



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Efecto de la acumulación de beta amiloide en la percepción gustativa y en el condicionamiento de aversión al sabor en un modelo transgénico para la enfermedad de Alzheimer.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**SILVIA MORALES RODRÍGUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Q.F.B. PERLA DEL ROCÍO MORENO CASTILLA**

**2014**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Morales  
Rodríguez  
Silvia  
52 73 40 79  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
305157397

### 2. Datos del tutor

Q.F.B.  
Perla del Rocío  
Moreno  
Castilla

### 3. Datos del sinodal 1

Dr  
Ricardo David  
Quiroz  
Báez

### 4. Datos del sinodal 2

Dr  
Jorge Antonio  
García  
Álvarez

### 5. Datos del sinodal 3

Dra  
Leticia  
Ramírez  
Lugo

### 6. Datos del sinodal 4

M en C  
Marlen  
Valdés  
Fuentes

### 7. Datos del trabajo escrito.

Efecto de la acumulación de beta amiloide en la percepción gustativa y en el condicionamiento de aversión al sabor en un modelo transgénico para la enfermedad de Alzheimer.

69 p  
2014

## **Agradecimientos.**

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de neurobiología del aprendizaje y la memoria, en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 155242, así como del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN209413.

El trabajo no hubiera podido ser realizado sin el importante apoyo de mi tutora, la candidata a doctora Perla Moreno Castilla, a quien agradezco profundamente sus enseñanzas y sobre todo la paciencia que siempre tuvo conmigo.

De igual importancia resulta agradecer al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, quien me aceptó en su grupo de trabajo y que siempre tuvo comentarios enriquecedores para mi trabajo. Además de permitirme fungir como ayudante de investigador nacional nivel III de julio de 2012 a junio de 2013, a su cargo.

Agradezco también a la Dra. Israela Balderas, técnica del laboratorio, por su apoyo durante el desarrollo de la tesis.

Adicionalmente me gustaría agradecer al Dr. Fernando García Hernández, jefe de la unidad de microscopía, quien siempre fue de gran ayuda. Así como a los académicos de la unidad de cómputo: Gerardo Coello, Ana Escalante y Francisco Pérez. Además de mi compañero Alejandro Bárcenas, por todo el apoyo brindado.

Me gustaría reconocer también, el invaluable apoyo de la Dra. Claudia Rivera, encargada del bioterio y de manera particular me gustaría agradecer al Dr. Héctor Malagón, quien siempre se tomó el tiempo para asesorarme con los animales y enriqueció mi formación como bióloga.

Por último, pero no menos importante, me gustaría agradecer a los miembros del jurado: al Dr. Jorge Antonio García Álvarez, al Dr. Ricardo Quiroz Báez, y a la M. en C. Marlen Valdés Fuentes, cuyos comentarios me ayudaron a mejorar ampliamente este trabajo y verlo desde varios enfoques. Adicionalmente me gustaría reconocer el apoyo de la Dra. Leticia Ramírez Lugo, quien además de ser mi sinodal, me brindó apoyo académico y asesoría para llevar a cabo este trabajo.

## Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>5</b>
<b>Resumen</b> :.....	<b>6</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>8</b>
Enfermedad de Alzheimer.....	8
Características generales de la EA.....	9
Síntomas y diagnóstico de la EA.....	9
Etiología.....	10
Hipótesis de la cascada amiloide.....	10
Hipótesis no amiloidogénicas.....	12
Características patológicas de la enfermedad de Alzheimer.....	14
El péptido $\beta$ A en la EA.....	14
La proteína tau hiperfosforilada en la EA.....	17
Alteración de neurotransmisores en la EA.....	19
Bases genéticas de la EA.....	21
Mutaciones en la EA.....	21
Modelos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.....	23
Modelo 3xTg-AD.....	23
Memoria gustativa.....	25
Condicionamiento de Aversión a Sabor (CAS).....	27
Alteraciones sensoriales en la EA.....	31
<b>Antecedentes</b> .....	<b>34</b>
<b>Planteamiento del problema</b> :.....	<b>38</b>
<b>Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>39</b>
<b>Desarrollo experimental</b> :.....	<b>40</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>44</b>
Prueba de percepción de sabor.....	44
Condicionamiento de Aversión a Sabor (CAS).....	49
Inmunofluorescencia.....	52
<b>Discusión</b> .....	<b>56</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>62</b>
<b>Bibliografía</b> :.....	<b>64</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>71</b>

## Abreviaturas.

aa	Aminoácidos	TASRs	Receptores gustativos
ABL	Amígdala basolateral	TH	Tirosina hidroxilasa
AC	Adenilato ciclasa		
ADYLC3	Adenilato ciclasa tipo III		
AP	Área postrema		
APP	Proteína precursora amiloide		
$\beta$ A	$\beta$ -amiloide		
CAS	Condicionamiento de aversión al sabor		
CI	Corteza Insular		
DA	Dopamina		
EA	Enfermedad de Alzheimer		
HCA	Hipótesis en cascada de amiloide		
IP	Índice de preferencia		
MCP	Memoria a corto plazo		
MLP	Memoria a largo plazo		
mo	Meses de edad		
MT	Microtúbulos		
NMDA	N-Methyl-D-aspartato		
NPBd	Núcleo parabraquial dorsolateral		
NT	Neurotransmisor		
NTS	Núcleo del tracto solitario		
ONFs	Ovillos neurofibrilares		
OR	Receptores olfativos		
PS1	Presenilina 1		
PS2	Presenilina 2		
SNC	Sistema Nervioso Central		

## Resumen:

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa del sistema nervioso central (SNC), en la que los procesos cognitivos se ven ampliamente afectados. Actualmente es una de las enfermedades con mayor impacto y se han desarrollado múltiples herramientas para su estudio. Una de ellas son los modelos de animales transgénicos que permitan entender los procesos que conllevan al desarrollo de la enfermedad.

El modelo 3xTg-AD (modelo de la EA), presenta alteraciones en la memoria gustativa, que pueden ser resultado de la acumulación del péptido beta amiloide ( $\beta$ A) en la corteza insular (CI) y la amígdala basolateral (ABL), regiones cerebrales relacionadas con la formación de este tipo de memoria. Una de las alteraciones que se aprecian, es que los animales no presentan el miedo y aversión que se exhibe de forma natural a sabores novedosos (neofobia). Adicionalmente, los animales no exhiben una memoria gustativa aversiva de largo plazo. Las perturbaciones en este tipo de memoria, pueden tener dos explicaciones: 1) Los animales presentan alteraciones sensoriales, tal como sucede en pacientes con EA, cuya percepción sensorial se encuentra disminuida, 2) Se trata de un problema en la formación de la memoria.

Para resolver esta disyuntiva, en este proyecto de tesis se analizó si los animales 3xTg-AD eran capaces de percibir el sabor de sacarina, saborizante utilizado en el laboratorio para la formación de una memoria gustativa aversiva. Al compararlos con animales con el mismo fondo genético (silvestres), se observó que ambos grupos presentan curvas de preferencia y consumo, con pendientes y umbrales similares; señalando una capacidad similar para percibir el estímulo gustativo, descartando con ello alteraciones de tipo sensorial, sugiriendo un problema de índole cognitivo.

Con el fin de analizar perturbaciones en la formación de la memoria, se analizó la memoria de corto plazo en el Condicionamiento de Aversión al Sabor (CAS), una herramienta utilizada para el análisis de la memoria aversiva. Se utilizaron animales con diferentes etapas de la acumulación de  $\beta$ A y se observó que tanto los ratones con una escasa acumulación, como animales con una acumulación importante del péptido, en la CI y la ABL, son capaces de formar una memoria a corto plazo. Este hallazgo es relevante

porque sugiere perturbaciones en la consolidación de la memoria gustativa, proceso en que la dopamina (DA) tiene un papel relevante.

Conociendo esta información y con el fin de entender las fallas en la liberación de DA que se reportan en este modelo y su relación con la acumulación de  $\beta$ A, se realizó un análisis por inmunofluorescencia doble, contra  $\beta$ A y tirosina hidroxilasa (TH) en CI y ABL.

El análisis de la CI mostró que existe una correlación inversa entre la acumulación de  $\beta$ A y la expresión de TH, es decir, entre mayor deposición de  $\beta$ A se encuentra en el tejido, menor expresión de TH es detectable, lo que puede sugerir una atrofia de las terminales catecolaminérgicas en animales de edad avanzada.

El análisis en la ABL, no replica los resultados observados en la CI, ya que se observa una acumulación importante de  $\beta$ A desde edades tempranas, acompañadas de una expresión importante de TH, expresión que no se reduce de manera significativa, en animales con una mayor acumulación del péptido.

Al integrar estos resultados, se sugiere que la acumulación de  $\beta$ A en la CI pudiera estar causando perturbaciones en la expresión de TH, evento que afectaría los procesos de la memoria donde participan catecolaminas, como la consolidación de la memoria gustativa y el etiquetamiento de los estímulos. Esta disminución de la expresión de TH pudiera presentarse también en la ABL, pero para corroborarlo, es necesario realizar un estudio más detallado de la región.

## **Introducción.**

### **Enfermedad de Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un problema de carácter médico, social y de salud pública, que ha recibido mayor importancia a medida que la población mundial envejece, ya que afecta principalmente a adultos mayores a partir de los 60 años de edad y es la causa más común de demencia.

La demencia es el deterioro severo, permanente y progresivo de las habilidades cognitivas, al grado de afectar funciones sociales, intelectuales y ocupacionales, esta condición es causada por alteraciones en el cerebro y puede ser una consecuencia normal del envejecimiento. Pero en la EA se presenta un deterioro cognitivo exacerbado que lleva la incapacidad mental y funcional y finalmente la muerte (Nowotny, et al., 2001; Oddo et al., 2003; Reynolds & Crowe, 2006).

La EA se caracteriza por un deterioro cognitivo gradual e irreversible, cuya manifestación más importante es una pérdida de la memoria. A nivel histológico, en la EA se presentan agregados amiloides, ovillos neurofibrilares (ONFs), así como una pérdida de neuronal y de las sinapsis (Castellani et al., 2010).

La etiología de la enfermedad no se conoce con certeza, pero la evidencia sugiere que los agregados amiloides (conformados por el péptido  $\beta$ A) y los ovillos neurofibrilares (conformados por la proteína tau), tienen un papel crítico en el desarrollo de la EA (Nowotny et al., 2001).  $\beta$ A y tau se encuentran de forma regular en el cerebro pero por motivos que aún se desconocen, en la EA estas proteínas se acumulan en forma de agregados amiloides y ONFs, respectivamente y dichas acumulaciones se acompañan de una serie de eventos tóxicos que provocan la muerte neuronal (LaFerla et al., 2007; Ballatore, et al., 2007; Gendron & Petrucelli, 2009).

## **Características generales de la EA.**

### **Síntomas y diagnóstico de la EA.**

Como se había mencionado, la EA tiene un desarrollo lento pero irreversible y es mortal en todos los casos, quienes la padecen viven en promedio entre 7 y 10 años después del diagnóstico, aunque hay quienes llegan a vivir hasta 20 años (Holtzman et al., 2011).

En los pacientes con EA los síntomas más tempranos se manifiestan como déficits súbitos e intermitentes en el recuerdo de eventos de la vida cotidiana, referidos como una pérdida de la memoria episódica, es decir, inician teniendo períodos de olvido que evolucionan hasta convertirse en una pérdida irreversible de la memoria y de las habilidades previamente aprendidas (Walsh & Selkoe, 2004).

Los pacientes en etapas avanzadas de la patología no pueden valerse por sí mismos, ya que el deterioro mental es tan severo que interviene con la función social y ocupacional, lo que provoca que la EA sea un trastorno incapacitante (Nowotny, et al., 2001; McKhann et al., 2011). Además de la pérdida de memoria se ha reportado que en la EA los pacientes presentan otros síntomas, principalmente de carácter neuropsiquiátrico (psicosis, depresión, etc.) (Tariot et al., 2002) así como perturbaciones en la percepción sensorial que afectan predominantemente al olfato (Aliani et al., 2013).

El diagnóstico de la EA es un proceso complicado, dado que los síntomas son confundidos a menudo con pérdida de habilidades propias de gente de edad avanzada, e incluso con otros tipos de demencia. Un diagnóstico certero de la EA sólo puede realizarse mediante un análisis histológico postmortem (Perl, 2010), que consiste en un examen detallado del tejido cerebral y en el que necesariamente deben encontrarse marcadores de la EA como los agregados de  $\beta$ A y tau.

A nivel macroscópico el cerebro de pacientes que padecieron una demencia severa por la EA presenta una atrofia evidente, ésta se caracteriza por una pérdida en el volumen y el peso cerebral, en comparación con el de personas sanas de la misma edad (Castellani et al., 2010).

## **Etiología**

Como ya se mencionó, no se ha logrado describir la etiología de la EA. Conocerla, facilitaría el diagnóstico, tratamiento y prevención del padecimiento, ya que podrían generarse herramientas más eficaces para evitar los síntomas y efectos que la EA produce.

A pesar de la escasez de conocimiento en el tema, se han propuesto múltiples hipótesis que describirían las causas iniciales subyacentes a los procesos degenerativos y su correlación con los síntomas observados.

### **Hipótesis de la cascada amiloide.**

Una de las hipótesis con mayor apoyo es la hipótesis de la cascada amiloide (HCA) que postula a  $\beta$ A como el causante principal de los eventos que se observan en la EA.

La producción de  $\beta$ A es un proceso fisiológico normal y se puede encontrar al péptido tanto en plasma como en fluido cerebroespinal de individuos sanos y de pacientes con la EA (Gustaw et al., 2008). Se ha señalado la presencia de una asociación entre el péptido y la EA, ya que éste se encuentra agregado en cerebros de pacientes con la enfermedad, además de estar asociado a la presencia de neuritas distróficas, que son restos de neuronas muertas que generalmente se agrupan en torno al núcleo amiloide (Verdile et al., 2004).

Actualmente se sabe que el péptido  $\beta$ A es el principal componente de las placas neuríticas y otros tipos de agregados amiloides, observados en los pacientes con la EA, la secuenciación del péptido permitió ubicarlo como un fragmento de la APP (Proteína Precursora Amiloide, por sus siglas en inglés), lo que aunado al hecho de que las mutaciones en esta proteína dan origen a la EA, constituyen la bases en la que se fundamenta la hipótesis de la cascada amiloide, que ha sido el modelo molecular de la patología de la EA más importante en los últimos años (Armstrong, 2011).

La HCA indica que  $\beta$ A en su forma oligomérica es el iniciador de la cascada neurotóxica que culmina en la muerte neuronal y la demencia observados en el padecimiento (Hardy & Selkoe, 2002; Haass &

Selkoe, 2007). Por lo que otras modificaciones celulares como la presencia de ovillos, pérdida neuronal, pérdida de contactos sinápticos y disfunción en la neurotransmisión, son una consecuencia de la presencia exacerbada de  $\beta$ A.

Aunque no existe un consenso ni un mecanismo claro que explique el daño celular provocado por  $\beta$ A, se han descrito un número importante de procesos relacionados con el péptido, que conllevan al deterioro neuronal. Algunos de ellos incluyen; la activación de la respuesta inflamatoria (Lee et al., 2013); liberación de citocinas neurotóxicas y producción de daño oxidativo en células vecinas (Jovanovic, 2012); inducción de mecanismos de apoptosis (Morishima et al., 2001); así como la afectación de los contactos sinápticos (LaFerla et al., 2007). Este último fenómeno, correlaciona con una de las primeras anormalidades descritas tanto en pacientes como en modelos animales.

Actualmente, esta hipótesis señala como principal factor de riesgo al envejecimiento, donde adicionalmente se requiere un detonante que puede ser heredable, como las mutaciones descritas para la EA. A partir de esta acumulación patológica se puede correlacionar el tipo y grado de agregación del péptido con diferentes eventos patológicos que desenlazan en la neurodegeneración y la demencia. En la figura 1 se presenta un esquema que integra la propuesta de la HCA, mostrando desde factores de riesgo, hasta eventos patológicos importantes presentes en el curso de la EA.

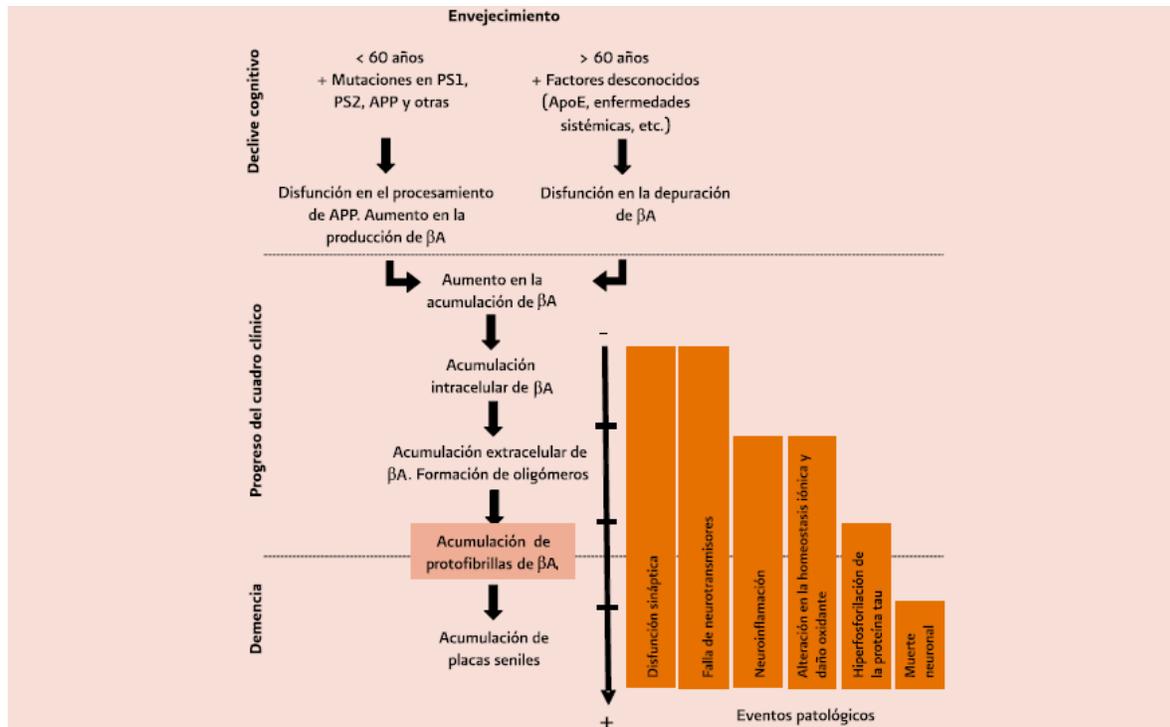


Figura 1. Hipótesis en cascada de amiloide. Este esquema integra la hipótesis de la acumulación de  $\beta A$  como el origen de la EA con el progreso de eventos patológicos ligados a la evolución del cuadro clínico, considerando el envejecimiento como el principal factor de riesgo. Tomada de Moreno-Castilla & Tovar y Romo en López Muñoz & Torres Castillo, 2012.

### Hipótesis no amiloidogénicas.

Es importante mencionar que aunque la HCA es ampliamente aceptada, tiene supuestos que resultan difícilmente reconciliables entre sí o cuyo nexa no se ha podido describir con certeza. Un ejemplo de ello, es que se ha observado que en modelos transgénicos que acumulan APP no se produce la cascada descrita y se necesita de la presencia de transgenes de la proteína tau para replicar los síntomas observados en la EA. Además de que la acumulación amiloide y la de ONFs, se da a diferentes tiempos y en regiones distintas (Armstrong, 2011).

Entre las varias objeciones que se hacen a la HCA, se encuentra el supuesto de que los agregados amiloides y de la proteína tau pueden ser un resultado de la neurodegeneración y no necesariamente la causa. Además de que no existe un mecanismo ampliamente aceptado que explique cómo la deposición

de  $\beta$ A conlleva a la formación de los ovillos neurofibrilares (Armstrong et al., 2011), ni a la muerte y degeneración neuronal, que llevan al desarrollo de la enfermedad (Neve & Robakis, 1998).

Adicionalmente, la dificultad para establecer el rol específico de los agregados amiloides en la EA, ha llevado a que se propongan modelos alternativos. Éstos se basan en la perturbación del tráfico vesicular en la sinapsis, perturbaciones de la red del citoesqueleto, o de la distribución de colesterol en la membrana (Drouet et al., 2000). Algunos autores sugieren que las placas pueden ser resultado de la neurodegeneración, como consecuencia del estrés oxidante (Atwood et al., 2003), e incluso pueden tener un papel protector.

Por otro lado, se ha observado que existe una correlación entre la carga de ONFs en la corteza y el grado de demencia de los pacientes, lo que sugiere que la presencia de los ONFs es la responsable de la neurodegeneración en la EA y al encontrarse en regiones cerebrales distintas a donde se localiza  $\beta$ A, se trata de estructuras que se forman de manera independiente. Además los ONFs, se han observado en tejido de pacientes con otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y la demencia pugilística, lo que subraya su papel neurotóxico (Neve & Robakis, 1998).

Otros autores sugieren que el problema no se encuentra en la acumulación de  $\beta$ A sino a perturbaciones provocadas por APP, por un lado se propone que la expresión excesiva de la APP es la responsable de la neurodegeneración, ya que modelos con amiloidosis avanzada no presentan problemas en el aprendizaje espacial a diferencia de los animales que sobreexpresaban la proteína en estado silvestre.

Por otro lado, también se considera que el desarrollo de la EA puede deberse a la pérdida de la función de APP y Presenilina 1 (PS1), proteínas a las que se les han asociado propiedades neurotróficas, Además se ha visto que la delección de  $\beta$ A en células neuronales con una mutación en APP, provoca la fragmentación de DNA y apoptosis, tal y como se genera en las células que sí producen el péptido, señalando a la mutación de APP y no a la acumulación de  $\beta$ A (Neve & Robakis, 1998).

## Características patológicas de la enfermedad de Alzheimer.

### El péptido $\beta$ A en la EA.

Es claro que al ser características diagnósticas de la EA y posibles causantes de ésta, tanto los agregados amiloides como ONFs, sean a la fecha, sujeto de estudio y se tenga una cantidad importante de información al respecto.

Por un lado, se sabe que la APP es una proteína transmembranal cuya función fisiológica no se conoce con certidumbre pero se ha reportado que puede estar involucrada en la plasticidad sináptica (Chan et al., 2002), la adhesión (Breen et al., 1991) y movimiento celular (Sabo et al., 2001). Ha sido una proteína ampliamente estudiada porque a partir de su procesamiento proteolítico por las proteasas  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, se genera el péptido  $\beta$ A (ruta amiloidogénica). Cabe mencionar que existe un proceso alternativo en el que no se genera el péptido y en el que participan las enzimas  $\alpha$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa (ruta no amiloidogénica). Ambos procesos se esquematizan en la figura 2.

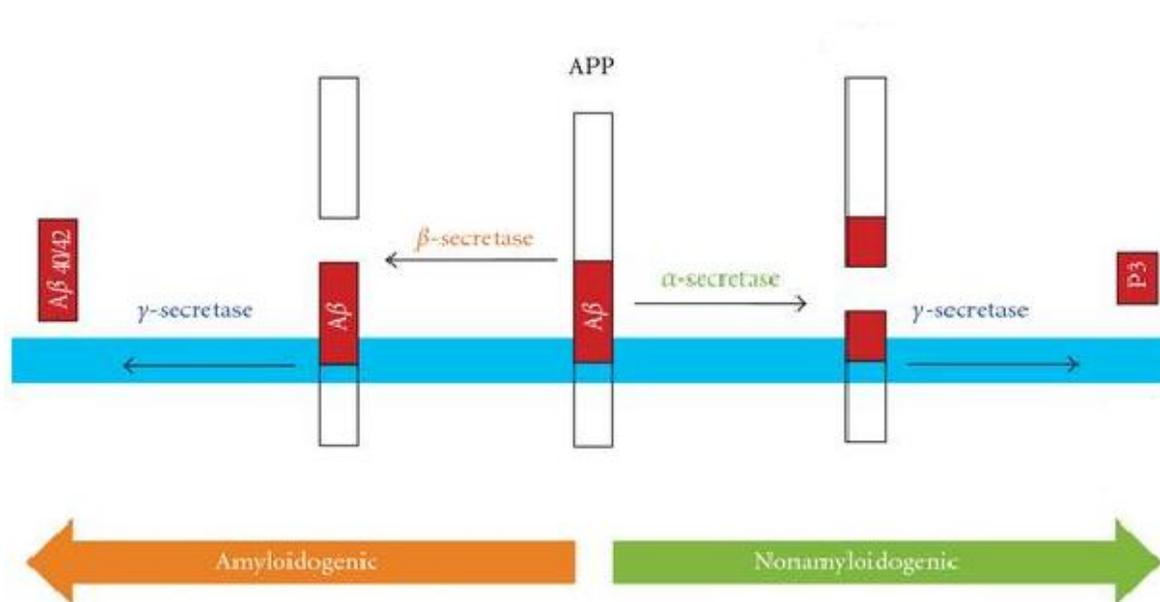


Figura 2: Procesamiento proteolítico de APP. En la ruta amiloidogénica  $\beta$ -secretasa libera el ectodominio soluble de APP. El fragmento unido a la membrana es posteriormente procesado por  $\gamma$ -secretasa, que libera el péptido al medio extracelular. El dominio intracelular de APP es liberado al citosol en donde es rápidamente degradado. Mientras que en la ruta no amiloidogénica, APP es cortada por  $\alpha$ -secretasa. Corte que se lleva a cabo a la mitad del dominio de  $\beta$ A, liberando un ectodominio soluble y un fragmento unido a la membrana, que al ser procesado por  $\gamma$ -secretasa genera el péptido P3. Modificado de Wang et al., 2012.

En la ruta no amiloidogénica, la APP es cortada por la  $\alpha$ -secretasa en su porción extracelular y por la  $\gamma$ -secretasa en su porción transmembranal, mediante estos procesamientos proteolíticos se generan tres péptidos: un ectodominio, un péptido libre (P3) y el dominio intracelular, a estas moléculas no se les ha reportado un papel tóxico y no se asocian con ninguna patología.

En la ruta amiloidogénica, APP es cortada por la  $\beta$ -secretasa en su porción extracelular, en una región cercana a la membrana y por la  $\gamma$ -secretasa en su porción transmembranal, provocando la generación de tres péptidos: un ectodominio,  $\beta$ A y el dominio intracelular. Cabe mencionar que este último es rápidamente degradado, mientras que  $\beta$ A tiene la capacidad de acumularse, conformando oligómeros, protofibrillas, fibrillas y placas neuríticas; agregados amiloides que como ya se resaltó, tienen un papel importante en la EA.

Es importante recalcar que las dos rutas, se llevan a cabo de manera fisiológica en las células y no implican una condición patológica por sí solas. Por ejemplo, se ha reportado que el fragmento correspondiente a  $\beta$ A parece estar participando en el control de la actividad sináptica, causando un decremento en ésta, que es necesario para evitar la excitotoxicidad en condiciones no patológicas (Kamenetz et al., 2003). Por otro lado, también se ha sugerido que tiene un papel relevante en la supervivencia neuronal, ya que la inhibición de la producción endógena del péptido o su inmunodepleción en cultivos primarios de neuronas del SNC, provoca muerte celular, efecto que no se observó en otros tipos celulares y que pudo ser contrarrestado con la adición de concentraciones fisiológicas de la isoforma más común de  $\beta$ A (Plant et al., 2003).

Cabe recalcar que paradigmáticamente se ha asumido que los efectos negativos/tóxicos provocados por  $\beta$ A en neuronas, se llevan a cabo hasta que existe una deposición del péptido en placas, aunque evidencia reciente indica que la presencia de oligómeros solubles dentro de la célula más que las placas, son la principal causa de disfunción sináptica que conlleva a la neurodegeneración (Ferreira et al, 2011; Demuro et al., 2010; Xia, 2010; Ferreira & Klein, 2011; Wilcox et al., 2011).

Una evidencia que apoya esta aseveración, es la que aportan trabajos recientes en los que se sugiere que la formación intracelular de  $\beta$ A pudiera ser un evento temprano en la patogénesis de la EA. Ya que

en pacientes con alteraciones cognitivas leves, se ha reportado la presencia intracelular del péptido en regiones que son más susceptibles al desarrollo temprano de la patología como el hipocampo y la corteza entorrinal (Gouras, et al., 2000); además de preceder a la formación de los depósitos extracelulares, y se ha demostrado que la concentración intracelular de  $\beta$ A se reduce conforme las placas extracelulares se acumulan (Mori, 2002; Oddo et al., 2006).

Es necesario mencionar la acumulación intracelular porque juega un papel importante en la EA, ya que produce efectos patológicos y afecta el funcionamiento celular y de los organelos (LaFerla et al., 2007). Además, se sugiere que pudiera estar mediando los eventos patológicos *in vivo*, particularmente dentro de una neurona disfuncional.

La evidencia sugiere que la acumulación intracelular de  $\beta$ A puede contribuir a la patología de la EA, ya que facilitaría la hiperfosforilación de tau, al perturbar la función del proteasoma (Gregori et al., 1995; Oh et al., 2005; Almeida et al., 2006) y la mitocondria (Manczak et al., 2006; Hansson et al., 2004), eventos que conllevan a la formación de especies reactivas de oxígeno y alteración en la liberación de calcio, eventos cuyo efecto es la disfunción sináptica (LaFerla et al., 2007).

Además, cuando los oligómeros se encuentran en las neuronas, son capaces de desregular la actividad y reducir la expresión de los receptores de glutamato (NMDA y AMPA), los receptores de tipo NMDA, se encargan de mantener la homeostasis de glutamato en la célula y están involucrados en procesos importantes como la plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria (Danysz & Parsons, 2012).

## **La proteína tau hiperfosforilada en la EA.**

Los ovillos neurofibrilares (ONFs) son depósitos intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada dentro de neuronas degeneradas, esta proteína en condiciones no patológicas, se encuentra en gran cantidad en neuronas y más predominantemente en los axones, en las que se une a los monómeros de tubulina formando polímeros estables que son esenciales para el transporte y crecimiento axonal (Nowotny, et al., 2001; Gendron & Petrucelli, 2009).

Tau es una proteína asociada a microtúbulos (MT) conformada principalmente por 3 dominios: uno de unión a tubulina en la fracción C-terminal, seguido de una región rica en prolina y en la fracción N-terminal cuenta con una región rica en aminoácidos (aa) ácidos (Gendron & Petrucelli, 2009).

Aunque la función primordial de tau es la estabilización de microtúbulos, varios reportes sugieren que tau puede interactuar con otras estructuras y enzimas, incluyendo el RNA (Kampers, et al., 1999) y la PS1 (Takashima, et al., 1998). Aunque la importancia de la interacción específica de tau con estructuras distintas a microtúbulos no ha sido descrita, se sugiere que tau pudiera estar uniéndose de manera promiscua con distintas moléculas, uniones que serían más comunes si la proteína no se encuentra asociada a los microtúbulos, lo que provocaría un plegamiento irregular de la proteína y su posterior acumulación (Ballatore, et al., 2007).

La afinidad de tau por los microtúbulos, depende de su fosforilación en residuos de serina y treonina. En condiciones normales, tau se encuentra en un equilibrio constante en el que se llevan a cabo ciclos frecuentes de unión y separación de tau con los MTs, en los que intervienen tanto cinasas como fosfatasas (Ballatore, et al., 2007).

La acción de tau sobre los MT no es nada trivial ya que contribuye de manera directa o indirecta a distintos procesos celulares ya permite el mantenimiento de la morfología celular, el transporte axonal y la formación de prolongaciones dendríticas y axonales. Estos procesos permiten que las neuronas se encuentren en estados óptimos de funcionamiento y viabilidad (Gendron & Petrucelli, 2009).

Para que los procesos de transporte axonal, señalización neurotrófica y la movilización de organelos durante la sinapsis, entre otros, puedan llevarse a cabo de manera efectiva, se necesita de la fosforilación y defosforilación de tau (Ballatore, et al., 2007). Perturbaciones en el transporte axonal, afectan severamente la sinapsis, además de la neurotransmisión y la propagación de señales llevando finalmente a la degeneración sináptica (Gendron & Petrucelli, 2009).

En condiciones patológicas, el equilibrio de unión de tau con los MTs está perturbado, lo que resulta en un incremento de tau libre (no unida), que es susceptible a sufrir modificaciones en el plegamiento y con ello mayor capacidad para agregarse, esto debido a una mayor fosforilación o una menor defosforilación.

En la EA tau se encuentra hiperfosforilada lo que conlleva a que se forme una unión poco eficiente con los microtúbulos. La proteína libre se pliega de manera anormal, formando depósitos cuya estructura se modifica hasta conformar los ovillos neurofibrilares (Gendron & Petrucelli, 2009).

Estos ovillos resultan tóxicos para las neuronas y conllevan a la pérdida de contactos sinápticos, transporte axonal deficiente, estructuras microtubulares defectuosas y posteriormente a la muerte neuronal (Nowotny, et al., 2001; Oddo, et al., 2003). Estudios han mostrado que la cantidad y la distribución de los ovillos neurofibrilares en casos de EA, correlacionan con el grado de demencia y la duración de la enfermedad (Perl, 2010).

Es importante mencionar que los efectos negativos provocados por tau en la célula, como la muerte neuronal, se han reportado aún sin la presencia de los ONFs, por lo que se propone que la neurodegeneración provocada por tau en EA y otras patologías como la demencia frontotemporal y la enfermedad de Pick, entre otras, se debe a la combinación de una pérdida de la función normal de la proteína y a la ganancia de otras funciones que resultan tóxicas para la célula (Ballatore, et al., 2007; Gendron & Petrucelli, 2009).

A diferencia de lo que sucede en la EA en la que la presencia de ovillos se lleva a cabo exclusivamente en neuronas, en otras patologías relacionadas con tau, se observa un acumulación proteica también en células gliales (Gendron & Petrucelli, 2009).

## **Alteración de neurotransmisores en la EA.**

Se ha descrito que además de la disfunción sináptica, en la EA se presentan perturbaciones en distintos sistemas de neurotransmisión, esto tiene una gran relevancia porque altera la comunicación entre las neuronas, y con ello la funcionalidad del sistema. Ejemplo la alteración de los neurotransmisores (NTs), son estudios realizados en tejido de pacientes en una fase temprana de la enfermedad, en los que se revela una alteración selectiva de los neurotransmisores que conlleva a una menor actividad neuronal (Francis, et al., 1993).

Se ha observado particularmente que el sistema colinérgico es uno de los sistemas que se encuentran afectados en la EA y es uno de los factores responsables del deterioro intelectual que se presenta en el envejecimiento de forma normal, así como en los pacientes con el transtorno (Pérez-Martínez, 2005, Francis, et al., 1993; Perry et al., 1978; Wilcock, et al., 1982; Sims, et al., 1983).

Es importante recalcar que a pesar de ser el sistema más estudiado, la neurotransmisión colinérgica no es el único sistema de neurotransmisión que presenta perturbaciones, ya que son varios los NT involucrados en el proceso neurodegenerativo y su disminución progresiva es la causante de los síntomas de declive cognitivo (Francis, 2005; Martorana et al, 2010).

Se han reportado alteraciones de neurotransmisores desde etapas tempranas de la EA, entre los sistemas afectados en esta fase están el colinérgico, serotoninérgico y noradrenérgico (Francis, et al., 1993), mientras que en etapas más avanzadas, las alteraciones se extienden también a los sistemas del ácido g-aminobutírico (GABA) (Rossor, et al., 1982; Lowe, et al., 1990) y el de somatostatina (Rossor & Iversen, 1986; Francis, et al, 1987).

De manera más reciente, se ha propuesto que el sistema dopaminérgico tiene un papel relevante en la patofisiología de la EA (Itoh et al., 1996; Kemppainen et al. 2003; Martorana et al., 2010; Mura et al., 2010). Ejemplo de esto es la desregulación de la expresión de los receptores dopaminérgicos, evento descrito por al menos dos grupos de investigación (Kumar & Patel, 2007; Joyce et al., 1993; 1998)

Es importante considerar también, la evidencia que aportan los modelos animales, como las deficiencias en la liberación de dopamina (DA) que afectan severamente el desempeño cognitivo de los animales en tareas en donde participa el neurotransmisor (Guzmán-Ramos et al., 2012; Moreno-Castilla et al., en preparación).

Considerando la relevancia que ha adquirido el sistema dopaminérgico en los últimos años debido a su relación con la EA y la escasa información con que se cuenta en este rubro, es importante estudiar con mayor detenimiento a este sistema para poder ubicar las posibles perturbaciones y conocer cómo afectan a los pacientes.

La dopamina es un neurotransmisor crucial para el óptimo funcionamiento del sistema nervioso. El paso inicial para la biosíntesis de dopamina y otras catecolaminas, es la acción de la Tirosina-hidroxilasa (TH) sobre la tirosina, aminoácido que llega al sistema nervioso mediante la barrera hematoencefálica.

La TH es una enzima relevante porque de manera general ha sido utilizada como marcador de neuronas catecolaminérgicas desde hace varios años, indicando la presencia de catecolaminas que se presentan en las células (Björklund & Dunnet, 2007) principalmente de DA, ya el NT constituye aproximadamente el 80% de las catecolaminas en el cerebro (Vallone et al., 2000). La enzima no debe perderse de vista porque es el marcador que se utilizó para realizar la inmunofluorescencia doble en el método de este trabajo.

Por otro lado, se sabe que a DA actúa sobre sus receptores, existen al menos 5 receptores para este NT (D1, D2, D3, D4 y D5), la acción de la DA sobre sus receptores, se relaciona con funciones como la regulación de la conducta motora, la emotividad y ciertos estudios también la relacionan con procesos de plasticidad neuronal y formación de la memoria (Bahena-Trujillo et al, 2000; Jay 2003; Girault & Greengard 2004; Rossato et al. 2009; Bannon et al, 2012).

El estudio de los sistemas y receptores dopaminérgicos ha generado gran interés, debido a que diversas alteraciones en este sistema, han sido relacionadas, directa o indirectamente, con la adicción a drogas como la anfetamina y la cocaína así como con trastornos severos como la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia (Bahena-Trujillo et al., 2000) y de manera más reciente, la EA.

## **Bases genéticas de la EA.**

### **Mutaciones en la EA.**

A partir del estudio de casos de EA de tipo familiar, se han descrito mutaciones en 3 genes involucrados en el desarrollo de la enfermedad, APP, PS1 y PS2. Las mutaciones en estos tres genes provocan una sobreproducción o fallas en el procesamiento normal de APP que se manifiestan en la acumulación del péptido  $\beta$ A. Se ha encontrado también un cuarto gen asociado consistentemente al desarrollo de la EA esporádica, el alelo  $\epsilon$ 4 del gen de apolipoproteína E (ApoE) (Selkoe, 1997).

Las mutaciones en APP han sido ampliamente estudiadas y algunas de ellas clasificadas dependiendo del sitio de origen de las familias portadoras de dichas mutaciones, se han descrito al menos 30 de ellas, descritas en 83 familias (Clarimón, 2010).

Ejemplos de ellas son la mutación inglesa ó V717I, encontrada en una familia de origen inglés que padecía de problemas tempranos de memoria episódica (Rossor et al., 1993). La mutación sueca (APP swe) que sustituye dos aminoácidos en las posiciones 670 y 671, que se ubican cerca del sitio de anclaje de la  $\beta$ -secretasa (Mullan et al., 1992) y que provocan el aumento del corte mediado por dicha secretasa (Haass et al., 1995).

Otras mutaciones en la APP localizadas en diferentes sitios de anclaje y corte de las secretasas incluyendo a la flamenca, holandesa y ártica, entre otras, provocan la deposición de  $\beta$ A pero con un patrón diferente de agregación al encontrado en pacientes con EA, además de deficiencias cognitivas, demencia e incluso hemorragia cerebral, particularmente la mutación ártica incrementa la agregación de  $\beta$ A, provocando un inicio temprano y una forma agresiva de la enfermedad (Nilsberth et al., 2001; Ryan & Rossor, 2010).

Otras alteraciones de APP asociadas al deterioro cognitivo pueden deberse a la duplicación genética, como es el caso de los pacientes con síndrome de Down, con una copia adicional total o parcial del cromosoma 21 (Rovelet-Lecrux et al., 2006).

Por otro lado las mutaciones en las presenilinas que son proteínas transmembranales que conforman el núcleo catalítico de la  $\gamma$ -secretasa y cuyas funciones normales aún se desconocen, son muy diversas. La mayoría de las mutaciones se han descrito para la PS1 (Citron et al., 1997). Una mutación del gen de PS1 es la PS1M146V, que de igual manera, incrementa los niveles de  $\beta$ A de 42aa, la forma más tóxica del péptido (Jankowsky et al., 2004).

En contraste, las mutaciones en PS2 tienen una incidencia muy baja en la EA familiar y se han descrito diferencias en la sintomatología clínica que presentan las familias con mutaciones en PS1 y PS2, además de afectar de manera diferencial el corte de la  $\gamma$ -secretasa, donde las mutaciones en PS2 parecen producir una deposición menor de  $\beta$ A (Bentahir et al., 2006).

Cabe mencionar que mutaciones en la proteína tau, provocan su hiperfosforilación y posterior acumulación en algunas taupatologías, un ejemplo de esta mutación es la P301L. Es importante resaltar que en la EA, los ovillos neurofibrilares que se observan, están conformados por la proteína tau en su forma silvestre (Walsh & Selkoe, 2004), lo que señala que su acumulación es efecto de la disfunción de otros mecanismos celulares y no de una alteración inicial en la proteína.

## **Modelos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.**

Para el estudio de la EA se han desarrollado múltiples técnicas de análisis, entre ellos varios modelos transgénicos que pretenden emular los eventos que suceden durante el curso de la patología de la EA.

Los modelos aprovechan las mutaciones que se han descrito para el desarrollo de la EA de tipo familiar y para que sean válidos, deben contar con acumulaciones proteicas además de déficits en la función cognitiva, medida mediante pruebas de memoria y plasticidad sináptica entre otras.

Existen varios modelos transgénicos para la EA, principalmente han sido desarrollados en ratón y se han centrado en el estudio de los efectos de  $\beta$ A, en los que se incluyen únicamente mutaciones relacionadas con la generación del péptido. Algunos ejemplos de ellos son los modelos: 5XFAD, APP<sup>swe</sup>/ PS1<sup>dE9</sup> y el TgCRND8, entre otros. Aunque existen otros modelos en los que se estudia el efecto de la acumulación de tau, que funciona como un modelo de la EA y de otras taupatologías (Gómez-Isla, 2003).

Uno de los modelos más utilizados es el 3xTg-AD, un modelo de ratón que conjunta la acumulación de tau y de  $\beta$ A, y que emula con mayor precisión los déficits de memoria y alteraciones neuronales presentes en pacientes con EA (Oddo et al., 2003). Me centraré en la descripción de este modelo porque fue la herramienta que utilizamos para el desarrollo de este trabajo.

### **Modelo 3xTg-AD**

Uno de los modelos más relevantes es el ratón triple transgénico para la EA (3xTg-AD, (PS1M146V, APP<sup>swe</sup>, tau P301L)) ya que los animales acumulan  $\beta$ A y ONFs de manera semejante a como ocurre en la EA humana, además estos depósitos se acumulan a través del tiempo, naciendo los ratones sin ninguna acumulación y desarrollando agregados conforme avanza la edad.

Este modelo es importante porque se ha visto que es necesaria la presencia alterada tanto de  $\beta A$  como de tau para reproducir con mayor eficiencia los síntomas observados en pacientes, además los animales muestran déficits en plasticidad sináptica antes de que se observen placas y ovillos en células cerebrales, por lo cual es muy similar al desarrollo de la enfermedad en humanos (Oddo et al., 2003).

En estos ratones se comienzan a presentar deficiencias en procesos de memoria y aprendizaje a partir de los 6 meses de edad, causadas por la acumulación de  $\beta A$  intraneuronal, sin que se observen aún alteraciones en la estructura de las células. Mientras la enfermedad progresa, la acumulación de placas y de ovillos neurofibrilares provoca cambios estructurales que potencian este déficit cognitivo (Oddo et al., 2003).

El modelo se realizó introduciendo directamente dos transgenes humanos (APP<sup>swe</sup> y tauP301L) adicionales a una línea germinal de ratones knock-in, que cuenta con la mutación PS1M146V en el gen de presenilina. Ambos genes insertados bajo el control del elemento regulatorio Thy 1.2, que permite que los genes se expresen solo en el sistema nervioso del ratón (Oddo et al., 2003). En la figura 3 se observa un esquema sencillo del método utilizado para el desarrollo del ratón.

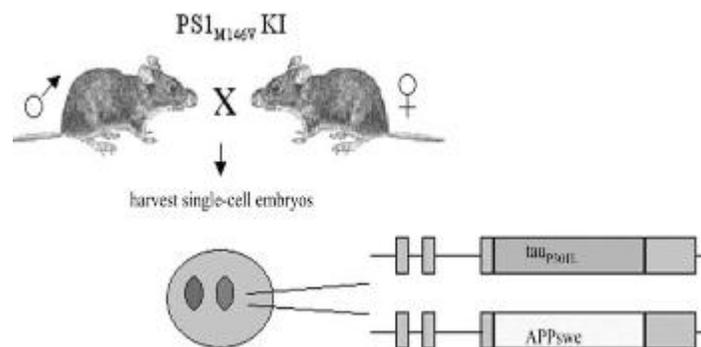


Figura 3. Modelo de ratón 3xTg-AD. Los transgenes con las mutaciones de tau P301L y APP swe, se insertaron en embriones de ratones con un fondo genético que incluye la mutación PS1M146V. Los ratones expresan los dos tipos de agregados que se observan en la EA. Tomada de Oddo et al., 2003

## Memoria gustativa

Se sabe que para que una especie sea capaz de sobrevivir en un ambiente determinado, requiere que sus miembros se comporten de una forma adecuada al entorno, uno de los elementos que permite dicha adaptación es el desarrollo de la memoria (Anderson, 2001), que se define como la capacidad de los organismos para beneficiarse de experiencias anteriores (Goshen-Gottstein, 2003) y donde el conocimiento producto de la experiencia es codificado, almacenado y después evocado (Kandel et al, 2000).

Un ejemplo sencillo en el que los organismos muestran la utilidad de la memoria para la supervivencia es cuando se encuentran en un medio en el que existen múltiples fuentes de alimento y tienen que aprender a distinguir cuáles de ellos pueden ser comidos con seguridad y cuales no. Cada comida se caracteriza por una combinación específica de olores y sabores, clasificar los sabores con base en la seguridad es importante para consumir los alimentos seguros y evitar los que pudieran resultar dañinos (Welzl et al., 2001).

La capacidad mediante la cual los animales pueden distinguir los alimentos y recordar las experiencias que se han tenido con ellos es la memoria gustativa, cualidad sin la cual la supervivencia se vería ampliamente amenazada.

El gusto es un sentido que aporta información crítica, dado que si la sustancia ingerida provoca náusea, el animal tiene oportunidad de dejar de comerla. De manera general los organismos pueden percibir y prever el aspecto y el sabor de un alimento aceptable (seguro), como consecuencia, un alimento o sabor desconocido no entrará en la categoría de seguridad, por lo que será rechazado (Dovey et al., 2008).

Es por ello que cuando un animal percibe un sabor nuevo por primera vez, éste duda en ingerirlo y presenta un consumo reducido de dicho sabor, proceso conocido como neofobia. La neofobia es un fenómeno de índole adaptativo, al reducir la posibilidad de envenenamiento por el consumo de alimentos no familiares y tóxicos (Cooke et al., 2007).

Si después de la ingesta del sabor novedoso, no se observaron consecuencias negativas, el estímulo es reconocido como seguro y las subsecuentes presentaciones se incrementará su consumo, presentándose así una atenuación de la neofobia (Domjan, 1976; Welzl, et al., 2001, Bermúdez-Rattoni, 2004). Si por el contrario, se observan consecuencias negativas, el animal rechazará el sabor la siguiente vez que se le presente, reflejando una memoria gustativa aversiva (García et al., 1955; Bermúdez-Rattoni, 2004).

En el laboratorio se estudian la memoria segura y la aversiva, resaltando el protocolo de Condicionamiento de Aversión al Sabor (CAS), para el análisis de la segunda. El CAS es una herramienta muy útil cuyas características describiré con mayor detalle más adelante. Pero que entre otras, permite el estudio de la memoria a corto y largo plazo.

La memoria de corto plazo (MCP) se considera como un sistema de almacenamiento temporal que contiene una cantidad reducida de información, mientras que la memoria de largo plazo MLP se considera como un depósito de conocimiento temporalmente estable sin ninguna limitación aparente de capacidad (Anderson, 2001).

Uno de los parámetros que las distinguen, es la cantidad de tiempo que perduran, la MCP puede durar de minutos a unas horas, mientras que la MLP puede llegar a durar toda la vida del individuo, cuando se trata de humanos. Es relevante considerar que los períodos en que se considera una MLP son diferentes entre especies, por lo que la duración mencionada no aplica para todos los organismos (Goshen-Gottstein, 2003). Aunque a diferencia principal entre ellas es que para la MLP se requiere de la síntesis proteica en las células y en la MCP este proceso no es necesario (Goelet et al., 1986).

El proceso que permite la estabilización de una memoria de largo plazo es la consolidación, que es un evento que se lleva a cabo después de la adquisición de la información, en el que suceden modificaciones cerebrales particulares, dependiendo de la duración y de las estructuras involucradas. La consolidación se ha clasificado como a) sináptica: que involucra la modificación de los circuitos neuronales y se lleva a cabo en períodos cortos posteriores a la adquisición (minutos-horas), y b) de sistema: que requiere de la organización a través del tiempo de los circuitos neuronales o de los

sistemas que codifican la memoria, en el curso de este proceso el trazo de memoria puede migrar a ubicaciones nuevas, haciéndose independiente de las estructuras necesarias para su adquisición, este proceso puede durar de días a meses (Dudai, 2004).

Es importante recalcar que en este trabajo se estudiaron las diferencias entre la MCP y la MLP en el CAS.

### **Condicionamiento de Aversión a Sabor (CAS)**

El CAS es uno de los modelos que han permitido estudiar las alteraciones en la memoria y forma parte de la memoria gustativa. El CAS se basa en un aprendizaje asociativo establecido cuando un animal relaciona un sabor con un subsecuente malestar gástrico. Esta asociación presenta varias características que confieren a los experimentadores ventajas metodológicas, ya que en contraste con otros tipos de condicionamientos, se puede establecer un CAS con una sola pareación del estímulo gustativo y el malestar gástrico, además de ser posible la formación del CAS cuando han pasado varias horas entre la presentación del estímulo gustativo y la inducción del malestar gástrico (Yamamoto et al., 1998; Welzl, et al., 2001).

El CAS es un protocolo ampliamente utilizado y es considerado una forma especial de condicionamiento clásico. Se ha convertido en un paradigma en el estudio del aprendizaje y la memoria. Se ha observado que para provocar que un sabor sea rechazado en el futuro, en protocolos de laboratorio, la ingesta de éste debe ir seguida de un tratamiento que provoque náusea, ya que si el malestar no está asociado al tracto gastrointestinal, no se desarrolla una aversión (García & Koelling, 1966; Nachman & Hartley, 1975; Ionescu & Buresova, 1977).

Generalmente para realizar un CAS, se utilizan sabores específicos en soluciones líquidas y posteriormente se administra un inductor de malestar gástrico como el cloruro de litio (LiCl). Roedores y otras especies, aprenden a asociar un sabor novedos con malestares como náusea y como consecuencia los animales evitan beber de ese sabor específico (Welzl, et al., 2001).

Se han descrito vías neurales involucradas en el procesamiento de los estímulos gustativo y visceral utilizando técnicas anatómicas y electrofisiológicas, el conocimiento de las estructuras involucradas constituye una ventaja importante para el estudio de la codificación del malestar gástrico y el estímulo gustativo (Bermúdez-Rattoni, 2004).

Para la codificación del estímulo gustativo, el núcleo del tracto solitario (NTS) rostral, recibe aferencias primarias de la lengua mediante los nervios facial y glossofaríngeo con contribución del nervio vago que inerva la lengua y la cara. Posteriormente la información gustativa llega al núcleo parabraquial dorsolateral (NPBd) en el cerebro medio, el NPBd tiene proyecciones hacia el hipotálamo lateral, estria terminal y la amígdala (central y basolateral) y hacia el núcleo ventral posterior del tálamo (VPT), éste proyecta hacia la corteza insular en donde se encuentra la corteza gustativa (corteza insular agranular) (Bermúdez-Rattoni, 2004). En la figura 4 se ilustran las vías de los procesamiento visceral y gustativo.

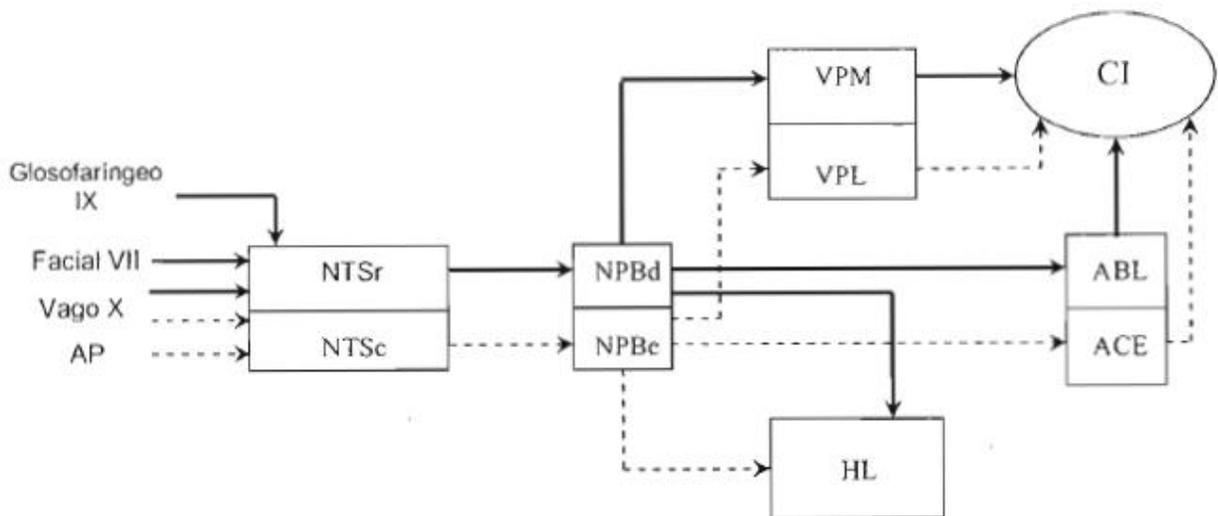


Figura 4: Resumen de las vías de procesamiento del estímulo gustativo (flechas continuas) y del estímulo visceral (flechas discontinuas). Ver texto. NTSr= núcleo del tracto solitario rostral, NTSc= núcleo del tracto solitario caudal, NPBd= núcleo parabraquial dorsal, NPDe= núcleo parabraquial externo lateral, VPM= tálamo ventral posteromedial, VPL=tálamo ventral posterolateral, HL= hipotálamo lateral. ABL= amígdala basolateral, ACE= amígdala central, CI= corteza insular. Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004.

El proceso del estímulo visceral, converge en varias estructuras con el procesamiento gustativo, aunque son transducidas en diferentes núcleos, se sabe que el NTS caudal recibe proyecciones de las ramas hepáticas del nervio vago, que son sensibles a la irritación gástrica, el NTS recibe además información del área postrema (AP) que es sensible a las toxinas presentes en la sangre. Las proyecciones del NTS llegan al NPB externo lateral, la amígdala central y el núcleo hipotalámico paraventricular. De la porción lateral del NPB existen proyecciones a la parte ventral posterolateral del tálamo que junto con la amígdala central presenta aferencias hacia la corteza insular (Bermúdez-Rattoni, 2004).

A pesar de la implicación de todas las estructuras mencionadas en el CAS, se ha observado que lesiones en CI, la ABL y el tálamo afectan severamente el condicionamiento, por lo que han sido estudiadas a mayor detalle y se han descrito además de sus funciones basales, su participación en el establecimiento del CAS. Para este trabajo se analizará la CI y la ABL, porque son estructuras con una acumulación considerable de  $\beta$ A.

Particularmente, se ha observado que la CI, participa en procesos viscerales, de estrés (Bermúdez-Rattoni et al., 1991), nocicepción (Ohara et al., 2003), además de procesos de aprendizaje y memoria bajo diferentes modelos de estudio (Gutiérrez et al., 1999, Bermúdez-Rattoni, 2004). Se sabe que la CI es una estructura relevante en el procesamiento gustativo pero que no necesariamente interviene en la percepción gustativa, ya que ratas con lesiones en esta estructura pueden percibir con normalidad los estímulos gustativos presentados (Kiefer et al., 1984b).

El análisis mediante la técnica de microdiálisis, que es una técnica que permite cuantificar los niveles extracelulares de neurotransmisores en una región cerebral específica, revela que ocurren cambios en la liberación de acetilcolina que correlacionan con la familiaridad del estímulo, liberándose en gran proporción cuando el estímulo es novedoso y decreciendo conforme el estímulo se vuelve familiar (Bermúdez-Rattoni, 2004).

Adicionalmente se ha observado que la presentación del estímulo gustativo provoca un aumento en la liberación de dopamina en esta estructura, además de que la liberación de DA y glutamato es necesaria para la consolidación de la memoria en el CAS (Guzmán-Ramos et al., 2010).

Por otro lado, se ha descrito que la amígdala es una estructura con una función relevante en procesos de aprendizaje y memoria cuando en éstos se presenta un componente emocional, como el condicionamiento al miedo. Además, la amígdala desempeña un papel importante en la modulación de la memoria, ya que se ha observado que modula el almacenamiento de la memoria en otras estructuras como el hipocampo (Torras et al., 2001).

Su participación en el CAS ha sido ampliamente estudiada y se ha observado que la actividad electrofisiológica de la amígdala basolateral (ABL) se modifica con la administración del LiCl (Reddy et al., 1981; Yasoshima et al., 1995), además, el bloqueo temporal de la ABL después de la presentación del estímulo gustativo o antes del estímulo visceral, atenúa la formación del trazo aversivo de memoria (Gallo et al., 1992) indicando que las señales viscerales que propician la formación de un trazo aversivo de memoria se procesan en la amígdala.

En el estudio de los neurotransmisores liberados, mediante microdiálisis, se observó que la administración de cloruro de litio provoca un incremento en la liberación de glutamato en la ABL, además, se lograron formar trazos aversivos de memoria, cuando se inyectó glutamato directamente en la amígdala (Miranda et al., 2002). Estas observaciones indican que la participación de la ABL es necesaria para la formación del CAS porque su actividad permite la codificación del estímulo aversivo.

Además de la funcionalidad del circuito de múltiples estructuras cerebrales (Bermúdez-Rattoni, 2004), se ha observado que se requiere de la participación de neurotransmisores y sus receptores, como el sistema colinérgico (Deutsch, 1978), receptores NMDA (Aguado et al., 1994; Welzl et al., 1990), etc., y procesos celulares como la inducción de genes de expresión inmediata (GEI) (Montag-Sallaz, 1999), vías Ras-Map (Berman et al., 1998; 2000) y la fosforilación de CREB (Swank, 2000), entre otras.

Por estos motivos, las alteraciones en sistemas de neurotransmisión, podrían estar afectando gravemente esta tarea (Guzmán-Ramos et al., 2010; 2012), sesgando la capacidad de los animales para sobrevivir en el medio.

Adicionalmente el estudio de la memoria gustativa es relevante porque pacientes con EA, presentan una disminución en la capacidad quimiosensorial (Aliani et al., 2013)

## **Alteraciones sensoriales en la EA.**

Regresando a la EA, se sabe que más allá de las alteraciones de la memoria que se presentan en pacientes, también se han observado perturbaciones importantes en la quimiopercepción y ésta juega un papel relevante en la interacción de los organismos con su ambiente (Aliani et al., 2013).

Actualmente el conocimiento de la quimiopercepción es relativamente amplio y la investigación en el rubro en humanos, arroja que las capacidades de quimiopercepción (sensoriales) pueden verse alteradas por varios factores, como la edad, la disminución de la salivación o el padecimiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson o Alzheimer (Boyce & Shone, 2006).

Ha sido consistente el reporte de la presencia de alteraciones en la capacidad olfativa de los pacientes con la EA, ya que se han observado pérdidas de la capacidad de percibir, reconocer, identificar y recordar olores (Doty et al., 1989; Knupfer et al., 1986; Murphy et al., 1987; Schiffman et al., 1990). Por lo general, pero no necesariamente antes de la afectación del desempeño cognitivo en otras áreas y en etapas tempranas de la enfermedad, que se enfatiza conforme el padecimiento avanza (Doty et al., 1987; Koss et al, 1988; Murphy et al., 1987; Rezek et al., 1987).

La capacidad olfativa se ha estudiado en pacientes con daño cognitivo leve, demencia y EA en fases tempranas y tardías, y se propone que puede ser una herramienta útil para el diagnóstico temprano de la EA y otras demencias, porque se ha reportado una disminución de la capacidad olfativa en pacientes con demencia y en individuos con daño cognitivo leve que después son diagnosticados con la EA, a diferencia de otros sujetos en los que el diagnóstico no se modifica (Steinbach et al, 2009).

El sentido del olfato se encuentra disminuido en la EA, porque las áreas cerebrales relacionadas con la discriminación, percepción y procesamiento de estímulos olfativos, presentan las primeras alteraciones provocadas por el padecimiento, además de una presencia importante de ONFs y acumulación de  $\beta$ A (Aliani et al., 2013), estas áreas incluyen a los bulbos olfatorios, núcleo olfatorio anterior y la amígdala, por mencionar algunas (Averback, 1983; Ball, 1977; Esiri & Wilcock, 1984; Hyman et al., 1984; Ohm & Braak, 1978; Pearson et al., 1985; Reyes et al., 1987; Simpson et al., 1984; Wilcock, 1983).

Por otro lado, a pesar de que el sentido del olfato en la neurodegeneración ha sido sujeto de múltiples estudios, no lo ha sido así el sentido del gusto, que bien podría pensarse que pudiera estar igualmente disminuido, al considerar que el olfato es un componente relevante para la identificación y percepción de los sabores.

Actualmente los reportes en este rubro no son numerosos y los hallazgos han resultado contrastantes, por un lado se ha reportado que aunque el olfato está afectado, la función gustativa no está alterada en pacientes con EA (Bacon et al., 1998), otra evidencia que apoya esta hipótesis es el hallazgo de Koos y colaboradores (1988), en el que no se encontró una modificación de los umbrales de detección para sacarosa y ácido cítrico en un grupo pequeño de pacientes con EA.

Por otro lado Waldton et al., (1974), reportan que pacientes con demencia senil tienen un decremento marcado tanto en la función olfativa como gustativa, mientras que otro estudio en pacientes con EA y deterioro cognitivo leve arroja resultados similares, ya que al comparar los grupos con los controles, se encuentra una disminución sensorial importante, que incluso proponen que puede ser utilizada para el diagnóstico de alteraciones cognitivas, sin poder diferenciar entre ellas utilizando sólo este procedimiento (Steinbach et al., 2009).

Se debe tomar en cuenta que los estudios fueron realizados en sujetos en diferentes etapas de la enfermedad y es debatible si los resultados son comparables. Adicionalmente, un trabajo indica que la pérdida gustativa es selectiva y varía según la estructura química del saborizante (Schiffman et al, 1990).

En conjunto, estos datos sugieren un consenso de pérdida olfativa en la EA, pero no existen conclusiones en cuanto a la capacidad gustativa, dado que no existe un número considerable de trabajos que permitan discernir con claridad qué es lo que sucede con la quimiopercepción gustativa.

Por otro lado, se han estudiado las familias de receptores involucrados en la quimiopercepción y sus segundos mensajeros obligados, el análisis de la expresión de estas moléculas en el cerebro de pacientes, ha permitido la generación de los patrones de expresión que se llevan a cabo de manera normal en un cerebro sano.

De manera interesante se ha encontrado que los receptores no limitan su expresión a las áreas cerebrales relacionadas con el proceso de estímulos quimiosensoriales (García-Esparcia et al., 2013). Además, también se describen alteraciones en los patrones de expresión de los receptores en pacientes con la Enfermedad de Parkinson, principalmente en los que existe una disminución de la expresión de los receptores, la identificación de estas alteraciones, sugiere la presencia de un sistema de comunicación química que es vulnerable en las enfermedades neurodegenerativas.

La realización de un estudio similar en sujetos con EA y un modelo animal doble transgénico (APP/PS1) para la enfermedad, arroja resultados similares en los que se observa una desregulación de la expresión genética de los receptores olfativos (ORs) y gustativos (TASRs) y sus segundos mensajeros (Adenilato ciclasa tipo III (ADYLC3) y la Proteína G olfativa (Gnal)).

En pacientes con EA se observó que la desregulación genética (aumentada o reducida, dependiendo del receptor) aumenta conforme avanza la enfermedad, observando cambios en dos ORs en etapas tempranas, a los que se suman otro OR y dos TASRs en etapas avanzadas.

En el modelo animal, se observó un aumento en la expresión de segundos mensajeros hasta el primer año de vida de los ratones, observando después de este período un decremento en la expresión de la ADYLC3, enzima necesaria para la transducción de señales olfativas (Wong et al, 2000). Apoyando la idea de que las alteraciones acumulativas en la expresión genética, están relacionadas con el avance de la enfermedad, en este modelo transgénico (Ansoleaga et al., 2013). Y considerando que dichas modificaciones no suceden en ratones silvestres, también pudieran asociarse a la acumulación proteica que presenta el modelo.

Estos datos pueden sugerir una desregulación de la expresión genética de quimiorreceptores asociada a la amiloidosis, que pudiera estar replicándose en otros modelos transgénicos de la enfermedad, aunque no se han reportado alteraciones olfativas relacionadas con mutaciones en APP, en los modelos APP751SL y APP23 (Le Cudennec et al., 2008; Vloeberghs et al., 2008), dichas alteraciones no pueden descartarse para otros modelos transgénicos.

## Antecedentes

El objetivo de este trabajo consiste en describir el nivel en que se presentan las perturbaciones en el aprendizaje gustativo en el modelo 3xTg-AD, porque podría aportar información sobre los eventos que se presentan en pacientes con la EA. Además de correlacionar las deficiencias observadas en la memoria gustativa, con alteraciones en neuronas catecolaminérgicas.

Para este propósito se tomaron en cuenta trabajos que indican perturbaciones importantes en la memoria del modelo a analizar, principalmente de tipo gustativo, además de su relación con el sistema dopaminérgico.

Un uno de los trabajos, se observó que las catecolaminas DA y norepinefrina se liberan en una menor proporción en corteza insular e hipocampo, comparados con animales silvestres (WT), esta situación se agudiza en ratones de edad avanzada. Además, los animales transgénicos no presentan un aumento en la liberación de DA cuando se le presentan los objetos novedosos como sucede en animales jóvenes y silvestres, y por ello presenta problemas recordando un objeto específico en una prueba de reconocimiento de objetos. Este déficit de aprendizaje correlaciona con la falla en la liberación de DA y la acumulación de  $\beta$ A en la CI. Con la administración de nomifensina (compuesto que evita la recaptura de catecolaminas), el desempeño de los ratones en la prueba mejoró significativamente, lo que sugiere que la acumulación intracelular de BA está asociada a una disfunción dopaminérgica cortical y a deficiencias en la memoria de reconocimiento (Guzmán-Ramos et al., 2012).

Se le atribuyen estos efectos a  $\beta$ A porque en el modelo 3xTg-AD, después de los 4 meses de edad, los animales muestran acumulación intraneuronal de  $\beta$ A en la corteza dorsal, mientras que las áreas ventrales de la corteza presentan una escasa agregación del péptido. En la CI la acumulación se observa a partir de los 9 meses de edad, lo que coincide con un mal desempeño cognitivo en tareas dependientes de esta estructura. Adicionalmente, la presencia de la forma fosforilada de tau, se ha observado hacia los 9 meses de edad en estructuras como el hipocampo y específicamente en la CI, hasta los 26 meses de edad (Oddo et al., 2003; Mastrangelo and Bowers, 2008; Guzmán-Ramos et al., 2012).

La corteza insular es relevante, porque ha sido relacionada con el reconocimiento de distintos estímulos, incluyendo olores (Bermudez-Rattoni et al., 1988), sabores (Bermúdez-Rattoni et al., 2004), contexto espacial (Bermudez-Rattoni et al., 1991) y objetos (Bermudez-Rattoni et al., 2005). Se sabe también que la estimulación novedosa promueve la liberación de DA (Guzmán-Ramos et al., 2010; 2012), y que fallas en la liberación del neurotransmisor, impiden la interpretación correcta de los estímulos como familiares o novedosos (Guzmán-Ramos et al., 2012).

La memoria de reconocimiento de objetos analizada en el trabajo mencionado, es una tarea dependiente de hipocampo, que es una estructura cerebral que presenta agregados de  $\beta$ A y tau desde edades tempranas y por ello su función se ve afectada. Para evaluar la memoria en los modelos animales, es necesario también conocer el desempeño cognitivo en tareas de memoria independientes del hipocampo, que aporten información sobre los circuitos neuronales que se afectan en presencia de agregados de  $\beta$ A y/o tau en modelos de la EA. Con esta finalidad se ha analizado el desempeño en el CAS.

Existe un número considerable de trabajos en ratones transgénicos que acumulan únicamente  $\beta$ A, donde se evalúa la memoria de ratones en edades mayores a seis meses, que es la edad en la que por lo general, se puede apreciar una agregación del péptido. En la mayoría de los trabajos se reportan alteraciones en el desempeño cognitivo de los animales en pruebas de memoria de largo plazo. Los modelos utilizados son APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>, TgCRND8 y 5xFAD, y los efectos se resumen en la tabla 1.

Analizando los trabajos en modelos con acumulación de  $\beta$ A, se observa una tendencia a que la agregación del péptido tiene efectos sobre el CAS, ya que se ha observado que cuando los animales presentan una agregación importante del péptido, no rechazan el estímulo asociado con el malestar.

Un trabajo reciente de nuestro laboratorio, realizado en el modelo 3xTg-AD obtuvo resultados similares. Se realizó una prueba de memoria de largo plazo en el CAS, a ratones 3xTg-AD de 3-5 y de 9-11 meses de edad y su correlato silvestre (WT). Se encontró que durante la adquisición de la tarea que los

animales silvestres y transgénicos de 3-5 meses, presentan el fenómeno de neofobia gustativa, consumiendo en menor proporción el sabor novedoso presentado, comparado con su consumo basal, respuesta que no se presentó en los animales 3xTg-AD de edad avanzada (Moreno-Castilla et al., en preparación).

Además, al medir mediante microdiálisis la liberación de NT de los animales en libre movimiento durante la prueba, se encontró que la ausencia de neofobia en este grupo de animales, estaba relacionada con la falta de liberación de DA en la corteza insular durante la adquisición, a diferencia de ratones WT y transgénicos jóvenes, en los que sí se observa esa liberación.

Al analizar la memoria a largo plazo (24 horas después) se observó que los animales transgénicos de mayor edad, eran el único grupo que no presentaba este tipo de memoria, al ingerir una cantidad mayor del estímulo gustativo durante la prueba, datos que corroboran el reporte previo en el que se demuestra que la actividad dopaminérgica es necesaria para la consolidación de la memoria y que ésta perdure a largo plazo (Moreno-Castilla et al., en preparación; Guzmán-Ramos et al., 2010).

Salta a la vista el hecho de que los animales transgénicos de edad avanzada no presenten neofobia, que es típicamente usada como un marcador del aprendizaje gustativo. Por lo que es relevante cuestionar si la falta de la respuesta neofóbica se debe a alteraciones en la percepción sensorial, que provoquen una pérdida de la capacidad gustativa, como reportan algunos trabajos, que sucede en pacientes con la EA (Waldton, 1974; Steinbach et al., 2009) y no una alteración en la formación de la memoria. La propuesta es posible, ya que se ha observado que inyecciones de  $\beta$ A en el hipocampo de rata, provocan pérdidas en la capacidad olfativa (Bernal-Mondragón et al., 2013). Además el trabajo en el modelo de amiloidosis Tg2576 AD, muestra disfunción de la red olfativa en el bulbo olfatorio y en la corteza piriforme, cuando el olfato empieza a deteriorarse en el modelo (Wesson et al, 2010).

Adicionalmente, es pertinente analizar las neuronas catecolaminérgicas en la CI y ABL, ya que parece haber una alteración importante que impide la liberación de DA y afecta el desempeño de los animales

en distintas tareas. En el caso del CAS, puede deberse a que los animales no etiquetan correctamente los estímulos debido a las fallas en la liberación del neurotransmisor.

**Tabla 1.**

<b>Autor, año.</b>	<b>Modelo</b>	<b>Neofobia</b>	<b>[sacarina] / [LiCl]</b>	<b>Análisis de acumulación en estructuras.</b>	<b>Edad con efectos</b>	<b>Conclusión</b>
Janus et al., 2004	TgCRND8	No se reporta.	0.5M 0.14M 2%PC	Hipocampo Corteza frontal	46-49 semanas	Alteraciones en CAS en el modelo TgCRND8
Pistell et al., 2008	APP <sup>swe</sup> /PS 1dE9	No se reporta.	0.5M 0.14M 2%PC	Corteza entorrinal Hipocampo	5 meses en hembras	La acumulación de $\beta$ A correlaciona con el desempeño cognitivo en el CAS
Hanna et al., 2009	TgCRND8	No se reporta.	0.5M 0.14M 2%PC	Cerebro completo	8-12 meses	CAS no correlaciona con acumulación de $\beta$ A pero sí está afectado en el modelo.
Ramírez-Lugo et al., 2009	APP <sup>swe</sup> /PS 1dE9	Incrementa con la edad.	0.3M 0.3M 20mg/K	Cerebro completo	15-16 meses*	Ratones del modelo desarrollan CAS a cualquier edad analizada.
Devi & Ohno, 2010	5XFAD	No se reporta.	0.5M 0.5M 2%PC	Corteza insular** ABL**	9 meses	Reducción de la expresión de BACE1 mejora el desempeño en el CAS.
Stover & Brown, 2012	APP <sup>swe</sup> /PS 1dE9	No se reporta.	0.5M 0.14M 2%PC	No se reporta.	No se reporta.	No se observan efectos en el CAS porque no es una conducta motora.

Tabla 1: Análisis del desempeño cognitivo en el condicionamiento de aversión a sabor (CAS) en modelos transgénicos para la EA que desarrollan amiloidosis, los protocolos utilizan concentraciones similares de sacarina y cloruro de litio (LiCl). La mayoría de los trabajos reportan alteraciones en la memoria de largo plazo. PC= Peso corporal, BACE1= beta secretasa.

\* En este trabajo los ratones de 15-16 meses desarrollan CAS pero en proporciones menores que su correlato silvestre.

\*\* Estructuras relacionadas con el procesamiento del CAS.

## **Planteamiento del problema:**

### **- Alteraciones sensoriales en pacientes con EA:**

Son varios los reportes que indican una disminución importante de la capacidad olfativa y gustativa en pacientes con EA, que puede deberse a la acumulación proteica, principalmente del péptido  $\beta$ A. La presencia del péptido en cerebros de animales de laboratorio coincide con pérdidas importantes de la función olfativa.

### **- Alteraciones en el aprendizaje gustativo en animales:**

Actualmente se sabe que varios modelos transgénicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer, presentan perturbaciones en el aprendizaje gustativo. Pero no se ha descrito con exactitud a qué nivel es que dicho aprendizaje se afecta.

### **- Déficits en la liberación de catecolaminas:**

Las catecolaminas tienen una función relevante en varias tareas de memoria, se sabe que la liberación de éstas se encuentra alterada en animales con acumulación importante de  $\beta$ A. Las fallas en dicha liberación en momentos clave de formación de la memoria, provocan déficits en el aprendizaje.

Al conjuntar esta información surgen varias cuestiones que pretenden resolverse en este trabajo. Por un lado se necesita dilucidar si las perturbaciones en el aprendizaje gustativo son resultado de una disminución de la capacidad sensorial en los animales, tal como sucede en pacientes con EA, o bien, si se deben a una alteración en procesos cognoscitivos en los que intervienen catecolaminas. Para ello se analizará a qué nivel se presentan las perturbaciones en el aprendizaje gustativo analizando la capacidad gustativa y la memoria de corto plazo de los animales, finalmente se analizará la presencia de alteraciones en neuronas catecolaminérgicas en áreas relacionadas con este tipo de aprendizaje, estudiando una posible relación entre las alteraciones en catecolaminas y los déficits de memoria observados.

## **Hipótesis y Objetivos.**

### **Hipótesis:**

El progreso de la acumulación de  $\beta A$  en el modelo 3xTg-AD afecta la formación de la memoria gustativa a causa de alteraciones en la percepción de los sabores, provocando además atrofia en las terminales catecolaminérgicas que afectan la liberación de dopamina

### **Objetivos:**

Evaluar la percepción del sabor en ratones 3xTg-AD con diferentes etapas de la acumulación de  $\beta A$  para analizar la existencia de alteraciones sensoriales, además de analizar la memoria de corto plazo, en caso de descartar dichas perturbaciones.

Determinar si la acumulación de  $\beta A$  tiene un efecto sobre las terminales catecolaminérgicas.

## Desarrollo experimental:

### Animales

Se utilizaron ratones machos homocigotos 3xTg-AD y no transgénicos (WT). Se analizaron animales de edades diferentes: 3xTg-AD y WT de entre 4-5 meses (jóvenes) y 9-10 meses (edad avanzada) para la prueba de percepción de sabor y 3xTg-AD de 4,9-12 meses para el CAS, se utilizaron animales de edad más avanzada para el CAS porque presentan una mayor acumulación del péptido. Los animales transgénicos han sido previamente caracterizados (Oddo et al., 2003). Los experimentos se realizaron de acuerdo a la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y con la aprobación del comité local de cuidado animal, en condiciones controladas de alimentación, hidratación, temperatura y ciclo de luz:oscuridad 12:12.

### Genotipificación:

Para corroborar la presencia de los transgenes en los ratones utilizados, se les tomó un fragmento de cola y se utilizó el método Hot Shot (Rudbeck & Dissing 1998), para la extracción del DNA. Que consiste en lisar 1 mm de cola del animal en un agente alcalino (NaOH 25 mM, 0.2 mM EDTA disodio pH 12) con calor (95°C, 1 hora) y neutralizarlo con buffer adecuado (1 M Tris-HC pH 5), aunque este DNA es impuro es adecuado para la amplificación del DNA (QIAGEN Kit).

Los primers utilizados fueron:

<b>5TAU REV</b>	5'TCCAAAGTTCACCTGATAGT3'
<b>APPInternal 5'</b>	5'GCTTGCACCAGTTCTGGATGG3'
<b>Thy 12.4</b>	5'GAGGTATTCAGTCATGTGCT3'
<b>PS1k 13</b>	5'CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC3'
<b>PS1k 15</b>	5'AGGCAGGAAGATCACGTGTTCCAAGTAC3'

Para cada animal es necesario realizar dos reacciones, una para APP/tau y otra para PS1. Se corrieron los programas correspondientes en el termociclador. Para las muestras en las que se amplificó PS1, se

realizó digestión con la enzima de restricción BSTEII (New England Biolabs) a 60° por 2 horas. Posteriormente se realizó la separación y detección del DNA amplificado, mediante electroforesis en gel. Se tomaron las fotografías correspondientes y se analizó cualitativamente para APP/tau, y el peso y número de bandas para los geles con PS1 para determinar el genotipo de los ratones.

Productos esperados:

PCR	WT	Heterocigoto	3Xtg-AD
APP-TAU	---	500-350	500-350
PS1	550	550, 300 y 250	300 y 250

### **Prueba de percepción de sabor:**

Para determinar la capacidad de percepción de los ratones para el sabor de soluciones de sacarina, se realizó una réplica del experimento de Bachmanov y colaboradores (2001), en el que se analiza y compara la respuesta conductual de ratones con genética distinta, a distintos endulzantes incluida la sacarina, para ello se realiza una curva de percepción de sabor, donde se presentan concentraciones ascendentes de un saborizante y se obtienen umbrales de preferencia y rechazo, así como los índices de preferencia y el consumo para cada concentración presentada, es una forma indirecta de conocer si un saborizante es percibido por los animales.

Los animales fueron colocados en cajas individuales, la parte experimental se llevó a cabo a la mitad de su ciclo luz:oscuridad (mediodía) y fueron pesados diariamente. Los animales fueron privados de agua por 24 horas antes de la prueba.

Se utilizaron concentraciones de sacarina: 0.01%, 0.02%, 0.1%, 0.3%,1% y al 3%. Era de especial interés la respuesta de los animales a la concentración 0.3% porque es la concentración en la que los animales 3xTg-AD de edad avanzada no presentan neofobia. A cada ratón se le colocó un bebedero con agua y otro con solución de sacarina, intercambiando la posición de éstos cada 24 horas para evitar las preferencias por un lado, por lo que cada concentración se colocó por 48 horas. Los consumos se midieron cada 24 horas y posteriormente se colocó solución fresca.

### **Análisis de datos:**

Los índices de preferencia se calcularon dividiendo el consumo de sacarina entre el consumo total. Adicionalmente, se tomó diariamente el peso de cada animal para poder obtener un promedio. Dada la diferencia de peso encontrada entre los ratones de 4-5 meses y los de 9-12 meses, los datos del consumo de fluido se normalizaron a 30g, que es el peso aproximado de un ratón adulto. Ya que se sabe que existe una correlación entre el peso corporal y el consumo de fluido, (Bachmanov et al., 1998), por lo que no deben compararse animales con pesos corporales diferentes.

### **Condicionamiento de aversión al sabor.**

Se realizaron los experimentos aproximadamente a la mitad de la fase de luz, que aunque es la etapa en la que los roedores presentan menor actividad, pueden desempeñar la tarea sin ningún agravo, dado que implica su supervivencia (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991).

.Los animales fueron sometidos a un protocolo de CAS en el que se realizó una prueba de memoria a corto plazo. Los animales fueron privados de agua por 24 horas, para después ser entrenados para beber agua por 20 minutos, en dos bebederos idénticos con 10ml de líquido cada uno, cada 24 horas, durante 4 días consecutivos para obtener un consumo estable de agua denominado línea base. Para la presentación de los consumos, los ratones son ingresados en burbujas de microdiálisis (Bioanalytical Systems, Inc.) con aserrín en la que se les coloca unos minutos antes de colocar el líquido.

En el quinto día se presentó a los animales solución de sacarina al 0.3% (Sigma-Aldrich, 98%) en los bebederos, por 20 min. y 10 min. después se inyectó intraperitonealmente un inductor de malestar gástrico (LiCl, 0.15M; 7.5 mg/kg, Baker analyzed 100%) o solución salina (NaCl, 0.15M; 7,5mg/kg, Sigma-Aldrich 99%) como control. 90 minutos después se realizó la prueba de memoria a corto plazo, presentando un bebedero con 10 ml de sacarina 0.3 % y otro con 10ml agua.

Después de medir el consumo total de las soluciones, se calcula el índice de preferencia (IP) al dividir el consumo de sacarina entre el consumo total (en mililitros).

**Sacrificio:**

Después de los experimentos conductuales, los ratones fueron sacrificados con la administración de la dosis letal de pentobarbital (>50 mg/kg) y fueron perfundidos intracardiamente con solución salina (0.9%) a una temperatura de 37°C y buffer de fijación (0.4% fomaldehído y 1% glutaraldehído al 1% en 0.1M de buffer de fosfatos a un pH de 7.4). Los cerebros se extrajeron y se guardaron en el buffer de fijación por 48 horas, después se colocaron en un gradiente de sacarosa (10%, 20% y 30%) en buffer de fosfatos, para crioprotección, en congelación. Posteriormente los cerebros fueron cortados y se obtuvieron cortes de 30  $\mu\text{m}$  de espesor.

**Inmunofluorescencia:**

Se seleccionaron cortes de las estructuras de interés y se procesaron en flotación, para la detección de  $\beta\text{A}$  se utiliza ácido fórmico al 88% (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos para la exposición de epítopes. Posteriormente se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% durante una hora. Después, se colocan al mismo tiempo los anticuerpos primarios, anti-tirosina hidroxilasa (TH) 1:1000 (Sigma), y anti- $\beta\text{A}$  1:500 (Signet), durante toda la noche en el cuarto frío. En el día 2, se hace la incubación con anticuerpos secundarios: primero se coloca el anticuerpo anti-conejo, acoplado al fluoróforo FITC para  $\beta\text{A}$  y luego se coloca el anticuerpo anti-ratón acoplado a CY3 para TH. Al terminar los cortes montados en laminillas silanizadas con medio de montaje fluorescente para poder observarlas al microscopio.

**Análisis estadístico:**

Todos los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar. Para el análisis estadístico se empleó una t de student de dos colas, además de una prueba de ANOVA para los datos de percepción de sabor. Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo. El análisis estadístico se lleva a cabo utilizando el programa StatView versión 4.5.

## **Resultados.**

### **Prueba de percepción de sabor.**

Se ha reportado que los pacientes con EA padecen de una disminución de la capacidad olfativa (Aliani et al., 2013), pero los reportes para la capacidad gustativa, no son concluyentes (Waldton, 1974; Bacon et al., 1998). Además, datos en modelos animales con acumulación de  $\beta$ A, apoyan dicha pérdida de la quimiopercepción (Bernal-Mondragón et al., 2013).

Tomando estos antecedentes, se estudió si la acumulación de  $\beta$ A afectaba la percepción sensorial gustativa en este modelo y que por ello, ratones de edad avanzada no desarrollaran un CAS.

Con el fin de evaluar el progreso de la histopatología de la enfermedad de Alzheimer sobre la percepción gustativa se realizó una curva de discriminación del sabor de sacarina siguiendo un protocolo utilizado previamente (Bachmanov et al., 2001). Donde se obtienen las preferencias hacia un sabor a distintas concentraciones, así como el consumo del saborizante presentado, como una manera indirecta de medir la percepción gustativa. El estudio incluyó animales 3xTg-AD y WT y de 4-5 meses (jóvenes) y de 9-12 meses (edad avanzada), en este último grupo de edad la histopatología es evidente en animales transgénicos.

Los resultados obtenidos al comparar la preferencia, muestran curvas (figura 5) con pendientes muy similares entre los animales de 4-5 meses y de 9-12 meses de ambos genotipos, de igual manera el consumo de los animales es similar (figura 6). El análisis de los grupos por genotipo, revela que animales jóvenes y de edad avanzada con la misma genética, tienen curvas de preferencia que no muestran diferencias significativas en ningún punto de la curva, al menos en la fracción analizada (Figuras 5A y 5B). Al analizar el consumo de fluido, se observa que la edad no tiene un efecto sobre la cantidad de fluido ingerido, ya que no se observan diferencias entre animales con la misma genética (Figura 6A y 6B).

Al analizar los grupos considerando la edad, se obtuvo que los animales de 4-5 meses tanto WT como 3xTg-AD no presentan diferencias en los índices de preferencia de sacarina en concentraciones en el rango de 0.02 % a 3%, no así en la concentración 0.01%. El análisis de los índices de preferencia mediante una prueba de ANOVA de dos vías y una prueba de Bonferroni, revelaron diferencias significativas entre los dos grupos mencionados en la concentración 0.01% ( $P < 0.002$ ) (Figura 5C), la diferencia entre preferencias en este punto de la curva.

Adicionalmente, se calcularon el índice de preferencia (IP) y de rechazo, que se definen como la concentración más baja a la que los animales presentan un consumo significativamente mayor o menor, con respecto del agua. En este caso el umbral de preferencia se calculó utilizando una prueba de ANOVA y los resultados se muestran en la tabla 2.

Se obtuvo que los animales de 4-5 meses presentan diferentes umbrales de preferencia, siendo éste de 0.01% para los animales transgénicos y de 0.02% de sacarina para los animales silvestres, indicando una posible respuesta aumentada en los animales transgénicos. Además, no se encontró un umbral de rechazo, aún con la solución al 3%, aunque en ésta concentración se observa un decremento importante en la preferencia comparada con soluciones menos concentradas.

Las diferencias en la concentración 0.01% tanto en la preferencia como en el umbral, pueden deberse a las modificaciones genéticas que existen entre los animales y el valor hedónico que tiene la sacarina en cada cepa, entre otros motivos. De manera congruente, la comparación del consumo entre grupos de la misma edad, arrojó que entre animales de 4-5 meses (Figura 6C), no existen diferencias en el consumo.

De manera interesante, las curvas de percepción de los animales de edad avanzada, presentan diferencias en el rango de concentraciones que va de 0.01% a 1%, siendo similar únicamente en la concentración máxima utilizada (3%) (Figura 5D). Estos resultados deben tomarse con cautela dado que para los animales WT se utilizó una n de 2, situación que pudiera estar enmascarando una mayor preferencia por el estímulo gustativo presentado.

La diferencia en la preferencia, parece estar relacionada con el umbral de preferencia, indicando que los animales no sólo muestran diferencias en la preferencia, sino que también tienen umbrales distintos,

siendo éste para los animales transgénicos de 0.02% y para los animales silvestres 0.1%. En la tabla 2 se muestran los umbrales de preferencia de cada grupo.

Al analizar el consumo de este grupo de animales, se observa que se presentan diferencias en el rango de 0.01 a 0.1, con los animales silvestres consumiendo una menor cantidad de fluido, es importante resaltar que a 0.3% la cantidad de sacarina ingerida, es la misma, por lo que esta concentración es pertinente para realizar un CAS, dado que tanto el consumo como la preferencia de sacarina son similares.

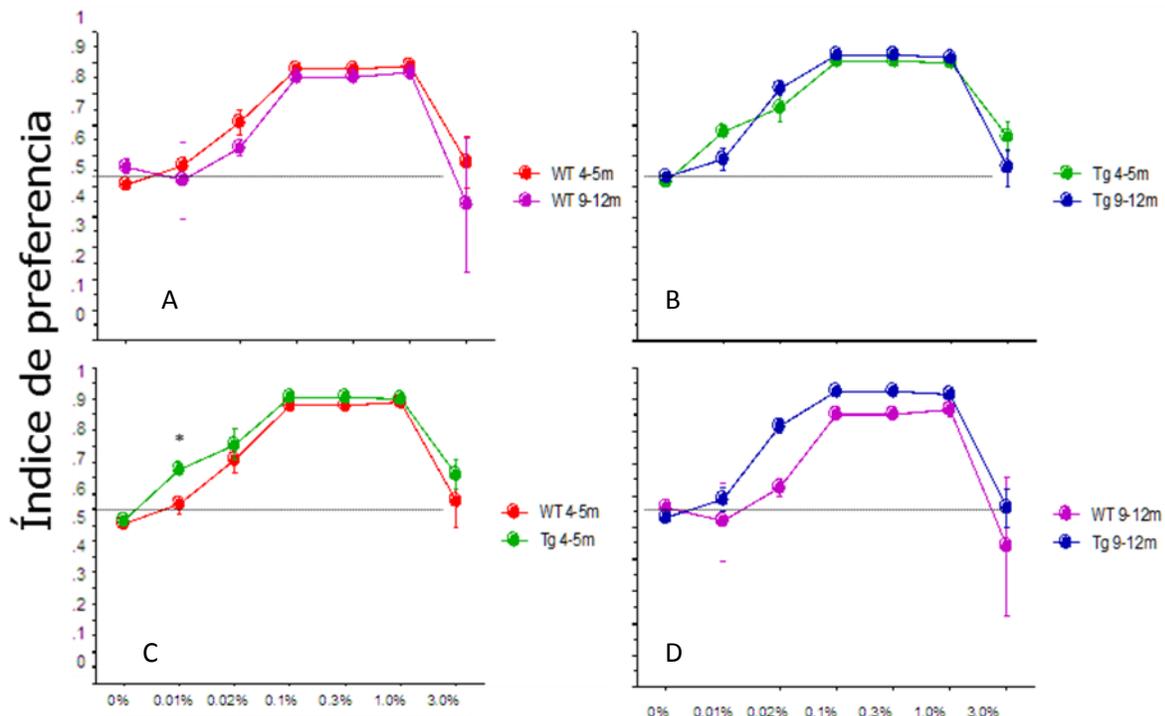
Considerando las diferencias en la preferencia, el umbral y el consumo, de ratones con genotipo diferente, lo más pertinente es realizar comparaciones únicamente entre animales con la misma genética.

Estos resultados sugieren que tanto los animales WT como 3xTg-AD de ambas edades, son capaces de percibir y discriminar el sabor de sacarina en proporciones similares, aunque no mantengan similitudes en la preferencia y el consumo de todas las concentraciones presentadas. El análisis de los animales 3xTg-AD con diferentes etapas de la acumulación de  $\beta$ A, indica que el progreso de la acumulación del péptido no produce alteraciones sensoriales al menos para percibir el sabor de sacarina, por lo que el uso de este saborizante en el CAS es pertinente y alteraciones en el condicionamiento, reflejarían perturbaciones de otra índole.

**Tabla 2**

<b>Grupo</b>	<b>Umbral de preferencia</b>	<b>Significancia</b>
<b>Tg 4-5 mo</b>	0.01%	P<0.005
<b>WT 4-5 mo</b>	0.02%	P<0.005
<b>Tg 9-12 mo</b>	0.02%	P<0.001
<b>WT 9-12 mo</b>	0.1%	P<0.01

Tabla 2: Se presentan las concentraciones más bajas de sacarina, que presentan un consumo significativamente mayor al de agua (umbral de preferencia), obtenidos mediante una prueba de ANOVA. En el experimento no se presentó un índice de rechazo.

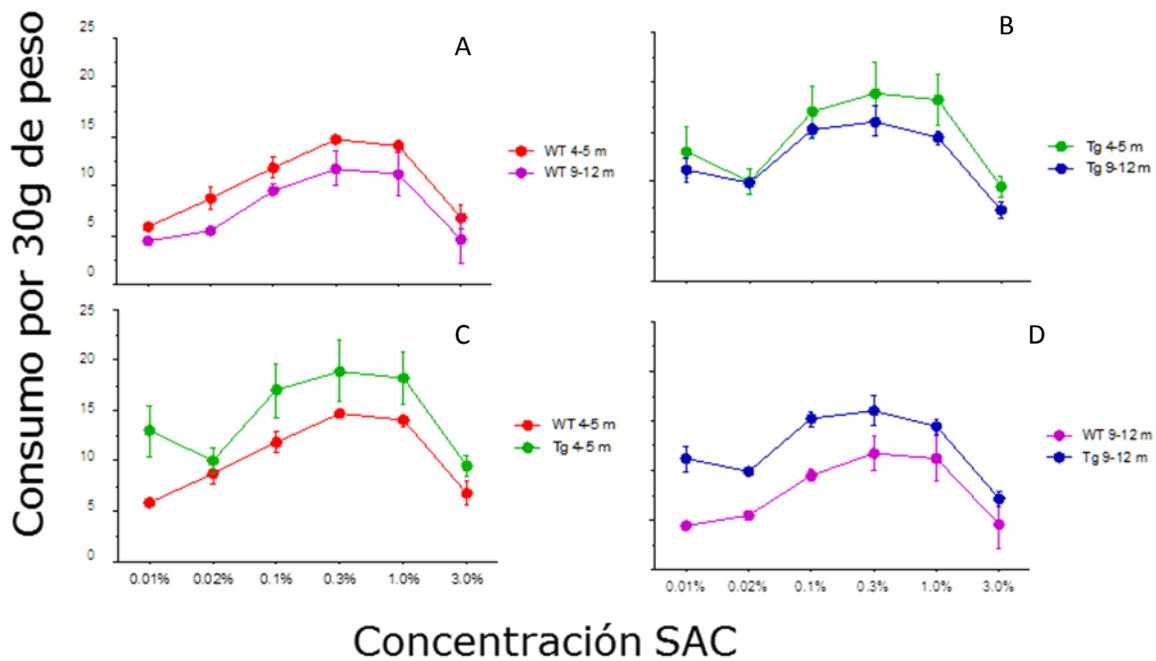


## Concentración SAC

WT 4-5m n= 4, WT 9-12m n=2, Tg 4-5m n= 6, Tg 9-12m n= 6

Figura 5. Curva de preferencia de concentraciones de sacarina (0.01% - 3%). (A) Animales WT de 4-5 meses (WT 4-5 mo, n= 4) y WT de 9-12 meses (WT 9-12 mo, n=2) muestran una preferencia similar por la sacarina como lo muestran sus IPs, aunque sus umbrales de preferencia son distintos, siendo para los animales jóvenes 0.02% y para los viejos 0.1% , este dato debe corroborarse debido a lo limitado de la n utilizada para los animales de 9-12 meses. (B) Animales 3xTg-AD de 4-5 meses (Tg 4-5 mo, n= 6) y 3xTg-AD de 9-12 meses (Tg 9-12 mo, n=6) muestran una capacidad similar para percibir sabor, como lo muestran sus índices y umbrales de preferencia, siendo este último 0.02% en animales de 9-12 mo y de 0.01% en animales jóvenes..(C) Ratones 3xTg-AD y WT de 4-5 meses presentan diferencias significativas en los índices de preferencia de sacarina al 0.01%, (\*P<0.002). Su umbral de preferencia es distinto, presentándose al 0.01% en animales 3xTg-AD y en 0.02% para animales WT. (D) Ratones 3xTg-AD y WT de 9-12 meses, presentan diferencias en el rango de concentraciones de 0.02 a 0.3%, los animales también presentan diferencias en el umbral de preferencia, este dato debe corroborarse debido al tamaño de la n utilizado en animales WT de 9-12 meses.

Como se observa, las curvas de preferencia de sacarina de ratones 3xTg-AD y WT de 4-5 meses y 9-12 meses, presentan pendientes similares. No se presentó el umbral de rechazo en ninguna de las concentraciones presentadas. El hecho de que la preferencia por sacarina sea similar, indica que los animales transgénicos de 9-12 meses, están detectando y respondiendo hacia el estímulo gustativo en una proporción comparable a la de los animales silvestres, sugiriendo que la capacidad gustativa no está alterada en el modelo.



WT 4-5m n= 4, WT 9-12m n=2, Tg 4-5m n= 6, Tg 9-12m n= 6

Figura 6. Consumo de diferentes concentraciones de sacarina (0.01% - 3%). (A) Animales WT de 4-5 meses (WT 4-5 mo, n= 4) y WT de 9-12 meses (WT 9-12 mo, n=2) muestran curvas de consumo con pendientes similares. (B) Animales 3xTg-AD de 4-5 meses (Tg 4-5 mo, n= 6) y 3xTg-AD de 9-12 meses (Tg 9-12 mo, n=6) no muestran diferencias en el consumo en ninguna de las concentraciones presentadas. (C) Ratones 3xTg-AD y WT de 4-5 meses, su consumo es similar en todas las concentraciones presentadas. (D) Ratones 3xTg-AD y WT de 9-12 meses. Los animales transgénicos consumen una mayor cantidad de sacarina pero esta diferencia no afecta la pendiente de la curva de consumo.

Se puede concluir que la capacidad gustativa de los animales es similar ya que éstos aumentan o disminuyen su consumo a las mismas concentraciones, fenómeno que sucede también con la preferencia por sacarina, indicando que los animales 3xTg-AD de 9-12 meses, tienen una respuesta al sabor similar a la de animales de menor edad y WT, lo que sugiere que en el modelo no se presenta una pérdida de la función gustativa.

### **Condicionamiento de Aversión a Sabor (CAS).**

Al descartar alteraciones sensoriales mediante la realización de la curva de discriminación y percepción de sabor, se realizó un CAS con el fin de ubicar con certeza la etapa de la formación de la memoria que pudiera estar alterada en animales transgénicos de edad avanzada y que les impidiera exhibir una memoria de largo plazo. Por ello se utilizaron únicamente ratones 3xTg-AD de 4-5 meses y de 9-12 meses en un protocolo de CAS.

Al analizar el consumo de líquido durante la presentación del estímulo gustativo (sacarina 0.3%), se observó que ninguno de los grupos de edad presenta el fenómeno de neofobia (Figura 7A), ingiriendo el estímulo gustativo en una proporción mayor en comparación con su consumo de agua ( $P < 0.22$  en animales jóvenes y  $P < 0.24$  en animales viejos), este dato contrasta con el hallazgo previo en el que únicamente los ratones de edad avanzada no presentan dicho fenómeno.

Salta a la vista también que no sólo no hay neofobia sino que en vez de ella se presenta un consumo mayor del sabor novedoso, sugiriendo la existencia de alteraciones en la interpretación de los estímulos. Además, al hacer la prueba de memoria 90 minutos después de la adquisición, se observó que los ratones de ambas edades que fueron condicionados (inyección intraperitoneal de LiCl), a diferencia de los controles a los que se administró NaCl, consumen menor cantidad de sacarina que de agua durante la prueba de memoria, que se refleja en un menor índice de preferencia (IP) y en un menor consumo en ml (anexo 1).

El análisis estadístico en el que se comparó el IP entre animales con administración de LiCl y los controles, arrojó una  $p < 0.03$  para los animales de 4-5 meses y  $p < 0.0001$  para los animales de 9-12 meses, indicando que su consumo de sacarina es significativamente menor, lo que indica que ambos grupos de edad son capaces de formar una memoria gustativa aversiva de corto plazo, memoria que no se observa en los grupos control en los que se encontró un consumo igual o mayor de sacarina, comparada con agua.

El hecho de que los animales puedan formar una memoria de corto plazo en el CAS es un hallazgo interesante dado que en otro tipo de tareas, este tipo de memoria también se encuentra afectado, adicionalmente, este dato sugiere que los animales pueden adquirir y evocar la tarea sin mayor complicación, por lo que las perturbaciones observadas en ratones de edad avanzada hablarían más bien de un problema en los procesos de consolidación de la memoria gustativa aversiva, en los que se ven implicados los neurotransmisores glutamato y dopamina (Guzmán-Ramos et al., 2010).

Además se debe considerar que en este modelo, existe una disminución de la liberación de norepinefrina y dopamina que no se presenta para otros NT como glutamato (Moreno-Castilla et al., en preparación), y que al evitar la recaptura de catecolaminas se recupera el desempeño conductual en tareas de memoria. Resulta congruente sugerir que la disminución/fallas en la liberación de catecolaminas es una de las causas principales por la que se ven perturbados los procesos de la consolidación de la memoria gustativa en el modelo 3xTg-AD en animales de edad avanzada.

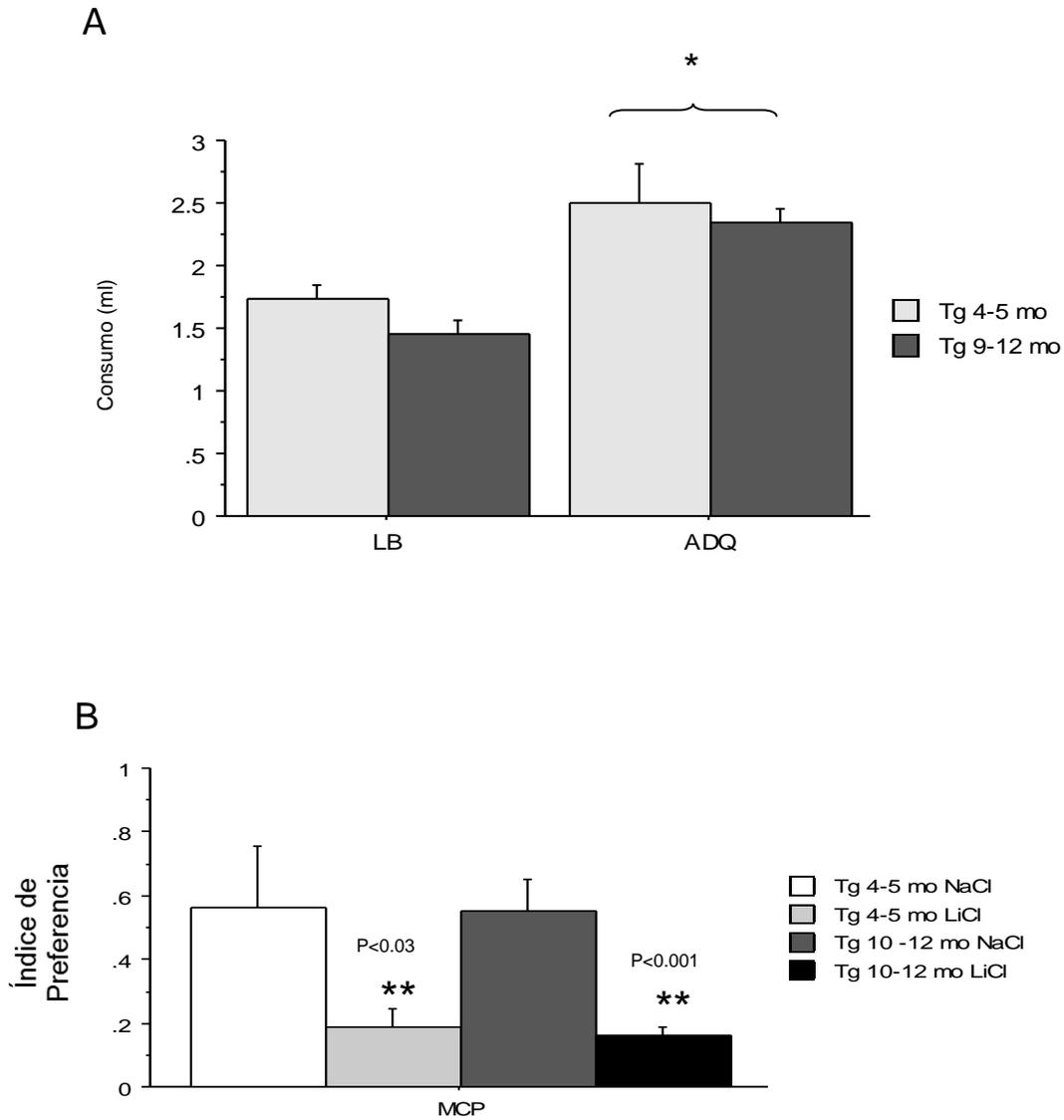


Figura 7: (A) Presentación del estímulo gustativo, se muestra el consumo basal de ratones 3xTg-AD de 4-5 meses (Tg 4-5 mo, n=4) y de 9-12 meses (Tg 9-12 mo, n=8) y su consumo durante la presentación del sabor novedoso (sacarina 0.3%), se observa una ingesta mayor de sacarina que es estadísticamente significativa (Tg 4-5 mo \*  $p < 0.022$  y Tg 9-12 mo \*  $P < 0.024$ ) y por ello no se presenta neofobia gustativa. (B) Índices de preferencia (IP) durante la prueba de memoria a corto plazo, los animales condicionados de ambas edades: Tg 4-5 mo LiCl (n=9) y Tg 9-12 mo LiCl (n=15), son capaces de exhibir una memoria a corto plazo al tener un IP menor, se muestran además los grupos que no fueron condicionados: 3xTg-AD de 4-5 meses (Tg 4-5 mo NaCl) y 9-12 meses (Tg 9-12 mo NaCl), el análisis estadístico indica que existen diferencias significativas en los índices de preferencia entre los animales con NaCl y LiCl, teniendo una  $p < 0.03$  en animales de 4-5 meses y  $P < 0.001$  en animales de 9-12 meses. El consumo total de los 4 grupos no presenta diferencias.

## **Inmunofluorescencia.**

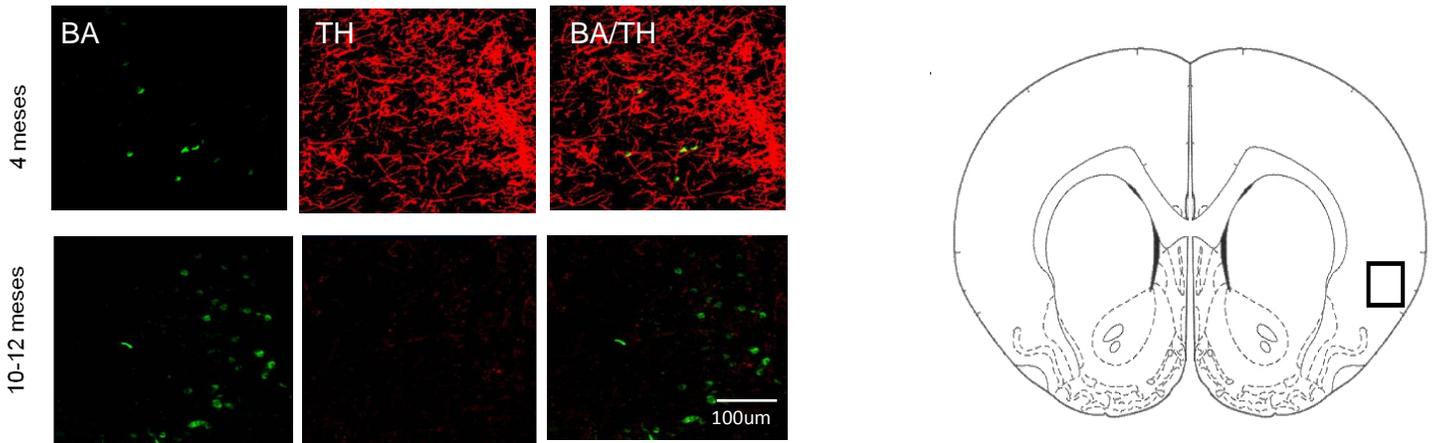
Ha sido reportado con anterioridad, que a los 9 meses de edad en el modelo 3xTg-AD existe una acumulación importante de  $\beta$ A en la corteza insular, sin que tau sea detectable incluso a los 11 meses de edad (Mastrangelo & Bowers, 2008).

Tomando en cuenta que las fallas en el desempeño cognitivo y las fallas en la liberación de DA se hacen evidentes a los 9 meses de edad en este modelo y que correlacionan con la acumulación de  $\beta$ A, se analizó la posibilidad de que las fallas en la liberación dopaminérgica, se debieran a perturbaciones en las terminales catecolaminérgicas inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa (TH+).

Se realizaron inmunofluorescencias tomando secciones de tejido cerebral de ratones transgénicos de 4-5 meses y 10-12 meses, de la CI y la ABL, estructuras relevantes en el procesamiento del CAS (Figura 8A). El análisis en la corteza insular, muestra que cuando  $\beta$ A está comenzando a acumularse en esta región, la expresión de TH es abundante, no así en el grupo de animales de edad avanzada, con una acumulación más extensa del péptido, en donde se observan anomalías estructurales y atrofia de las terminales catecolaminérgicas, que se hace evidente por una disminución importante en su cantidad y longitud (Figura 8B).

El análisis estadístico mostró que la expresión de TH en el grupo de ratones de 9-12 meses se encontró significativamente disminuida ( $P < 0.01$ ) en una proporción aproximada del 50%, en relación con el área analizada y en comparación con el grupo de ratones de 4-5 meses de edad (Figura 8B). El análisis anatómico muestra una pérdida de terminales TH+ que coincide con las alteraciones en la liberación dopaminérgica, lo que sugiere que  $\beta$ A puede estar provocando efectos tóxicos en las terminales donde se sintetiza dopamina, lo que conlleva a que su liberación funcional esté alterada y esto afecte el desempeño cognitivo en tareas donde participa este neurotransmisor.

A



B

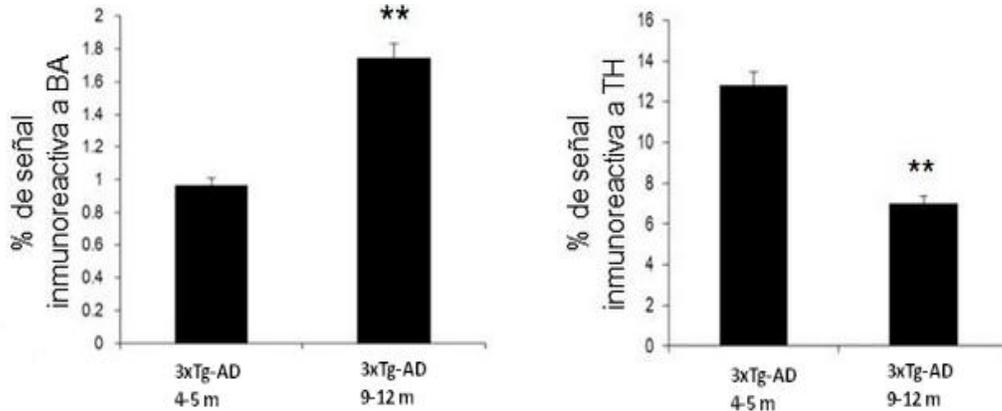


Figura 8. Distrofia de las terminales inmunorreactivas a TH y la acumulación de  $\beta$ A en el modelo 3xTg-AD en la corteza insular. Inmunofluorescencia doble contra BA y TH, imágenes representativas de la inmunofluorescencia de ratones 3xTgAD de 4-5 meses ( $n=6$ ) y de 9-12 meses de edad ( $n=4$ ) (A). Análisis cuantitativo de la expresión de TH y BA (B), que muestra una disminución significativa (\*\* $P<0.01$ ) en la densidad expresión de TH en ratones 3xTgAD de 9-12 meses, en comparación con los ratones 3xTgAD de 3-4 meses y el correspondiente aumento en la densidad de la señal de  $\beta$ A. La densidad de la señal fue normalizada al área analizada.

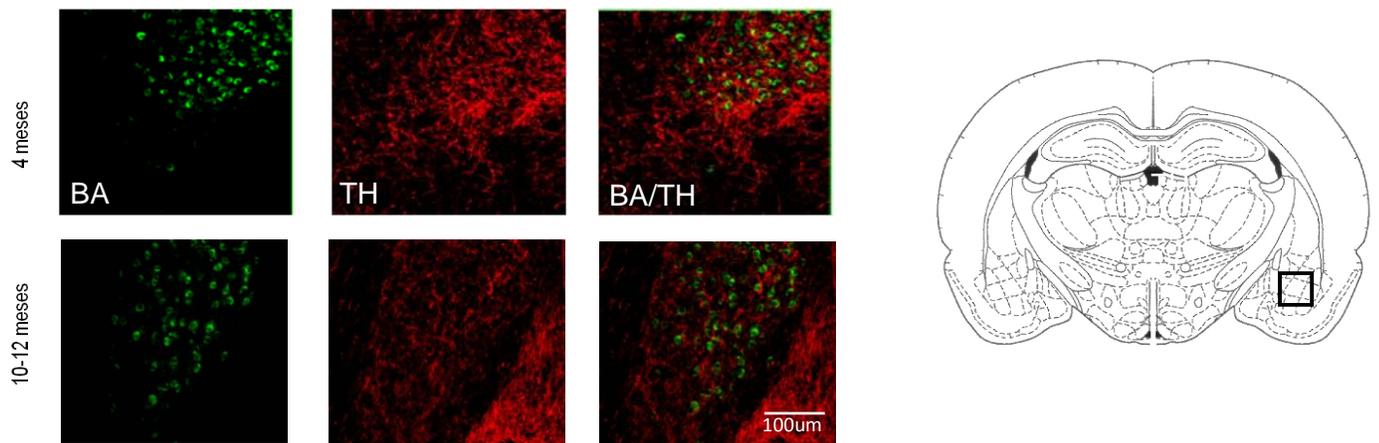
El análisis en la amígdala, mostró una acumulación importante de  $\beta$ A desde de los 4-5 meses de edad y la expresión de TH es abundante (Figura 9A), de manera interesante, en animales de edad avanzada, la señal de  $\beta$ A no muestra un aumento en animales de 9-12 meses, en comparación con animales más jóvenes (Figura 9B), aunque se observan anomalías estructurales y una tendencia a la disminución

de las terminales catecolaminérgicas, aunque las diferencias en la señal expresión de TH no son significativas.

En esta estructura no se presenta una correlación entre la acumulación de  $\beta$ A y la distrofia de las terminales catecolaminérgicas como sucede en la corteza insular, lo que sugiere que existen diferencias anatómicas y en la bioquímica de las estructuras que pudieran hacerlas más susceptibles a la acumulación del péptido y sus efectos tóxicos.

Queda también por analizar el efecto de otros componentes de la histopatología de la EA y no precisamente de las placas, sobre las terminales catecolaminérgicas y otros tipos neuronales, por ejemplo el efecto de los oligómeros solubles que se forman antes de las placas, además de estudiar si es un efecto específico de neuronas catecolaminérgicas.

A



B

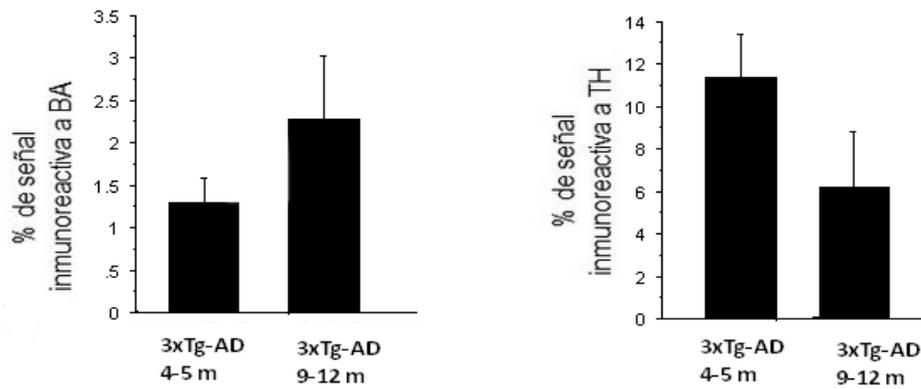


Figura 9. Distrofia de las terminales inmunorreactivas a TH y la acumulación de  $\beta$ A en el modelo 3xTg-AD en la amígdala basolateral. Inmunofluorescencia doble contra BA y TH, imágenes representativas de la inmunofluorescencia de ratones 3xTgAD de 4-5 meses (n= 6) y de 9-12 meses de edad (n=4) (A). Análisis cuantitativo de la expresión de TH y BA (B), que muestra una disminución significativa (\*\*P<0.004) en la densidad de axones inmunoreactivos a TH en ratones 3xTgAD de 9-12 meses, en comparación con los ratones 3xTgAD de 3-4 meses y no se observa un aumento en la densidad de la señal de  $\beta$ A. La densidad de la señal fue normalizada al área analizada.

## **Discusión.**

Los resultados obtenidos mediante la realización de este trabajo, apuntan a que animales 3xTg-AD y los animales con el mismo fondo genético (WT) pueden percibir y detectar el sabor de sacarina, en proporciones similares, esto se puede concluir porque sus preferencias, umbrales y consumo, son similares a las concentraciones de sacarina presentadas, además, ninguno de los dos grupos de animales presenta un umbral de rechazo en la máxima concentración presentada (3%). Por lo que la edad ni la acumulación de  $\beta$ A, parecen estar afectando la capacidad sensorial de los ratones.

Las diferencias encontradas entre animales transgénicos y silvestres, indican que los animales transgénicos tienen una preferencia mayor por la sacarina, sin que esto afecte su umbral de preferencia ni de rechazo, fenómeno que podría deberse a que para los animales 3xTg-AD la sacarina tienen un mayor valor hedónico. Ha sido reportado que la preferencia por sacarina en ratones está parcialmente definida por el locus de sacarina, y que variantes alélicas en este locus, modifican la preferencia y las respuestas aferentes de los nervios gustativos (Bachmanov et al., 2002; Fuller et al., 1974).

El locus de sacarina cuenta con un gen que codifica para el receptor gustativo Tas1R3, considerando que se ha reportado de manera reciente una desregulación genética de receptores gustativos en la EA y el modelo APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>, se sugiere que la acumulación gradual de  $\beta$ A puede tener un efecto sobre la expresión genética de quimiorreceptores. Y por tanto, Tas1R3 podría tener una expresión desregulada del receptor en el modelo 3xTg-AD en las edades analizadas, comparadas con los animales silvestres, y por ello podrían tener una mayor preferencia hacia la sacarina. Debido a que la información en este rubro es escasa, futuras investigaciones serán necesarias para dilucidar si la expresión de receptores está alterada, y si la desregulación de éstos afecta la preferencia por sacarina.

De cualquier modo, las diferencias en la preferencia no parecen tener gran impacto en los umbrales, con los animales prefiriendo o rechazando las concentraciones del endulzante de una forma similar, indican que no existen alteraciones sensoriales en el modelo transgénico.

Este experimento por sí solo, no descartó la posibilidad de que la acumulación de  $\beta$ A en animales de edad avanzada, provocara el fenómeno denominado agnosia, que se refiere a que animales con lesiones

en la corteza gustativa pueden detectar los estímulos con normalidad pero no pueden reconocer el significado conductual de los estímulos (Braun, Lasiter & Kiefer, 1982) (ej. presentar neofobia, reconocer una asociación previamente formada entre dos estímulos, etc.) y por ello no presenten memoria de largo plazo. Para conocer si existía una alteración de este tipo, se realizó la prueba de memoria a corto plazo, además de que con ella se ubicaría la fase de la memoria alterada y la intervención de la DA en esa fase.

De acuerdo a los resultados obtenidos durante el CAS, el primer resultado que salta a la vista es que ninguno de los dos grupos de edad exhibe neofobia, que es típicamente usado como un marcador de la adquisición y que se ha asociado con liberación de DA (Moreno-Castilla et al., en preparación).

El resultado contrasta con el dato anterior en que únicamente los ratones de edad avanzada no exhibían el fenómeno, esto se puede deber a una diferencia en el protocolo, ya que en el estudio mencionado se utilizó únicamente un bebedero durante la adquisición, que pudiera alterar la cantidad de sacarina que los animales ingieren de algún modo, por lo que este resultado no es del todo concreto y se necesitan repeticiones utilizando el protocolo de un bebedero para corroborar la diferencia durante esta etapa. En caso de que los animales de ambas edades continúen sin exhibir neofobia, se puede sugerir que se debe a que los animales transgénicos cuentan con concentraciones decrementadas de norepinefrina en comparación con la cepa silvestre (Guzmán-Ramos et al., 2012).

La norepinefrina es un neurotransmisor al que se le ha descrito un papel relevante en el aprendizaje, la atención selectiva y la ansiedad (Steketee et al., 1992), y al estar decrementado en el modelo 3xTg-AD, podría provocar que esta conducta no se exhiba. Se tendría que explorar con detenimiento esta posibilidad, ya que en el trabajo citado el neurotransmisor fue cuantificado en la CI por lo que sería de importancia realizar una cuantificación en otras regiones cerebrales, ya que dependiendo del área que se analiza, se han publicado reportes contrastantes en los que la disminución del neurotransmisor en las proyecciones del locus coeruleus (nucleo que provee la norepinefrina al sistema nervioso central) aumenta (Mason et al., 1977) y en el prosencéfalo disminuye (Steketee et al., 1989) la respuesta neofóbica.

Es necesario mencionar que a pesar de ser un fenómeno ampliamente conocido, son pocos los reportes que se enfocan al estudio de la neofobia. Es en un trabajo reciente donde se estudian los mecanismos estructurales que subyacen a la exhibición de ésta, en el reporte se demuestra que es necesario contar con una conectividad intacta entre la ABL y la corteza gustativa (CI) para que el fenómeno se exhiba.

Las alteraciones bilaterales en la conexión de las estructuras provoca un decremento en la respuesta neofóbica (Lin & Reilly, 2012), que es lo que pudiera estar sucediendo en los animales de edad avanzada. Considerando que la eficiencia sináptica en la vía ABL-CI medida por la respuesta a estimulación eléctrica, se encuentra reducida en este grupo de edad, coincidiendo además con fallas en la liberación de DA, por lo que ambos procesos podrían actuar en conjunto y por ello aparentemente los animales están etiquetando un sabor novedoso como familiar y por ello lo consumen en grandes cantidades.

En caso de que esta hipótesis sea cierta, se esperaría que se presentara una inhibición latente, que se refiere a que un estímulo familiar tarda más tiempo en adquirir significado como estímulo condicionado que un estímulo novedoso.

Esta situación no se observa en nuestro caso, porque los animales aprenden la tarea en una sola pareación de estímulos, relacionándolos con eficiencia, sugiriendo que los animales probablemente no estén percibiendo el estímulo como novedoso, pero pueden relacionar la ocasión en que se presentó con el malestar gástrico inducido por el LiCl.

Lo anterior indica que los procesos, mecanismos y estructuras relacionadas con la aversión gustativa son funcionales en el modelo, además se demuestra que la sacarina puede ser utilizada en protocolos de CAS en este modelo, porque reflejarían con certeza alteraciones en la memoria.

Aunque aún faltan experimentos que aporten información sobre la interpretación de los estímulos en el modelo transgénico, ya que arrojarían información más concisa sobre la memoria de reconocimiento en este modelo y los motivos por los que este tipo de memoria se afecta.

El análisis de la memoria, demostró que los ratones 3xTg-AD jóvenes y de edad avanzada, pueden desarrollar un CAS a corto plazo, contrastando con el reporte del laboratorio en que los animales no pueden formar memoria a largo plazo es esta tarea (Moreno-Castilla et al., en preparación) y tampoco memoria de corto plazo en una tarea dependiente de hipocampo (Guzmán-Ramos et al., 2012).

Esto indica que la perturbación en la formación de este tipo de memoria, se debe a procesos de consolidación, donde los neurotransmisores glutamato y dopamina tienen una acción sinérgica para llevar a cabo el proceso (Guzmán-Ramos et al., 2010). Considerando que las concentraciones de glutamato no están disminuidas en el modelo 3xTg-AD, como sucede con la DA (Moreno-Castilla et al., en preparación), los efectos deleterios observados podrían deberse principalmente a que no se activan las señales moleculares dependientes de DA.

Un ejemplo de ello podrían ser las cascadas de segundos mensajeros a través de la adenilato ciclasa (AC), que aumenta los niveles de adenosín monofosfato cíclico y activa a la proteína cinasa A (PKA); esta enzima tiene una participación importante en procesos de plasticidad sináptica y síntesis proteica, este último proceso necesario para el establecimiento de una MLP. Además de que se ha visto que cuando esta enzima es inhibida en la ABL, se impide la formación de una memoria gustativa aversiva, además animales transgénicos que no cuentan con la subunidad reguladora de la enzima, muestran memoria de corto plazo pero no así, de largo plazo (Bermúdez-Rattoni, 2004).

Al conjuntar estos resultados con los hallazgos previamente realizados y analizar el fenómeno de agnosia, que es un fenómeno ampliamente observado en animales con lesiones en la corteza gustativa (Braun et al., 1981; Braun et al., 1972; Kiefer et al., 1984), tenemos resultados contrastantes que impiden llegar a una conclusión concisa en este tema

Por un lado observamos que la reactividad o percepción gustativa no está alterada, pero no se presenta el fenómeno de neofobia. En este caso se podría sugerir que los animales son agnósicos y que las lesiones provocadas por la acumulación de  $\beta$ A provocan una incapacidad para reconocer el significado de los estímulos.

Y por otro lado se presenta una memoria de corto plazo, indicando que la agnosia no se manifiesta en este modelo, dado que los animales son capaces de asociar la sacarina con el malestar digestivo y evitar el consumo del saborizante, pero al tomar en cuenta que los animales transgénicos de edad avanzada y con mayor grado de amiloidosis en la CI, no exhiben memoria de largo plazo, nuevamente nos indica que los animales presentan agnosia, al no discriminar el significado de los estímulos gustativos, aún después de haber sido pareados con un inductor de malestar.

Resulta complicado descartar o aceptar el fenómeno de agnosia en este modelo, dado que la mayoría de los trabajos en los que se reporta la presencia del fenómeno, se analiza la memoria de largo plazo únicamente, obteniendo resultados que resultan congruentes con los encontrados previamente en el modelo 3xTg-AD. Aunque al no contar con las observaciones de la MCP en estos trabajos, no podemos asegurar que se estén presentando los mismos eventos y condiciones que en el modelo triple transgénico, donde al parecer el problema se centra en alteraciones en procesos de consolidación.

Los resultados observados mediante el análisis histológico revelan una atrofia de las terminales catecolaminérgicas que correlaciona con la propuesta de que la degeneración de terminales axonales es un proceso temprano en la neurodegeneración en la EA (Kanaan et al., 2012) y que la disfunción sináptica pudiera ser una de las alteraciones tempranas de la enfermedad.

Se observó que la presencia de  $\beta A$  es tóxica para las neuronas donde sintetiza dopamina, evento que da lugar a fallas en la liberación del neurotransmisor y que provoca un desempeño reducido en animales de edad avanzada.

La deposición en forma de placas, resultó correlacionar con la pérdida de la expresión de TH únicamente en la CI no así en la ABL, indicando que el proceso de acumulación podría no ser tan relevante para la pérdida de terminales, como podrían ser las formas oligoméricas de  $\beta A$ . La sugerencia anterior se sustenta en que la reducción de TH se observa en animales de edad avanzada, que han estado desarrollado la patología amiloide por mayor tiempo que los animales jóvenes, además se ha visto que la infusión del péptido en animales silvestres provoca una reducción de las terminales (Moreno-Castilla et al., en preparación). De igual modo que se observó en este trabajo, evidencias que colocan a los

oligómeros con un papel central en la atrofia de las terminales axonales catecolaminérgicas. Queda aún por analizar cuáles son los mecanismos involucrados en este proceso y describir en qué etapa de la patología se producen.

La pérdida de terminales catecolaminérgicas es relevante, porque además de dar luz sobre las causas de las alteraciones en la liberación dopaminérgica, permite sugerir que el ambiente generado con la reducción de terminales catecolaminérgicas y la consecuente disminución del neurotransmisor podría propiciar condiciones favorables para que la deposición del péptido se realice con mayor abundancia, considerando los reportes en los que la catecolamina tiene un papel protector en neuronas con amiloidosis, ya que puede disolver fibrillas de  $\beta A$  in vitro (Li et al., 2004) y provocar fragmentación de las fibrillas del péptido en complejos proteicos pequeños que producen un menor efecto tóxico en experimentos in vivo (Kokanova et al., 2001).

Estos resultados enfatizan la participación del sistema dopaminérgico en la patología de la EA principalmente en etapas tempranas del padecimiento y a largo plazo podrían sugerirse blancos específicos que permitieran una intervención en este sistema en etapas tempranas para evitar los síntomas y alentar el avance de la histopatología de la enfermedad.

## **Conclusión.**

Con el trabajo realizado durante este proyecto de tesis, podemos concluir que los ratones WT y 3xTg-AD son capaces de percibir y discriminar el sabor de sacarina en proporciones similares y no existe una alteración sensorial, al menos para la percepción de sacarina, por lo que es conveniente utilizar este saborizante en el CAS en este modelo, porque las perturbaciones observadas, reflejan con certeza problemas de memoria.

Por otro lado, se sugiere que los animales 3xTg-AD de edad avanzada (9-12 meses) son capaces de formar una memoria a corto plazo en una tarea independiente de hipocampo, por lo que los procesos de adquisición y evocación no están alterados, y la falla en la exhibición de memoria a largo plazo involucraría perturbaciones en procesos de consolidación, procesos donde la dopamina ejerce un rol importante y como se demuestra en este trabajo, el neurotransmisor está decrementado debido a la atrofia de las terminales catecolaminérgicas.

Resulta necesario enfocarse en el estudio de la DA en etapas tempranas de la enfermedad, ya que la intervención en este sistema desde etapas iniciales podría ser una herramienta útil para el tratamiento de la EA.

## **Perspectivas:**

Resulta relevante corroborar los resultados observados en este trabajo y analizar si se replican, para poder describir algunas de las alteraciones del sistema dopaminérgico que pudieran encontrarse en la EA. Para ello sería necesario el uso de animales silvestres a los que se denerve con 6-OHDA, molécula que es tóxica específicamente para neuronas dopaminérgicas, y analizar el proceso de neofobia, adquisición y consolidación de la memoria, ya que arrojarían información valiosa sobre las alteraciones específicas en el modelo 3xTg-AD que pudieran extrapolarse hacia la EA en pacientes.

Adicionalmente resulta importante estudiar el proceso de neofobia y analizar si el fenómeno está ausente únicamente en animales de edad avanzada, si éste es el caso, deben estudiarse los componentes estructurales del fenómeno de neofobia y analizar cuáles de ellos están afectados en el modelo 3xTg-AD. Trabajos sugieren la existencia de una alteración de la eficiencia sináptica entre la ABL y la CI realizando mediciones ipsilaterales en animales de edad avanzada.

Un reporte reciente sugiere que la perturbación de la neofobia está relacionada con fallas en la conectividad de la ABL y CI, por lo que es relevante realizar lesiones en esta vía en animales silvestres y estudiar si se presenta una conducta similar; ya que se podrían describir alteraciones que estén modificando la expresión de la neofobia y con ello poder discriminar cuáles son los motivos subyacentes a que los animales 3xTg-AD no exhiban dicho fenómeno.

En caso de encontrar que los animales jóvenes tampoco exhiben neofobia, se debe analizar la posibilidad de que se deba a los niveles decrementados de norepinefrina en regiones cerebrales ya que se ha reportado con anterioridad un decremento del NT en la corteza insular. Al realizar estos análisis se podría saber si el consumo aumentado durante la adquisición se debe a la interacción de varios factores o una única alteración.

Además, queda por caracterizar el mecanismo por el cual  $\beta$ A atrofia las terminales catecolaminérgicas y determinar si es específico para este grupo neuronal, habría que describir cómo y cuándo es que el proceso sucede, lo que podría arrojar información sobre una ventana temporal en la que se podría intervenir para evitar el daño, al menos para las terminales catecolaminérgicas.

## Bibliografía:

- Aguado, L., Antonio, A. S., Pérez, L., Valle, R. D., & Gómez, J. (1994). Effects of the NMDA receptor antagonist ketamine on flavor memory: conditioned aversion, latent inhibition, and habituation of neophobia. *Behavioral and neural biology*, 61(3), 271-281.
- Aliani, M., Udenigwe, C. C., Girgih, A. T., Pownall, T. L., Bugera, J. L., & Eskin, M. N. (2013). Aroma and Taste Perceptions With Alzheimer Disease and Stroke. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(7), 760-769.
- Almeida, C. G., Takahashi, R. H., & Gouras, G. K. (2006).  $\beta$ -amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *The Journal of neuroscience*, 26(16), 4277-4288.
- Anderson, John R. Aprendizaje y memoria. McGraw-Hill. México. 2001.
- Ansoleaga, B., Garcia-Esparcia, P., Llorens, F., Moreno, J., Aso, E., & Ferrer, I. (2013). Dysregulation of brain olfactory and taste receptors in AD, PSP and CJD, and AD-related model. *Neuroscience*, 248, 369-382.
- Armstrong, R. A. (2011). The pathogenesis of Alzheimer's disease: a reevaluation of the "amyloid cascade hypothesis". *International journal of Alzheimer's disease*, 2011.
- Atwood, C. S., Obrenovich, M. E., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith, M. A., & Martins, R. N. (2003). Amyloid- $\beta$ : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- $\beta$ . *Brain Research Reviews*, 43(1), 1-16.
- Averbach, P. (1983). Two new lesions in Alzheimer's disease. *The Lancet*, 322(8360), 1203.
- Bachmanov, A. A., Tordoff, M. G., & Beauchamp, G. K. (1998). Voluntary sodium chloride consumption by mice: differences among five inbred strains. *Behavior genetics*, 28(2), 117-124.
- Bachmanov, A. A., Tordoff, M. G., & Beauchamp, G. K. (2001). Sweetener preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *Chemical Senses*, 26(7), 905-913.
- Bachmanov, A. A., Reed, D. R., Li, X., & Beauchamp, G. K. (2002). Genetics of sweet taste preferences. *Pure and applied chemistry. Chimie pure et appliquee*, 74(7), 1135.
- Bacon, A. W., Bondi, M. W., Salmon, D. P., & Murphy, C. (1998). Very Early Changes in Olfactory Functioning Due to Alzheimer's Disease and the Role of Apolipoprotein E in Olfaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855(1), 723-731.
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., Arias-Montano, J. A., & de Puebla, P. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed*, 11, 39-60.
- Ball, M. J. (1977). Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. *Acta neuropathologica*, 37(2), 111-118.
- Ballatore, C., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(9), 663-672.
- Bannon, Michael J, Bannon, Erin E, and Bannon, Kellen T. (2012) Dopamine. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horré, K., Wiltfang, J., ... & Strooper, B. (2006). Presenilin clinical mutations can affect  $\gamma$ -secretase activity by different mechanisms. *Journal of neurochemistry*, 96(3), 732-742.
- Berman, D. E., Hazvi, S., Neduva, V., & Dudai, Y. (2000). The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *The Journal of Neuroscience*, 20(18), 7017-7023.
- Berman, D. E., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R., & Dudai, Y. (1998). Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *The Journal of neuroscience*, 18(23), 10037-10044.
- Bermúdez-Rattoni, F., Ramírez-Lugo, L., Gutiérrez, R., & Miranda, M. I. (2004). Molecular signals into the insular cortex and amygdala during aversive gustatory memory formation. *Cellular and molecular neurobiology*, 24(1), 25-36.
- Bermudez-Rattoni, F., Okuda, S., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (2005). Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learning & Memory*, 12(5), 447-449.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(3), 209-217.
- Bermudez-Rattoni, F., Forthman, D. L., Sanchez, M. A., Perez, J. L., & Garcia, J. (1988). Odor and taste aversions conditioned in anesthetized rats. *Behavioral neuroscience*, 102(5), 726.
- Bermudez-Rattoni, F., Intorini-Collison, I. B., & McGaugh, J. L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(12), 5379-5382.
- Bermudez-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain research*, 549(1), 165-170.
- Bernal-Mondragón, C., Rivas-Arancibia, S., Kendrick, K. M., & Guevara-Guzmán, R. (2013). Estradiol prevents olfactory dysfunction induced by A-beta 25-35 injection in hippocampus. *BMC neuroscience*, 14(1), 104.
- Björklund, A., & Dunnett, S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in neurosciences*, 30(5), 194-202.
- Boyce, J. M., & Shone, G. R. (2006). Effects of ageing on smell and taste. *Postgraduate medical journal*, 82(966), 239-241.
- Braun, J. J., Lasiter, P. S., & Kiefer, S. W. (1982). The gustatory neocortex of the rat. *Physiological Psychology*, 10(1), 13-45.
- Braun, J. J., Kiefer, S. W., & Ouellet, J. V. (1981). Psychic ageusia in rats lacking gustatory neocortex. *Experimental neurology*, 72(3), 711-716.
- Braun, J., Slick, T. B., & Lorden, J. F. (1972). Involvement of gustatory neocortex in the learning of taste aversions. *Physiology & behavior*, 9(4), 637-641.
- Breen, K. C., Bruce, M., & Anderton, B. H. (1991). Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *Journal of neuroscience research*, 28(1), 90-100.
- Castellani, R. J., Rolston, R. K., & Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease. *Disease-a-month: DM*, 56(9), 484.
- Chan, S. L., Furukawa, K., & Mattson, M. P. (2002). Presenilins and APP in neuritic and synaptic plasticity. *Neuromolecular medicine*, 2(2), 167-196.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., ... & Selkoe, D. J. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid  $\beta$ -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature medicine*, 3(1), 67-72.
- Clarimón, Jordi. Genética de la enfermedad de Alzheimer. ¿Cuándo hacer un estudio genético? En Rey Pérez, Antoni, Lleó Bisa Alberto. Enfermedad de Alzheimer. Neurología caso a caso. Ed. Médica Panamericana, 2010. 89-97pp

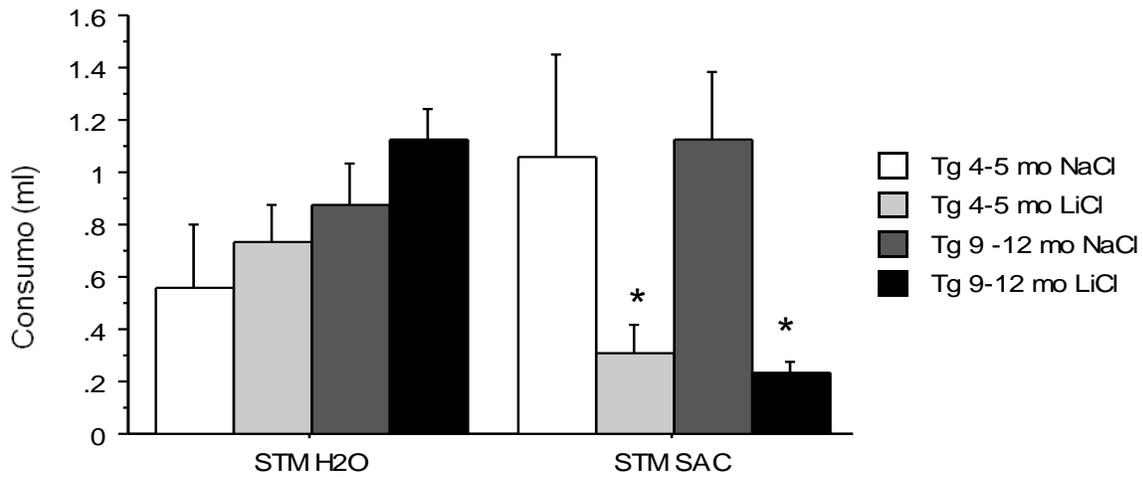
- Cooke, L. J., Haworth, C. M., & Wardle, J. (2007). Genetic and environmental influences on children's food neophobia. *The American journal of clinical nutrition*, 86(2), 428-433.
- Danysz, W., & Parsons, C. G. (2012). Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine—searching for the connections. *British journal of pharmacology*, 167(2), 324-352.
- Demuro, A., Parker, I., & Stutzmann, G. E. (2010). Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 285(17), 12463-12468.
- Deutsch, R. (1978). Effects of atropine on conditioned taste aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 8(6), 685-694.
- Devi, L., & Ohno, M. (2010). Genetic reductions of  $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and amyloid- $\beta$  ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer's disease model mice. *European Journal of Neuroscience*, 31(1), 110-118.
- Domjan, M. (1976). Determinants of the enhancement of flavored-water intake by prior exposure. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2(1), 17.
- Doty, R. L. (1989). Influence of Age and Age-Related Diseases on Olfactory Function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 561(1), 76-86.
- Doty, R. L., Reyes, P. F., & Gregor, T. (1987). Presence of both odor identification and detection deficits in Alzheimer's disease. *Brain research bulletin*, 18(5), 597-600.
- Dovey, T. M., Staples, P. A., Gibson, E. L., & Halford, J. C. (2008). Food neophobia and 'picky/fussy' eating in children: A review. *Appetite*, 50(2), 181-193.
- Drouot, B., Pincon-Raymond, M., Chambaz, J., & Pillot, T. (2000). Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(5), 705-715.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?. *Annu. Rev. Psychol.*, 55, 51-86.
- Esiri, M. M., & Wilcock, G. K. (1984). The olfactory bulbs in Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 47(1), 56-60.
- Ferreira, A., Sinjoanu, R. C., Nicholson, A., & Kleinschmidt, S. (2011). A $\beta$  Toxicity in Primary Cultured Neurons. In *Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia* (pp. 141-153). Humana Press.
- Ferreira, S. T., & Klein, W. L. (2011). The A $\beta$  oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiology of learning and memory*, 96(4), 529-543.
- Francis, P. T. (2005). The interplay of neurotransmitters in Alzheimer's disease. *CNS spectrums*, 10(11 Suppl 18), 6-9.
- Francis, P. T., Bowen, D. M., Lowe, S. L., Neary, D., Mann, D. M. A., & Snowden, J. S. (1987). Somatostatin content and release measured in cerebral biopsies from demented patients. *Journal of the neurological sciences*, 78(1), 1-16.
- Francis, P. T., Sims, N. R., Procter, A. W., & Bowen, D. M. (1993). Cortical pyramidal neurone loss may cause glutamatergic hypoactivity and cognitive impairment in Alzheimer's disease: investigative and therapeutic perspectives. *Journal of neurochemistry*, 60(5), 1589-1604.
- Fuller, J. L. (1974). Single-locus control of saccharin preference in mice. *Journal of Heredity*, 65(1), 33-36.
- Gallo, M., Roldan, G., & Bureš, J. (1992). Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioural brain research*, 52(1), 91-97.
- Garcia-Esparcia, P., Schlüter, A., Carmona, M., Moreno, J., Ansoleaga, B., Torrejón-Escribano, B., & Ferrer, I. (2013). Functional Genomics Reveals Dysregulation of Cortical Olfactory Receptors in Parkinson Disease: Novel Putative Chemoreceptors in the Human Brain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 72(6), 524-539.
- Garcia, J., Kimeldorf, D. J., & Koelling, R. A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*.
- Garcia, J., & Koelling, R. A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science*.
- Gendron, T. F., & Petrucelli, L. (2009). The role of tau in neurodegeneration. *Molecular neurodegeneration*, 4(1), 13.
- Girault, J. A., & Greengard, P. (2004). The neurobiology of dopamine signaling. *Archives of Neurology*, 61(5), 641-644.
- Goelet, P., Castellucci, V. F., Schacher, S., & Kandel, E. R. (1986). The long and the short of long-term memory: A molecular framework. *Nature*.
- Gómez-Isla, T. (2003). Modelos transgénicos de enfermedad de Alzheimer. *Alzheimer: Realidades e investigación en demencia*. Sep-Dic : 27:5-13.
- Goshen-Gottstein, Yonatan. (2003). Learning and Memory. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Gouras, G. K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., ... & Relkin, N. R. (2000). Intraneuronal A $\beta$ 42 accumulation in human brain. *The American journal of pathology*, 156(1), 15-20.
- Gregori, L., Fuchs, C., Figueiredo-Pereira, M. E., Van Nostrand, W. E., & Goldgaber, D. (1995). Amyloid-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 270(34), 19702-19708.
- Gustaw, K. A., Garrett, M. R., Lee, H. G., Castellani, R. J., Zagorski, M. G., Prakasam, A. & Smith, M. A. (2008). Antigen-antibody dissociation in Alzheimer disease: a novel approach to diagnosis. *Journal of neurochemistry*, 106(3), 1350-1356.
- Gutierrez, H., Hernandez-Echeagaray, E., & Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*, 89(3), 751-758.
- Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2010). Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *Journal of neurochemistry*, 114(1), 226-236.
- Guzmán-Ramos, K., Moreno-Castilla, P., Castro-Cruz, M., McGaugh, J. L., Martínez-Coria, H., LaFerla, F. M., & Bermúdez-Rattoni, F. (2012). Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learning & memory*, 19(10), 453-460.
- Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., ... & Selkoe, D. J. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by  $\beta$ -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature medicine*, 1(12), 1291-1296.
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(2), 101-112.
- Hanna, A., Horne, P., Yager, D., Eckman, C., Eckman, E., & Janus, C. (2009). Amyloid  $\beta$  and impairment in multiple memory systems in older transgenic APP TgCRND8 mice. *Genes, Brain and Behavior*, 8(7), 676-684.
- Hansson, C. A., Frykman, S., Farmery, M. R., Tjernberg, L. O., Nilsberth, C., Pursglove, S. E. & Ankarcróna, M. (2004). Nicastrin, presenilin, A $\beta$ 1, and PEN-2 form active  $\gamma$ -secretase complexes in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 51654-51660.

- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356.
- Holtzman, D. M., Morris, J. C., & Goate, A. M. (2011). Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Science translational medicine*, 3(77), 77sr1-77sr1.
- Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., Damasio, A. R., & Barnes, C. L. (1984). Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*, 225(4667), 1168-1170.
- Ionescu, E., & Burešová, O. (1977). Failure to elicit conditioned taste aversion by severe poisoning. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 6(3), 251-254.
- Itoh, A., Nitta, A., Nadai, M., Nishimura, K., Hirose, M., Hasegawa, T., & Nabeshima, T. (1996). Dysfunction of Cholinergic and Dopaminergic Neuronal Systems in  $\beta$ -Amyloid Protein-Infused Rats. *Journal of neurochemistry*, 66(3), 1113-1117.
- Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., ... & Borchelt, D. R. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue  $\beta$ -amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific  $\gamma$  secretase. *Human molecular genetics*, 13(2), 159-170.
- Janus, C., Welzl, H., Hanna, A., Lovasic, L., Lane, N., St George-Hyslop, P., & Westaway, D. (2004). Impaired conditioned taste aversion learning in  $\beta$ -APP transgenic mice. *Neurobiology of aging*, 25(9), 1213-1219.
- Jay, T. M. (2003). Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Progress in neurobiology*, 69(6), 375-390.
- Jovanović, Z. (2012). Mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Medicinski pregleđ*, 65(7-8), 301-307.
- Joyce, J. N., Kaeger, C., Ryoo, H., & Goldsmith, S. (1993). Dopamine D2 receptors in the hippocampus and amygdala in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 154(1), 171-174.
- Joyce, J. N., Myers, A. J., & Gurevich, E. (1998). Dopamine D2 receptor bands in normal human temporal cortex are absent in Alzheimer's disease. *Brain research*, 784(1), 7-17.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., ... & Malinow, R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron*, 37(6), 925-937.
- Kampers, T., Pangalos, M., Geerts, H., Wiech, H., & Mandelkow, E. (1999). Assembly of paired helical filaments from mouse tau: implications for the neurofibrillary pathology in transgenic mouse models for Alzheimer's disease. *FEBS letters*, 451(1), 39-44.
- Kanaan, N. M., Pigino, G. F., Brady, S. T., Lazarov, O., Binder, L. I., & Morfini, G. A. (2013). Axonal degeneration in Alzheimer's disease: when signaling abnormalities meet the axonal transport system. *Experimental neurology*, 246, 44-53.
- Kandel, E.R., Kupfermann I., & Iversen, S. (2000). Learning and memory. En Kandel, E.R., Schwartz, J.H., y Jessel, T.M.. Principles of neural sciences. 4<sup>th</sup> edition. McGraw Hill New York.
- Kempainen, N., Laine, M., Laakso, M. P., Kaasinen, V., Någren, K., Vahlberg, T., & Rinne, J. O. (2003). Hippocampal dopamine D2 receptors correlate with memory functions in Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, 18(1), 149-154.
- Kiefer, S. W., Leach, L. R., & Braun, J. J. (1984b). Taste agnosia following gustatory neocortex ablation: dissociation from odor and generality across taste qualities. *Behavioral neuroscience*, 98(4), 590.
- Kiefer, S. W., Cabral, R. J., & Garcia, J. (1984). Neonatal ablations of the gustatory neocortex in the rat: Taste aversion learning and taste reactivity. *Behavioral neuroscience*, 98(5), 804.
- Knupfer, L., & Spiegel, R. (1986). Differences in olfactory test performance between normal aged, Alzheimer and vascular type dementia individuals. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 1(1), 3-14.
- Kokanova, N. A., Mikhaïlova, G. Z., Shtanchaev, R., Tiras, N. R., & Moshkov, D. A. (2011). [Induction of neuron morphological resistance to beta-amyloid]. *Morfologija (Saint Petersburg, Russia)*, 141(1), 23-28.
- Koss, E., Weiffenbach, J. M., Haxby, J. V., & Friedland, R. P. (1988). Olfactory detection and identification performance are dissociated in early Alzheimer's disease. *Neurology*, 38(8), 1228-1228.
- Kumar, U., & Patel, S. C. (2007). Immunohistochemical localization of dopamine receptor subtypes (D1R–D5R) in Alzheimer's disease brain. *Brain research*, 1131, 187-196.
- LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(7), 499-509.
- Le Cudennec, C., Faure, A., Ly, M., & Delatour, B. (2008). One-year longitudinal evaluation of sensorimotor functions in APP751SL transgenic mice. *Genes, Brain and Behavior*, 7(s1), 83-91.
- Lee, E. O., Yang, J. H., Chang, K. A., Suh, Y. H., & Chong, Y. H. (2013). Amyloid- $\beta$  peptide-induced extracellular S100A9 depletion is associated with decrease of antimicrobial peptide activity in human THP-1 monocytes. *Journal of neuroinflammation*, 10(1), 68.
- Li, J., Zhu, M., Manning-Bog, A. B., Di Monte, D. A., & Fink, A. L. (2004). Dopamine and L-dopa disaggregate amyloid fibrils: implications for Parkinson's and Alzheimer's disease. *The FASEB journal*, 18(9), 962-964.
- Lin, J. Y., & Reilly, S. (2012). Amygdala–gustatory insular cortex connections and taste neophobia. *Behavioural brain research*, 235(2), 182-188.
- Lowe, S. L., Bowen, D. M., Francis, P. T., & Neary, D. (1990). *Ante mortem* cerebral amino acid concentrations indicate selective degeneration of glutamate-enriched neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 38(3), 571-577.
- Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., Park, B. S., Quinn, J., & Reddy, P. H. (2006). Mitochondria are a direct site of A $\beta$  accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human molecular genetics*, 15(9), 1437-1449.
- Martorana, A., Esposito, Z., & Koch, G. (2010). Beyond the cholinergic hypothesis: do current drugs work in Alzheimer's disease?. *CNS neuroscience & therapeutics*, 16(4), 235-245.
- Mason, S. T., Roberts, D., & Fibiger, H. C. (1978). Noradrenaline and neophobia. *Physiology & behavior*, 21(3), 353-361.
- Mastrangelo, M. A., & Bowers, W. J. (2008). Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC neuroscience*, 9(1), 81.
- Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430(7000), 631-639.
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack Jr, C. R., Kawas, C. H., ... & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7(3), 263-269.
- Miranda, M. I., Ferreira, G., Ramírez-Lugo, L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2002). Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11417-11422.

- Montag-Sallaz, M., Welzl, H., Kuhl, D., Montag, D., & Schachner, M. (1999). Novelty-induced increased expression of immediate-early genes c-fos and arg 3.1 in the mouse brain. *Journal of neurobiology*, 38(2), 234-246.
- Moreno-Castilla, P, Tovar y Romo L. (2012). Enfermedad de Alzheimer en López Muñoz E y Torres Carrillo NM (coords.) (2012). *Aspectos moleculares del envejecimiento*. México:Instituto de Geriátria.
- Mori, C., Spooner, E. T., Wisniewski, K. E., Wisniewski, T. M., Yamaguchi, H., Saido, T. C., ... & Lemere, C. A. (2002). Intra-neuronal A $\beta$ 42 accumulation in Down syndrome brain: Original Articles. *Amyloid*, 9(2), 88-102.
- Morishima, Y., Gotoh, Y., Zieg, J., Barrett, T., Takano, H., Flavell, R., ... & Greenberg, M. E. (2001).  $\beta$ -Amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *The Journal of Neuroscience*, 21(19), 7551-7560.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., & Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of  $\beta$ -amyloid. *Nature genetics*, 1(5), 345-347.
- Mura, E., Lanni, C., Preda, S., Pistoia, F., Sarà, M., Racchi, M., ... & Govoni, S. (2010). -Amyloid: A Disease Target or a Synaptic Regulator Affecting Age-Related Neurotransmitter Changes?. *Current pharmaceutical design*, 16(6), 672-683.
- Murphy, C., Lasker, B. R., & Salmon, D. P. (1987). Olfactory dysfunction and odor memory in Alzheimer's disease, Huntington's disease and normal aging. In *Soc. Neurosci. Abstr* (Vol. 13, No. Part 1, p. 1403).
- Nachman, M., & Hartley, P. L. (1975). Role of illness in producing learned taste aversions in rats: A comparison of several rodenticides. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 89(9), 1010.
- Neve, R. L., & Robakis, N. K. (1998). Alzheimer's disease: a re-examination of the amyloid hypothesis. *Trends in neurosciences*, 21(1), 15-19.
- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C. B., Condron, M. M., Axelman, K., Forsell, C., ... & Lannfelt, L. (2001). The Arctic APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A $\beta$  protofibril formation. *Nature neuroscience*, 4(9), 887-893.
- Nowotny, Petra, Kwon, Jennifer M, and Goate, Alison M. (2001) Alzheimer Disease. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409-421.
- Oddo, S., Caccamo, A., Smith, I. F., Green, K. N., & LaFerla, F. M. (2006). A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of A $\beta$ . *The American journal of pathology*, 168(1), 184-194.
- Oh, S., Hong, H. S., Hwang, E., Sim, H. J., Lee, W., Shin, S. J., & Mook-Jung, I. (2005). Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells. *Mechanisms of ageing and development*, 126(12), 1292-1299.
- Ohara, P. T., Granato, A., Moallem, T. M., Wang, B. R., Tillet, Y., & Jasmin, L. (2003). Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *Journal of neurocytology*, 32(2), 131-141.
- Ohm, T. G., & Braak, H. (1987). Olfactory bulb changes in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 73(4), 365-369.
- Pearson, R. C., Esiri, M. M., Hiorns, R. W., Wilcock, G. K., & Powell, T. P. (1985). Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(13), 4531-4534.
- Pérez Martínez, V. T. (2005). Demencia en la enfermedad de Alzheimer: un enfoque integral. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 21(3-4), 0-0.
- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 77(1), 32-42.
- Perry, E. K., Tomlinson, B. E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P. H., & Perry, R. H. (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *British Medical Journal*, 2(6150), 1457.
- Pistell, P. J., Zhu, M., & Ingram, D. K. (2008). Acquisition of conditioned taste aversion is impaired in the amyloid precursor protein/presenilin 1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 152(3), 594-600.
- Plant, L. D., Boyle, J. P., Smith, I. F., Peers, C., & Pearson, H. A. (2003). The production of amyloid  $\beta$  peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *The Journal of neuroscience*, 23(13), 5531-5535.
- Ramírez-Lugo, L., Jensen, M. S., Söderman, A., & West, M. J. (2009). Deficits in aversive but not in safe taste memory in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 18(2), 281-293.
- Reddy, M. M., & Bureš, J. (1981). Unit activity changes elicited in amygdala and neocortex of anaesthetized rats by intraperitoneal injection of lithium chloride. *Neuroscience letters*, 22(2), 169-172.
- Reyes, P. F., Golden, G. T., Fagel, P. L., Fariello, R. G., Katz, L., & Carner, E. (1987). The prepiriform cortex in dementia of the Alzheimer type. *Archives of neurology*, 44(6), 644.
- Reynolds, Chandra A, & Crowe, Michael, (2006) Alzheimer Disease. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester .
- Rezek, D. L. (1987). Olfactory deficits as a neurologic sign in dementia of the Alzheimer type. *Archives of neurology*, 44(10), 1030-1032.
- Rossato, J. I., Bevilacqua, L. R., Izquierdo, I., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science*, 325(5943), 1017-1020.
- Rossor, M., & Iversen, L. L. (1986). Non-cholinergic neurotransmitter abnormalities in Alzheimer's disease. *British medical bulletin*, 42(1), 70-74.
- Rossor, M. N., Garrett, N. J., Johnson, A. L., Mountjoy, C. Q., Roth, M., & Iversen, L. L. (1982). A post-mortem study of the cholinergic and GABA systems in senile dementia. *Brain: a journal of neurology*, 105(Pt 2), 313-330.
- Rossor MN, Newman S, Frackowiak RS, Lantos P, Kennedy AM. (1993). Alzheimer's disease families with amyloid precursor protein mutations. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Sep 24;695:198-202. Review.
- Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerrière, A., Vital, A., ... & Campion, D. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature genetics*, 38(1), 24-26.
- Rudbeck, L., & Dissing, J. (1998). Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *Biotechniques*, 25(4), 588-592.
- Ryan, N. S., & Rossor, M. N. (2010). Correlating familial Alzheimer's disease gene mutations with clinical phenotype. *Biomarkers in medicine*, 4(1), 99-112.
- Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D., & Greengard, P. (2001). The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *The Journal of cell biology*, 153(7), 1403-1414.
- Schiffman, S. S., Clark, C. M., & Warwick, Z. S. (1990). Gustatory and olfactory dysfunction in dementia: not specific to Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 11(6), 597-600.

- Selkoe, D. J. (1997). Alzheimer's Disease--Genotypes, Phenotype, and Treatments. *Science*, 275(5300), 630-631.
- Simpson, J., Yates, C. M., Gordon, A., & St Clair, D. M. (1984). Olfactory tubercle choline acetyltransferase activity in Alzheimer-type dementia, Down's syndrome and Huntington's chorea. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 47(10), 1138.
- Sims, N. R., Bowen, D. M., Allen, S. J., Smith, C. C. T., Neary, D., Thomas, D., & Davison, A. N. (1983). Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia. *Journal of neurochemistry*, 40(2), 503-509.
- Steinbach, S., Hundt, W., Vaitl, A., Heinrich, P., Förster, S., Bürger, K., & Zahnert, T. (2010). Taste in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of neurology*, 257(2), 238-246.
- Steketee, J. D., Silverman, P. B., & Swann, A. C. (1989). Forebrain norepinephrine involvement in selective attention and neophobia. *Physiology & behavior*, 46(4), 577-583.
- Steketee, J. D., Silverman, P. B., & Swann, A. C. (1992). Noradrenergic receptor mechanisms in neophobia. *Psychopharmacology*, 106(1), 136-142.
- Stover, K. R., & Brown, R. E. (2012). Age-related changes in visual acuity, learning and memory in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural brain research*, 231(1), 75-85.
- Swank, M. W. (2000). Phosphorylation of MAP kinase and CREB in mouse cortex and amygdala during taste aversion learning. *Neuroreport*, 11(8), 1625-1630.
- Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K. & Wolozin, B. (1998). Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and its substrate tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9637-9641.
- Tariot, P. N., Loy, R., Ryan, J. M., Porsteinsson, A., & Ismail, S. (2002). Mood stabilizers in Alzheimer's disease: symptomatic and neuroprotective rationales. *Advanced drug delivery reviews*, 54(12), 1567-1577.
- Torras, M., Portell, I., & Morgado, I. (2000). [The amigdaloid body: functional implications]. *Revista de neurologia*, 33(5), 471-476.
- Vallone, D., Picetti, R., & Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(1), 125-132.
- Verdile, G., Fuller, S., Atwood, C. S., Laws, S. M., Gandy, S. E., & Martins, R. N. (2004). The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught?. *Pharmacological Research*, 50(4), 397-409.
- Vloeberghs, E., Van Dam, D., Franck, F., Serroyen, J., Geert, M., Staufenbiel, M., & De Deyn, P. P. (2008). Altered ingestive behavior, weight changes, and intact olfactory sense in an APP overexpression model. *Behavioral neuroscience*, 122(3), 491.
- Waldton, S. (1974). Clinical observations of impaired cranial nerve function in senile dementia. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 50(5), 539-547.
- Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*, 44(1), 181-193.
- Wang, H., Megill, A., He, K., Kirkwood, A., & Lee, H. K. (2012). Consequences of inhibiting amyloid precursor protein processing enzymes on synaptic function and plasticity. *Neural plasticity*, 2012.
- Welzl, H., Alessandri, B., & Bättig, K. (1990). The formation of a new gustatory memory trace in rats is prevented by the noncompetitive NMDA antagonist ketamine. *Psychobiology*, 18(1), 43-47.
- Welzl, H., D'Adamo, P., & Lipp, H. P. (2001). Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioural brain research*, 125(1), 205-213.
- Wesson, D. W., Levy, E., Nixon, R. A., & Wilson, D. A. (2010). Olfactory dysfunction correlates with amyloid- $\beta$  burden in an Alzheimer's disease mouse model. *The journal of Neuroscience*, 30(2), 505-514.
- Wilcock, G. K., Esiri, M. M., Bowen, D. M., & Smith, C. C. T. (1982). Alzheimer's disease: correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. *Journal of the neurological sciences*, 57(2), 407-417.
- Wilcock, G. K. (1983). The temporal lobe in dementia of Alzheimer's type. *Gerontology*, 29(5), 320-324.
- Wilcox, K. C., Lacor, P. N., Pitt, J., & Klein, W. L. (2011). A $\beta$  oligomer-induced synapse degeneration in Alzheimer's disease. *Cellular and molecular neurobiology*, 31(6), 939-948.
- Wong, S. T., Trinh, K., Hacker, B., Chan, G. C., Lowe, G., Gaggar, A., ... & Storm, D. R. (2000). Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron*, 27(3), 487-497.
- Xia, W. (2009). Brain amyloid  $\beta$  protein and memory disruption in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 6, 605-611.
- Yamamoto, T., Nagai, T., Shimura, T., & Yasoshima, Y. (1998). Roles of chemical mediators in the taste system. *Japanese journal of pharmacology*, 76(4), 325-348.
- Yasoshima, Y., Shimura, T., & Yamamoto, T. (1995). Single unit responses of the amygdala after conditioned taste aversion in conscious rats. *Neuroreport*, 6(17), 2424-2428.

## Anexos.



Consumo de agua y sacarina durante la prueba de memoria a corto plazo, los animales condicionados de ambas edades, son capaces de exhibir una memoria a corto plazo, se muestran además los grupos que no fueron condicionados: 3xTg-AD de 4-5 meses (Tg 4-5 mo NaCl) y 9-12 meses (Tg 9-12 mo NaCl), el análisis estadístico comparó el consumo de agua y sacarina obteniendo: Tg 4-5 mo NaCl (n=4)  $p < 0.0023$  (siendo mayor el consumo de sacarina), Tg 4-5 mo LiCl (n=9)\*  $p < 2.95E-8$  (siendo mayor el consumo de agua), Tg 9-12 mo NaCl (n=4)  $p < 0.051$ , en este grupo no se observaron diferencias significativas en el consumo de ambas sustancias, Tg 9-12 mo LiCl (n=15)\*  $p < 1.45E-16$  (siendo mayor el consumo de agua), el consumo total de los 4 grupos no presenta diferencias.