción provoca que las células que expresan α 7 sirvan como blancos en la enfermedad (Terry & Buccafusco, 2003). También, se ha demostrado que el complejo α 7-A β es resistente a el uso de detergentes y se puede detectar por co-inmunoprecipitación seguida por Western Blot (Ma & Qian, 2019).

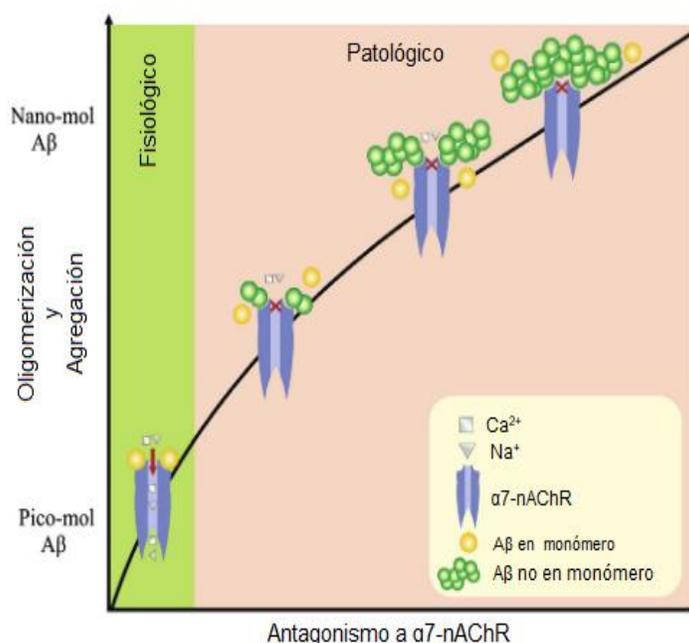


Figura 4. Representación esquemática de interacción entre α 7 y A β a diferentes concentraciones. (Sadigh-Eteghad et al., 2014).

La acumulación intracelular de A β es uno de los primeros eventos en la patología el cual puede desencadenar múltiples consecuencias como déficits en la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo, la facilitación de la hiperfosforilación de Tau, la disrupción del proteasoma y déficits en las funciones mitocondriales (Gouras et al., 2000). Se ha descrito que esta internalización se da por la vía endocítica del complejo α 7-A β , lo cual se ha demostrado por la co-localización de α 7 nAChR con el péptido β -amiloide tanto en cerebros humanos, como en cultivos celulares (Nagele et al., 2002; Wang et al., 2000; Yang et al.,

2014), esta internalización lleva a la lisis celular y a la neurodegeneración (Ma & Qian, 2019; Nagele et al., 2002).

Espinoza-Fonseca (2004a) mediante la técnica de acoplamiento molecular estudió las regiones de asociación del péptido $A\beta_{1-42}$ con los receptores $\alpha 7$, encontrando que el péptido se une de forma paralela al receptor en una región diferente a su antagonista la α -BGT, esta unión ocurre en el “loop” C del receptor, localizado cercano a el sitio del ligando, en los residuos F186-P193. Por el otro lado parece ser que para la formación y estabilidad del complejo $A\beta$ - $\alpha 7$ es necesaria la fuerza de unión de todo el péptido y esta está regulada por fuerzas hidrofóbicas e interacciones de Van der Waals (Espinoza-Fonseca, 2004a; Wang et al., 2000). Robert y colaboradores reportan las interacciones del péptido $A\beta_{1-42}$ con el receptor se dan en el loop C del receptor, en específico en los residuos R208 y E211, los cuales están conservados en el receptor $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ y muestran evidencia molecular de como el péptido $A\beta$ interactúa de manera selectiva con estos dos receptores, pero no con el $\alpha 3\beta 4$ (Roberts et al., 2021).

Diversos autores han demostrado que el péptido $A\beta_{1-42}$ pueden actuar como antagonista y como agonista al receptor $\alpha 7$, esto difiere por las concentraciones en las que se encuentre el péptido, en concentraciones bajas, incluso fisiológicas, entre los fM-pM actúan como agonistas al receptor potenciando la liberación de diversos neurotransmisores como glutamato, promoviendo la LTP y la potenciación post-tetánica (PTP). Además, se ha demostrado que tienen propiedades neuroprotectoras por la activación de diversas vías como ERK, MAPK o PI-2-K. Sin embargo, en concentraciones más elevadas (nM- μ M) actúa inhibiendo o desensibilizando al receptor (Figura 4), lo que provoca deficiencias en la liberación de neurotransmisores, en la transmisión sináptica, en la memoria y en la LTP (Buckingham et al., 2009; Findley et al., 2019; Puzzo & Arancio, 2013; Sadigh-Eteghad et al., 2014). En el modelo AD11, un modelo con privación de NGF que lleva a déficits en la función colinérgica y neurodegeneración tipo Alzheimer, a los seis meses de edad, donde el péptido $A\beta_{1-42}$ se está empezando a acumular en el CA1 se observa un decremento en la actividad sináptica por los receptores $\alpha 7$ en las terminales glutamatérgicas. Sin embargo, en el campo, CA3 que carece de péptido $A\beta_{1-42}$ en esta edad, no se observan cambios en la transmisión sináptica modulada por los receptores $\alpha 7$ entre los ratones control y los ratones del modelo AD11 (Sola et al., 2006).

2.3.3. Expresión de $\alpha 7$ en la EA

Diversos autores reportan una correlación negativa en cuanto a los niveles del péptido $A\beta$ con la expresión de receptores nAChR. El péptido $A\beta$ se acumula preferentemente donde

la expresión de los receptores $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ es alta como en el hipocampo y la corteza. Se sabe que la densidad de los receptores nicotínicos disminuye con la progresión de la EA (Hurst et al., 2013; Terry & Buccafusco, 2003).

Con el receptor $\alpha 7$ se ha encontrado que la expresión del mRNA de la subunidad $\alpha 7$ aumenta hasta un 65% en pacientes con EA, sin embargo, también se reporta reducción en los niveles de la proteína $\alpha 7$ nAChR, esto es indicativo de posibles defectos en los mecanismos postranscripcionales observados en la patología (Chu et al., 2005; Wu et al., 2006). Por otro lado, se reportan incrementos de la proteína en la periferia de pacientes con EA esporádica por Chu et al., (2005). Teaktong y colaboradores reportaron un incremento en la expresión del receptor $\alpha 7$ en astrocitos en pacientes con AD (Teaktong et al., 2003). Ren y colaboradores observaron una correlación negativa entre los niveles del péptido A β y del receptor $\alpha 7$ con un incremento en la expresión de A β en pacientes con la EA y un decremento en los niveles de expresión del receptor $\alpha 7$ (Ren et al., 2020).

Por otra parte, en modelos murinos de la enfermedad se han encontrado algunas discrepancias. En ratones transgénicos para la PPA se reporta la sobreexpresión de los receptores que prevalecen desde los 4 hasta los 19 meses de edad (D'andrea & Nagele, 2006, Ma & Qian, 2019). En el modelo 3xTg-AD se observó la reducción de los receptores $\alpha 7$ a los seis meses de edad, la cual se correlaciona con la acumulación interneuronal del péptido A β (Oddo et al., 2005), al igual que en el ratón transgénico PS1 donde se observa esta reducción en el hipocampo desde los 5 meses (Tabla 1).

Una de las explicaciones que se ha dado la disminución del receptor es que la internalización del péptido A β en etapas tempranas de la patología y que puede estar mediada por la unión con el receptor $\alpha 7$, ya que con la formación del complejo ocurre endocitosis de este. Esta internalización no solo tiene como consecuencia la disminución del receptor, sino también interferencias con la función neuronal e incrementos intracelulares de Ca²⁺ que posteriormente llevan a la activación de diferentes quinasas provocando la hiperfosforilación de la proteína Tau y la subsecuente desestabilización de microtúbulos (Oddo et al., 2005).

Tabla 1. Cambios en la expresión y cantidad de nAChR en pacientes y modelos animales de la EA

Especie	Región cerebral	Expresión del receptor	Bibliografía
Humanos			
	Hipocampo	↑ Inmunoreactividad $\alpha 7$	

Homo sapiens		Sin cambios $\alpha 4$	(Teaktong et al., 2003)
	Corteza entorrinal	\uparrow Inmunoreactividad $\alpha 7$ Sin cambios $\alpha 4$	
Homo sapiens	Leucocitos en sangre periférica	\uparrow en niveles de la proteína $\alpha 7$	(Chu et al., 2005)
Homo sapiens	Corteza temporal	\downarrow en la expresión $\alpha 7$	(Ren et al., 2020)
	Corteza frontal		
	Hipocampo		
Homo sapiens	Hipocampo	\downarrow 35% niveles de proteína $\alpha 4$ \downarrow 25% niveles de proteína $\alpha 3$ \downarrow 36% niveles de proteína $\alpha 7$ Sin cambios para subunidad $\beta 2$	(Guan et al., 2000)
	Corteza temporal	\downarrow 47% niveles de proteína $\alpha 4$ \downarrow 29% niveles de proteína $\alpha 3$ Sin cambios para subunidad $\alpha 7$ Sin cambios para subunidad $\beta 2$	
Homo sapiens	Corteza temporal	Niveles de mRNA de $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 7$ iguales Unión α -bungarotoxina /distribución de $\alpha 7$ sin cambios \downarrow Unión nicotina y epibatidina /distribución de $\alpha 3$, $\alpha 4$	(Hellstrom-Lindahl et al., 1999)
	Hipocampo	Niveles de mRNA de $\alpha 3$ y $\alpha 4$ iguales \uparrow Niveles de mRNA $\alpha 7$ \downarrow Unión α -bungarotoxina /distribución de $\alpha 7$ (25%) Unión nicotina y epibatidina /distribución de $\alpha 3$ y $\alpha 4$ iguales	
	Cerebelo	Niveles de mRNA de $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 7$ iguales \uparrow Unión α -bungarotoxina/ distribución de $\alpha 7$ (39%) Unión nicotina y epibatidina /distribución de $\alpha 3$ y $\alpha 4$ iguales	
Homo sapiens	Corteza temporal	\downarrow en la expresión $\alpha 7$ y $\alpha 4$	(Burghaus et al., 2000)
Homo sapiens	Núcleo Basal	\uparrow Niveles de mRNA $\alpha 7$ Sin cambios en $\alpha 4$	(Counts et al., 2007)
Modelos animales			
Mus musculus (<i>APP_{swe}</i>)	Piriforme, corteza retrosplenial, hipocampo, núcleo caudado, cerebelo	\uparrow Unión α -bungarotoxina/ distribución de $\alpha 7$ desde los 4 meses que perduro hasta los 17-19 meses	(Bednar et al., 2002)

	Corteza frontal y parietal	↓ Unión α -bungarotoxina/ distribución de $\alpha 7$ a los 9 y 11 meses	
	Tálamo, corteza frontal, hipocampo, núcleo caudado y tálamo	↑ Unión citisina/ distribución de $\alpha 4\beta 2$ a los 17-19 meses	
Mus musculus (<i>APP_{swe}</i>)	Hipocampo (CA1 y GD)	↑ en niveles de expresión de $\alpha 7$ a los 5 y 9 meses	(Dineley et al., 2002)
Mus musculus PS-1/ <i>APP_{swe}</i>	Hipocampo (CA1 y GD)	↑ en niveles de expresión de $\alpha 7$ a los 5 y 9 meses	
Mus musculus PS1	Hipocampo (GD)	↓ en niveles de expresión de $\alpha 7$ a los 5 meses	
Mus musculus 3xTg-AD	Hipocampo, corteza retroespinal, corteza parietal y tálamo	↓ en niveles de expresión de $\alpha 7$ a los 6 meses	(Oddo et al., 2005)
Mus musculus 3xTg-AD	Corteza frontal	Sin cambios significativos	(Elnagar et al., 2017)

Abreviaciones: 3xTg-AD= modelo triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer; *APP*= modelo contra la proteína precursora amiloide; GD= giro dentado, mRNA= ácido ribonucleico mensajero, PS1= presinilina 1.

2.4. Regiones de importancia

2.4.1. Formación Hipocampal

La formación hipocampal es una estructura en forma de caballo de mar que se divide en hipocampo propio con seis diferentes subcampos: *Cornu ammonis* (CA) 1-4, el giro dentado y el complejo del *Subiculum* (Sb), dividido en: *perisubiculum* y *parasubiculum*, éste en roedores comienza donde termina CA1 (Fröhlich, 2016).

Esta región tiene un papel importante en el sistema de memoria temporal medial, aprendizaje y navegación espacial, es por ello por lo que alteraciones en la formación hipocampal están ligadas con déficits cognitivos en la memoria y aprendizaje como los que ocurren durante demencias como de tipo Alzheimer (Alkondon & Albuquerque, 2004; Fröhlich, 2016; Yakel, 2012).

El hipocampo está integrado por un circuito trisináptico conectado entre sí. La información que viene de la corteza entorrinal es proyectada al giro dentado y a CA3 por una vía conocida como perforante, por otro lado, las células piramidales de CA3 proyectan a las células piramidales de CA1 por una vía conocida como colateral de Schaffer. Por último, las células piramidales de CA1 proyecta al subiculum y a capas profundas de la corteza entorrinal (Figura 5-B) (Fröhlich, 2016).

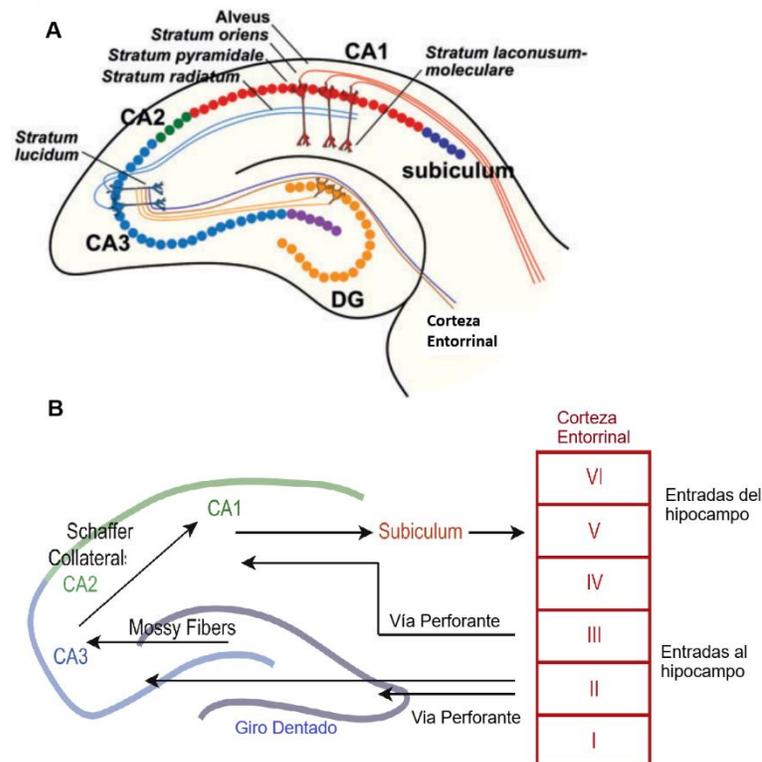


Figura 5. Estructura y vías del hipocampo. A) Estructuras del hipocampo (Modificada de: Temido-Ferreira et al., 2019). B) Circuito sináptico del hipocampo (Modificada de: Fröhlich, 2016)

Por otro lado, la estructura anatómica de los campos del hipocampo está dividida en capas: la principal formada de células piramidales, ésta se encuentra con una mayor densidad en el CA1 y menor en los CA2 y CA3. Superior a ésta se localiza el *stratum oriens* (SO) formada por las dendritas basales de las células piramidales y algunos tipos de interneuronas, por debajo de las células piramidales se encuentra el *stratum radiatum* (SR) formado por diferentes tipos de interneuronas. Por debajo del SR está el *stratum lacunosum-moleculare* (SLM) donde además de las dendritas terminales de las neuronas

piramidales del CA, contiene interneuronas de diversos tipos (Figura 5-A) (Fröhlich, 2016; Temido-Ferreira et al., 2019).

Los diferentes tipos de interneuronas que podemos encontrar en el hipocampo juegan un papel importante en la regulación de sus circuitos. Estas interneuronas son principalmente del tipo GABAérgicas, sin embargo, las hay inmunorreactivas a somatostatina, al neuropéptido Y, vasopresina y parvalbúmina (Burwell & Agster, 2008).

En las interneuronas del hipocampo, se encuentra una gran cantidad de receptores nicotínicos expresados ($\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$). Los receptores $\alpha 7$ se localizan en el SR y en el SO del CA1, mientras que los receptores heteroméricos $\alpha 4\beta 2$ en interneuronas de las capas del SO y del SLM, y solo un 28% de interneuronas del SR contienen este receptor (Alkondon & Albuquerque, 2004; Yakel, 2012).

De los receptores nicotínicos, en específico el $\alpha 7$, que se encuentra expresado en el hipocampo, se han demostrado sus roles críticos en la memoria de trabajo, espacial y de referencia. Además, diversas investigaciones han demostrado que ambos tipos de receptores ($\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$) son afectados durante patologías como Alzheimer (Yakel, 2012).

En el hipocampo los receptores $\alpha 7$ en terminales presinápticas pueden incrementar la probabilidad de producir LTP en células piramidales, además en el hipocampo los receptores nicotínicos tienen roles fundamentales en la modulación de la transmisión sináptica GABAérgica y glutamatérgica (Alkondon & Albuquerque, 2004; Yakel, 2012). Por todo lo anterior esta región es considerada de gran importancia para el presente estudio del rol de los receptores $\alpha 7$ in vitro.

2.5. Tratamientos actuales para la EA

2.5.1. Tratamientos contra el sistema colinérgico

En la actualidad, se cuenta con dos clases de fármacos aprobados por la FDA (Administración de alimentos y fármacos de Estados Unidos de América por sus siglas en inglés) para el tratamiento de la EA, por un lado la memantina es un antagonista no competitivo del receptor glutamatérgico NMDA que protege contra la excitotoxicidad provocada por la activación de estos receptores y por otro lado los inhibidores de la acetilcolinesterasa, estos fármacos actúan incrementando los niveles de ACh mediante la

Figura 5

encuentra el donepezilo, la

rivastigmina y la galantamina, sin embargo, los efectos benéficos únicamente son para tratar los síntomas cognitivos y conductuales y tienden a durar un periodo corto de tiempo,

además no revierten el curso de la enfermedad ni ralentiza su progresión (Folch et al., 2016; Lanctôt et al., 2003).

Otra estrategia que va dirigida hacia el sistema colinérgico, a través del uso de agonistas a los receptores nicotínicos (Vallés et al., 2014). Esta se empezó a desarrollar cuando observaron que la nicotina ayudaba a mejorar la memoria, aprendizaje y atención, los compuestos A-582941 (Medeiros et al., 2014), AZD0328 (Sydserff et al., 2009) y SSR180711 (Kroger et al., 2013) todos agonistas a los $\alpha 7$ nAChR demostraron incrementar la cognición en modelos con la EA. Sin embargo, las desventajas de este tipo de compuestos son que únicamente alivian de algún modo, los síntomas cognitivos y no ayudan a revertir las placas A β ni la hiperfosforilación de Tau y además pueden llevar a la sobreactivación de los receptores o a su desensibilización (Pohanka, 2012b; Vallés et al., 2014).

2.5.2. Tratamientos contra el péptido A β

Actualmente el objetivo de los tratamientos va dirigido, a disminuir los depósitos del péptido A β y por ende la formación de placas extracelulares. Por lo tanto, se están desarrollando diversas estrategias para llevar a cabo este objetivo (Folch et al., 2016; Vallés et al., 2014). Los inhibidores de las β -secretasa y γ -secretasa a pesar de poder disminuir la formación del péptido tienen efectos secundarios (Folch et al., 2016) ya que ambas enzimas participan en otros procesos, por ejemplo, la β -secretasa tiene también como sustrato una molécula importante en el proceso de mielinización de los axones (Chiang & Koo, 2014) y la γ -secretasa tiene como sustrato la proteína transmembranal *Notch* que es importante para regular la proliferación celular, desarrollo, diferenciación celular, entre otros (Imbimbo & Giardina, 2011).

Otra estrategia que ha tomado valor es la inmunoterapia amiloide de dos clases, la inmunización activa con las vacunas de los péptidos amiloides de diferentes longitudes, que han mostrado estimular las células B y T y las respuestas inmunes gracias a la activación de macrófagos (Folch et al., 2016; Scarpini et al., 2003). Ejemplos de este tipo es la vacuna AN1792 (Gilman et al., 2005), sin embargo, ésta presentó efectos adversos como inflamación cerebral. Existen otras vacunas de segunda generación que se encuentran en ensayos clínicos como CAD106, ACC-001 y ACI-24 (Panza et al., 2014; Winblad et al., 2014). La segunda clase es la inmunización pasiva la cual se basa en la administración de anticuerpos monoclonales o policlonales contra el péptido A β , sin embargo, vacunas como Bapineuzumab y solanezumab han fallado en tener suficiente eficacia en ensayos clínicos (Tayeb et al., 2013). Otra opción ha sido Aducanumab que está hecha de anticuerpos

anillos aromáticos de dos moléculas. Estos compuestos de igual forma cuentan con otras particularidades como una cadena amino-alquilo la cual les brinda carácter hidrofílico a los derivados, además de diversos grupos donares/aceptores, los cuales permitirán otro tipo de interacciones con el péptido A β como puentes de hidrógeno, interacciones electroestáticas, de Van der Waals o hidrofóbicas (Sablón-Carrazana et al., 2015).

Amylovis es una de las moléculas sintetizadas por el grupo mencionado (Figura 6) siendo su nombre químico metil 2-[[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanil]amio]etil]ditiocarbamato, y se ha demostrado que no es tóxica, además de que tiene capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y su particularidad de unirse con el péptido y fibras A β_{1-42} . Entre todos los derivados sintetizados por el grupo, Amylovis fue el que demostró una mayor estabilidad al unirse con el péptido, la energía libre de unión con el péptido y fibrillas fue de -7.4 kcal/mol y -7.7 kcal/mol respectivamente y esta unión se da con los residuos de los aminoácidos Fenilalanina 19 y 20 del péptido A β_{1-42} y los anillos aromáticos de la molécula (Rivera-Marrero et al., 2019, 2020). Resaltando que el péptido A β_{1-42} se une al $\alpha 7$ nAChR por sus residuos V12-K28, se podría hipotetizar que Amylovis, además de prevenir la formación de oligómeros y fibrillas del péptido, podría igualmente interrumpir la unión del péptido al $\alpha 7$ nAChR y así prevenir los eventos desencadenados por la formación del complejo A β_{1-42} - $\alpha 7$ nAChR.

La unión del Amylovis al péptido y fibrillas A β_{1-42} disminuye su agregación y formación de placas tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*, de igual forma en modelos *in vivo* se ha observado que es capaz de mejorar la memoria espacial y el aprendizaje del modelo 3xTg para la EA (Rivera-Marrero et al., 2020).

2.7. Modelos de murinos para la EA

El 95% de los casos de la EA son de origen esporádico relacionado a factores ambientales y genéticos y el otro 5% de los casos son de origen familiar con mutaciones en los genes de la *PSEN1*, *PSEN2* o de la *PPA* (Liu et al., 2019), a pesar de esto la mayoría de los modelos animales utilizados para investigar la EA son ratones transgénicos que expresan mutaciones asociadas con la EA de trasfondo familiar (Drummond & Wisniewski, 2017).

2.7.1. Modelos con placas extracelulares

Los primeros modelos transgénicos desarrollados expresaban una mutación en el gen *PPA* y mostraban la formación de placas, gliosis, deficiencias en la transmisión sináptica y en pruebas cognitivas, entre estos modelos se encuentran el Tg2576 que presenta la doble

mutación sueca ($APP^{K670N/M671L}$) (Hsiao et al., 1996) o el $PDAPP$ que expresa la mutación de Indiana (APP^{V717F}) (Games et al., 1995). Posteriormente se empezaron a desarrollar ratones que presentaban más de una mutación en PPA o incluso mutaciones en PPA y en $PSEN1$, el modelo J20 expresa tanto la mutación sueca como de Indiana o el modelo comúnmente usado $APP/PSEN1$ que expresa mutaciones para ambos genes estos modelos expresan la patología más severa y a edades más tempranas (Radde et al., 2006).

En general estos modelos asemejan algunas de las características relacionadas con la patología como son la formación de placas extracelulares en zonas como la corteza y el hipocampo, problemas en la transmisión sináptica y déficits cognitivos, sin embargo, ninguna desarrolla marañas neurofibrilares y neurodegeneración, además presentan la patología a edades más tempranas (Drummond & Wisniewski, 2017; LaFerla & Green, 2012; Newman et al., 2017).

2.7.2. Modelos que expresan marañas neurofibrilares

También se han desarrollado modelos transgénicos de ratones que expresan mutaciones en la proteína Tau humana, los más comúnmente usados son modelos que expresan mutaciones en P301L o en P301S, estos ratones desarrollan las marañas neurofibrilares, neurodegeneración, atrofia y déficits motores, sin embargo, esta mutación no está asociada a la EA, por ello el uso de estos modelos es limitado (Drummond & Wisniewski, 2017).

2.7.3. Modelos que expresan placas y marañas

Son limitados aquellos que logran expresar placas extracelulares amiloides y las marañas neurofibrilares de la proteína Tau, los modelos más importantes que cuentan con ambas características de la enfermedad presentan mutaciones en los genes APP y MAPT y de manera ocasional en PSEN1 O PSEN2 y así presentan ambos marcadores de la enfermedad, sin embargo, esta expresión ocurre hasta edades muy avanzadas de los modelos (Drummond & Wisniewski, 2017).

Entre todos los modelos reportados, el que es más usado y el que se considera más completo para entender la patogénesis de la enfermedad es el 3xTg-AD, este modelo fue desarrollado por Oddo y colaboradores en el 2003 a través de la microinyección de dos transgenes independientes que codificaban la mutación sueca para la APP (APP_{swe}), que es una doble mutación que resulta en la sustitución de dos aminoácidos, y la mutación P301L que codifica para la proteína Tau (Tau_{P301L}), en una célula homocigota de un embrión de ratón Knockin con la mutante $PSEN1_{M146V}$ (Oddo et al., 2003).

El 3xTg-AD presenta ambos marcadores representativos de la patología que son las placas extracelulares y las marañas de Tau hiperfosforilada. La acumulación del péptido A β es progresiva y se presenta de forma intracelular desde los 3-4 meses en la neocorteza y desde los 6 meses en CA1 del hipocampo, además los depósitos extracelulares se comienzan a observar en las capas IV y V de la corteza frontal desde los 6 meses y son completamente evidentes a los 12 meses. Los cambios en la proteína Tau hiperfosforilada son aparentes en las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo entre los 12 y 15 meses de edad (Oddo et al., 2003). En el 3xTg-AD, los depósitos intracelulares de A β se observan desde etapas tempranas en el subiculum (*Sb*) y la región CA1 del hipocampo, además estas regiones son afectadas por el péptido A β y por Tau en etapas tempranas de la patología, lo que puede verse relacionado con los primeros déficits cognitivos (Roda et al., 2020), desde los 4 meses de edad. Estas deficiencias cognitivas, preceden a la formación de placas y marañas, las primeras se manifiestan en la retención y recuperación en paradigmas basados en contextos y espacios, y con la progresión de la enfermedad a los 6 meses se muestran déficits en el aprendizaje y la memoria cuando son aludados en el laberinto de Barnes y en tareas de condicionamiento al miedo (REFs). En esta edad ya muestran defectos en la transmisión sináptica basal y deficiencias severas en la LTP en el hipocampo, donde aún no son significativas las placas extracelulares, por lo que disfunción sináptica la atribuyen a la acumulación intracelular de A β , más que a la formación de las placas (Oddo et al., 2003).

En cuanto al sistema colinérgico el modelo 3xTg-AD muestra distrofias en las proyecciones colinérgicas al hipocampo y corteza en ratones hembra de 18 a 20 meses de edad (Perez et al., 2011). En estas mismas zonas los niveles del receptor Tirosine kinasa A (TrkA) que es de alta afinidad para su ligando el factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) y que es esencial para la diferenciación, sobrevivencia y función del prosencéfalo colinérgico basal, se encuentra disminuido en hembras entre los 3 y 5 meses de edad en comparación de machos 3xTg, sin embargo en ambos sexos los niveles de este receptor están disminuidos entre los 15-18 meses a comparación con el sus controles (Pérez et al., 2011). Además, el número de neuronas positivas para ChAT en el prosencéfalo basal se encuentra disminuido entre los 3 y 18 meses en ambos sexos, demostrando una pérdida de neuronas colinérgicas relacionada con la edad en ratones 3xTg (da Cruz et al., 2012; Pérez et al., 2011).

Es de importancia mencionar que se ha encontrado dimorfismo sexual en el 3xTg-AD, las hembras empiezan a manifestar primero el péptido A β y su progresión al agregarse

de un modo más rápido en comparación con los machos. Diversos estudios donde se ha evaluado la memoria espacial, apuntan que hembras desempeñan peor la tarea del laberinto acuático de Morris y del laberinto en Y que los machos (Dennison et al., 2021).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El péptido β A se une con alta afinidad al receptor α 7 nicotínico, esto lleva a deterioros de la transmisión sináptica modulada por este receptor, así como a su disminución y al deterioro cognitivo. Por lo tanto, el compuesto Amylovis al interactuar con el péptido A β impedirá que se una al receptor α 7, recuperando sus niveles, función y retrasando el deterioro cognitivo

4. HIPÓTESIS

La administración en etapas tempranas del compuesto Amylovis en el modelo 3xTg-AD, podrá provocar su recuperación en el aprendizaje y la memoria, asociado a la función de sus receptores nicotínicos en el hipocampo.

5. OBJETIVOS

5.2. Objetivos generales

- Evaluar el efecto del tratamiento con Amylovis sobre la recuperación del aprendizaje y la memoria en ratones 3xTg-AD en etapa presintomática y compararla con los ratones WT.
- Evaluar en el hipocampo (in vitro) del modelo 3xTg-AD, el efecto de Amylovis en la cantidad del receptor α 7 nicotínico y en las corrientes moduladas por este.

5.1. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de Amylovis en la tarea de memoria espacial en el modelo 3xTg-AD.
2. Evaluar la cantidad proteica de la subunidad α 7 de nAChR, después de la administración farmacológica con Amylovis en el modelo 3xTg-AD.
3. Evaluar las corrientes modulada por α 7 nAChR en presencia del compuesto Amylovis.

6. METODOLOGÍA

6.1. Animales

Todos los procedimientos experimentales se realizaron bajo la aprobación del comité de bioética del instituto de neurobiología (INB)-UNAM y de acuerdo con la norma

oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 “especificaciones para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. En total se utilizaron 40 ratones hembra de distintas camadas de 4 meses de edad provenientes del bioterio del INB-UNAM campus Juriquilla, Querétaro, de las cepas 3xTg-AD y No transgénicos (Notg), la cual tiene el mismo fondo genético (C7BL/6) que la cepa 3xTg-AD. Entre 2 y 3 ratones se colocaron por jaula (12x12x25 cm) en el bioterio del laboratorio con agua y alimento ad libitum. Con condiciones de temperatura de 22 ± 1 °C, ciclos de luz/oscuridad 12:12 horas.

6.2. Administración

Se formaron cuatro grupos experimentales: Notg-vehículo (Notg-Vh), No transgénicos-Amylovis (Notg-Amy), 3xTg-vehículo, 3xTg-Amylovis. En total de 40 ratones hembra de 4 meses de edad divididos en 10 por cada grupo experimental, 20 animales fueron del mismo fondo genético que la cepa transgénica (NoTg) y 20 animales 3xTg-AD. Los animales según el caso fueron administrados con una solución de almidón al 0.5% (solución vehículo) o con Amylovis preparado en almidón al 0.5% para administrar a una dosis de 1 mg/kg de peso. La administración se realizó vía oral con una cánula intragástrica, una vez al día por la mañana, durante ocho semanas. Todos los roedores fueron pesados antes de la administración una vez por semana durante las ocho semanas (Figura 7).

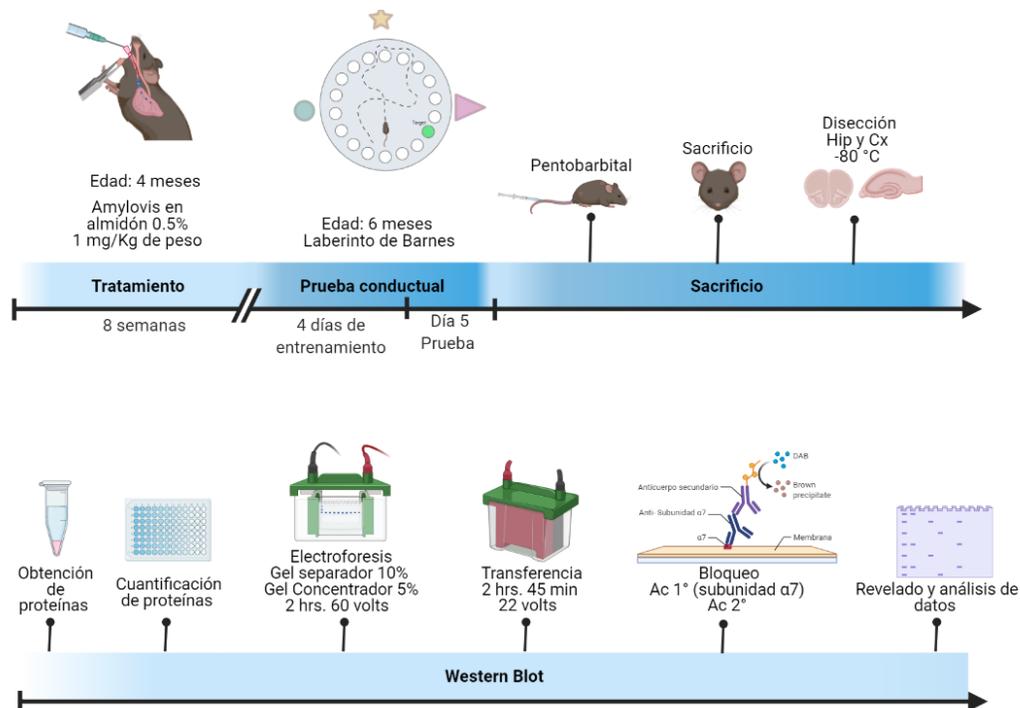


Figura 6. Esquema de metodología que se llevará a cabo para la administración, prueba conductual y Western Blot.

6.3. Laberinto de Barnes

Concluidas las ocho semanas de administración se evaluó el aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto de Barnes, este consta de una plataforma circular elevada de 91.44 cm de diámetro con 20 orificios de 5.08 cm de diámetro localizados a la periferia de la plataforma, uno de los cuales cuenta con una caja de escape localizada por debajo de la plataforma. Este laberinto se colocó en una habitación con cuatro pistas extralaberínticas localizadas en las paredes del cuarto y con una iluminación de 150 luxes (Figura 8-A).

La prueba experimental constó de tres fases: Primera (fase uno) de habituación se llevó a cabo una hora antes del primer entrenamiento, colocando las jaulas de los roedores sobre la superficie de la plataforma siguiendo las mismas condiciones con las que se correría el experimento durante tres minutos. La fase dos, de entrenamiento, consistió en cuatro pruebas al día durante cuatro días, en cada prueba se colocaba al ratón en el centro de la plataforma cubierto con la caja de inicio durante 15 segundos, para que la orientación del ratón fuera aleatoria, luego se levantaba la caja de inicio y se dejaba al ratón explorar durante 3 minutos o hasta que entrara completamente a la caja de escape (Figura 8-B). Una vez dentro de ésta se retiraba al ratón y se colocaba nuevamente en su jaula, si el ratón no entraba al finalizar los tres minutos, era guiado hasta la caja de escape gentilmente y se dejaba ahí por 20 segundos, posteriormente se volvía a colocar en su jaula. La localización de la caja de escape fue seleccionada de manera aleatoria y se mantuvo la misma localización durante todos los entrenamientos e individuos. Después de cada entrenamiento se dejaba descansar al ratón un periodo de 15-20 min para la siguiente prueba. Después de cada prueba se limpió la plataforma con alcohol al 70% y un paño húmedo. Por último, la fase de retención (fase 3) se realizó 24 horas después de la última prueba, ésta se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que los entrenamientos exceptuando que la caja de escape fue retirada, se colocó al ratón en el centro de la plataforma y durante dos minutos se contó el tiempo que pasaba el ratón donde se ubicaba la caja de escape.

El parámetro medido durante la etapa de entrenamiento fue la latencia del ratón en llegar y entrar completamente a la caja de escape, se consideró el entrar a la caja cuando el cuerpo del ratón había atravesado el agujero y no era visible en la plataforma. Para la etapa de retención se tomó en cuenta los siguientes parámetros: 1) la latencia del ratón en encontrar el agujero donde se encontraba la caja de escape se tomó en cuenta que para encontrarlo la nariz del roedor debía cruzar el plano horizontal de la plataforma, 2) el número

de errores o de agujeros incorrectos hasta encontrar el correcto, 3) Tiempo total que el ratón permanecía en el cuadrante donde se encontraba la caja de escape.



Figura 8. Cuarto de conducta y plataforma Barnes

6.4. Genotipificación

Se realizó la genotipificación de todos los animales utilizados por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cuando se realizó el punto final humanitario de los animales se cortó 1 cm de la punta de la cola del ratón con tijeras expuestas al fuego para cauterizar, estas colas fueron almacenadas en tubos eppendorf de 1.5 ml a 4°C hasta su uso. Para la extracción del ADN de las colas se agregaron 500 µl de NaOH 0.05M a el microtubo con el tejido, esto se colocó a baño maría a 95°C durante 15 min., concluidos los 15 min se añadieron 50 µl de solución Stop (Tris 1M, EDTA 10mM) y se agitó con el vortex.

Los primer utilizados para la PCR son los que se encuentran en la tabla 2 para cada gen que fue utilizado. Primero se realizó una PCR para los genes de *TAU* y *APP* con productos de PCR de 350 pb y 500 pb respectivamente. Se siguió el programa especificado en la tabla 3 y con lo obtenido se corrió en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1x (TBE 10x Ultrapure: Tris 1M, Ácido bórico 0.9 M y EDTA 0.01 M) a 100 V durante 40 min, esto se visualizó con luz UV. Para el gen de *presinilina* se utilizó el mismo programa descrito en la Tabla 3, pero con lo obtenido de la PCR se realizó una digestión con enzimas BSTII durante 2h a 37°C, posteriormente el producto de digestión se corrió en un gel de agarosa en las mismas condiciones descritas anteriormente y se visualizaron dos bandas de 300 y 250 pb.

Tabla 2. Primers utilizados para genotipificación

Gen	Primer
TAU	5'TCCAAAGTTCACCTGATAGT3'
APP	5'GCTTGCACCAGTTCTGGATGG3'
Thy	5'GAGGTATTCAGTCATGTGCT3'
PS1k 13	5'CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC3'
PS1k 15	5'AGGCAGGAAGATCACGTGTTCCAAGTAC3'

Tabla 3. Programa utilizado para PCR

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
94	5
94	0.5
53	0.5
72	1
105	2 (x25 ciclos)
72	3
4	-

6.5. Obtención de hipocampo

Entre 24-48 horas después de concluida la prueba de memoria se anestesiaron a los animales con pentobarbital 15 mg/kg vía intravenosa y procedió a su decapitación con guillotina. Inmediatamente después se extrajo el cerebro y se disecciono el hipocampo. Los tejidos fueron pesados, colocados en microtubos y llevados inmediatamente al congelador a -80°C hasta el día de su uso. Cada hipocampo fue procesado para Western Blot como se describirá más adelante.

6.6. Niveles de la subunidad α -7

6.6.1. Obtención de proteínas

Se realizó el homogenizado de los tejidos que se encontraban en congelación, para ello se colocaron los microtubos con el tejido en hielo, a cada tubo se le colocó 300 μ l de buffer de lisis (Tritón 1%, NaCl 50 mM, Tris 50 mM, mini cOplete inhibidor de proteasas, pH 8) por cada 5 mg de tejido. Se homogenizó el tejido con fuerza mecánica manteniéndolo en hielo, posteriormente se dejó en refrigeración por 2 horas. Concluidas las dos horas se

centrifugaron los tubos a 12000 rpm durante 30 min. Para obtener el sobrenadante que fue almacenado a 4°C hasta su cuantificación.

6.6.2. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford, para ello se preparó el reactivo correspondiente (CAT#: CB-P005-K) al 20% con agua. Se realizó una curva de calibración con albumina en las siguientes concentraciones: 2, 1.5, 1.25, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 y 0 mg/ml. Por pocillo se tomó 5 µl del sobrenadante o de la albumina y se colocaron 250 µl del reactivo de Bradford. Posteriormente se colocó en el espectrofotómetro Varioskan y se leyeron las absorbancias a 595 nm. Lo anterior se realizó por triplicado y se obtuvo el promedio para la concentración de proteínas en cada homogenado.

6.6.3. Preparación de muestras

De acuerdo con la concentración obtenida en la cuantificación de proteínas se toman 40 µg/ml de proteínas de cada homogenado y se mezclan con de buffer de carga 1:1 (solución desnaturizante Tris 0.125 mM, Sodio dodecil sulfato (SDS) 4%, glicerol 20%, mercaptoetanol 10% azul de bromofenol 0.1%, pH 6.8), posteriormente se calentaron a 100°C durante 5 minutos e inmediatamente concluido el tiempo se colocaron en hielo hasta su carga en el gel.

6.6.4. Electroforesis SDS

Se preparó el gel separador 10% (Tris-HCl 1.5 M, pH 8; Acrilamida/bisacrilamida 30%; SDS 10%; persulfato amónico (PSA) 10%; tetrametiletilendiamina (TEMED)) y el gel concentrador 5% (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8; Acrilamida/bisacrilamida 30%; SDS 10%; PSA 10%; TEMED), teniendo en cuenta que los agentes polimerizantes (PSA y TEMED) se colocaban antes de colocar las mezclas entre los dos vidrios. Primero se agrega el gel separador, se esperó a que polimerizara (20 min) y luego se colocó el gel concentrador junto con el peine hasta que polimerizaba (25 min). Se retiró el peine y se colocó el gel en la cámara de electroforesis la cual se llenó con el buffer de corrida (Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 10%, pH 8.3), de manera consecutiva, se cargaron los pozos con las muestras y en el primer pocillo se colocó el marcador de peso molecular (5 µl). Finalmente se corrió a 60-65 volts durante 3 horas.

6.6.5. Transferencia

Finalizadas las tres horas, se retiraron los geles del soporte y se colocaron en la unidad de transferencia de la siguiente manera: Sobre el cátodo se colocó una esponja, papel filtro, el

gel separador con las muestras, la membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponja. Cabe destacar que una hora antes de comenzar la transferencia, todos los componentes de ésta se sumergieron en el buffer de transferencia. Una vez armado el paquete, se quitaron las burbujas con un rodillo y se colocó en la cámara, ésta se llenó con el buffer de transferencia (Tris 0.0255 M, Glicina 0.192 M, Metanol 20%, pH 8.3) y se colocó hielo para mantener la temperatura baja. Se dejó corriendo por 3 horas 40 minutos a 22 volts.

Para asegurar que la transferencia fue exitosa se tiñó el gel y la membrana una vez concluido el tiempo de la transferencia. Para ello se preparó una solución al 0.1% de Coomassie R-250 en 40% de etanol y 10% de ácido acético, esta solución fue calentada a 70-90°C y posteriormente el gel se colocó durante 10-15 min, transcurrido el tiempo se retiró el gel y se hizo un lavado con agua destilada, para después ser colocado en la solución para desteñir (10% etanol, 7.5% ácido acético) previamente calentada a 70-90°C por un periodo de 10-15 min, el gel fue cambiado a diferentes soluciones limpias hasta que el fondo fuera suficientemente traslucido, si no se observaban bandas se asumía que si había ocurrido la transferencia. Por otro lado, se colocó la membrana en rojo de Ponceau durante 5-10 min hasta que las bandas fueran visibles, finalmente se lavó la membrana con agua destilada y se prosiguió con el Western Blot.

A continuación, se utilizó el kit *Pierce™ Fast Western Blot*. Con este kit se realizó un lavado de 5 min, con el *Fast Western 1X Wash buffer* posterior a la transferencia, subsiguientemente, sin bloquear la membrana, esta se incubó con el anticuerpo primario contra la subunidad α -7 del receptor de acetil colina nicotínico (cat #: ab216485, abcam, preparado en PBS 0.1M) en una concentración 1:200 y con el anticuerpo Anti-Actina (MAB1501R) en una concentración 1:8000 durante 12 horas en agitación a 4°C (los anticuerpos fueron diluidos con el *Fast Western Antibody Diluent* del kit). Transcurridas las 12 horas se recuperó el anticuerpo y la membrana se incubó con el *Fast Western Optimized HRP reagent Working dilution* y se dejó incubando por 10 minutos. Finalizada la incubación se realizaron dos lavados de 5 y 10 minutos con el *Fast Western 1X Wash buffer*.

6.6.6. Revelado

Concluidos los lavados se procedió al revelado por quimioluminiscencia. Se incubó la membrana por 5 minutos en el sustrato quimioluminiscente (Detection reagent 1 y 2 del kit), posteriormente se colocó acetato sobre la membrana. Una vez concluido el tiempo se reveló con el C-Digit Blot Scanner de LI-COR.

6.7. Registros electrofisiológicos

Para caracterizar y evaluar la transmisión sináptica modulada por los receptores nicotínicos en el 3xTg-AD se realizaron ensayos electrofisiológicos *in vitro* en rebanadas, las cuales, fueron obtenidas de ratones hembra de seis meses de edad, de dos grupos experimentales (NoTg y 3xTg-AD). Todos los ratones fueron anestesiados con isoflurano y decapitados, el cerebro removido y colocado en una solución de sacarosa (en mM: 250 sacarosa, 2.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 5 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 glucosa, pH 7.4) congelada (4 °C). Los cortes coronales de 300 µm del hipocampo se obtuvieron en el vibratomo (Leica VT 1000), para luego ser colocados en solución de líquido cerebroespinal artificial (SCA) (en mM: 12.5 NaCl, 2.5 KCl, 1.23 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 glucosa, pH 7.4) durante una hora a 30°C antes del registro. Todas las soluciones fueron tratadas con 95% O₂ y 5% CO₂.

Los registros electrofisiológicos se realizaron en un microscopio infrarrojo (BX51WI, Olympus Instruments, Japón) con un objetivo de inmersión 80x y se realizó la técnica de fijación en parche de la membrana en la configuración de célula completa y en modo fijación de voltaje a -70mV. Una rebanada fue colocada en la cámara de registro y bañada de manera continua con solución cerebroespinal artificial burbujeada con 95% O₂ y 5% CO₂ a una velocidad de 2mL/min. Se utilizaron pipetas para la fijación de vidrio borosilicato con una resistencia de 3-7 MΩ. Se utilizó una solución interna de cloruro de potasio (en mM: 10 EGTA, 1 MgCl₂, 140 KCl, 10 HEPES y 5 NaCl, pH 7.4). Las corrientes fueron registradas con una PC-ONE patch/whole cell patch clamp (Dagan Corporation, MN, USA), usando un sistema de adquisición Digitadata 1440 manejado con pClamp 10 (Molecular devices, CA, USA).

Para caracterizar las corrientes moduladas por receptores nicotínicos se hicieron aplicaciones de nicotina 10 mM, esta fue colocada en una pipeta de vidrio de boro silicato, la cual fue conectada a una picobomba (PV830, WPI, FL, USA). La punta con el agonista fue colocada a 20-40 µm de la célula que se iba a registrar y la aplicación del compuesto fue realizada a 1s. Los registros fueron realizados en las zonas del CA1 en el *Stratum Radiatum* del hipocampo. El promedio de las amplitudes de las corrientes de entrada que se presentaban en respuesta a la aplicación de nicotina fue comparado entre los grupos NoTg y 3xTg. Para evaluar si Amylovis tuviese algún efecto en estas corrientes, en un set

de experimentos previo a los registros se incubaron las rebanadas 2 hrs en Amylovis 1 μ M o bien durante el registro se agregó en el baño Amylovis 1 μ M.

6.8. Estadística

Al finalizar las pruebas, los resultados fueron capturados para su análisis. Para el análisis de los videos de la prueba conductual se utilizó el software Smart. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el software Graphpad Prism versión 8. Para la prueba conductual y western blot para verificar la normalidad de los datos se utilizó el gráfico Q-Q, los datos se consideraron normalmente distribuidos cuando caían en una línea recta de referencia de 45 grados, de igual forma se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk y de homocedasticidad con la prueba de Levene. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) y efectos mixtos. Los resultados fueron considerados como significativos cuando la $p < 0.05$ para todas las pruebas realizadas. Para las pruebas electrofisiológicas se utilizó el programa Origin Pro-8 para el análisis de datos y se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para la estadística.

7. Resultados

7.1. Administración

7.1.1. Amylovis no afectó el peso de los ratones

Durante ocho semanas se realizó la administración de Amylovis o de la solución vehículo a los cuatro grupos con una edad de 4 meses cada ratón y semanalmente se registraron los pesos corporales de los ratones para observar que no decrementaran en su peso como consecuencia de las administraciones orales del vehículo y del Amylovis.

Entre grupos del mismo transgén no se encontraron diferencias significativas en cuanto al peso, es decir Amylovis no les provocó falta de apetito o bien un decremento en el peso corporal del animal, sin embargo, comparando grupos transgénicos contra los no transgénicos se puede ver que los 3xTg muestran un incremento en el peso corporal comparados con los NoTg ($p < 0.01$) desde la semana cero hasta la última semana, en estudios anteriores ya se ha descrito ratones hembras 3xTg entre 2 y hasta 7 meses presentan mayores pesos que su grupo control, esto se ha explicado por una disminución en la actividad y un incremento en el consumo de alimento (Knight et al., 2012; Robison et al., 2020; Winslow et al., 2021). (Figura 9)

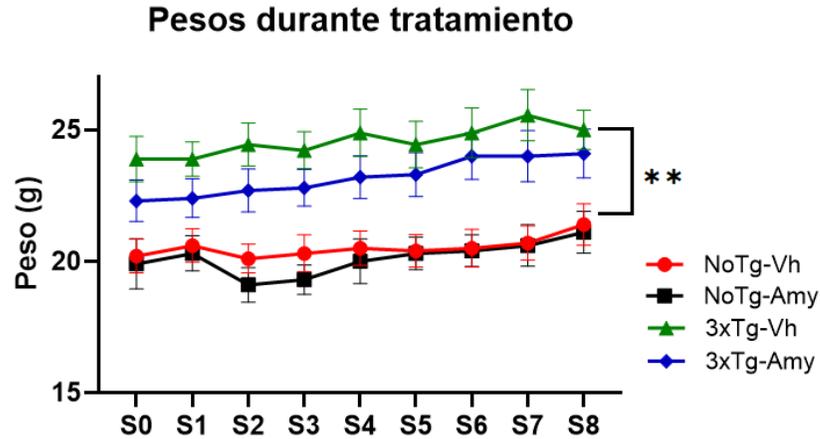


Figura 9. Pesos semanales durante la administración. De color negro (n=10) y rojo (n=10) se muestran grupos no transgénicos y de color azul (n=10) y verde (n=9) se muestran grupos transgénicos, todos los grupos tratados respectivamente con Amylovis o solución vehículo. Los datos se muestran como la media \pm SEM. ANOVA de efectos mixtos ** p<0.01

7.2. Laberinto de Barnes

7.2.1. Amylovis mejora la memoria y aprendizaje del 3xTg-AD en el laberinto de Barnes

Concluidas las ocho semanas de tratamiento con el compuesto, cuando los animales contaban con 6 meses de edades se realizó una prueba cognitiva de aprendizaje y memoria espacial con el laberinto de Barnes. Se llevó a cabo esta prueba por ser un

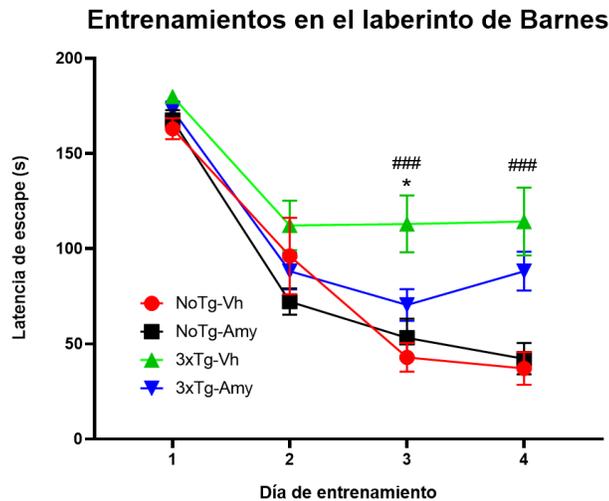


Figura 10. Latencias de escape durante cuatro días de entrenamiento en el laberinto de Barnes. Los datos se muestran como medias \pm SEM. ANOVA de efectos mixtos, comparación entre transgenes se muestra cómo ### p<0.001. Diferencia entre 3xTg tratados con Amylovis y vehículo se muestra cómo *p<0.05. n= 9 por grupo

paradigma en el que se puede medir el aprendizaje y la memoria espacial de los animales y por ser una tarea menos estresante a comparación con el laberinto acuático de Morris (Gawel et al., 2019a).

Primero se estudió el aprendizaje de los animales en cuatro días de entrenamiento, durante este periodo se midió la latencia de escape de los ratones, es decir el tiempo que les tomaba entrar al agujero donde se encontraba la caja de seguridad. A los seis meses de edad los ratones 3xTg-AD que solo fueron tratados con solución vehículo muestran deterioro en el aprendizaje comparándolos con sus grupos controles NoTg (Figura 10) ($p < 0.001$), esto se observa como latencias más altas en encontrar el agujero de escape durante los cuatro días de entrenamiento. Por otro lado, el grupo 3xTg-AD que fue tratado con Amylovis durante 8 semanas muestra una disminución en la latencia de entrada en el día 3 de entrenamiento, la cual es significativamente menor comparada con el grupo 3xTg no tratado ($p < 0.05$). Sin embargo, esta diferencia, aunque sigue siendo menor en el día cuatro, no es significativa.

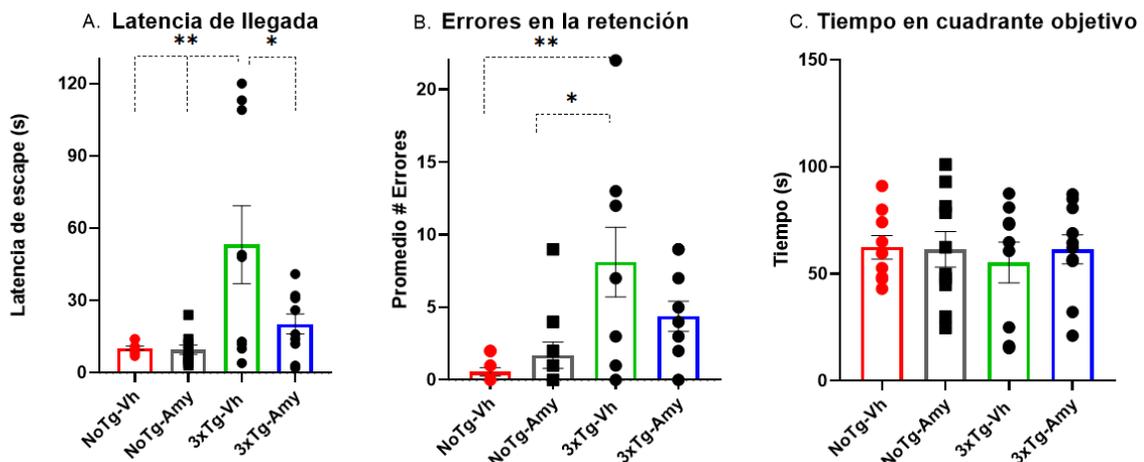


Figura 11. Efectos de Amylovis en la memoria espacial en el laberinto de Barnes. El día de retención del laberinto de Barnes se midieron diversas variables para observar la memoria espacial de los roedores: A) Latencia en llegar al agujero objetivo B) Numero de errores antes de llegar al agujero objetivo C) Tiempo en el cuadrante donde se encontraba el agujero objetivo. Los datos se muestran como medias \pm SEM. ANOVA seguida de prueba post hoc con Tukey * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. $n = 9$ por grupo.

La retención, para medir la memoria espacial, se llevó a cabo 24 hrs después del último entrenamiento, durante este día se midieron tres parámetros: la latencia de llegada, que es el tiempo en el que los ratones asomaban la cabeza en el agujero donde se encontraba la caja de escape, el número de errores los cuales se tomaron en cuenta cuando el animal asomaba la cabeza en un agujero donde no se encontraba la caja y el tiempo en

el cuadrante objetivo (Clinton et al., 2010). Nuevamente se observó deterioro cognitivo entre los 3xTg administrados con solución vehículo comparándolos con los grupos controles NoTg en la latencia de llegada y en el número de errores, donde ambos parámetros tienden a ser significativamente menores en los grupos control ($p < 0.01$). El grupo 3xTg el cual fue tratado con Amylovis mostró una menor latencia de llegada con respecto al grupo 3xTg-Vh ($p < 0.05$), por otro lado, en promedio también cometió una menor cantidad de errores, sin embargo, sin significancia estadística (Figura 11-A y B). En cuanto al tiempo que estuvieron en el cuadrante objetivo no se observaron diferencias entre ningún grupo (Figura 11-C).

7.3. Western Blot

7.3.1. No se encuentran diferencias en la cantidad relativa de la subunidad $\alpha 7$

Concluida la prueba conductual y previa anestesia, se preparó a los animales para un análisis de la cantidad relativa del receptor $\alpha 7$ -nAChR en el hipocampo, se escogió esta región por ser una de las zonas donde primero comienza la acumulación de los péptidos β -amiloides, por su implicación en procesos de aprendizaje y memoria y por su alta expresión del receptor, sin embargo, también se recolectó la corteza prefrontal por ser también de las primeras regiones afectadas y sus implicaciones en la memoria.

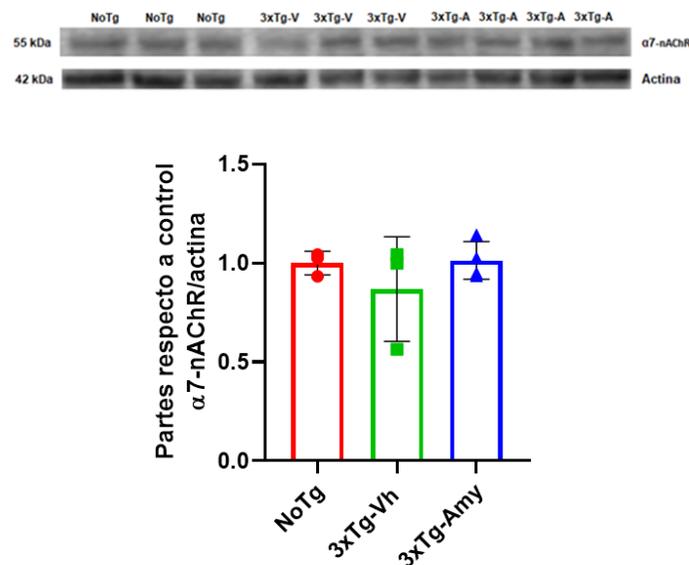


Figura 12. Cambios en la cantidad relativa de la subunidad $\alpha 7$ del receptor $\alpha 7$ -nAChR. No se observaron cambios significativos cuando se realizó el Western Blot. Son necesarias más réplicas de los blot. Los datos se muestran como medias \pm SEM. ($n=3$ por grupo)

Los valores relativos de la subunidad $\alpha 7$ se muestran en la figura 12, aquí podemos observar cómo no hubo cambios significativos en cuanto a la cantidad de la subunidad $\alpha 7$ del receptor ($F_{2,7} = 0.8203$, $P = 0.4786$) entre los diferentes grupos. (Figura 12)

7.4. Electrofisiología

7.4.1. *Amylovis* aumenta la respuesta de receptores nicotínicos

A pesar de no encontrar diferencias en la concentración de proteína de receptores $\alpha 7$ nicotínicos en el modelo 3xTg en el hipocampo, se planteó evaluar la funcionalidad de estos receptores, ya que se ha visto que péptidos beta amiloides pueden estar interfiriendo con la función de estos actuando como antagonistas. Para lograr esta meta se realizaron registros electrofisiológicos con la técnica de célula parchada en su modalidad célula completa en el *stratum radiatum* de CA1 del hipocampo. Se aplicaron pulsos de nicotina 10mM por 1 s a 2-5 psi directamente a la célula que se estaba registrando, estas aplicaciones provocaban corrientes de entrada en las células registradas. El promedio de las amplitudes de ratones no transgénicos tras la aplicación de nicotina fue de 156.1 ± 42.76 pA ($n=7$) y se comparó con el promedio de 3xTg-AD el cual fue de 81.10 ± 40.94 pA ($n=9$), estas fueron menores que las de los ratones controles, sin embargo, no se alcanzó la

significancia estadística (Kruskal-Wallis, test de comparaciones múltiples de Dunn) (Figura 13 A-B).

Para ver el rol que tiene el Amylovis en este tipo de corrientes, se realizó una pre-incubación de las rebanadas que se iban a registrar con Amylovis 1 μ durante dos horas, esto se llevó a cabo al concluir una hora de estabilización de las rebanadas. Posteriormente a la incubación se midieron las amplitudes de las corrientes provocadas por nicotina y se encontró que en promedio estas corrientes son de 267.4 \pm 93.01 pA, siendo incluso mayores que con el animal control, pero además siendo significativamente diferentes con aquellas suscitadas por el grupo 3xTg- AD sin incubación (Kruskal-Wallis, test de comparaciones múltiples de Dunn, * p <0.05). Estos datos nos indican que Amylovis tiene un efecto en la

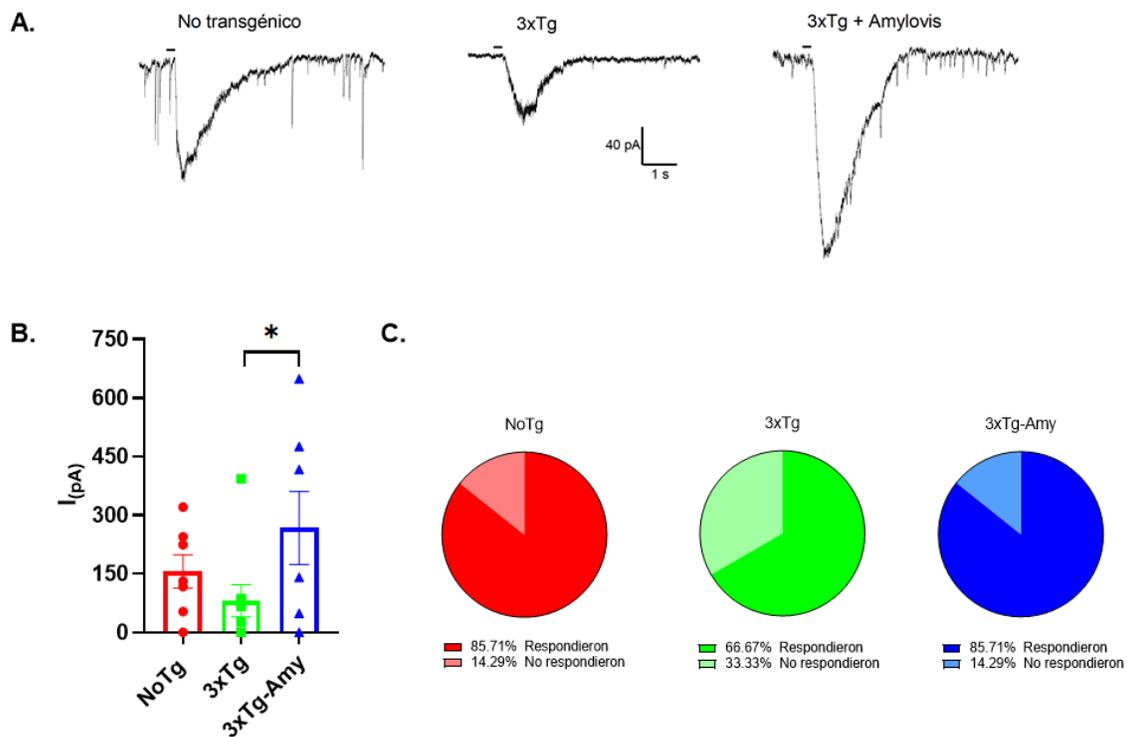


Figura 13. Amylovis aumenta las corrientes inducidas por Nicotina en el stratum Radiatum de CA1 del hipocampo. A) Trazos representativos de corrientes promedio inducidas por Nicotina 10 mM aplicada de forma local (1s a 2-5 psi) (las rebanadas del grupo 3xTg-Amylovis fueron incubadas durante 2 hr en Amylovis 1 μ M previo a los registros.) B) Amplitud de corrientes inducidas por aplicación de Nicotina 10 mM en cada condición (n=6-9) Los datos se presentan como promedio \pm SEM, Kruskal-Wallis * p <0.05. C) Porcentaje de células que tuvieron una respuesta mayor que cero (respondieron) o igual a cero (no respondieron) por cada grupo (n=7-9).

potenciación en la amplitud de las corrientes de entrada provocadas por receptores nicotínicos en el hipocampo de ratones con patología tipo Alzheimer (Figura 13 A-B).

Mientras se realizaban los registros se observó que no todas las células registradas tenían una respuesta ante el estímulo con nicotina y además que había una mayor proporción de células no responsivas a los pulsos del agonista nicotínico en rebanadas del modelo 3xTg que no habían sido pre incubadas con Amylovis (Figura 13-C), de igual forma a lo largo de los registros se notó mayor fragilidad en estas células y mayor propensión a que los registros no duraran a lo largo del tiempo.

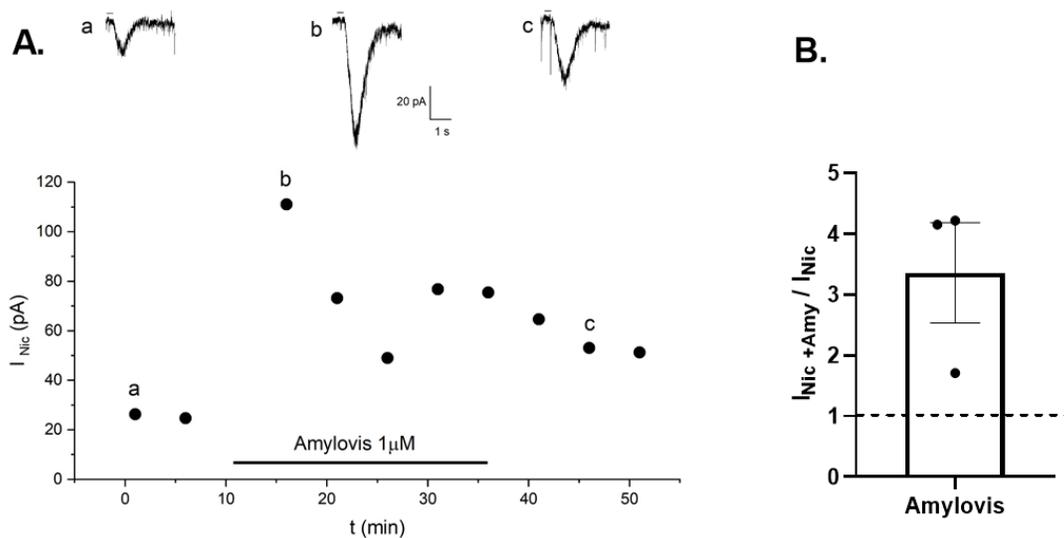


Figura 14. Aumento de las corrientes inducidas por Nicotina por acción de Amylovis en el hipocampo. A) Grafica representativa de corrientes provocadas por la aplicación de nicotina en presencia de Amylovis (representativo de $n=3$ experimentos). Cada punto en la gráfica representa las corrientes inducidas por la aplicación de nicotina 10mM (1s, 2-5 psi) en función del tiempo de registro. Se muestra el momento en el que se aplicó Amylovis 1 μ M en el baño durante el registro. En la parte superior se muestran tres trazos representativos de datos en la gráfica. B) Razón entre la amplitud de la corriente inducida por nicotina en presencia de Amylovis 1 μ M y la corriente inducida por nicotina control. Los datos están representados como el promedio \pm SEM. ($n=3$)

A modo de verificar los datos obtenidos sobre el efecto de la pre-incubación con Amylovis y para elucidar en qué momento ocurría el aumento en las corrientes cuando existía la presencia de Amylovis se realizó el siguiente set de experimentos. Se aplicaron pulsos de nicotina 10mM de la misma forma descrita en intervalos de 5 minutos, para así obtener las corrientes controles inducidas por este agonista; posteriormente se colocó en

la solución del baño Amylovis 1 μ M durante 25 minutos. De esta forma las corrientes de las amplitudes inducidas por nicotina se continuaron registrando en función del tiempo de registro y tomando en cuenta la amplitud de cada corriente producida por nicotina antes, durante y después de la aplicación con Amylovis (Figura 14-A). Cuando se aplicaba Amylovis en el baño se pudo observar un incremento en la amplitud de las corrientes desde los 10 minutos (Figura 14), además una observación interesante es que cuando se quitaba Amylovis del baño se podía observar como las corrientes volvían a disminuir, sin embargo, no regresaban a la magnitud de las corrientes control.

7.5. Genotipificación

Se realizó la genotipificación de todos los 3xTd-AD para comprobar que los triples transgénicos aun tuvieran las mutaciones para los genes *APP*, *TAU* y *Presinilina*. En la figura 15 se muestra la expresión de estos genes. Los animales transgénicos que no presentarán las mutaciones fueron excluidos del estudio.

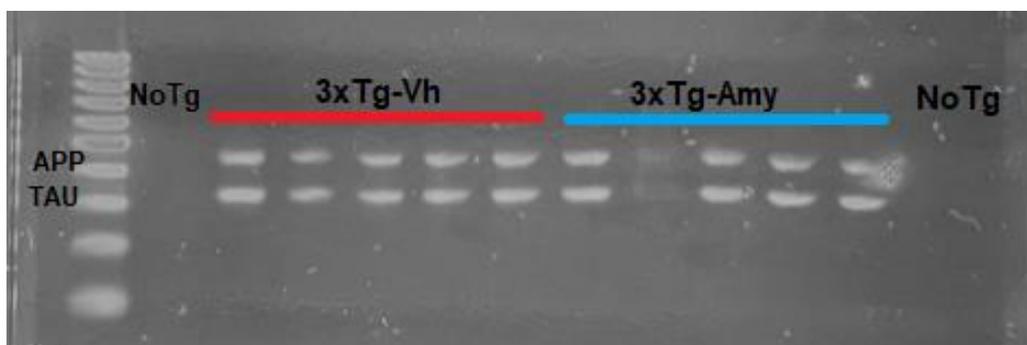


Figura 15. Genotipificación de los grupos utilizados. Se muestran los animales 3xTg que fueron administrados con solución vehículo y con el compuesto Amylovis. Las bandas resultantes para los genes APP y TAU.

8. Discusión

Este trabajo demuestra el potencial de Amylovis, un derivado naftaleno, en mejorar el aprendizaje y memoria de ratones con patología tipo Alzheimer y el efecto que tiene en los receptores nicotínicos en el hipocampo del mismo modelo murino.

Se ha descrito a los derivados de naftalenos como “andamios privilegiados”, ya que son estructuras que funcionan como ligandos de alta afinidad a diferentes moléculas. Los apilamientos o interacciones tipo π y las fuerzas de Vander Waals de los grupos aromáticos con otras moléculas los vuelven compuestos con alto potencial para el desarrollo de fármacos. Se han descrito diversos derivados naftalenos como agentes antitumorales,

antinflamatorios, antivirales, antineurodegenerativos, antipsicóticos y antidepresivos (Makar et al., 2019).

En el presente trabajo se empleó el compuesto Amylovis, un derivado naftaleno que interacciona con los péptidos y fibrillas A β , inhibiendo su proceso de oligomerización, disrumpiendo la estructura de las fibrillas y por ende alentando su proceso de agregación (Rivera-Marrero et al., 2020; Sablón-Carrazana et al., 2015). Se ha demostrado que el tratamiento con Amylovis en ratones 3xTg-AD causa un decremento en la carga amiloide gracias a la interacción del compuesto con los péptidos y fibras A β , además también se había observado una tendencia de este compuesto a mejorar la estrategia espacial en el laberinto acuático de Morris de ratones 3xTg-AD de 12 meses, lo que sugería efectos beneficiosos del compuesto en la cognición y memoria, sin embargo en el estudio no se alcanzaba la significancia estadística probablemente por el número de animales usados (Rivera-Marrero et al., 2020)

Para mitigar factores estresantes como la inmersión de agua en el presente trabajo se utilizó el laberinto de Barnes ya que esta no aumenta los niveles de corticosterona lo cual pudiera afectar en el rendimiento de los ratones como ocurre en el laberinto acuático de Morris (Gawel et al., 2019b). Se ha visto antes que el modelo 3xTg-AD comienza a presentar la acumulación del péptido β -amiloide desde los 3-4 meses de edad, y esta acumulación es progresiva, siendo que a los 6 meses de edad ya se ven algunas placas extracelulares en corteza e hipocampo, esto conlleva a que desde los 4 meses de edad ya se presente deterioro cognitivo en el modelo (Oddo et al., 2003).

Durante la primera parte de las pruebas llevadas a cabo en laberinto de Barnes, el entrenamiento, se evaluó el aprendizaje espacial de los roedores, y con los resultados obtenidos se observó que los ratones 3xTg-AD presentan deficiencias cognitivas en el aprendizaje como se ha reportado con otras pruebas (Oddo et al., 2003; Roda et al., 2020), ya que estos tenían latencias más grandes para encontrar la caja de escape. Efecto diferente observado en el grupo que fue tratado con Amylovis desde el día 3 ya mostraba diferencias en cuanto a la latencia de escape, sin embargo para el día 4, a pesar de seguir teniendo menor promedio de latencia de escape que el grupo no tratado, ésta aumento con respecto al día 3 de entrenamiento, hecho descrito y que puede deberse a falta de motivación, algunos autores describen este fenómeno en los últimos días de entrenamiento porque los animales ya se encuentran familiarizados con el ambiente y el estímulo aversivo como lo es la luz (Gawel et al., 2019b).

Posteriormente en la etapa de retención nos podemos dar cuenta nuevamente por el número de errores y por las latencias encontradas, deficiencias cognitivas, pero esta vez en la memoria, que tienen los ratones 3xTg-AD. Por otro lado, los ratones tratados muestran una mejoría en la memoria espacial y a pesar de que esta diferencia solo se ve como estadísticamente significativa en las latencias, al analizar los videos se puede observar cómo los ratones llevan a cabo una estrategia para encontrar el agujero, a diferencia de los ratones no tratados. Se ha discutido acerca de las estrategias que utilizan los animales para encontrar el agujero donde se encontraba la caja de escape, indudablemente los animales no transgénicos utilizados durante el estudio utilizan una estrategia directa ya que en cuanto son colocados en el laberinto se dirigen rectamente al agujero correcto o a uno adyacente, esto es gracias a que se basan en las pistas visuales con las que cuenta el laberinto y claro que se puede apreciar en el número de errores o las latencias que ambas son bajas, al contrario del grupo control se puede observar que los animales 3xTg-AD no tratados van moviéndose de un modo aleatorio asomando la cabeza en los agujeros del laberinto. Por otra parte, los animales tratados con Amylovis, a pesar de no todos tener una estrategia directa, si se observa que siguen una continuidad o estrategia serial, en la que van asomando la cabeza en agujeros cercanos y continuos al agujero de escape hasta encontrarlo, es tal vez por esta diferencia de estrategia que observamos una mejoría en la memoria espacial en las latencias de escape, pero no en el número de errores, como se ha reportado (Gawel et al., 2019b). Por último, la falta de diferencias entre todos los grupos en el tiempo por cuadrante puede deberse a la misma falta de motivación de la que se mencionó y es que una vez que los animales se dan cuenta que ya no existe una caja de escape, únicamente empiezan a merodear en la plataforma (Gawel et al., 2019b). En resumen Amylovis mejora la estrategia espacial de los ratones, permitiendo que localicen rápidamente el agujero donde se encontraba la caja de escape y cometiendo menos errores en el proceso, lo que a su vez indica el rol del Amylovis en el mejoramiento de la memoria de los animales 3xTg.

Con referencia a los resultados de la cantidad de la subunidad $\alpha 7$ en el hipocampo, en la bibliografía se han reportado una controversia en cuanto su expresión durante la patología humana mientras que algunos autores reportan un decremento en cerebros postmortem (Burghaus et al., 2000; Guan et al., 2000; Ren et al., 2020), otros reportan un incremento en la inmunoreactividad de la subunidad $\alpha 7$ (Chu et al., 2005; Counts et al., 2007; Teaktong et al., 2003). Por otro lado, en modelos animales también se han encontrado algunas discrepancias, en modelos que únicamente presentan mutaciones para

el gen APP se ha visto que los cambios en la expresión del receptor son dependientes de la zona, siendo que en el hipocampo algunos autores reportan un aumento (Bednar et al., 2002; Dineley et al., 2002), mientras que en zonas como la corteza frontal se ha visto un decremento (Bednar et al., 2002). Por otro lado, en el 3xTg-AD Oddo y colaboradores reportan un decremento en la expresión del receptor en diferentes partes del cerebro a los seis meses de edad y esto lo relacionan con la acumulación del péptido beta amiloide, ya que en zonas donde no existe esta acumulación no observan diferencias en la expresión del receptor (Oddo et al., 2005). Sin embargo, el grupo de Elnagar no observó ningún cambio significativo, pero solo realizó la medición en la corteza frontal (Elnagar et al., 2017). Cabe aclarar que estos últimos dos estudios donde trabajan con el modelo 3xTg-AD tienen una diferencia crucial en cuanto a la técnica utilizada para identificar diferencias en la expresión. Mientras que Oddo y colaboradores utilizan un ensayo de unión con α -bungarotoxina [I^{125}], un antagonista muy específico para los receptores $\alpha 7$ nicotínicos, donde observan los niveles estables del receptor nicotínico que se encuentra funcional en membrana, Elnagar y colaboradores realizan Western Blot de un homogenado de proteínas previamente purificado con perlas de agarosa unidas al antagonista α -bungarotoxina. En el presente estudio se observó la cantidad relativa de la subunidad $\alpha 7$ en el hipocampo de los ratones, ya que esta región está asociada con los hallazgos encontrados en la prueba conductual (Gawel et al., 2019b), no obstante al contrario de lo que se esperaba no se encontraron diferencias significativas entre los grupos no transgénicos con el grupo 3xTg-AD, esto es comparable con lo que encontró Elnagar sin embargo se podrían llevar a cabo estudios más sensibles o bien Western Blot donde se fraccionen los homogenados, por ejemplo, con solo la porción de membrana, para ver la cantidad de receptor que se encontraba específicamente en esta región. Esto también puede deberse a el bajo número de muestras analizadas por grupo ($n=3-4$) o a la edad a la que se realizó el análisis, siendo que en edades más avanzadas se podría ver más pronunciada esta diferencia.

No solo se ha discutido a fondo la unión de alta afinidad entre β -amiloide 1-40 y 1-42, con receptores nicotínicos como $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$, si no también se ha demostrado el fenómeno de hormesis del A β donde a concentraciones bajas (fM-pM) y fisiológicas se observa un rol agonista a los receptores nicotínicos, mientras que a concentraciones más altas (nM- μ M) y patológicas, como las observadas durante el Alzheimer, actúa inhibiendo a este tipo de receptores (Cecon et al., 2019; Nagele et al., 2002; Puzzo et al., 2012; Puzzo & Arancio, 2013; Wang et al., 2000; Wang et al., 2000b).

Este fenómeno se ha descrito principalmente en modelos *in vitro* o en modelos *ex vivo* donde A β es colocado directamente en el baño de las células y son pocos los artículos donde se describe este suceso en modelos que presentan la acumulación propia de A β (Puzzo et al., 2012; Puzzo & Arancio, 2013). Sabemos que el modelo 3xTg comienza con la acumulación progresiva de A β desde los 3-4 y que depósitos extracelulares se observan desde los 6 meses en zonas como la corteza frontal y CA1 del hipocampo (Oddo et al., 2003).

Para caracterizar la funcionalidad de los receptores nicotínicos en el modelo 3xTg-AD se llevó a cabo la técnica electrofisiológica parchado de célula completa. Se aplicó nicotina en una concentración 10mM a rebanadas y se midió las corrientes de entrada que provocaba este agonista en interneuronas de CA1 del hipocampo, en comparación con su grupo control no se encontró la significancia estadística, pero si se observó una tendencia a corrientes de menor amplitud, esto es comparable con otros trabajos. Spencer en el 2006 en un modelo *in vitro* midió la amplitud de las corrientes tras pulsos de nicotina 10 μ M y explicó que tras aplicar A β 1-42 la amplitud de estas corrientes disminuía (Spencer et al., 2006), por otro lado, Liu en el 2012 volvió a describir este fenómeno pero en un modelo *ex vivo*, al cual al aplicarse A β 1-42 en forma de oligómeros se observaba una disminución en la amplitud de las corrientes inducidas por colina 10M, otro agonista a receptores nicotínicos, que de manera interesante este fenómeno fue registrado en interneuronas de CA1 del hipocampo (Liu et al., 2012).

En otros modelos para la enfermedad de Alzheimer también se ven defectos en la función de receptores nicotínicos, por asociación con A β . Sola y colaboradores en el 2006 observaron que en células piramidales de CA1 del modelo AD11 la nicotina no aumenta la frecuencia de corrientes sinápticas excitadoras miniaturas (mEPSCs), a diferencia de en su grupo control y que este fenómeno no es replicable en células de CA3 donde todavía no existe la acumulación de A β , ellos discuten que podría deberse a una reducción en la expresión o en la actividad presináptica bloqueada por A β de estos receptores (Sola et al., 2006). En nuestro estudio como ya se mencionó no se encontraron diferencias en la cantidad del receptor, sin embargo, sería interesante llevar a cabo estudios que midieran esto con una mayor sensibilidad. Por otro lado, la disminución en la actividad postsináptica del receptor podría estar mediada por A β que lo está bloqueando. También se observa que en el modelo 5xFAD no existe un aumento en la frecuencia de las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSC) inducidas por aplicación de nicotina 5 μ M al contrario de

lo que se ve de su grupo control, lo que nos habla nuevamente de que A β puede alterar la transmisión sináptica modulada por receptores nicotínicos (Chen et al., 2013).

Después de caracterizar como se encontraba la funcionalidad de los receptores en el modelo 3xTg-AD, se observó si Amylovis tenía algún efecto, y se encontró que aumenta la amplitud de las corrientes inducidas por aplicación de nicotina. Se ha visto *in silico* que Amylovis se une al A β_{1-42} en los residuos que van de E11 a F20 (Rivera-Marrero et al., 2020), además se ha mostrado *in vitro* que este compuesto provoca la desestabilización de A β , por lo que se lleva a cabo la disrupción de las estructuras en forma de fibras y se inhibe el proceso de agregación y formación de placas (Rivera-Marrero et al., 2020). Se teoriza que Amylovis al unirse a A β , impide su interacción con los receptores nicotínicos y por ende previene la inhibición. Además, Barykin y colaboradores en el 2020 sintetizaron un tetrapéptido que se une a esta misma región en los aminoácidos que van de E11 - H14 de A β y midieron corrientes inducidas por ACh 100 μ M, cuando los ovocitos eran incubados con A β se observaba una disminución en las corrientes comparadas con su grupo control, por otro lado si además de A β se agregaban el tetrapeptido, estas corrientes eran semejantes a aquellas antes de la aplicación de A β , por ende y de la misma forma su tetrapeptido puede estar interrumpiendo la unión de A β con el receptor nicotínico y así rescatando la función de este (Barykin et al., 2020).

9. Conclusiones y perspectivas

Teniendo en cuenta el trabajo previo, donde se presenta a Amylovis como un potencial fármaco innovador para abordar el tratamiento del Alzheimer, se investigó *in vivo* su papel en el modelo (3xT-AD), que simula los aspectos conductuales y moleculares de la demencia tipo Alzheimer en las primeras etapas de la enfermedad.

Después de una administración continua del compuesto durante 8 semanas, se pudo observar que Amylovis no tuvo ningún impacto en el apetito ni en el peso de los animales, lo que sugiere que podría considerarse seguro en relación con estos parámetros.

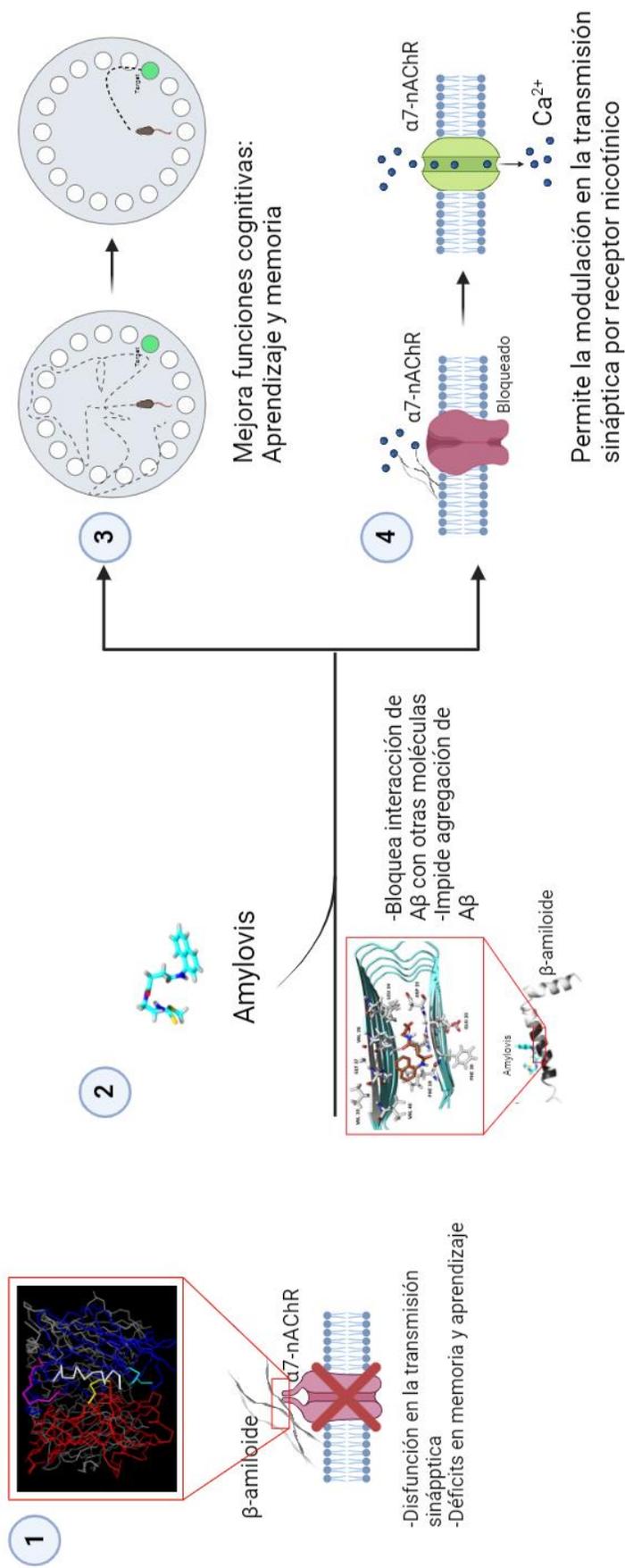


Figura 16. Mecanismo propuesto por el cual Amylovis puede estar ejerciendo su efecto. 1) $A\beta$ se une a el receptor $\alpha 7$ e inhibe su función provocando deficiencias en la transmisión sináptica y por ende en la memoria y aprendizaje. 2) Amylovis se une a $A\beta$ lo que impide su agregación y posiblemente su interacción con otras moléculas. 3) El tratamiento con Amylovis mejora el aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto de Barnes. 4) Al Amylovis unirse a $A\beta$ en la misma región que $A\beta$ se une al receptor nicotínico, podría recuperarse la función del receptor permitiendo la modulación de las corrientes y así la mejora en la memoria y aprendizaje.

Por otra parte, al evaluar su efecto en la memoria espacial y el aprendizaje, se pudo comprobar que Amylovis generó efectos positivos, mejorando ambas conductas de adquisición y memoria de tipo espacial. Esto implica que, al igual que otros fármacos aprobados, Amylovis también puede contribuir a la mejora de síntomas cognitivos.

Con referencia al tipo de receptores estudiados en el hipocampo, no se observaron diferencias en su cantidad, debido quizás a la sensibilidad de la técnica utilizada. En futuras investigaciones, sería recomendable considerar el uso de técnicas más sensibles o específicas para evaluar la expresión de este tipo de receptores funcionales. De igual forma se sugeriría un esquema sin interrupciones del tratamiento o bien modificaciones en cuanto a la dosis. Esto permitiría confirmar los resultados obtenidos en este estudio o incluso descubrir nuevos hallazgos en donde la administración de Amylovis, pudiera provocar un cambio en la expresión relativa de los receptores nicotínicos.

Sin embargo, con el diseño empleado, se logró caracterizar el estado funcional de los receptores nicotínicos en el hipocampo del modelo 3xTg-AD, un hallazgo que hasta ahora no había sido descrito en la literatura científica. Se pudo determinar que la amplitud de las corrientes provocadas por la nicotina era menor en el modelo 3xTg-AD, posiblemente debido a la inhibición o bloqueo de βA . Además, que Amylovis contribuyó a restaurar la amplitud de estas corrientes.

En conjunto, los resultados indican que Amylovis tiene efectos beneficiosos en la memoria y el aprendizaje espacial, así como en la función de los receptores nicotínicos en el modelo 3xTg-AD, que simula la enfermedad tipo Alzheimer. Aunque se requieren más investigaciones en otros modelos y considerando diversas variables para avanzar en la utilización de Amylovis como posible tratamiento para esta forma de demencia, este estudio representa un primer acercamiento a los posibles mecanismos de acción involucrados.

10. Referencias

- Ahmed, T., Zahid, S., Mahboob, A., & Farhat, S. M. (2016). Cholinergic System and Post-translational Modifications: An Insight on the Role in Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, 15(4), 480–494. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666160325121145>
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: From structure to function. In *Physiological Reviews* (Vol. 89, Issue 1, pp. 73–120). <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>

- Alkondon, M., & Albuquerque, E. X. (2004). The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. *Progress in Brain Research*, 145, 109–120. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)45007-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)45007-3)
- Asik, R. M., Suganthy, N., Aarifa, M. A., Kumar, A., Szigeti, K., Mathe, D., Gulyás, B., Archunan, G., & Padmanabhan, P. (2021). Alzheimer's disease: A molecular view of β -amyloid induced morbid events. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091126>
- Barykin, E. P., Garifulina, A. I., Tolstova, A. P., Anashkina, A. A., Adzhubei, A. A., Mezentsev, Y. V., Shelukhina, I. V., Kozin, S. A., Tsetlin, V. I., & Makarov, A. A. (2020). Tetrapeptide ac-haee-nh₂ protects α 4 β 2 nAChR from inhibition by α β . *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21176272>
- Bednar, I., Paterson, D., Marutle, A., Pham, T. M., Svedberg, M., Hellström-Lindahl, E., Mousavi, M., Court, J., Morris, C., Perry, E., Mohammed, A., Zhang, X., & Nordberg, A. (2002). Selective nicotinic receptor consequences in APPSWE transgenic mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 20(2), 354–365. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1112>
- Bilikiewicz, A., & Gaus, W. (2004). Colostrinin 1 (a naturally occurring, proline-rich, polypeptide mixture) in the treatment of Alzheimer's disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 6). IOS Press.
- Bowen, D. M., Smith, C. B., White, P., & Davison, A. N. (1976). NEUROTRANSMITTER-RELATED ENZYMES AND INDICES OF HYPOXIA IN SENILE DEMENTIA AND OTHER ABIOTROPHIES. In *Brain* (Vol. 99). <http://brain.oxfordjournals.org/>
- Buckingham, S. D., Jones, A. K., Brown, L. A., & Sattelle, D. B. (2009). Nicotinic acetylcholine receptor signalling: Roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 61, Issue 1, pp. 39–61). <https://doi.org/10.1124/pr.108.000562>
- Burghaus, L., Schutz, U., Krempel, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., Wevers, A., Lindstrom, J., & Schroder, H. (2000). Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. In *Molecular Brain Research* (Vol. 76). www.elsevier.com/locate/brain
- Burwell, R. D., & Agster, K. L. (2008). *Anatomy of the Hippocampus and the Declarative Memory System*.
- Calabrò, M., Rinaldi, C., Santoro, G., & Crisafulli, C. (2021). The biological pathways of Alzheimer disease: a review. *AIMS Neuroscience*, 8(1), 86–132. <https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2021005>
- Cecon, E., Dam, J., Luka, M., Gautier, C., Chollet, A.-M., Delagrèze, P., Danover, J., Laurence, & Jockers, R. (2019). Quantitative assessment of oligomeric amyloid β peptide binding to α 7 nicotinic receptor. *Background and Purpose: Progressive dysfunction of cholinergic transmission is a*. <https://doi.org/10.1111/bph.v176.18/issuetoc>

- Chen, G. J., Xiong, Z., & Yan, Z. (2013). A β impairs nicotinic regulation of inhibitory synaptic transmission and interneuron excitability in prefrontal cortex. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-3>
- Chen, Z. R., Huang, J. B., Yang, S. L., & Hong, F. F. (2022). Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27061816>
- Chiang, K., & Koo, E. H. (2014). Emerging therapeutics for alzheimer's disease. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 54, pp. 381–405). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135932>
- Chu, L. W., Ma, E. S. K., Lam, K. K. Y., Chan, M. F., & Lee, D. H. S. (2005). Increased alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor protein levels in Alzheimer's disease patients. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 19(2–3), 106–112. <https://doi.org/10.1159/000082661>
- Clinton, L. K., Blurton-Jones, M., Myczek, K., Trojanowski, J. Q., & LaFerla, F. M. (2010). Synergistic interactions between A β , tau, and α -synuclein: Acceleration of neuropathology and cognitive decline. *Journal of Neuroscience*, 30(21), 7281–7289. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0490-10.2010>
- Counts, S. E., Che, S., Ikonovic, M. D., Dekosky, S. T., Ginsberg, S. D., & Mufson, E. J. (2007). 7 Nicotinic Receptor Up-regulation in Cholinergic Basal Forebrain Neurons in Alzheimer Disease. *ARCHNEUROL*, 64. <https://jamanetwork.com/>
- da Cruz, M. T. G., Jordo, J., da Silva, K. A., Ayala-Grossoa, C. A., Ypsilantia, A., Weng, Y. Q., Laferla, F. M., McLaurin, J., & Auberta, I. (2012). Early increases in soluble amyloid- β levels coincide with cholinergic degeneration in 3xTg-AD mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 32(2), 267–272. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-100732>
- D'andrea, M. R., & Nagele, R. G. (2006). Targeting the Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor to Reduce Amyloid Accumulation in Alzheimer's Disease Pyramidal Neurons. In *Current Pharmaceutical Design* (Vol. 12).
- Davies, P., & Maloney, A. J. F. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in alzheimer's disease. *The Lancet*, 112.
- Dennison, J. L., Ricciardi, N. R., Lohse, I., Volmar, C. H., & Wahlestedt, C. (2021). Sexual Dimorphism in the 3xTg-AD Mouse Model and Its Impact on Pre-Clinical Research. In *Journal of Alzheimer's disease : JAD* (Vol. 80, Issue 1, pp. 41–52). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3233/JAD-201014>
- Dineley, K. T., Xia, X., Bui, D., David Sweatt, J., & Zheng, H. (2002). Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and up-regulation of α 7 nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22768–22780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200164200>
- Drummond, E., & Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 133, Issue 2, pp. 155–175). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>

- Elnagar, M. R., Walls, A. B., Helal, G. K., Hamada, F. M., Thomsen, M. S., & Jensen, A. A. (2017). Probing the putative $\alpha 7$ nAChR/NMDAR complex in human and murine cortex and hippocampus: Different degrees of complex formation in healthy and Alzheimer brain tissue. *PLoS ONE*, *12*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189513>
- Espinoza-Fonseca, L. M. (2004a). Base docking model of the homomeric $\alpha 7$ nicotinic receptor- β - amyloid1-42 complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *320*(2), 587–591. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.207>
- Espinoza-Fonseca, L. M. (2004b). Molecular docking of four β -amyloid 1-42 fragments on the $\alpha 7$ nicotinic receptor: Delineating the binding site of the A β peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *323*(4), 1191–1196. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.218>
- Etienne, P., Robitaille, Y., Wood, P., Gauthier, S., Nair, N. P. v., & Quirion, R. (1986). Nucleus basalis neuronal loss, neuritic plaque and choline acetyltransferase activity in advanced alzheimer's disease. *Pergamon*, *19*, 1279–1291.
- Fabiani, C., & Antollini, S. S. (2019). Alzheimer's disease as a membrane disorder: Spatial cross-talk among beta-amyloid peptides, nicotinic acetylcholine receptors and lipid rafts. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00309>
- Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. In *Current Neuropharmacology* (Vol. 14).
- Findley, C. A., Bartke, A., Hascup, K. N., & Hascup, E. R. (2019). Amyloid Beta-Related Alterations to Glutamate Signaling Dynamics During Alzheimer's Disease Progression. In *ASN Neuro* (Vol. 11). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1759091419855541>
- Folch, J., Petrov, D., Ettcheto, M., Abad, S., Sánchez-López, E., García, M. L., Olloquequi, J., Beas-Zarate, C., Auladell, C., & Camins, A. (2016). Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment. In *Neural Plasticity* (Vol. 2016). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2016/8501693>
- Fröhlich, F. (2016). Microcircuits of the Hippocampus. In *Network Neuroscience* (pp. 97–109). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801560-5.00008-2>
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., Guido, T., Hagopian, S., Johnson-Wood, K., Khan, K., Lee, M., Leibowitz, P., Lieberburg, I., Little, S., Masliah, E., ... Zhao, J. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F b-amyloid precursor protein. *Nature*, *373*, 523–527.
- Gawel, K., Gibula, E., Marszalek-Grabska, M., Filarowska, J., & Kotlinska, J. H. (2019a). Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. In *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (Vol. 392, Issue 1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1589-y>
- Gawel, K., Gibula, E., Marszalek-Grabska, M., Filarowska, J., & Kotlinska, J. H. (2019b). Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—

- methodological consideration. In *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (Vol. 392, Issue 1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1589-y>
- Gilman, S., Koller, ; M, Black, ; R S, Jenkins, ; L, Griffith, ; S G, Fox, C., Eisner, ; L, Kirby, ; L, Rovira, ; M Boada, Forette, ; F, & Orgogozo, J.-M. (2005). Clinical effects of A immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*, *64*, 1553–1562. www.neurology.org
- Gotti, C., & Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: From structure to pathology. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 74, Issue 6, pp. 363–396). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.09.006>
- Gouras, G. K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J. P., Haroutunian, V., Buxbaum, J. D., Xu, H., Greengard, P., & Relkin, N. R. (2000). Short Communication Intraneuronal A42 Accumulation in Human Brain. In *American Journal of Pathology* (Vol. 156, Issue 1).
- Guan, Z.-Z., Zhang, X., Ravid, R., & Nordberg, A. (2000). Decreased Protein Levels of Nicotinic Receptor Subunits in the Hippocampus and Temporal Cortex of Patients with Alzheimer's Disease. In *J. Neurochem* (Vol. 74).
- Gutiérrez, M., María, R., Carmen, D., Peña, G., Arlet, P., Rojas, R., & Ruiz, A. M. (2017). *La Enfermedad de Alzheimer y otras demencias como problema nacional de salud*.
- Hampel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P. J., & Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. In *Brain* (Vol. 141, Issue 7, pp. 1917–1933). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/brain/awy132>
- Hellstrom-Lindahl, E., Mousavi, M., Zhang, X., Ravid, R., & Nordberg, A. (1999). Regional distribution of nicotinic receptor subunit mRNAs in human brain: comparison between Alzheimer and normal brain. *Molecular Brain Research*, *66*, 94–103.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., & Cole, G. (1996). *Correlative Memory Deficits, AP3 Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice*. <http://science.sciencemag.org/>
- Hurst, R., Rollema, H., & Bertrand, D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors: From basic science to therapeutics. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 137, Issue 1, pp. 22–54). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.08.012>
- Imbimbo, B. P., & Giardino, G. A. M. (2011). Secretase Inhibitors and Modulators for the Treatment of Alzheimer's Disease: Disappointments and Hopes. In *Current Topics in Medicinal Chemistry* (Vol. 11).
- Knight, E. M., Verkhatsky, A., Luckman, S. M., Allan, S. M., & Lawrence, C. B. (2012). Hypermetabolism in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *33*(1), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.02.003>

- Koulousakis, P., Andrade, P., Visser-Vandewalle, V., & Sesia, T. (2019). The nucleus basalis of meynert and its role in deep brain stimulation for cognitive disorders: A historical perspective. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 69, Issue 4, pp. 905–919). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-180133>
- Kroker, K. S., Moreth, J., Kusmaul, L., Rast, G., & Rosenbrock, H. (2013). Restoring long-term potentiation impaired by amyloid-beta oligomers: Comparison of an acetylcholinesterase inhibitor and selective neuronal nicotinic receptor agonists. *Brain Research Bulletin*, 96, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.04.006>
- LaFerla, F. M., & Green, K. N. (2012). Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006320>
- LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 8, Issue 7, pp. 499–509). <https://doi.org/10.1038/nrn2168>
- Langot, K. L., Herrmann, N., Yau, K. K., Khan, L. R., Liu, B. A., Loulou, M. M., & Einarson, T. R. (2003). *Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis*.
- Liu, P. P., Xie, Y., Meng, X. Y., & Kang, J. S. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for alzheimer's disease. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 4, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>
- Liu, Q., Huang, Y., Shen, J., Steffensen, S., & Wu, J. (2012). Functional $\alpha 7\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors expressed in hippocampal interneurons exhibit high sensitivity to pathological level of amyloid β peptides. *BMC Neuroscience*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-155>
- Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Costafreda, S. G., Dias, A., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Kivimäki, M., Larson, E. B., Ogunniyi, A., ... Mukadam, N. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. In *The Lancet* (Vol. 396, Issue 10248, pp. 413–446). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6)
- Lombardo, S., & Maskos, U. (2015). Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. In *Neuropharmacology* (Vol. 96, Issue PB, pp. 255–262). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.018>
- Lührs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Döbeli, H., Schubert, D., Riek, R., & Hoffmann-La Roche, F. (2005). *3D structure of Alzheimer's amyloid-(1-42) fibrils* (Vol. 29, Issue 48). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506723102
- Ma, K. G., & Qian, Y. H. (2019). Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and its effects on Alzheimer's disease. In *Neuropeptides* (Vol. 73, pp. 96–106). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.12.003>
- Makar, S., Saha, T., & Singh, S. K. (2019). Naphthalene, a versatile platform in medicinal chemistry: Sky-high perspective. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 161, pp. 252–276). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.018>

- Manzano, S., Agüera, L., Aguilar, M., & Olazarán, J. (2020). A Review on Tramiprosate (Homotaurine) in Alzheimer's Disease and Other Neurocognitive Disorders. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00614>
- Maurer, S. v., & Williams, C. L. (2017). The cholinergic system modulates memory and hippocampal plasticity via its interactions with non-neuronal cells. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01489>
- Medeiros, R., Castello, N. A., Cheng, D., Kitazawa, M., Baglietto-Vargas, D., Green, K. N., Esbenshade, T. A., Bitner, R. S., Decker, M. W., & Laferla, F. M. (2014). $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist enhances cognition in aged 3xTg-AD mice with robust plaques and tangles. *American Journal of Pathology*, 184(2), 520–529. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.10.010>
- Mesulam. (2004). The Cholinergic Lesion of Alzheimer's Disease: Pivotal Factor or Side Show? In *Learning and Memory* (Vol. 11, Issue 1, pp. 43–49). <https://doi.org/10.1101/lm.69204>
- Mesulam, Mufson E J, Levey, A. I., & Wainer, B. H. (1983). Cholinergic Innervation of Cortex by the Basal Forebrain: Cytochemistry and Cortical Connections of the Septa1 Area, Diagonal Band Nuclei, Nucleus Basalis (Substantia Innominata), and Hypothalamus in the Rhesus Monkey. In *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY*.
- Mohandas, E. (2009). neurobiology of Alzheimer's disease. In *Indian J Psychiatry* (Vol. 21, pp. 55–61). <https://doi.org/0.4103/0019-5545.44908>
- Nagele, R. G., D'andrea, M. R., Anderson, W. J., & Wang, H.-Y. (2002). *INTRACELLULAR ACCUMULATION OF L-AMYLOID 1Å42 IN NEURONS IS FACILITATED BY THE K7 NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR IN ALZHEIMER'S DISEASE.* www.neuroscience-ibro.com
- Newman, M., Kretschmar, D., Khan, I., Chen, M., Verdile, G., & Lardelli, M. (2017). *Chapter 40 - Animal Models of Alzheimer's Disease.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809468-6/00040-1>
- Oddo, S., Caccamo, A., Green, K. N., Liang, K., Tran, L., Chen, Y., Leslie, F. M., & Laferla, F. M. (2005). Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. In *PNAS February* (Vol. 22, Issue 8). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0408500102
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & Laferla, F. M. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A and Synaptic Dysfunction. In *Neuron* (Vol. 39).
- Orta-Salazar, E., Aguilar-Vázquez, A., Martínez-Coria, H., Luquín-De Anda, S., Rivera-Cervantes, M., Beas-Zarate, C., Feria-Velasco, A., & Díaz-Cintra, S. (2014). REST/NRSF-induced changes of ChAT protein expression in the neocortex and

- hippocampus of the 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease. *Life Sciences*, 116(2), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.013>
- Orta-Salazar, E., Cuellar-Lemus, C. A., Díaz-Cintra, S., & Feria-Velasco, A. I. (2014). Cholinergic markers in the cortex and hippocampus of some animal species and their correlation to Alzheimer's disease. *Neurología (English Edition)*, 29(8), 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2012.10.010>
- Panza, F., Solfrizzi, V., Imbimbo, B. P., Tortelli, R., Santamato, A., & Logroscino, G. (2014). Amyloid-based immunotherapy for Alzheimer's disease in the time of prevention trials: The way forward. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(3), 405–419. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.883921>
- Perez, S. E., He, B., Muhammad, N., Oh, K. J., Fahnestock, M., Ikonovic, M. D., & Mufson, E. J. (2011). Cholinergic basal forebrain system alterations in 3xTg-AD transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, 41(2), 338–352. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.10.002>
- Pohanka, M. (2012a). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 13, Issue 2, pp. 2219–2238). <https://doi.org/10.3390/ijms13022219>
- Pohanka, M. (2012b). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 13, Issue 2, pp. 2219–2238). <https://doi.org/10.3390/ijms13022219>
- Puzzo, D., & Arancio, O. (2013). Amyloid- β peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 33, Issue SUPPL. 1). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129033>
- Puzzo, D., Privitera, L., & Palmeri, A. (2012). Hormetic effect of amyloid-beta peptide in synaptic plasticity and memory. *Neurobiology of Aging*, 33(7), 1484.e15-1484.e24. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.12.020>
- Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S. A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M. E., Jäggi, F., Wolburg, H., Gengler, S., Haass, C., Ghetti, B., Czech, C., Hölscher, C., Mathews, P. M., & Jucker, M. (2006). A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Reports*, 7(9), 940–946. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400784>
- Ren, J. M., Zhang, S. L., Wang, X. L., Guan, Z. Z., & Qi, X. L. (2020). Expression levels of the α 7 nicotinic acetylcholine receptor in the brains of patients with Alzheimer's disease and their effect on synaptic proteins in SH-SY5Y cells. *Molecular Medicine Reports*, 22(3), 2063–2075. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11253>
- Reyna, González, M., López, F., & González, G. (2014). *Demencias, una visión panorámica : temas derivados del V Simposio de Medicina Geriátrica realizado el 5 y 6 de septiembre del 2014 San Luis Potosí, S.L.P.* (M. , G. M. , L. F. G. G. Reyna, Ed.). Editorial Universitaria Potosina .
- Rivera-Marrero, S., Bencomo-Martínez, A., Orta Salazar, E., Sablón-Carrazana, M., García-Pupo, L., Zoppolo, F., Arredondo, F., Dapuerto, R., Daniela Santi, M., Kreimerman, I.,

- Pardo, T., Reyes, L., Galán, L., León-Chaviano, S., Espinosa-Rodríguez, L. A., Menéndez-Soto del Valle, R., Savio, E., Díaz Cintra, S., & Rodríguez-Tanty, C. (2020). A new naphthalene derivative with anti-amyloidogenic activity as potential therapeutic agent for Alzheimer's disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 28(20). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115700>
- Rivera-Marrero, S., Fernández-Maza, L., León-Chaviano, S., Sablón-Carrazana, M., Bencomo-Martínez, A., Perera-Pintado, A., Prats-Capote, A., Zoppolo, F., Kreimerman, I., Pardo, T., Reyes, L., Balcerzyk, M., Dubed-Bandomo, G., Mercerón-Martínez, D., Espinosa-Rodríguez, L. A., Engler, H., Savio, E., & Rodríguez-Tanty, C. (2019). [18 F]Amylovis as a Potential PET Probe for β -Amyloid Plaque: Synthesis, In Silico, In vitro and In vivo Evaluations . *Current Radiopharmaceuticals*, 12(1), 58–71. <https://doi.org/10.2174/1874471012666190102165053>
- Roberts, J. P., Stokoe, S. A., Sathler, M. F., Nichols, R. A., & Kim, S. (2021). Selective coactivation of $\alpha 7$ - and $\alpha 4\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptors reverses beta-Amyloid-induced synaptic dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*, 296. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100402>
- Robison, L. S., Gannon, O. J., Thomas, M. A., Salinero, A. E., Abi-Ghanem, C., Poitelon, Y., Belin, S., & Zuloaga, K. L. (2020). Role of sex and high-fat diet in metabolic and hypothalamic disturbances in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01956-5>
- Roda, A. R., Villegas, S., Esquerda-Canals, G., & Martí-Clúa, J. (2020). Cognitive impairment in the 3xtg-ad mouse model of alzheimer's disease is affected by $\alpha\beta$ -immunotherapy and cognitive stimulation. *Pharmaceutics*, 12(10), 1–21. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100944>
- Sablón-Carrazana, M., Fernández, I., Bencomo, A., Lara-Martínez, R., Rivera-Marrero, S., Domínguez, G., Pérez-Perera, R., Jiménez-García, L. F., Altamirano-Bustamante, N. F., Díaz-Delgado, M., Vedrenne, F., Rivillas-Acevedo, L., Pasten-Hidalgo, K., De Lourdes Segura-Valdez, M., Islas-Andrade, S., Garrido-Magaña, E., Perera-Pintado, A., Prats-Capote, A., Rodríguez-Tanty, C., & Altamirano-Bustamante, M. M. (2015). Drug development in conformational diseases: A novel family of chemical chaperones that bind and stabilise several polymorphic amyloid structures. *PLoS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135292>
- Sadigh-Eteghad, S., Talebi, M., Farhoudi, M., Golzari, S. E. J., Sabermarouf, B., & Mahmoudi, J. (2014). Beta-amyloid exhibits antagonistic effects on alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in orchestrated manner. *Journal of Medical Hypotheses and Ideas*, 8(2), 49–52. <https://doi.org/10.1016/j.jmhi.2014.01.001>
- Scarpini, E., Scheltens, P., & Feldman, H. (2003). Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol*, 2, 539–547.
- Sharma, K., Pradhan, S., Duffy, L. K., Yeasmin, S., Bhattarai, N., & Schulte, M. K. (2021). Role of receptors in relation to plaques and tangles in Alzheimer's disease pathology. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222312987>

- Sola, E., Capsoni, S., Rosato-Siri, M., Cattaneo, A., & Cherubini, E. (2006). Failure of nicotine-dependent enhancement of synaptic efficacy at Schaffer-collateral CA1 synapses of AD11 anti-nerve growth factor transgenic mice. *European Journal of Neuroscience*, *24*(5), 1252–1264. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04996.x>
- Sosa-Ortiz, A. L., Gutierrez-Robledo, M., Crías Cortés, J. L., & Mimenza-Alvarado, A. (2019, August 21). Las demencias en México, avances, rezagos y retos. *Las Demencias En México, Avances, Rezagos y Retos*.
- Spencer, J. P., Weil, A., Hill, K., Hussain, I., Richardson, J. C., Cusdin, F. S., Chen, Y. H., & Randall, A. D. (2006). Transgenic mice over-expressing human β -amyloid have functional nicotinic $\alpha 7$ receptors. *Neuroscience*, *137*(3), 795–805. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.007>
- Stanciu, G. D., Rusu, R. N., Bild, V., Filipiuc, L. E., Tamba, B. I., & Ababei, D. C. (2021). Systemic actions of sglT2 inhibition on chronic mtor activation as a shared pathogenic mechanism between alzheimer's disease and diabetes. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050576>
- Sydserrf, S., Sutton, E. J., Song, D., Quirk, M. C., Maciag, C., Li, C., Jonak, G., Gurley, D., Gordon, J. C., Christian, E. P., Doherty, J. J., Hudzik, T., Johnson, E., Mrzljak, L., Piser, T., Smagin, G. N., Wang, Y., Widzowski, D., & Smith, J. S. (2009). Selective $\alpha 7$ nicotinic receptor activation by AZD0328 enhances cortical dopamine release and improves learning and attentional processes. *Biochemical Pharmacology*, *78*(7), 880–888. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.07.005>
- Tampi, R. R., Forester, B. P., & Agronin, M. (2021). Aducanumab: evidence from clinical trial data and controversies. *Drugs in Context*, *10*, 1–9. <https://doi.org/10.7573/dic.2021-7-3>
- Tayeb, H. O., Murray, E. D., Price, B. H., & Tarazi, F. I. (2013). Bapineuzumab and solanezumab for Alzheimer's disease: Is the "amyloid cascade hypothesis" still alive? In *Expert Opinion on Biological Therapy* (Vol. 13, Issue 7, pp. 1075–1084). <https://doi.org/10.1517/14712598.2013.789856>
- Teaktong, T., Graham, A., Court, J., Perry, R., Jaros, E., Johnson, M., Hall, R., & Perry, E. (2003). Alzheimer's disease is associated with a selective increase in $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity in astrocytes. *GLIA*, *41*(2), 207–211. <https://doi.org/10.1002/glia.10132>
- Temido-Ferreira, M., Coelho, J. E., Pousinha, P. A., & Lopes, L. V. (2019). Novel Players in the Aging Synapse: Impact on Cognition. *Journal of Caffeine and Adenosine Research*, *9*(3), 104–127. <https://doi.org/10.1089/caff.2019.0013>
- Terry, A. v., & Buccafusco, J. J. (2003). The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: Recent challenges and their implications for novel drug development. In *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (Vol. 306, Issue 3, pp. 821–827). <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041616>

- Vallés, A. S., Borroni, M. V., & Barrantes, F. J. (2014). Targeting brain $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease: Rationale and current status. *CNS Drugs*, 28(11), 975–987. <https://doi.org/10.1007/s40263-014-0201-3>
- Wang, H. Y., Lee, D. H. S., D'Andrea, M. R., Peterson, P. A., Shank, R. P., & Reitz, A. B. (2000). β -Amyloid1-42 binds to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5626–5632. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5626>
- Wang, H.-Y., Lee, D. H. S., Davis, C. B., & Shank, R. P. (2000). Amyloid Peptide A 1-42 Binds Selectively and with Picomolar Affinity to 7 Nicotinic Acetylcholine Receptors. In *J. Neurochem* (Vol. 75).
- Winblad, B., Graf, A., Riviere, M.-E., Andreasen, N., & Ryan, J. M. (2014). Active immunotherapy options for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, 6. <http://alzres.com/content/6/1/7>
- Winslow, W., McDonough, I., Tallino, S., Decker, A., Vural, A. S., & Velazquez, R. (2021). IntelliCage Automated Behavioral Phenotyping Reveals Behavior Deficits in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease Associated With Brain Weight. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.720214>
- Woolf, N. J. (1991). CHOLINERGIC SYSTEMS IN MAMMALIAN BRAIN AND SPINAL CORD. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 37).
- Wu J, Ishikawa M, Zhang J, & Hashimoto k. (2006). Brain imaging of nicotinic receptors in Alzheimer's disease. *Journal of Nuclear Medicine*, 47(2), 302–312. <https://doi.org/10.4061/2010/548913>
- Xia, Y., Prokop, S., & Giasson, B. I. (2021). "Don't Phos Over Tau": recent developments in clinical biomarkers and therapies targeting tau phosphorylation in Alzheimer's disease and other tauopathies. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 16, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00460-5>
- Yakel, J. L. (2012). Nicotinic ACh Receptors in the Hippocampus: Role in Excitability and plasticity. In *Nicotine & Tobacco Research* (Vol. 14, Issue 11, pp. 1249–1257). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.004>
- Yang, T., Li, S., Xu, H., Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2017). Large soluble oligomers of amyloid β -protein from Alzheimer brain are far less neuroactive than the smaller oligomers to which they dissociate. *Journal of Neuroscience*, 37(1), 152–163. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1698-16.2016>
- Yang, W. N., Ma, K. G., Chen, X. L., Shi, L. L., Bu, G., Hu, X. D., Han, H., Liu, Y., & Qian, Y. H. (2014). Mitogen-activated protein kinase signaling pathways are involved in regulating $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated amyloid- β uptake in SH-SY5Y cells. *Neuroscience*, 278, 276–290. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.08.013>
- Yu, D., Yan, H., Zhou, J., Yang, X., Lu, Y., & Han, Y. (2019). A circuit view of deep brain stimulation in Alzheimer's disease and the possible mechanisms. In *Molecular*

