

a



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**El grupo catecol de las catecolaminas disminuye la  
acumulación de beta amiloide 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:**

**LUCIA LANDA NAVARRO**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Q.F.B PERLA DEL ROCÍO MORENO CASTILLA  
2016  
CDMX**



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  
Landa  
Navarro  
Lucia  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
308242113
  
2. Datos del tutor  
Q.F.B. / cDra  
Perla del Rocío  
Moreno  
Castilla
  
3. Datos del sinodal 1  
Dr.  
Julio  
Morán  
Andrade
  
4. Datos del sinodal 2  
Dra.  
Tatiana  
Fiordelisio  
Coll
  
5. Datos del sinodal 3  
Dra.  
Leticia  
Ramírez  
Lugo
  
6. Datos del sinodal 4  
Dr.  
Josué Orlando  
Ramírez  
Jarquín

Datos del trabajo escrito

El grupo catecol de las catecolaminas disminuye la acumulación de beta amiloide en un modelo transgénico para la enfermedad de Alzheimer

81 p

2016

## Dedicatoria

*A mis padres, que el mundo siga lleno de individuos dispuestos a  
luchar por siempre ser mejores.*

## **Agradecimientos**

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de neurobiología del aprendizaje y la memoria, ubicado en el Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 155242 y CB 250870, del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN209413 e IN208616, y de la beca de ayudante de investigador nivel III SNI.

Agradezco la paciencia y el apoyo de mi tutora, la cDra Perla del Rocío Moreno Castilla sin quien este proyecto no hubiera podido llevarse a cabo. También agradezco al Dr. Federico Bermúdez Rattoni quien me aceptó en su grupo de investigación y siempre estuvo pendiente del desarrollo del presente trabajo.

De forma especial quiero agradecer al Jefe de la unidad de microscopía de IBB, el Dr Miguel Tapia, quien tuvo un papel muy importante en este trabajo y siempre estuvo dispuesto a apoyarme en la cuantificación estereológica.

Agradezco el apoyo brindado por la Dra. Israela Balderas, técnico de laboratorio, durante mi materia de Taller y durante los experimento de esta tesis.

Así mismo quiero agradecer al la M.V.Z Claudia Rivera y al Técnico Académico Héctor Malagón Rivero del Bioterio del IFC por asesorarme en cuanto al manejo de animales. También quiero agradecer el apoyo de Biol. Ana María Escalante y del Ing. Francisco Pérez Eugenio de la Unidad de Computo del IFC; y el apoyo de la Biol. Ma. Guadalupe Códiz Huerta y la M. en C. Minerva Mora Cabrera de la Unidad de Biología Molecular del IFC.

Además quiero hacer un reconocimiento especial mis compañeros de laboratorio: Elvi Gil Lievana, Gerardo Ramírez Mejía, Daniel Ávila Aguirre, Ma. Fernanda López Gutiérrez, María Romero Viveros, Rodrigo Pérez Ortega, Jorge Escajadillo González y Alejandro Bárcenas Femat porque no solo me brindaron su

ayuda y apoyo durante la realización de este trabajo, sino que también se convirtieron en personas que atesoraré en mi corazón para siempre.

Agradezco a Rox, Lau, Erika, Alonso, Lis, Ben e Isela quienes creyeron en mi y me animaron a seguir dando lo mejor aún en los momentos difíciles.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mis sinodales el Dr. Julio Morán Andrade, la Dra. Tatiana Fiordelisio Coll, la Dra. Leticia Ramírez Lugo y el Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín quienes se tomaron el tiempo de leer mi trabajo y enriquecerlo con sus comentarios.

## Índice

1. Abreviaturas	8
2. Resumen	9
3. Introducción	
3.1. Características generales de la Enfermedad de Alzheimer	11
3.2. Características histopatológicas de la Enfermedad de Alzheimer. Beta Amiloide y Tau hiperfosforilada	11
3.3. Procesamiento de APP. Vía amiloidogénica y vía no amiloidogénica	12
3.4. Agregación de Beta amiloide	14
3.5. Enfermedad de Alzheimer hereditaria y esporádica	15
3.6. Hipótesis en cascada de Beta amiloide	16
3.7. Tratamientos	18
3.8. Tratamientos sintomáticos	18
3.9. Tratamientos progresivos	19
3.10. Catecolaminas, metabolismo y su función en el sistema nervioso central	20
3.11. Dopamina y noradrenalina en la Enfermedad de Alzheimer	24
3.12. Alteraciones en sistemas dopaminérgico y noradrenérgico en modelos murinos para la Enfermedad de Alzheimer	25
3.13. Modelo triple transgénico para la Enfermedad de Alzheimer	27
4. Planteamiento del problema	29
4.1. Objetivo general	29
4.2. Objetivos particulares	29
4.3. Justificación	30
4.4. Hipótesis	30
5. Metodología experimental	31
5.1. Sujetos	31
5.2. Administración i.p. de catecol	31
5.3. Inmunohistoquímica contra Beta amiloide	32
5.4. Cuantificación por estereología	33
5.5. Memoria de Reconocimiento de Objetos y	

de Localización de Objetos	36
a. Objetos y aparatos	37
b. Tarea de Reconocimiento de Objetos	38
c. Tarea de Localización de Objetos	39
d. Análisis de las tareas de Reconocimiento de Objetos y Localización de Objetos	39
e. Índice de reconocimiento	40
5.6. Laberinto acuático de Morris	41
a. Aparatos	41
b. Protocolo del Laberinto acuático de Morris	42
c. Análisis de la memoria a largo plazo del laberinto acuático de Morris	43
d. Velocidad de nado y distancia recorrida	44
5.7. Sacrificio	45
5.8. Genotipificación	45
5.9. Análisis estadístico	48
6. Resultados	49
6.1. Acumulación de Beta amiloide	49
6.2. Tareas de Reconocimiento de Objetos y Localización de Objetos	51
6.3. Laberinto acuático de Morris	54
7. Discusión	58
7.1. Disminución de señal positiva a Beta amiloide en cerebro de ratón 3xTg AD de 12 meses tras administración subaguda de catecol	58
7.2. Efecto de la administración de catecol sobre memoria de reconocimiento de objetos	59
7.3. Efecto de la administración de catecol sobre la tarea de Laberinto acuático de Morris	62
8. Conclusiones	64
9. Perspectivas	64
10. Referencias	66
11. Anexos	81

## 1. Abreviaturas

ACh: Acetilcolina	INGER: Instituto Nacional de Geriátría
ADN: ácido desoxirribonucleico	LC: Locus Coeruleus
APP: Proteína precursora de amiloide	L-DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina
apoE: lipoproteína E	LTD: Depresión a largo plazo
AMI: Amígdala	LTP: Potenciación a largo plazo
βA: Beta amiloide	MAO: Monoamino oxidasa
CA1: Cornus ammonis 1	NE: Noradrenalina o norepinefrina
CC: corteza cingulada	NMDA: N-metil-D-aspartato
ChAT: Acetilcolinotransferasa	OLM: Memoria de Ubicación o Localización de Objetos
CICUAL del IFC: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular	ORM: Memoria de Reconocimiento de Objetos
COMT: catecol-O-metil transferasa	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
DA: Dopamina	PS1: Presinilina 1
EA: Enfermedad de Alzheimer	PS2: Presinilina 2
Epi: adrenalina o epinefrina	ROI: Región de interés
FDA: Food and Drugs Administration	TH: tirosina hidroxilasa
IDE: Enzima degradadora de insulina	3xTg AD: Triple transgénico para la Enfermedad de Alzheimer
IFC: Instituto de Fisiología Celular	VTA: Área ventral tegmental
i.p.: intraperitoneal	WMM: Laberinto Acuático de Morris
IR: índice de reconocimiento	

## 2. Resumen.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma de demencia progresiva más común en la actualidad, principalmente se caracteriza por un declive de habilidades cognitivas y pérdida de la memoria. Uno de los marcadores histopatológicos de la enfermedad es el péptido beta amiloide ( $\beta$ A), el cual tiende a agregarse en placas amiloides, y ha sido correlacionado con el declive de las funciones cognitivas.

La EA no tiene cura y los tratamientos aprobados hasta ahora únicamente tratan los síntomas pero no el progreso de la enfermedad. Debido a esto, diferentes grupos de investigación se han enfocado a probar nuevos tratamientos que puedan, no solo disminuir la sintomatología, sino también detener o aminorar el progreso de esta enfermedad.

Existen estudios *in vitro* en los que se muestra que las catecolaminas, las cuales poseen un grupo catecol en su estructura, son capaces de disgregar el  $\beta$ A e impedir su agregación en placas. Además, experimentos en animales a los que se les administraron agonistas dopaminérgicos o precursores de la dopamina (DA) muestran una disminución en la deposición del  $\beta$ A y un mejor desempeño en tareas conductuales. Debido a que la mayoría de estos compuestos poseen un grupo catecol, y el mismo grupo catecol ha demostrado tener efecto sobre la fibrilación del  $\beta$ A, este trabajo plantea evaluar el efecto de un tratamiento con catecol en la acumulación de  $\beta$ A y en el desempeño cognitivo de un modelo murino de la EA.

Tras el tratamiento de 16 días con catecol (10mg/kg/i.p.) se encontró una disminución en la acumulación del  $\beta$ A en la corteza cingulada y motora de los ratones, además de una mejora en el desempeño de la tarea de localización de objetos. Esto es importante debido a que estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que el catecol es quien confiere a las catecolaminas su capacidad

de evitar la agregación o disgregar  $\beta A$ , con lo que es posible mejorar el desempeño cognitivo aún en un estado avanzado de la patología amiloide.

### **3. Introducción**

#### **3.1. Características generales de la Enfermedad de Alzheimer .**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma de demencia progresiva más común en personas mayores de 65 años. Hasta 2014, la Alzheimer's Association reportó que aproximadamente 5.2 millones de estadounidenses padecen EA (Fargo, 2014). En México, no se cuenta con cifras exactas de cuantas personas padecen de esta enfermedad, pero según datos del Instituto Nacional de Geriátría (INGER) en 2014 la prevalencia de enfermedades por demencia en el país era de 860,000 casos.

La EA es mayormente caracterizada por un declive gradual de las habilidades cognitivas y pérdida de la memoria episódica (Moreno-Castilla et al., 2012). Lo que se correlaciona con que en regiones como el hipocampo y las cortezas entorrinal, parietal y frontal, se presente una marcada atrofia cerebral, muerte neuronal (Holtzman et al., 2011) y neuritas distróficas (Dickson et al., 1999).

#### **3.2. Características histopatológicas de la Enfermedad de Alzheimer. Beta amiloide y Tau hiperfosforilada**

Las principales características histopatológicas de la enfermedad son las placas amiloides o neuríticas mayormente constituidas por el péptido beta amiloide ( $\beta$ A) y los ovillos neurofibrilares constituidos por la proteína Tau en su estado hiperfosforilado (Murphy et al., 2010). El  $\beta$ A es un péptido que se genera a partir de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP). APP es una glicoproteína transmembranal ampliamente distribuida en el sistema nervioso central. Se localiza en la membrana de la célula y de diversos organelos membranosos (De-paula et al., 2012).

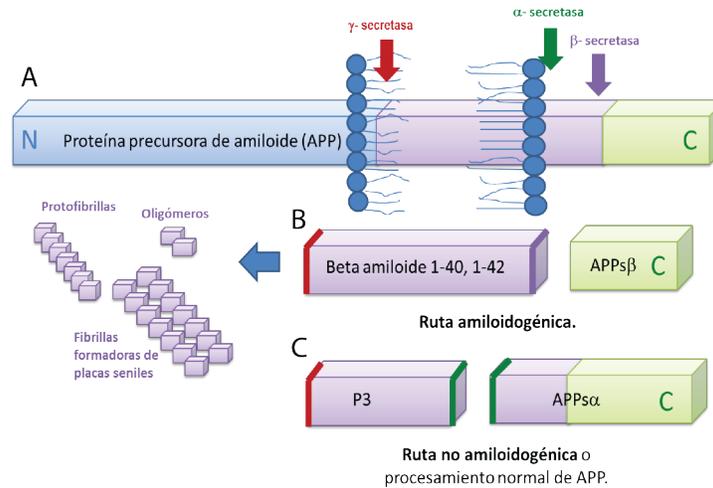
Por otro lado, Tau es una proteína asociada a microtúbulos cuya fosforilación es crítica para el proceso de estabilización de polímeros de tubulina.

La hiperfosforilación de esta proteína en la EA, altera la capacidad de ésta para unirse a los polímeros de tubulina, lo que resulta en la desestabilización de los microtúbulos y la agregación de esta proteína en marañas u ovillos neurofibrilares (De-paula et al., 2012).

Aunque la proteína tau también tiene un papel importante en la EA, su aparición en el cerebro es más tardía que la del  $\beta$ A, por lo que se considera que los eventos patológicos que dan inicio su agregación en marañas neurofibrilares son desencadenados mayormente por las alteraciones en el procesamiento y sobreproducción del  $\beta$ A (Armstrong, 2014; Hardy et al., 1992). Por estas razones mi trabajo se centró en el  $\beta$ A.

### **3.3. Procesamiento de APP. Vía amiloidogénica y vía no amiloidogénica.**

Se han atribuido diferentes funciones a la proteína APP, entre estas se le ha implicado como neuroprotector contra daño hipoglicémico y neurotoxicidad por glutamato (Mattson et al., 1993), factor neurotrófico (Qiu et al., 1995) y promotor de adhesión celular (Schubert, Jin, Saitoh, & Cole, 1989). Cultivos neuronales de ratón con el gen de la APP depletado que presentan viabilidad disminuida y un retraso en el crecimiento de neuritas (Perez et al., 1997; Selkoe, 2001).



**Fig 1. Procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) mediante la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica. A)** APP antes de ser proteolisada. **B)** Ruta amiloidogénica con los diferentes estadios de agregación previos a la formación de la placas neuríticas de  $\beta$ A. **C)** Ruta no amiloidogénica y sus productos. Las flechas y colores señalan el sitio de corte de cada enzima. Verde:  $\alpha$ -secretasa, Morado:  $\beta$ -secretasa y Rojo:  $\gamma$ -Secretasa. La N hace referencia al extremo amino de la proteína y C al extremo carboxilo.

La APP puede ser procesada mediante la vía secretora o no amiloidogénica, en la cual la proteína es proteolisada por la enzima  $\alpha$ -secretasa, lo que genera un fragmento N-terminal soluble (sAPP $\alpha$ ) y un fragmento C-terminal de 83 residuos que posteriormente es cortado por la enzima  $\gamma$ -secretasa, dando origen a un fragmento C-terminal de menor tamaño, como se muestra en la Figura 1C. Sin embargo, APP también puede ser procesada mediante la vía amiloidogénica, en la cual el primer corte es producido por la enzima  $\beta$ -secretasa, lo que resulta en un fragmento N-terminal pequeño (sAPP $\beta$ ) y un fragmento C-terminal de 99 residuos; el segundo corte, producido por la enzima  $\gamma$ -secretasa genera un péptido de composición heterogénea de entre 39 a 43 residuos denominado  $\beta$ A el cual tiende a agregarse en oligómeros protofibrillas y placas seniles (Figura 1B) (De-paula et al., 2012; Kang et al., 1987; Selkoe, 2001).

### 3.4 Agregación de Beta Amiloide.

A partir de la proteólisis de la APP por parte de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas se pueden obtener una gran variedad de formas de  $\beta$ A. La forma más común de  $\beta$ A presente en las placas neuríticas es aquella constituida por 40 aminoácidos, denominada  $\beta$ A<sub>40</sub> y en menor proporción  $\beta$ A<sub>42</sub>, denominada de esta forma debido a que esta constituida por 42 aminoácidos (Bekris et al., 2010). El péptido  $\beta$ A tiene una estructura secundaria de beta plegada que tiende a agregarse para formar dímeros, trímeros, oligómeros, protofibrillas, fibrillas y placas neuríticas (Reinke et al. 2011). El  $\beta$ A<sub>42</sub> tiene mayor tendencia a agregarse que el  $\beta$ A<sub>40</sub>. Esto es importante dado que sugiere que esta forma del péptido es la primera en acumularse en forma de placas (Selkoe, 2001).

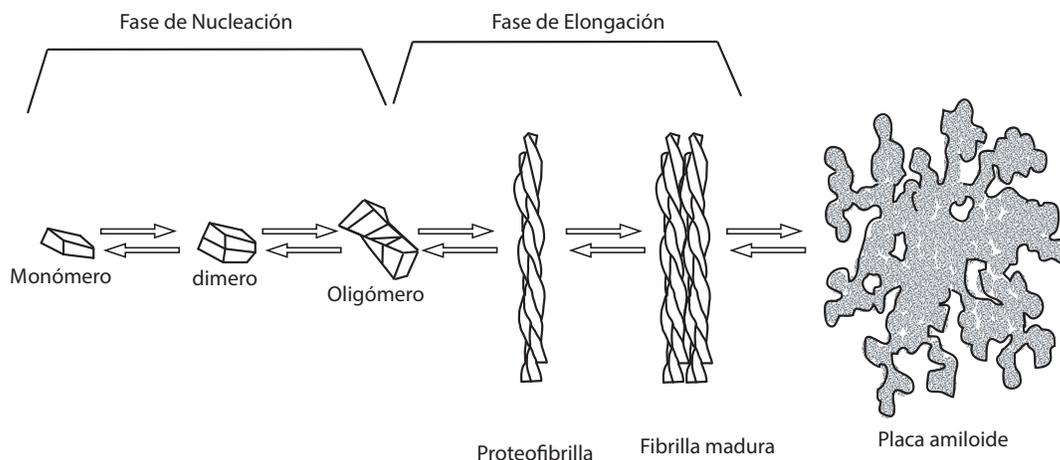


Fig 2. **Proceso de agregación de  $\beta$ A.** Se señalan los estados pertenecientes a las fases de nucleación y elongación. Las flechas en ambos sentidos indican el equilibrio que existe entre los diferentes estados de agregación de  $\beta$ A. Las placas amiloides o neuríticas no pertenecen a ninguna de las fases de agregación, puesto que estas fases se han descrito *in vitro* y la agregación en placas solo se da en cerebro (Castillo et al., 1999; Díaz-Nido et al., 2002).

Como se observa en la Figura 2, la formación de las fibrillas de  $\beta$ A se da en el tiempo como una función sigmoide que se divide en al menos dos fases: nucleación y elongación. La fase de nucleación o lag, trata de la formación de estructuras beta, es decir que en esta fase se da la generación de estructuras no

fibrilares u oligómeros del  $\beta$ A. Seguida de esta, se da la fase de elongación, en la que las estructuras beta generadas durante la nucleación, se transforman en fibrillas mediante la adición de múltiples oligómeros del  $\beta$ A (Benseny-Cases et al., 2007; Castillo et al., 1999; Díaz-Nido et al., 2002). El crecimiento de fibrillas (tanto *in vitro*, como *in vivo*), es dependiente de la concentración de monómeros de  $\beta$ A (Murphy et al., 2010). Además algunos reportes indican que los depósitos del  $\beta$ A se encuentran en equilibrio con el  $\beta$ A intersticial, por lo que las placas neuríticas pueden fungir como reservorios de oligómeros, los cuales tienen una actividad tóxica importante (Mucke et al., 2012; Murphy et al., 2010).

### **3.5 Enfermedad de Alzheimer hereditaria y esporádica**

La EA se subdivide por su causa en hereditaria y esporádica. La EA hereditaria se caracteriza por una aparición temprana de la sintomatología, entre los 30 y 60 años. Únicamente afecta a alrededor del 1- 7% de la población de enfermos, y posee una penetrancia autosómica dominante total en alrededor del 13% de los casos (Ridge et al., 2013). Cerca del 60% de los enfermos que presentan esta forma de la enfermedad reportan múltiples casos de EA dentro de su círculo familiar (Bekris et al., 2010). Algo importante es que el Alzheimer de tipo hereditario está ampliamente asociado a mutaciones en los genes de APP (localizado en el cromosoma 21), Presenilina 1 (PS1) localizado en el cromosoma 14 y Presenilina 2 (PS2) (localizado en el cromosoma 1) (Bekris et al., 2010). La patología clínica de la enfermedad de forma hereditaria varia dependiendo de la mutación presentada y de la localización de ésta dentro del gen (Ridge et al., 2013).

A diferencia de la EA hereditaria, la EA esporádica se caracteriza por la aparición tardía de la enfermedad, de los 65 años en adelante, representando alrededor del 90- 97% de los casos (Holtzman et al., 2011). A pesar de que existen numerosos factores de riesgo genético o biomarcadores de esta forma de la enfermedad, no se ha identificado un gen o mutación que pueda señalarse como el causante del progreso de la misma (Ridge et al., 2013). Sin embargo, se

piensa que la interacción de estos factores genéticos con otros de carácter ambiental contribuyen a su desarrollo (Moreno-Castilla et al., 2012). Uno de los genes con mayor importancia asociados a la EA de tipo esporádico es aquel que codifica para la lipoproteína E (apoE). Existen tres alelos comunes de apoE en humanos cuya única diferencia radica en un aminoácido ya sea en la posición 112 o 158 de la secuencia de dicha proteína. De especial importancia es el alelo 4 ( $\epsilon 4$ ), pues cuando se presenta este alelo el riesgo de presentar la enfermedad aumenta. Una sola copia del  $\epsilon 4$  incrementa la posibilidad de padecer EA unas 3 veces, mientras que dos copias de este la incrementan alrededor de 12 veces (Holtzman et al., 2011). Se sabe que la apoE esta involucrada en la degradación proteica del  $\beta A$  y que esta se ve afectada de manera negativa cuando el  $\beta A$  se encuentra formando un complejo con la apoE (Kim et al., 2009). En consecuencia la EA de tipo esporádico tiene un parece estar más relacionada con la degradación óptima del  $\beta A$ , y la EA de tipo hereditario con la sobreproducción del péptido (Selkoe, 2001).

Conocer el procesamiento de APP y ambas variantes de la enfermedad es importante, debido a que la hipótesis de la etiología de la EA más aceptada hasta ahora plantea al  $\beta A$  como el desencadenante de los eventos patológicos de la enfermedad (Armstrong, 2014).

### **3.6. Hipótesis en cascada de Beta Amiloide.**

En 1992, el grupo de Hardy y Higgins plantean la hipótesis en cascada del  $\beta A$ , que propone que la acumulación extracelular del  $\beta A$  en forma fibrilar induce una cascada de eventos neurodegenerativos asociados a la EA (Hardy et al., 1992). La cascada de eventos propuesta originalmente por los autores señala diferentes factores como las mutaciones en APP, PS1 y PS2; el alelo  $\epsilon 4$  de la apoE y factores ambientales como los causantes de la sobreproducción o mala degradación del  $\beta A$ . El exceso de oligómeros del péptido  $\beta A$  y la subsecuente acumulación en placas de este, da pie a la acumulación de tau hiperfosforilada en marañas neurofibrilares. Ambos eventos patológicos, la

acumulación del  $\beta$ A y tau hiperfosforilada, derivan en procesos de neuroinflamación, muerte neuronal, y demencia (Hardy et al., 1992).

Otros factores que participaron en el surgimiento de esta hipótesis son que las alteraciones en el proceso proteolítico de APP suelen ser eventos tempranos en la EA y el descubrimiento de que  $\beta$ A es el principal constituyente de las placas neuríticas (Armstrong, 2014).

Parte de la evidencia que apoya esta hipótesis es que existe una correlación entre un déficit cognitivo temprano con la presencia de altos niveles de oligómeros del  $\beta$ A (Armstrong, 2014; Selkoe, 2002). A su vez este déficit cognitivo se ha ligado a alteraciones en la plasticidad sináptica. Esto es importante pues se propone que estos procesos de plasticidad sináptica, como la potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés), subyacen al proceso de aprendizaje. Además existen reportes que indican que la presencia de los oligómeros del  $\beta$ A es suficiente para inhibir la LTP (Selkoe, 2002), lo que correlaciona con que los déficits cognitivos y la pérdida de sinapsis suelen presentarse de forma temprana en modelos animales de la EA (Masliah et al., 2001).

Aunque las fibras del  $\beta$ A y las placas neuríticas no se consideran la causa principal de la patología y neurodegeneración presentes en la EA, esto no quiere decir que no estén implicadas en los procesos de la enfermedad, de hecho alrededor de éstas se encuentra gran cantidad de microglia activa, inflamación y neuritas distróficas. Todos ellos importantes componentes que contribuyen ampliamente a la neurodegeneración (Castellani, et al 2010; Selkoe 2001). Además, como ya se mencionó anteriormente, las placas neuríticas están en equilibrio con el  $\beta$ A soluble, por lo cual siempre que existan placas también existirán oligómeros capaces de ejercer efectos tóxicos.

### **3.7. Tratamientos.**

Los tratamientos o terapias que se tienen hasta ahora contra la EA no son del todo efectivos, pues ninguno de estos detiene la progresión de la enfermedad. Hasta el 2014, la Food and drugs Administration (FDA) sólo había aprobado 5 fármacos (donepezilo, galantamina, memantina, rivastigmina y tacrina) para su uso en pacientes con la EA, sin embargo estas drogas únicamente tratan los síntomas de la enfermedad (Fargo, 2014).

### **3.8. Tratamientos sintomáticos.**

El surgimiento de la hipótesis colinérgica (que dicta que las primeras neuronas en verse afectadas durante la EA son las neuronas colinérgicas presentes en el cerebro basal anterior) y los diferentes reportes que demostraban, tanto la degeneración de neuronas en el núcleo basal de Meynert, como la existencia de déficits neocorticales de la acetilcolinotransferasa (ChAT) (Davies et al., 1976; Perry et al., 1977), dieron pie a los primeros tratamientos con fármacos contra la EA. El donepezilo, la galantamina, rivastigmina y tacrina, son inhibidores de la actividad de la colinesterasa, dado que inhiben la degradación de la acetilcolina (ACh) (Galimberti et al., 2013).

Está reportado que en los pacientes con la EA la enzima glutamina sintetasa está oxidada, y esto produce un exceso de glutamato y sobreactivación del receptor a glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA). Dicha sobreactivación puede llevar a un proceso de exitotoxicidad que derive en muerte celular (Castellani et al., 2010). A esto se le suma el hecho de que los oligómeros de  $\beta$ A interactúan con dicho receptor alterando la señalización glutamatérgica. Los oligómeros del  $\beta$ A tienden a reducir el flujo de  $Ca^{2+}$  que se da a través del receptor con lo cual favorecen la depresión a largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés), inhibiendo a su vez la LTP, interfiriendo así con procesos de plasticidad sináptica que son de vital importancia para el aprendizaje (Shankar et al., 2007). Debido a esto, también se ha buscado el tratamiento con antagonistas del

receptor NMDA; el único aprobado hasta ahora por la FDA es la memantina (Galimberti et al., 2013).

Aunque los fármacos mencionados anteriormente permiten tratar los síntomas del paciente, no detienen el avance de la EA, por lo que solo funcionan durante algunos años y después el paciente empeora rápidamente (Galimberti et al., 2013).

### **3.9. Tratamientos de progresión.**

Debido a la importancia del  $\beta$ A en la patología de la EA, se han desarrollado tratamientos cuya meta es reducir la carga de este péptido en el cerebro.

Entre estos tratamientos se encuentran los que proponen modular la producción del  $\beta$ A mediante inhibidores de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$ - secretasas. Sin embargo, estos tratamientos no mejoran las deficiencias cognitivas y funcionales de los pacientes (De-paula et al., 2012). Otros tratamientos se enfocan en promover la expresión de enzimas degradadoras del  $\beta$ A, como la enzima degradadora de insulina (IDE) que elimina sustratos con secuencia proclive a formar estructuras beta plegada (Selkoe, 2001). Sin embargo, estos tratamientos tienen la desventaja de que estas enzimas rara vez degradan sustratos específicos.

Un nuevo enfoque terapéutico es la inhibición de la fibrilación del  $\beta$ A. Recientemente se ha propuesto que los fármacos que estimulan el sistema dopaminérgico pueden tener un efecto benéfico en los pacientes con EA (Koch et al., 2014; Martorana et al., 2009). Diferentes reportes *in vitro* indican que las catecolaminas y algunos agonistas dopaminérgicos pueden inhibir la formación de fibrillas (Huong et al., 2010; Ono et al., 2013) o disgregar la acumulación de  $\beta$ A (Li et al., 2004).

Entre estos trabajos destaca el de Huong y colaboradores 2010, en el que se evidencía que el grupo catecol (orto dihidroxibenceno) inhibe la formación de fibrillas de  $\beta A_{40}$  y  $\beta A_{42}$ . Además, la coincubación de monómeros de ambas formas del péptido con compuestos derivados del catecol, y el catecol mismo, demostró que su estructura interfiere en la formación de las fibrillas (Huong et al., 2010; Ono et al., 2013). Estos datos sugieren que la estructura de las catecolaminas presenta una interacción importante con el  $\beta A$ , por lo cual potenciadores de estos neurotransmisores podrían representar un buen blanco como tratamiento de progresión para la EA. Además, las catecolaminas participan en procesos de aprendizaje y memoria (Guzmán-Ramos et al., 2010; de Lima et al., 2011; Nieoullon, 2002) por lo que el mantenimiento de sus niveles tónicos, liberación y degradación son importantes.

### **3.10. Catecolaminas, metabolismo y función en el sistema nervioso central.**

En el cerebro el catecol puede encontrarse en las catecolaminas, que son un grupo de monoaminas cuyo precursor es el aminoácido tirosina. Dentro de este grupo están los neurotransmisores dopamina (DA), norepinefrina (NE) y Epinefrina (Epi) (Purves et al., 2008).

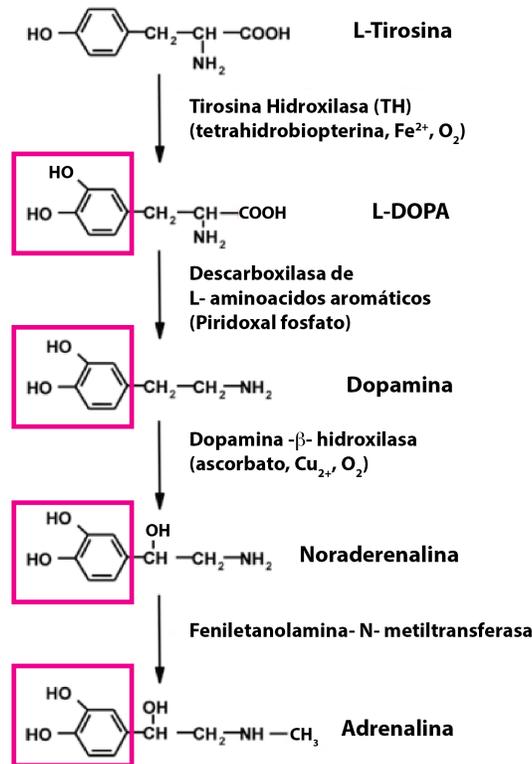


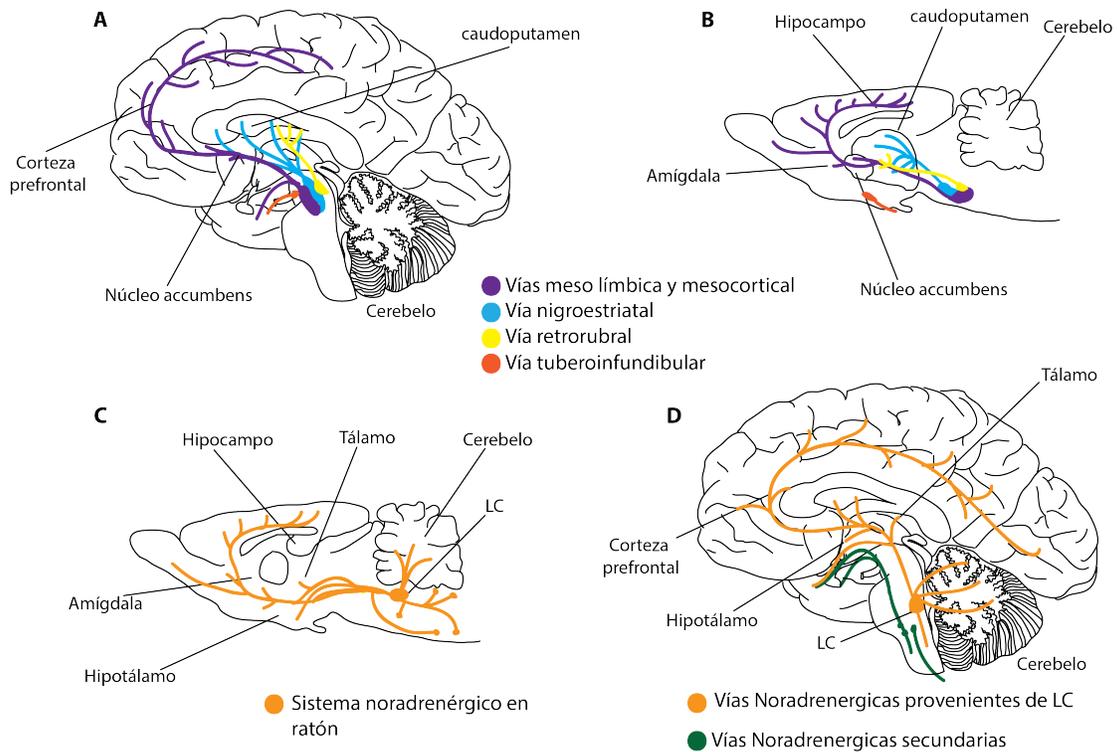
Fig 3. **Síntesis de catecolaminas.** Se señalan los cofactores y coenzimas necesarios para que se lleven a cabo las reacciones en la vía de síntesis de la L-DOPA, Dopamina, Noradrenalina y Adrenalina. El recuadro rosa señala el grupo catecol en cada producto de la vía.

El primer paso en la síntesis de catecolaminas es catalizado por la tirosina hidroxilasa (TH) para sintetizar 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Posteriormente la L-DOPA es metabolizada por la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos, generándose la pérdida de dióxido de carbono y formándose la DA. En las neuronas dopaminérgicas la síntesis de catecolaminas finaliza con la producción de DA. Sin embargo, en las neuronas noradrenérgicas o adrenérgicas, la síntesis de catecolaminas continúa mediante la enzima dopamina β hidroxilasa, la cual cataliza el paso de DA a NE. Finalmente, en las neuronas adrenérgicas, la síntesis de Epi se da por la acción de la feniletanolamina N- metil transferasa. (Figura 3).

La enzima limitante en la síntesis de catecolaminas es la tirosina hidroxilasa (TH), aunque en el caso de las neuronas noradrenérgicas y adrenérgicas se sabe que la dopamina β hidroxilasa también puede fungir como reguladora de la vía (Squire et al., 2008). La regulación de la actividad de la enzima TH se da mediante la fosforilación en 4 diferentes residuos de serina, desfosforilación por 2 fosfatasas, interacciones con enzimas productoras de tetrahidrobiopterina (cofactor necesario para la síntesis de L-DOPA) e inhibición por exceso de catecolaminas (Daubner et al., 2011).

La inactivación y degradación de la catecolaminas, al igual que su síntesis, participa en el mantenimiento óptimo de estos neurotransmisores (Squire et al., 2008). La forma de inactivación mas común de las catecolaminas parece ser la recaptura de éstas a través de los transportadores dependientes del cotransporte de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, pero también existen enzimas que contribuyen al catabolismo de las mismas. Dos enzimas implicadas en la degradación de las catecolaminas son la monoamino oxidasa (MAO) y la catecol-O-metil transferasa (COMT) (Squire et al., 2008).

La MAO cataliza la deaminación oxidativa de monoaminas y sus derivados O- metilados. Existen dos isoenzimas de la MAO, la MAO<sub>A</sub> y la MAO<sub>B</sub>, ambas localizadas en la membrana de la mitocondria. Por otro lado, la COMT se presenta como las aloenzimas MB-COMT y S-COMT, siendo la MB-COMT la más común en el cerebro. La MB-COMT se encuentra localizada en la membrana plasmática y mitocondrial. Su función es la transferencia de grupos metilo al grupo m- hidroxilo de la S-adenosilmetionina a las catecolaminas (Siegel et al. 2012).



**Fig 4. Comparación de los sistemas dopaminérgico y noradrenérgico en cerebro humano y de ratón.** Se señalan las principales vías dopaminérgicas y noradrenérgicas presentes en los cerebros de humano y ratón. A) Esquema de las vías dopaminérgicas en cerebro humano y B) de ratón. Cada color representa una vía diferente. C) Esquema de las vías noradrenérgicas en cerebro de ratón. Se señalan las principales vías noradrenérgicas del ratón, las cuales al igual que en el humano se originan del locus coeruleus (LC). D) Esquema de las vías noradrenérgicas en cerebro humano. Las vías que no se originan en el LC se presentan en verde.

Los principales núcleos dopaminérgicos son la sustancia nigra, el área ventral tegmental (VTA), el área retrorubral. A partir del primero, se constituye la vía nigroestriatal que proyecta mayormente al caudoputamen dorsal (Figura 4 A y B). Esta vía está implicada en la coordinación del movimiento voluntario. A partir del VTA se originan 2 vías, la mesolímbica que proyecta al núcleo accumbens, y la mesocortical que proyecta a la corteza prefrontal (Figura 4 A y B). Ambas vías están implicadas en procesos de motivación, recompensa, reforzamiento y aprendizaje (Guzmán-Ramos et al., 2010; de Lima et al., 2011; Nieoullon, 2002). Se sabe que únicamente el 5% de las neuronas del área retrorubral son dopaminérgicas (Siegel et al., 2012; Trillo et al., 2013). También

es importante mencionar que existen neuronas dopaminérgicas en el núcleo arcuato, las cuales participan en procesos endócrinos (Siegel et al., 2012).

En el caso de la NE existen 3 principales núcleos cerebrales, el locus coeruleus (LC), el sistema lateral tegmental y el grupo medular dorsal. La mayoría de las fibras noradrenérgicas ascendentes parten del LC y proyectan hacia el bulbo olfatorio, neocortex, hipocampo, tálamo, estriado, hipotálamo y cerebro anterior basal (Figura 4 C y D)(Trillo et al., 2013).

La NE cerebral está mayormente implicada en la regulación del ciclo sueño-vigilia y procesos de atención (Siegel et al., 2012) y se le atribuye un papel importante en procesos de estrés y en memoria emocional (van Stegeren, 2008).

Aunque se sabe que existen neuronas secretoras de Epi en el sistema lateral tegmental y el grupo medular que proyectan hacia hipotálamo y tálamo, no se conoce el papel de Epi en el cerebro (Purves et al., 2008).

### **3.11. Dopamina y Noradrenalina en la Enfermedad de Alzheimer.**

El estudio de otros neurotransmisores, además de la ACh, revelo que otros sistemas de neurotransmisión relevantes para el aprendizaje y la memoria, como el dopaminérgico y el noradrenérgico, se encontraban alterados en la EA (Gibb et al., 1989; Storga et al 1996; Yu et al., 2008).

Se ha reportado que los pacientes con la EA presentan una disminución significativa de DA, L-DOPA y NE en el giro cingulado, la amígdala, el estriado y los núcleos del rafé (Storga et al., 1996). Además existe una reducción en receptores D1 (Cortés et al., 1988) y D2 en el hipocampo (Kemppainen et al., 2003). Las alteraciones presentes en amígdala e hipocampo son de especial importancia debido a la implicación que tienen las catecolaminas en ambas

estructuras durante los procesos de aprendizaje y memoria (Guzmán-Ramos et al., 2010; Laatikainen et al., 2012; Violante Soria, 2014).

La necropsia de pacientes con EA, reveló que existe una pérdida de neuronas noradrenérgicas del LC y el grupo medular dorsal de aproximadamente 50 a 60% (Mann et al., 1982). Lo que coincide con la disminución de niveles de este neurotransmisor en áreas cerebrales como el hipocampo, el giro cingulado y las cortezas temporal y frontal, las cuales reciben proyecciones del LC (Storga et al., 1996).

Diferentes estudios sugieren que la síntesis de ambas catecolaminas se encuentra afectada por la EA, por ejemplo, existe una marcada pérdida de señal inmunoreactiva a TH y dopamina  $\beta$  hidroxilasa en hipocampo (Iversen et al., 1983). Además se reporta una disminución en la afinidad de adenoreceptores de tipo  $\alpha$  2 en corteza prefrontal e hipocampo (Kalaria et al., 1991; Pascual et al., 1992).

También se han encontrado polimorfismos que incrementan el riesgo de padecer la EA esporádica en genes relacionados con el sistema noradrenérgico, lo que sugiere que el receptor adrenérgico  $\beta$ 2 juega un papel importante en esta patología (Yu et al., 2008). En cuanto al sistema dopaminérgico, los polimorfismos identificados hasta ahora en los genes de los receptores D1 y D3, están relacionados con una mayor probabilidad de presentar psicosis y agresión durante la EA de tipo esporádico (Holmes et al., 2001).

### **3.12. Alteraciones en sistemas dopaminérgico y noradrenérgico en modelos murinos para la Enfermedad de Alzheimer.**

Diferentes modelos animales de la EA presentan alteraciones en el sistema dopaminérgico. El modelo murino APP23, que sobreexpresa APP, presenta una disminución de fibras reactivas a TH en el hipocampo y en la neocorteza (Diez et al., 2003). Por lo tanto, también se ha ligado la

sobreexpresión de esta proteína con la degeneración de neuronas noradrenérgicas en el LC y con la disminución de receptores adrenérgicos  $\alpha 1$  en el giro cingulado y el hipocampo en el modelo Tg2576 (Klingner et al., 2003).

Otro modelo murino, el triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTgAD), presenta un déficit en la liberación de DA durante el desempeño de una tarea de reconocimiento de objetos (ORM, por sus siglas en inglés) a partir de los 10 meses de edad (Guzmán-Ramos et al., 2012). Datos recientes sobre este mismo modelo señalan que este déficit en la liberación de DA correlaciona con la pérdida y atrofia de terminales catecolaminérgicos debida a la acumulación del  $\beta A$  (Moreno-Castilla et al., 2016). A esto se suma, la degeneración de las terminales provenientes del LC en hipocampo y algunas regiones corticales reportada en el modelo APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta E9$  (Liu et al., 2008). Por otro lado, la infusión del  $\beta A$  en cerebros de ratones silvestres también afecta la liberación de catecolaminas. Por ejemplo la infusión de  $\beta A_{40}$  en el núcleo accumbens afecta la liberación de DA evocada por agonistas colinérgicos (Preda et al., 2008), y la infusión del  $\beta A_{42}$  también genera la pérdida de terminales catecolaminérgicas, una reducción en los niveles de DA en la corteza insular y alteraciones en la plasticidad sináptica, como lo es la imposibilidad de inducir LTP en la vía corteza insular-amígdala basolateral con estimulación de alta frecuencia (Moreno-Castilla et al., 2016).

Diferentes tratamientos con precursores o agonistas catecolaminérgicos como la L-DOPA (Ambrée et al., 2009), apomorfina (Himeno et al., 2011), e inhibidores de la recaptura de DA y NE (Guzmán-Ramos et al., 2012) tienen efecto benéfico sobre los déficits cognoscitivos y la acumulación del  $\beta A$  en modelos transgénicos para la EA. Por ejemplo, el tratamiento con apomorfina disminuye la cantidad del  $\beta A$  acumulado en hipocampo y mejora el desempeño de ratones 3xTg AD en el laberinto acuático de Morris (MWM, por sus siglas en inglés) (Himeno et al., 2011) que es una tarea de memoria espacial dependiente de hipocampo (Naghdi et al., 2003).

Los experimentos más recientes en nuestro laboratorio señalan que el tratamiento con L-DOPA (10 mg/kg) disminuye la acumulación del  $\beta$ A en el hipocampo, y en las cortezas insular y motora en ratones 3xTg-AD de 11-12 meses de edad, además de mejorar el desempeño conductual en una tarea de memoria de reconocimiento (Moreno-Castilla et al., 2014) (dependiente de corteza), en la cual el ratón debe distinguir entre un objeto familiar y uno novedoso (Balderas et al., 2008). Esto concuerda con los estudios *in vitro*, mencionados anteriormente, en los que los derivados del grupo catecol como la L-DOPA, la dopamina y la norepinefrina, entre otros, tienen la capacidad de inhibir la formación de fibrillas del  $\beta$ A (Huong et al., 2010; Ono et al., 2013) y de disgregarlas (Li et al., 2004). Además, se ha reportado que tanto la DA como otras moléculas que tienen grupo catecol en su estructura química, establecen interacciones con el péptido  $\beta$ A, lo que fue determinado mediante un inmunensayo (Inbar et al., 2008).

### **3.13. Modelo triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer**

Uno de los modelos murinos más relevantes en el estudio de la EA, es el 3xTg AD que fue originalmente desarrollado en el laboratorio del Dr. Frank La Ferla. Este modelo destaca de otros debido a que no solo acumula  $\beta$ A tanto intra como extracelular, sino también tau hiperfosforilada. Además tiene un patrón de inicio de la neuropatología regional muy similar al de pacientes con EA, ya que mayormente afecta regiones cerebrales como la amígdala, el hipocampo y la corteza cerebral (Mastrangelo et al., 2008).

Para el desarrollo del modelo se microinyectaron 2 constructos transgénicos independientes, codificantes para las mutaciones humanas APP<sub>swe</sub> y Tau<sub>P301L</sub>, en embriones de ratón knock-in PS1<sub>M146V</sub>. Ambos constructos están bajo el control transcripcional del mismo promotor, el Thy 1.2. Este promotor se expresa mayormente en regiones como el hipocampo y la corteza, y su expresión es casi nula fuera de sistema nervioso central (Oddo et al., 2003).

Las mutaciones APP<sub>swe</sub> y PS1<sub>M146V</sub> generan un aumento del corte mediado por la enzima  $\beta$ -secretasa (Ridge et al., 2013) y el aumento en la producción del  $\beta$ A<sub>42</sub> (Murayama et al., 1999), respectivamente. La mutación Tau genera la acumulación de esta proteína en su forma hiperfosforilada en regiones cerebrales severamente afectadas por la EA (Spillantini et al., 1998).

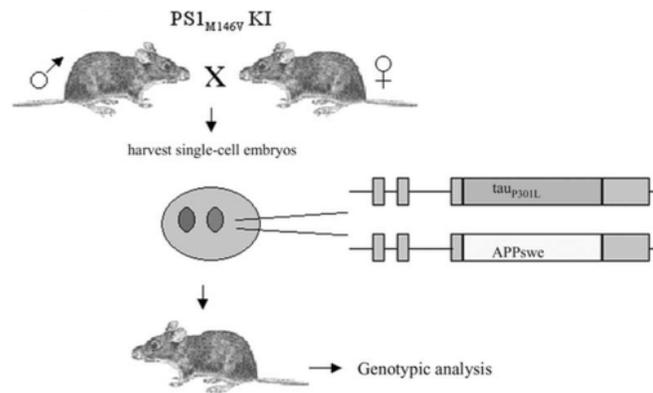


Fig 5. diagrama representativo de cómo se desarrollo el modelo 3xTgAD (Oddo, Caccamo, & Shepherd, 2003)

En este modelo los primeros déficits cognitivos se manifiesta a los 4 meses de edad correlacionando con la acumulación del  $\beta$ A intracelular en el hipocampo y la amígdala. Aunque los déficits cognitivos empeoran a medida que el ratón envejece y la patología amiloide se agrava. (Billings et al., 2005; Guzmán-Ramos et al., 2012). Las alteraciones en la plasticidad sináptica son evidentes desde los 6 meses de edad (Oddo et al., 2003) y la acumulación de tau hiperfosforilada es más evidente a los 12 meses de edad (Oddo et al., 2003).

#### 4. Planteamiento del problema.

Las evidencias antes presentadas señalan que existe una clara correlación entre la acumulación del péptido  $\beta$ A y alteraciones en sistemas relevantes para el aprendizaje y la memoria, como sistemas noradrenérgico y dopaminérgico, lo cual contribuye al agravamiento de la patología durante la EA.

Reportes *in vitro* que apuntan a las catecolaminas y al mismo grupo catecol como moléculas capaces de disgregar o impedir la acumulación del  $\beta$ A. Además el tratamiento de modelos transgénicos de la EA con precursores, agonistas e inhibidores de la recaptura de las catecolaminas ha resultado, no solo en la disminución de la acumulación del  $\beta$ A en regiones cerebrales relevantes para la EA y la memoria, como la corteza prefrontal y el hipocampo; sino también con el mejoramiento de tareas cognitivas relacionadas a dichas áreas cerebrales.

Por lo tanto, resulta interesante entonces evaluar la posibilidad de que el grupo catecol sea el que confiere a las catecolaminas la capacidad de disgregar la acumulación del  $\beta$ A *in vivo*, en el modelo transgénico para la EA.

#### **4.1. Objetivo general.**

- Evaluar el efecto *in vivo* de la molécula catecol sobre la agregación de  $\beta$ A y su consecuencia en la memoria en un modelo transgénico de la EA.

#### **4.2. Objetivos particulares.**

- Evaluar el efecto de la administración subaguda de catecol sobre los agregados de  $\beta$ A en la corteza, el hipocampo y amígdala de ratones 3xTg AD de 12 meses de edad.
- Evaluar el efecto de la administración subaguda de catecol en las tareas de Laberinto Acuático de Morris, Reconocimiento y Localización de Objetos en ratones 3xTg AD de 12 meses.

#### **4.3 Justificación.**

El estudio del efecto que posee el grupo catecol sobre la atenuación del déficit cognoscitivo provocado por la acumulación de  $\beta$ A en modelos de la

enfermedad nos permite entender mejor el papel que tiene el sistema catecolaminérgico en la EA.

#### **4.4 Hipótesis.**

El grupo catecol disminuye la acumulación de  $\beta$ A en un modelo transgénico de la EA, permitiendo una mejora cognitiva.

## **5. Metodología experimental**

### **5.1. Sujetos**

Los sujetos empleados para el desarrollo de este trabajo fueron ratones 3xTg AD macho de 12 meses de edad. Los animales se mantuvieron en el vivario del Instituto de Fisiología Celular (IFC) en cajas individuales, condiciones de 12 h luz/ 12 h oscuridad y tuvieron acceso libre a comida y agua en todo momento.

El protocolo empleado en este trabajo se desarrolló de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 y con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IFC (CICUAL del IFC) con numero FBR 30-14.

### **5.2. Administración intraperitoneal de catecol.**

Se les administró catecol (Sigma, México) o vehículo (solución salina 0.9%) vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 10mg/kg de peso por 16 días continuos durante los cuales se realizaron las tareas conductuales.

La administración del fármaco y su vehículo comenzaron el primer día de habituación de la tarea de ORM, lo quiere decir que al concluir dicha tarea los ratones tenían 5 días de haber sido administrados con catecol. Para cuando los ratones concluyeron la tarea de localización de objetos (OLM, por sus siglas en inglés) tenían 7 días de haber sido administrados y para el final del protocolo del MWM tenían 16 días de administración (Figura 6).

Catecol 10mg/kg/día 					
Días 1-3	Días 4-7		Días 8-11	//	Día 16
Habitación	ORM	OLM	MWM		Sacrificio
					Cuantificación por estereología

Fig 6. **Protocolo experimental.** En el cuadro se resume el protocolo empleado para el desarrollo de esta tesis. Nótese que los días de administración no son los mismos para todas las tareas. Las líneas diagonales en el protocolo de laberinto acuático de Morris (MWM) indican los 4 días de descanso en los que los animales fueron administrados con catecol y vehículo pero no participaron en ninguna conducta. Tarea de reconocimiento de objetos (ORM) y tarea de localización de objetos (OLM).

### 5.3. Inmunohistoquímica contra Beta Amiloide

Para confirmar la presencia del  $\beta A$  y posteriormente cuantificar dicho péptido, se empleó la técnica de inmunofluorescencia contra el  $\beta A$ , en la cual un anticuerpo, acoplado a un fluoróforo, reconoce a su antígeno dentro de un tejido. Al excitar el fluoróforo a una longitud de onda determinada, se puede observar la localización del antígeno de interés por la emisión del mismo.

Se empleó un protocolo de inmunofluorescencia que se realiza en 2 días. El primer día se realizaron 3 lavados con buffer 0.1M Tris y NaCl 0.9% pH 7.4 (TBS 1X) de 10 min cada uno. Tras esto, se realizó la exposición de los epítopes con ácido fórmico al 88% durante 5 min, se lavó 3 veces con buffer 0.1M Tris, NaCl 0.9% y Tritón 0.1% pH 7.4 (TBST 0.1%) (cada lavado es de 10min) y se incubó con solución de bloqueo (TBST 0.1% y BSA 5%) por 30 min. El anticuerpo primario anti  $\beta A$  empleado fue el  $\beta A$  6E10 hecho en ratón (1:300/500  $\mu L$ , Covance, Emeryville, California), el cual se incubó una noche a 4°C con agitación. El segundo día se lavó 6 veces con TBS 1X, (cada lavado de 10min), posteriormente se realiza una incubación de 1 h con el anticuerpo secundario goat anti Mouse IgG FITC (1:250  $\mu L$ , Millipore, Darmstadt, Alemania). Para finalizar, se lava 3 veces con TBS 1X, (cada lavado es de 10min, en oscuro) y

al terminar los lavados se colocaron las rebanadas en portaobjetos silanizados (VWR, Leuven, Bélgica) con medio de montaje Dako (Dako, E.U.A.).

#### **5.4. Cuantificación de la acumulación intracelular de Beta Amiloide mediante estereología**

La estereología es una técnica mediante la cual se pueden obtener descripciones cuantitativas de una estructura tridimensional a partir de medidas realizadas en rebanadas de dicha estructura (imágenes en segunda dimensión), evitando la sub o sobreestimación de densidades de volumen, área o numéricas. Para llevar a cabo esta técnica la estructura de interés tiene que ser seccionada de manera que todas las partes de esta tengan las mismas probabilidades de ser muestreadas (West, 2012).

Para la cuantificación de  $\beta$ A intracelular se empleó la prueba de fraccionador óptico del software Stereo Investigator®. Esta prueba estereológica permite estimar el número total de partículas que hay en un determinado volumen a partir de un muestreo sistemático aleatorio realizado en secciones distribuidas de manera uniforme en los planos X, Y y Z a lo largo de la región de interés sin importar su forma u orientación en el espacio (MBF Bioscience, 2015).

El uso de esta prueba requiere de la selección del tamaño de los cuadros de conteo y de la malla de conteo. Los cuadros de conteo corresponden al área muestreada, mientras que la malla de conteo se refiere a la distancia entre cada cuadro de conteo en cada sección (Figura 7). Las secciones de tejido o rebanadas a muestrear deben estar separadas entre sí por una periodicidad determinada. Además, se mide el grosor de cada sección muestreada.

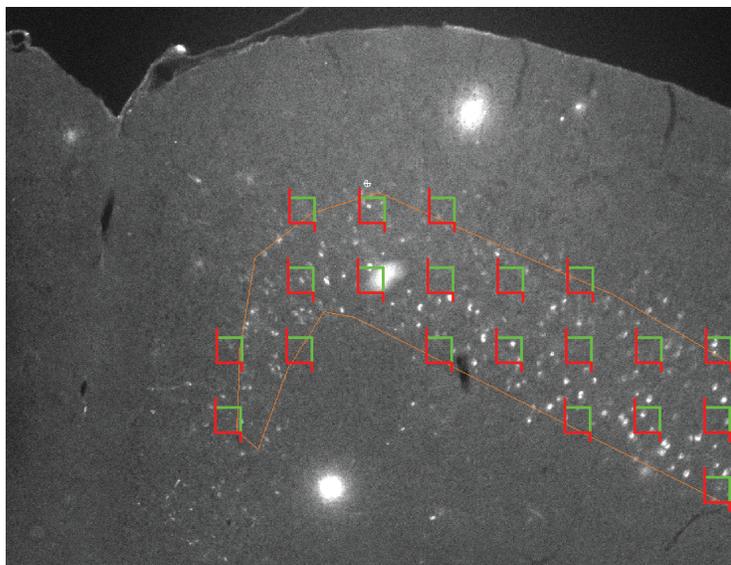


Fig 7. **Área de conteo para corteza.** En la imagen se muestra la selección realizada a 4x del área de interés para la cuantificación de  $\beta$ A, en este caso delimitada por la línea naranja. También se muestra la distribución de la malla de conteo, compuesta por un grupo de cuadros de conteo (línea verde y roja), los cuales señalan las áreas a cuantificar.

La formula para obtener el total de partículas en una región de interés es la siguiente:

$$N = \Sigma Q^*(t/h)(1/asf)(1/ssf)$$

donde  $Q^*$  es el numero de partículas contadas,  $t$  es el grosor de corte de la sección,  $h$  es la altura del cuadro de conteo,  $asf$  se refiere a la razón entre el área del cuadro de conteo con respecto al área formada por la distancia entre cada cuadro de conteo; finalmente  $ssf$  se refiere al número de rebanadas muestreadas del total de rebanadas de la estructura analizada (MBF Bioscience, 2015).

En este trabajo se cuantificaron células positivas a  $\beta$ A en las cortezas cingulada (CC) y motora (región AP 1.545 a 0.945 mm), subiculum y CA1 del hipocampo (región AP -2.48 a -3.28 mm); y amígdala basolateral (región AP -1.155 a -2.355  $\mu$ m) (Atlas, 2009). La cuantificación en estas tres regiones

cerebrales se realizó para evaluar los efectos de una dosis diaria de catecol durante 16 días sobre la acumulación intracelular de  $\beta$ A. Para cada estructura se determinaron el tamaño de la malla para conteo, y el número de rebanadas de cerebro a cuantificar y la periodicidad entre ellas, como se indica en la siguiente tabla.

<b>Estructura</b>	<b>Tamaño de malla de conteo (mm)</b>	<b>Periodicidad</b>	<b>No. Rebanadas analizadas</b>
Corteza	250x250	3	6
Hipocampo	180x180	4	6
Amígdala	150x150	4	6

Tabla 1. Descripción de los parámetros empleados durante la cuantificación estereológica para cada estructura.

La región de interés (ROI, por sus siglas en inglés) en cada estructura cerebral analizada se delimitó en función del patrón de acumulación de  $\beta$ A reportado en los ratones 3xTg-AD (Mastrangelo et al., 2008) y con ayuda de la tinción con DAPI para la ubicación espacial de la región. En las cortezas cingulada y motora la ROI comprende la capa IV y V de la corteza. En el subiculum y CA1 de hipocampo la ROI comprende la capa piramidal de neuronas y en la amígdala comprende la región basolateral de la estructura.

La estereología se llevo a cabo en la unidad de microscopia del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en el microscopio Olympus BX51WI el cual se encuentra equipado un módulo confocal de disco giratorio, una lámpara de mercurio, una platina motorizada y una cámara Hamamatsu C9100 EM-CCD, con resolución temporal de 32 frames/s y resolución espacial de 1024 (H) x 1024 (V). Para el trazado de la malla de conteo se empleo el objetivo 4x, mientras que para la cuantificación se empleó un objetivo de 60x.

Únicamente se cuantificaron las células cuya señal positiva a  $\beta$ A caía dentro del cuadro de conteo o tocaban la línea verde que se muestra en la Figura 10.

La señal positiva al  $\beta$ A que tocaba la línea roja no se considera en las cuantificaciones, por regla del fraccionador óptico que busca evitar el sesgo. Cabe señalar que se determinó como señal positiva la acumulación intracelular de gránulos del  $\beta$ A.

Las fotografías representativas de cada estructura se tomaron en el microscopio confocal FV10i (Olympus, Miami, Florida) de la Unidad de Microscopia del IFC, el cual está equipado con láseres LD y luz ultravioleta. Dependiendo de la estructura se tomaron un total de 18 imágenes para corteza, 4 para amígdala y 9 de hipocampo. Cada imagen con un área de  $424.6 \times 424.6 \mu\text{m}$ . Posteriormente se les procesó con el software Image J (NIH) para transformarlas en imágenes de 8-bits.

### **5.5. Memoria de Reconocimiento de Objetos y Memoria de Localización de Objetos .**

La memoria de reconocimiento es la capacidad de un individuo de identificar si algún estímulo o evento ha sido experimentado previamente; tiene dos componentes básicos: el juicio de la familiaridad/novedad o recuerdo y el componente contextual que implica un espacio y un tiempo determinados (Balderas et al., 2008).

En modelos animales es posible evaluar la memoria de reconocimiento mediante tareas conductuales como la memoria de reconocimiento de objetos ORM y la OLM. La tarea de ORM se emplea para evaluar el juicio de la novedad/familiaridad, mientras que la tarea de OLM se emplea para evaluar el componente contextual (Balderas et al., 2008).

Tareas como la ORM y la OLM son importantes para la evaluación de modelos animales de déficits cognitivos o de memoria, pues implican el uso de estructuras del lóbulo temporal medial, las cuales se ven severamente afectadas en demencias como la EA (Vogel-Ciernia et al., 2014).

### a) Objetos y aparatos.

Se emplearon 4 objetos construidos de bloques (Lego<sup>®</sup>, México), 2 idénticos entre si denominados robot y 2 idénticos entre si denominados edificio. Los objetos se colocaron dentro de dos cajas de madera cuadradas de 33 cm x 30cm ; el piso de éstas se cubrió con aserrín durante el desempeño de la tarea. También se añadió una clave espacial de 4 cm x 28 cm que consistió de rayas verticales negras pintadas sobre fondo blanco (cada raya mide 1.5 cm de ancho). La clave espacial se colocó dentro de la caja en una pared a 2 cm del piso (Figura 8.)

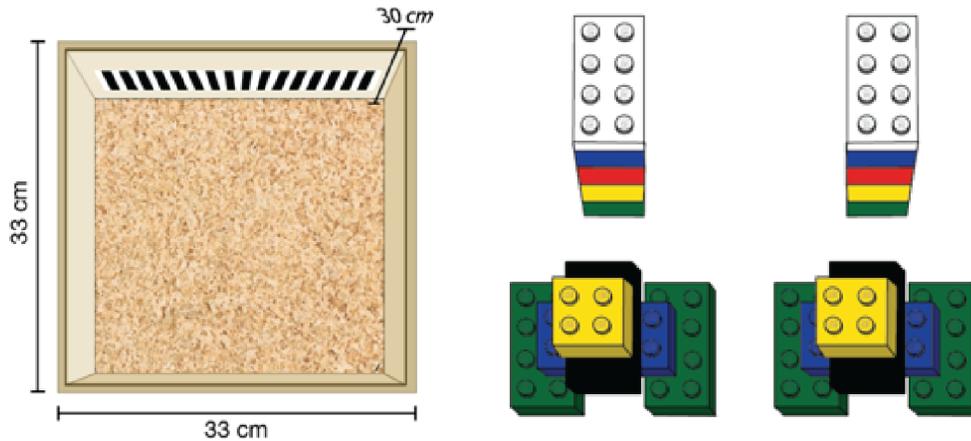


Fig 8. **Objetos y aparatos de las tareas de reconocimiento de objetos (ORM) y localización de objetos (OLM).** A la izquierda se muestra un esquema de la caja en la que se llevaron a cabo las tareas de ORM y OLM. A la derecha se muestran los objetos empleados en dichas pruebas. Legos superiores edificios y legos inferiores robots

Antes de iniciar cada sesión del protocolo y entre sujeto y sujeto, se limpiaron los objetos con etanol al 70% y toallas de papel. Con la finalidad de reducir sesgos debidos a preferencia por algún objeto, se balanceó la elección de éstos y sus ubicaciones. Es decir, que los cuatro objetos ocuparon todas las configuraciones posibles dentro de la arena en la que se llevaron a cabo las tareas.

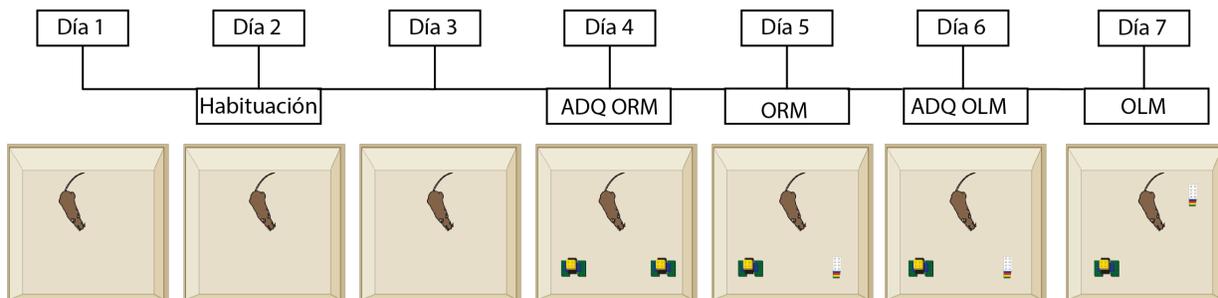


Fig 9. **Protocolo para las tareas de reconocimiento de objetos (ORM) y localización de objetos (OLM).** Durante la fase de habituación se permite a los sujetos explorar un contexto 3 días seguidos. El cuarto día se realiza la fase de adquisición de ORM (ADQ ORM) durante la cual se presentan dos objetos iguales al ratón. Veinticuatro horas después se realiza la fase de memoria a largo plazo de ORM, en la cual se presenta un objeto familiar y un objeto novedoso. Al siguiente día, durante la adquisición de OLM, se presentan los mismos objetos que en la prueba de memoria a largo plazo de ORM. Finalmente, el día 7 se realiza la prueba de memoria de largo plazo de OLM, en la que uno de los objetos se desplaza a una ubicación novedosa. Cada día se permite a los sujetos explorar el contexto o los objetos por 10 minutos.

## b) Tarea de Reconocimiento de Objetos

El protocolo de ORM empleado es una modificación del reportado por Guzmán-Ramos y colaboradores en 2012, y consistió en 3 fases: la habituación, la adquisición y la memoria a largo plazo o evocación. La primera consistió en 3 días durante los cuales se introdujo al sujeto a una de las cajas (contexto) durante 10 minutos; con el fin de que el contexto se volviera familiar. Durante la segunda fase, denominada adquisición, se introdujo en la caja un par de objetos idénticos que el sujeto nunca antes había visto (Por ejemplo, Robot y Robot), estos se fijaron al piso mediante cuadros de velcro que se encuentran a 5 cm de la pared de la caja. A cada sujeto se le dieron 10 minutos para explorar los objetos. En la última fase, denominada memoria a largo plazo, se introdujo uno de los objetos que el sujeto exploró durante la adquisición y un objeto novedoso. Al igual que en las fases anteriores, a cada sujeto se le dieron 10 minutos para

explorar los objetos. Entre cada acceso a la caja que tiene el sujeto pasan 24 horas (Figura 9).

La adquisición y la prueba de memoria a largo plazo fueron videograbadas con cámaras digitales modelo VG-160/X-990/D-745 (Olympus, E.U.A) para su posterior análisis.

### **c) Tarea de Localización de Objetos.**

El protocolo de OLM empleado es una modificación del empleado por Violante Soria en 2014, y consistió en 3 fases: la habituación, la adquisición y la memoria a largo plazo. Dado que este protocolo conductual se hizo seguido de el de ORM, y para esta tarea ya se había realizado una fase de habituación esta tarea se inició en la segunda fase. Durante la fase de adquisición, se introdujo en la caja el mismo par de objetos que el sujeto exploró durante la fase de evocación de la tarea de ORM. Por ejemplo, Robot y Edificio (Figura 9). Esto con el fin de evaluar la familiaridad de ambos objetos durante esta segunda exposición a los mismos. A cada sujeto se le dieron 10 minutos para explorar los objetos. En la última fase, denominada memoria a largo plazo, uno de los objetos se desplazó a una ubicación novedosa. Al igual que en las fases anteriores, a cada sujeto se le dieron 10 minutos para explorar los objetos. Entre cada acceso a la caja que tiene el sujeto pasan 24 horas.

La adquisición y la prueba de memoria a largo plazo fueron videograbadas con cámaras digitales modelo VG-160/X-990/D-745 (Olympus, E.U.A) para su posterior análisis.

### **d) Análisis de las tareas de Reconocimiento de Objetos y Localización de Objetos.**

El análisis de los videos es realizado por dos analistas entrenados para cronometrar la duración de la conducta de exploración para cada objeto en intervalos de 1 minuto durante los 10 minutos que dura cada fase. Para esto

ambos analistas deben evaluar mediante índices similares que es una exploración y que no lo es. La conducta de exploración consiste en que el sujeto oriente su cabeza hacia los objetos a una distancia menor a 2 cm. Si el sujeto muerde el objeto, no orienta su cabeza hacia este o solo pasa a su alrededor no se considera que este explorando el objeto (Violante Soria, 2014).

Es importante señalar que los analistas desconocieron en todo momento la asociación característica entre cada par de objetos, es decir si cual era el objeto familiar y cual el novedoso. Además cada analista evaluó los videos de manera independiente.

### **e) Índice de reconocimiento**

A partir de los registros de exploración realizados durante el análisis de los videos se obtuvo el índice de reconocimiento (IR) de cada objeto mediante la siguiente ecuación:

$$IR = \frac{OA}{OA + OB} ; = \frac{OB}{OA + OB}$$

donde OA es el total de tiempo de exploración del objeto A en centésimas de segundo, OB es el total de tiempo de exploración del objeto B en centésimas de segundo y OA+AB es el tiempo total de exploración del OA más el tiempo total del tiempo de exploración del OB.

Para obtener el IR de la memoria a largo plazo se reescribe la ecuación anterior como:

$$IR = \frac{OF}{OF + ON} ; = \frac{ON}{OF + ON}$$

donde OF es el total de tiempo de exploración del objeto familiar en centésimas de segundo, ON es el total de tiempo de exploración del objeto

novedoso en centésimas de segundo y OF+ON es el tiempo total de exploración del OF más el tiempo total del tiempo de exploración del ON.

Cuando el IR se encuentra alrededor de 0.5 indica que no hay preferencias por alguno de los objetos. Un índice mayor a 0.5 indica preferencia por explorar algún objeto (Violante Soria, 2014). Se grafican dos barras en cada fase de la tarea, una para expresar el índice de reconocimiento de cada objeto.

## **5.6. Laberinto acuático de Morris.**

La memoria espacial es el proceso mediante el cual los individuos almacenan información referente a su ubicación o la ubicación de un objetos en el espacio (Purves et al., 2008). En animales este tipo de memoria depende de las asociaciones entre características del ambiente y la formación de una representación o mapa que permita al animal ubicarse (Vicens et al., 2003).

Una de las tareas conductuales más utilizadas para evaluar la memoria espacial en modelos animales es el MWM, en el cual los animales deben encontrar una plataforma sumergida en una tina de agua mediante claves espaciales (Morris, 2008).

Diferentes reportes indican que la integridad del hipocampo es esencial para memorias que se valen de relaciones entre claves espaciales (von Bohlen und Halbach et al., 2006; Broadbent et al., 2004; Bromley-Brits et al., 2011; D'Hooge et al., 2001; Morris et al., 1982). Por ejemplo; ratas con lesiones en el hipocampo presentan una inhabilidad para recordar la localización de la plataforma (Broadbent et al., 2004).

### **a) Aparatos**

Se usó de una tina circular de 110 cm de diámetro y 64.4 cm de alto, una plataforma blanca de 13.2 x 13.2 cm. Se llenó la tina con agua a 20°C hasta que la plataforma quedó sumergida 1 cm y se agregó pintura blanca hasta que ya no fuera visible la plataforma. Al igual que en la tarea de ORM se colocó una clave

visual para que el ratón pudiera orientarse al estar dentro de la tina, esta clave consistió en el experimentador sentado en el mismo punto durante todos los ensayos y la memoria a largo plazo.

Entre sujeto y sujeto se removió el agua para que la pintura no se asentaría. Además se limpiaban los aserrines que quedaban flotando. Esto con el fin de que no hubiera más claves para el ratón que las espaciales provistas por el investigador.

#### **b) Protocolo del Laberinto acuático de Morris.**

Al día siguiente de que los sujetos realizan la memoria a largo plazo de la tarea de OLM, entran al protocolo de entrenamiento del MWM, que consta de 4 días de entrenamiento separados por 24 h cada uno y una prueba de memoria a largo plazo (5 días después de finalizado el cuarto día de entrenamiento).

Cada día de entrenamiento consta de 4 ensayos en los que se pone al sujeto a nadar en la tina con agua y pintura blanca, desde diferentes posiciones (1 a 4). La finalidad es que el sujeto encuentre la plataforma sumergida. Se mide el tiempo de latencia que tarda el sujeto en llegar desde cada posición a la plataforma; el tiempo no debe pasar de 60 s, si tras ese tiempo el ratón no ha alcanzado la plataforma se le guía a ésta y se le deja explorar por 20 s (Figura. 10). Los 4 días anteriores a la prueba de memoria de largo plazo el ratón permanece en su caja en el vivario y no entra a ninguna prueba conductual.

Durante la prueba de memoria a largo plazo se retiró la plataforma de su lugar y se dejó nadar al sujeto desde la posición más lejana a la plataforma por 60 s.

Al igual que las pruebas de ORM y OLM, La prueba fue videograbada con cámaras digitales modelo VG-160/X-990/D-745 (Olympus, E.U.A) para su posterior análisis.

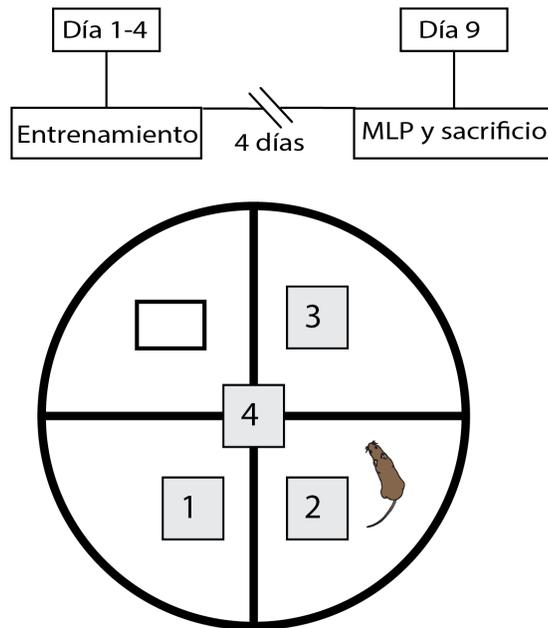


Fig 10. **Protocolo para Laberinto Acuático de Morris (MWM).** Se dan 4 días de entrenamiento en los que el ratón entra en diferentes posiciones al laberinto (señaladas por los números en cuadros), y desde las cuales debe aprender a localizar la plataforma. Una vez terminados los entrenamientos se dejan pasar 4 días, y al 5 día se lleva a cabo la prueba de memoria a largo plazo (MLP) y el sacrificio del roedor.

### c) Análisis de la prueba de memoria a largo plazo del Laberinto acuático de Morris.

Para el análisis de los videos obtenidos del MWM se dibujó el perímetro y los cuadrantes de la tina en un acetato transparente. Además, se dibujo el lugar donde estuvo situada la plataforma durante los ensayos, esto con la finalidad de que fuera más fácil para el observador contar el número de cruces (número de veces que el ratón cruza por donde estuvo la plataforma) y la latencia en llegar a la plataforma. También se cuantificó el tiempo de permanencia en el cuadrante donde estuvo la plataforma o blanco y el tiempo que permaneció en el cuadrante opuesto.

#### d) Velocidad de nado y distancia recorrida

Debido a que el tiempo en el que el ratón alcanza la plataforma se usa como indicativo de aprendizaje, también se realizaron mediciones de velocidad de nado y de distancia recorrida durante los 60 s que dura la evaluación de memoria a largo plazo con el fin de descartar alteraciones motoras.

Las mediciones se realizaron con el *plug in* TrackMate del software Image J (NIH), en el que se calibraron los pixeles con respecto al tamaño de la tina en la que se realizó el MWM. En este caso cada pixel corresponde a 1.4091 pixel/cm. Después, se definió el tamaño del ratón en cm (8 cm considerando solo el cuerpo) y se realizó una selección de cambio en el umbral de la imagen de video a blancos y negros para que el programa detecta a el ratón en movimiento. Después de esto, se definió el filtro de calidad para asegurar que el programa siguiera en todo momento al ratón y para acceder a la función de LAP tracker en el cual el programa nos permitió definir y seleccionar un único trazo con el que se realizaron los cálculos de velocidad media y la distancia.

Como el programa arroja la velocidad media en centímetros sobre cuadros (cm/f) hay que multiplicar este valor por el número de cuadros o frames sobre segundo (f/s) que hay en el video. Dicha medida es indicada en el manual de especificaciones de la cámara, en el caso de la cámaras empleadas en este trabajo es de 18 f/s. La ecuación mediante la que se hacen estos cálculos se represente en seguida.

$$Vm \left( \frac{cm}{s} \right) = Vm \left( \frac{cm}{f} \right) \times 18 \left( \frac{f}{s} \right)$$

Esta multiplicación nos permite obtener la velocidad media en centímetros sobre segundos (cm/s). Una vez obtenida la velocidad media en cm/s se multiplica por el numero de segundos que hay en un minuto, es decir 60 s, y eso nos da la distancia total recorrida por el ratón en cm.

Las tareas antes indicadas se realizaron en el siguiente orden ORM-OLM- MWM, esto en acorde con experimentos previos realizados en el laboratorio donde se determinó que dicho orden era mejor para el desarrollo de estas tareas (Moreno-Castilla et al., 2014).

### **5.7. Sacrificio.**

El sacrificio se realizó al terminar la memoria a largo plazo del MWM pasados los 16 días de tratamiento. Se empleo una sobredosis de pentobarbital sódico de vía i.p. La perfusión se realizó de manera intracardiaca con solución salina 0.9%, seguido de paraformaldehído (PFA) al 4% a pH: 7.4.

Tras esto, se extrajo el cerebro de los sujetos y se almacenó en PFA 4%, por 48 h. Para la etapa de criopreservación, los cerebros se almacenaron en sacarosa 30% a 4°C por 24h. Se realizaron cortes coronales de 50  $\mu\text{m}$  de todo el cerebro y se recuperaron las rebanadas correspondientes al área de interés para su posterior proceso mediante por inmunohistoquímica contra el  $\beta\text{A}$ .

### **5.8. Genotipificación**

Para asegurar que los ratones que se usaron en los experimentos eran 3xTg AD homocigotos, es decir que ambos alelos de un gen son idénticos, se extrajo ADN genómico de la cola del ratón por el método de *hot shot* (Rudbeck et al., 1998). Este método consiste en lisar 1 mm de cola del animal con una solución alcalina (NaOH 25 mM, 0.2 mM EDTA disodio pH 12) con calor (95°C, 1 h) y neutralizarlo con una solución ácida (1 M Tris-HC pH 5).

Una vez que se extrajo el ADN de cada sujeto, se realizó un reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR, por sus siglas en inglés), técnica mediante la cual se puede amplificar una secuencia específica de ADN. Para esto se empleó un kit marca QIAGEN (Hilden, Alemania) y los oligonucleótidos señalados en las tablas 2 y 3.

<b>5TAU REv</b>	5'TCCAAAGTTCACCTGATAGT3'
<b>APP internal 5'</b>	5'GCTTGCACCAGTTCTGGATGG3'
<b>Thy 12.4</b>	5'GAGGTATTCAGTCATGTGCT3'

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la PCR de AAP/ Tau. Se muestra la secuencia de oligos, tanto forward como reverse, empleados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifica los segmentos de DNA que codifican para APP y Tau.

<b>PS1k13</b>	5'CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC3'
<b>PS1k 15</b>	5'AGGCAGGAAGATCACGTGTTCCAAGTAC3'

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la PCR de PS1. Se muestra la secuencia de oligonucleótidos empleados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifica el segmento de DNA que codifican para PS1 de humano.

Se realizaron protocolos independientes de PCR para APP/Tau y PS1, debido a que PS1 requiere de mayor numero de ciclos y una digestión de 2h a 37°C con la enzima BSTII (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) para determinar si los animales eran silvestres, 3xTg AD homocigotos o heterocigotos. Ver tabla 4 para el método usado para APP/Tau y tabla 5 para el empleado para PS1.

	<b>APP/TAU</b>	Tiempo
Desnaturalización	94°C	5 min
	94°C	30 s
Hibridación	53°C	30 s
Extensión	72°C	1 min
	Volver a paso 2	x24 veces
Extensión final	72°C	3 min

Tabla 4. método empleado para la realización de la PCR de APP/Tau. En la tabla se muestra el tiempo y la temperatura que las muestras pasaron en cada etapa del ciclo de la PCR.

	<b>PS1</b>	Tiempo
Desnaturalización	94°C	5min
	94°C	40 s
Hibridación	62°C	40 s
Extensión	72°C	1min
	Volver a paso 2	x40 veces
Extensión final	72° C	3 min

Tabla 5. método empleado para la realización de la PCR de PS1. En la tabla se muestra el tiempo y la temperatura que las muestras pasaron en cada etapa del ciclo de la PCR.

Una vez obtenidos los productos de la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio para determinar el genotipo de los ratones (silvestre o 3xTg homocigoto o heterocigoto) a través de los productos observados en el gel. Además se tomaron las fotos pertinentes (Anexo 2).

	<b>silvestre pb</b>	<b>3xTg AD Hh pb</b>	<b>3xTg AD HH pb</b>
<b>APP/TAU</b>	-----	500-350	500-350
<b>PS1</b>	550	550, 300 Y 250	300 Y 250

Tabla 6. Productos esperados de la electroforesis de APP/tau y de PS1. Para APP/Tau se observan dos bandas de 500 y de 350 pares de bases (pdb) respectivamente si los ratones son 3xTg AD. En el caso de PS1, si el ratón es WT se observa una banda de 550 pdb, si es heterocigoto (Hh) se observan 3 bandas de 550, 300 y 250 pdb respectivamente y si es homocigoto (HH) se observan 2 bandas de 300 y 250 pdb respectivamente.

### **5.9 Análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico se empleó la prueba de t de Student independiente de dos colas para evaluar el la adquisición, la memoria a largo plazo y la exploración total de las tareas de ORM y OLM. Las diferentes variables analizadas para la memoria a largo plazo MWM (incluidas la velocidad de nado y la distancia recorrida), así como para la evaluación de las pruebas de estereología de las 3 estructuras estudiadas. Además, se realizaron pruebas de

ANOVA de una vía y de medidas repetidas de dos vías con Post hoc Bonferroni para el análisis de los ensayos del MWM y el peso de los ratones a lo largo del tratamiento (ver Anexo 1). Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa GraphPad Prisma versión 5.01. Todos los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar.

## **6. Resultados**

### **6.1 Acumulación del Beta Amiloide.**

Con la finalidad de evaluar el efecto de la administración subaguda de catecol sobre la acumulación de  $\beta A$  intracelular en ratones 3xTg-AD con patología amiloide avanzada, se empleó una dosis de 10 mg/kg, basados en que la dosis convulsiva media de este fármaco es de 40.7 mg/kg (Angel et al., 1977). Además, este fármaco suele generar pérdida de peso en animales, puede oxidar la hemoglobina y los tratamientos orales prolongados incrementan el riesgo de hiperplasias no cancerosas en esófago (Michałowicz et al., 2007). Debido a esto se decidió monitorear el peso de los animales durante los 16 días de tratamiento. El tratamiento no generó cambios en el peso de los ratones durante los 16 días evaluados acorde a una ANOVA de medidas repetidas de 2 vías (Anexo 1).

Los análisis estadísticos de la cuantificación de células positivas a  $\beta A$ , mediante la técnica de estereología, señalan que existe una disminución evidente de señal positiva en la corteza ( $t_8=4.543$ ,  $p= 0.0019$ ) (Figura 11), mas no en la amígdala ( $t_8=1.079$ ,  $p= 0.3220$ ) (Figura 12) ni en hipocampo posterior ( $t_8=1.119$ ,  $p=0.2956$ ) (Figura 13). Como se mencionó en la introducción, se eligieron estas estructuras debido a su relevancia en la EA, pues suelen ser áreas que se ven afectadas por la deposición del  $\beta A$  desde el inicio de la patología (Castellani et al., 2010; Mastrangelo et al., 2008), además de su importancia para el desempeño de las tareas de ORM, OLM (Balderas et al., 2008) y MWM (Naghdi et al., 2003).

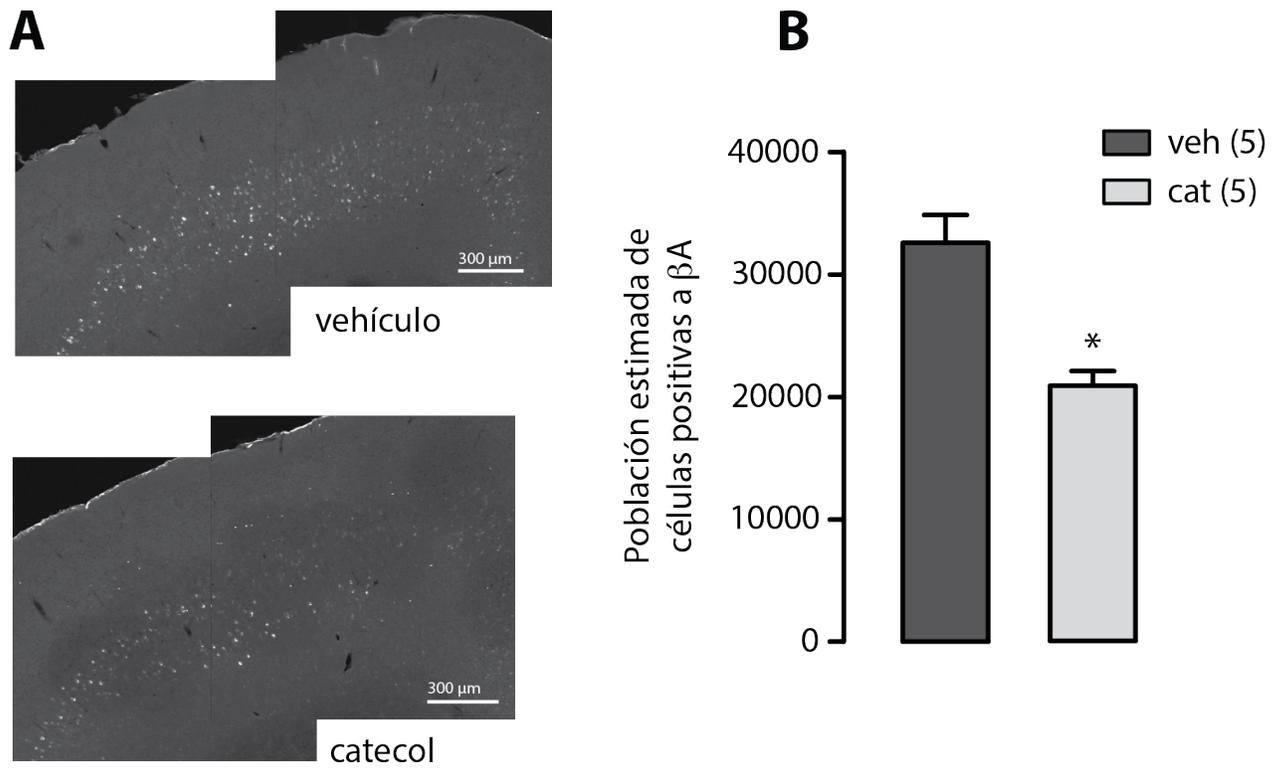


Fig 11. **Efecto de la administración de vehículo (veh) y catecol (cat) durante 16 días en la corteza. A)** Fotos representativas post tratamiento. **B)** En la gráfica se muestra el estimado poblacional de células positivas a βA en la corteza para los grupos veh (n=5) y cat (n=5). t de Student independiente ( $t_8=4.543$ ,  $p=0.0019$ ).

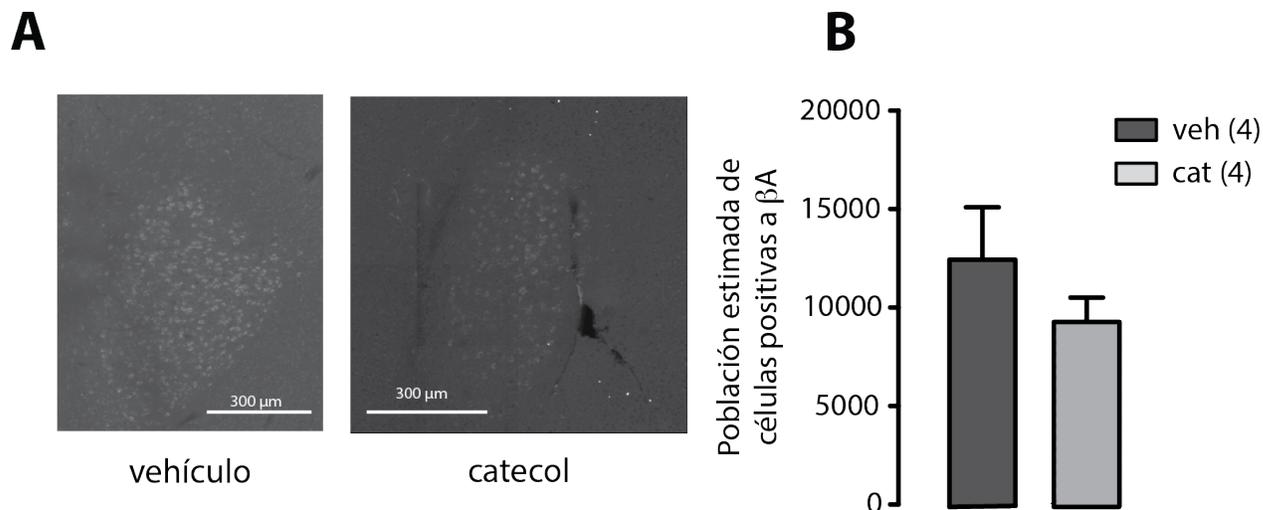


Fig 12. **Efecto de la administración de vehículo (veh) y catecol (cat) durante 16 días en la amígdala (AMI).** **A)** Fotos representativas post tratamiento. **B)** En la gráfica se muestra el estimado poblacional de células positivas a  $\beta A$  en la AMI para los grupos veh (n=4) y cat (n=4) t de Student independiente ( $t_6=1.079$ ,  $p= 0.3220$ ).

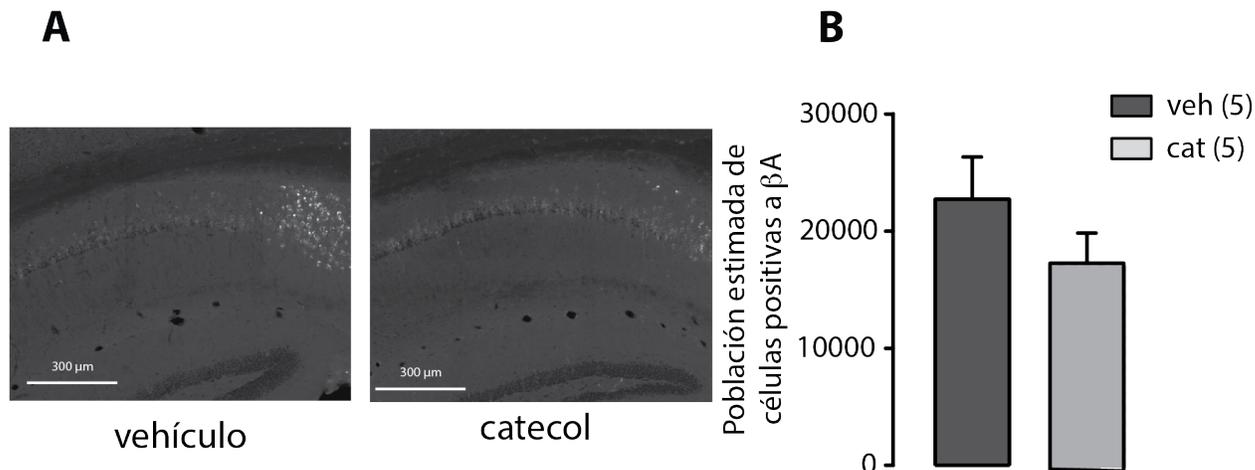


Fig 13. **Efecto de la administración de vehículo (veh) y catecol (cat) durante 16 días en hipocampo posterior.** **A)** Fotos representativas post tratamiento. **B)** En la gráfica se muestra el estimado poblacional de células positivas a  $\beta A$  en el hipocampo posterior para los grupos veh (n=5) y cat (n=5) t de Student independiente ( $t_8=1.119$ ,  $p= 0.2956$ ).

## 6.2 Pruebas de Reconocimiento de Objetos y Localización de Objetos

Los resultados obtenidos muestran que tras 4 días de administración i.p. de catecol (10mg/kg) los ratones 3xTg AD se desempeñan adecuadamente

durante la adquisición de la tarea de ORM, es decir, que exploran los objetos presentados por igual (Figura 14 A) acorde a una t de Student independiente ( $t_6=0.8328$ ;  $p= 0.4368$ ). Lo mismo sucede con el grupo de ratones a los que se les administró vehículo ( $t_8=0.9875$ ;  $p=0.3523$ ).

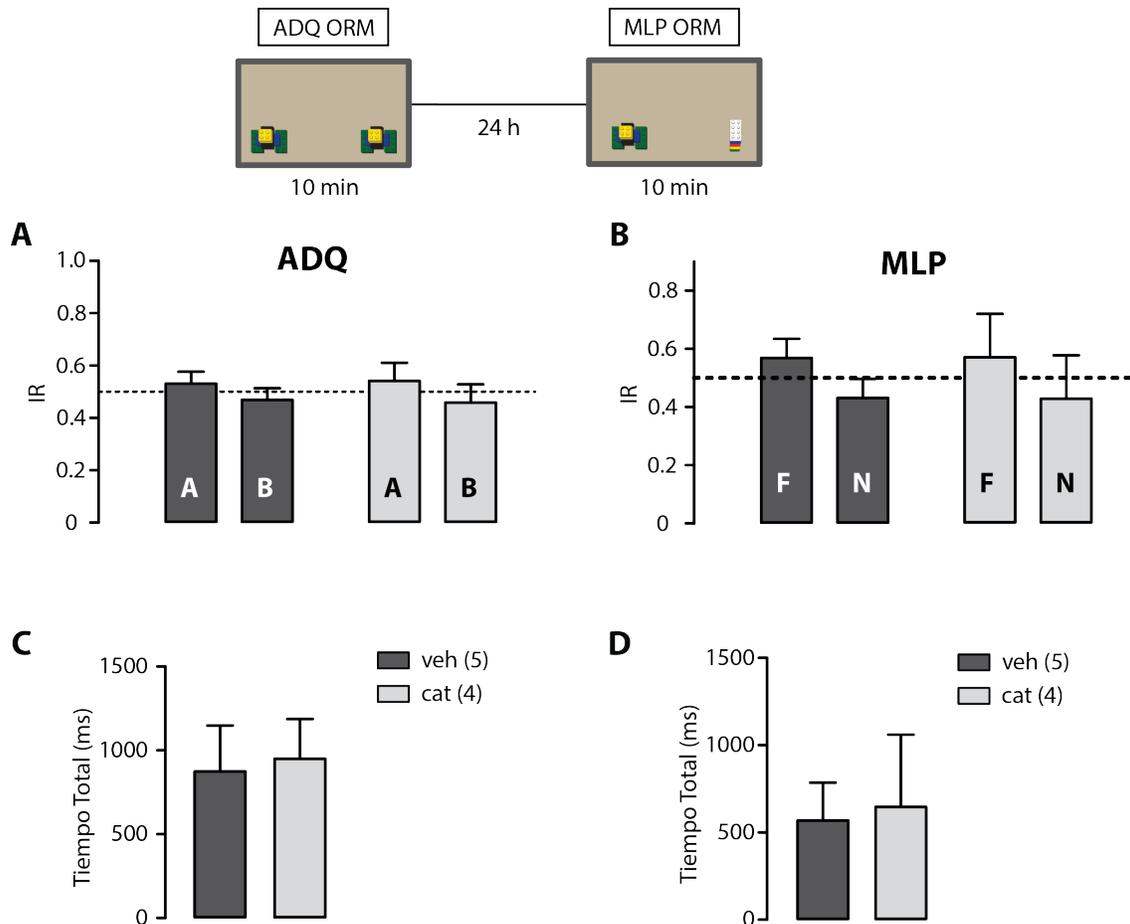


Fig 14. **Adquisición (ADQ) y Prueba de memoria a largo plazo (MLP) de ORM (Object Recognition Memory).** **A)** ADQ de ORM. Se muestra el índice de reconocimiento (IR) de los objetos A y B para el grupo vehículo (veh) ( $n=5$ ) y el grupo catecol (cat) ( $n=4$ ).  $t$  de Student grupo vehículo ( $t_8=0.9875$ ;  $p=0.3523$ );  $t$  de Student grupo catecol ( $t_6=0.8328$ ;  $p= 0.4368$ ). **B)** Prueba de MLP a las 24h de la ADQ. Se muestra el índice de reconocimiento (IR) de los objetos familiar (F) y novedoso (N) para el grupo veh ( $n=5$ ) y el grupo cat ( $n=4$ )  $t$  de Student grupo vehículo ( $t_8=1.475$ ;  $p= 0.1784$ );  $t$  de Student grupo catecol ( $t_6=0.6776$ ;  $p=0.5233$ ). **C)** Tiempo total de exploración en milisegundos de ambos grupos durante la ADQ ( $t_7=0.2000$ ;  $p=0.8472$ ). **D)** Tiempo total de exploración en milisegundos de ambos grupos durante la MLP ( $t_7=0.1773$ ;  $p=0.8643$ ).

En la prueba de memoria a largo plazo 24 h después, (en el quinto día de administración), ni los ratones administrados con catecol ( $t_6=0.6776$ ;  $p=0.5233$ ) ni los ratones administrados con vehículo ( $t_8=1.475$ ;  $p= 0.1784$ ), son capaces diferenciar el objeto familiar del novedoso acorde a una  $t$  de Student independiente. La Figura 14 B muestra las graficas de memoria a largo plazo de ORM para ambos grupos.

Durante la prueba de adquisición de la tarea de OLM, sexto día de administración, el grupo de ratones 3xTg AD administrados con catecol reconoce ambos objetos, edificio (E) y robot (R), como familiares acorde a una  $t$  de Student independiente ( $t_6=0.8328$ ,  $p= 0.4368$ ). Lo mismo ocurre con los ratones que fueron administrados con vehículo ( $t_8=0.9875$ ,  $p=0.3523$ ) (Figura 15 A). Sin embargo, en la prueba de memoria a largo plazo 24 h después (siendo el séptimo día de administración), únicamente los sujetos a los que se les administró catecol fueron capaces de identificar la localización novedosa como señala la prueba de  $t$  de Student independiente ( $t_6=7.817$ ,  $p=0.0002$ ); no fue así en el caso de los ratones administrados con vehículo ( $t_8= 1.587$ ,  $p= 0.1511$ ) (Figura 15 B). Cabe señalar que los objetos E y R son el mismo par de objetos empleados para cada sujeto durante la prueba de memoria a largo plazo de la tarea de ORM.

Los tiempos de exploración total de ambos grupos fueron estadísticamente similares durante la adquisición ( $t_7=0.2000$ ,  $p=0.8472$ ) (Figura 14 B) y memoria a largo plazo ( $t_7=0.1773$ ,  $p=0.8643$ ) de la tarea de ORM acorde a una prueba  $t$  de Student independiente (Figura 14 D). Lo mismo sucede para las pruebas de adquisición ( $t_7=0.6105$ ,  $p=0.5608$ ) (Figura 15 C) y memoria a largo plazo ( $t_7=0.3219$ ,  $p=0.7569$ ) de la tarea de OLM (Figura 15 D).

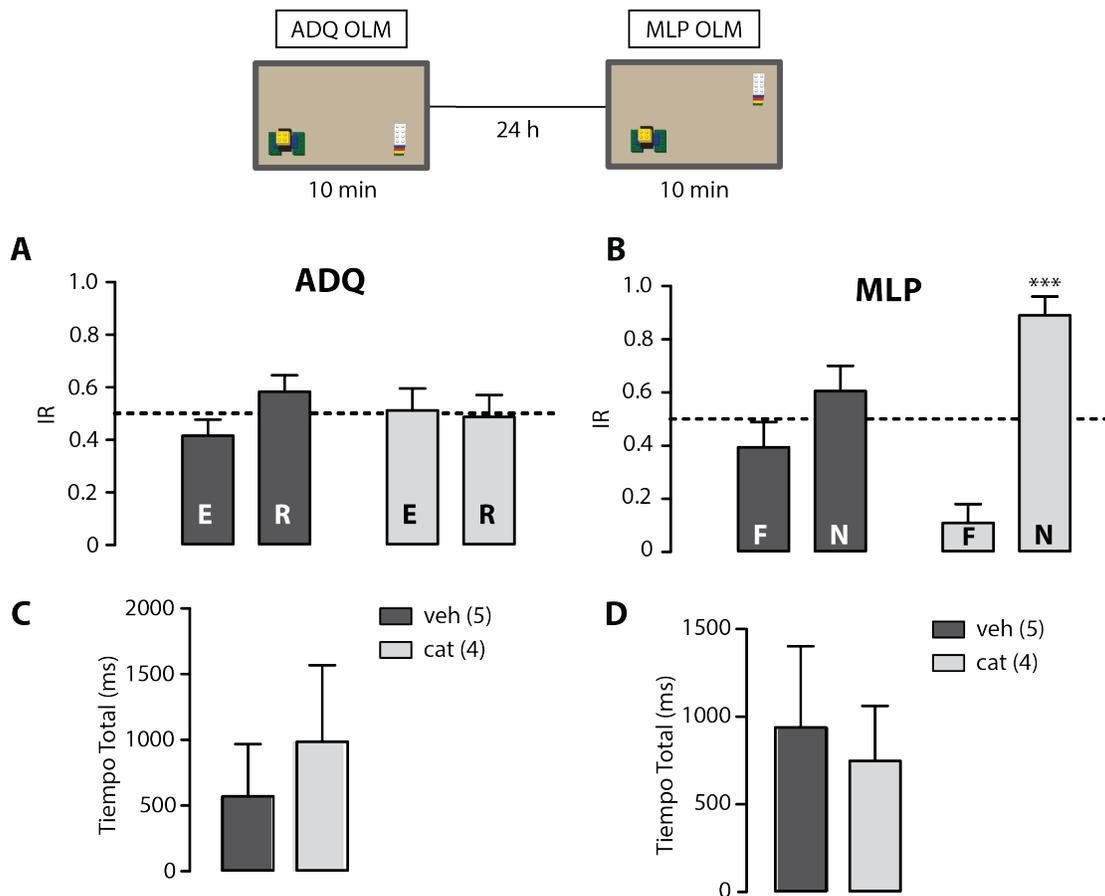


Fig 15. **Adquisición (ADQ) y Prueba de memoria a largo plazo (MLP) de OLM (Object Location Memory).** **A)** ADQ de OLM. Se muestra el índice de reconocimiento (IR) de los objetos E y R para el grupo vehículo (veh) (n=5) y el grupo catecol (cat) (n=4). t de Student grupo vehículo ( $t_8=1.928$ ;  $p=0.0901$ ); t de Student grupo catecol ( $t_6=0.2132$ ;  $p=0.8383$ ). **B)** Prueba de MLP a las 24h de la ADQ. Se muestra el índice de reconocimiento (IR) de los objetos con localización familiar (F) y localización novedosa (N) para el grupo veh (n=5) y el grupo cat (n=4). t de Student grupo vehículo ( $t_8=1.587$ ;  $p=0.1511$ ); t de Student grupo catecol ( $t_6=7.817$ ;  $p=0.0002$ ). **C)** Tiempo total de exploración en milisegundos de ambos grupos durante la ADQ ( $t_7=0.6105$ ;  $p=0.5608$ ). **D)** Tiempo total de exploración en milisegundos de ambos grupos durante la MLP ( $t_7=0.3219$ ;  $p=0.7569$ ).

### 6.3 Laberinto acuático de Morris.

Los ensayos del WMM abarcaron desde el octavo al onceavo día de administración. Se realizó un ANOVA de medidas repetidas de 2 vías, el cual mostró que existe una disminución en latencia al escape en los diferentes días de tratamiento ( $F_{3,27}=9.269$ ,  $p=0.0002$ ). Sin embargo, no se observaron

diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{1,27}=0.6915$ ,  $p=0.4272$ ). Posteriormente se realizó un ANOVA de una vía el cual señala que la latencia a la plataforma disminuyó entre el primer (E1) y cuarto día (E4) de entrenamiento en el grupo vehículo ( $F_{3,20}= 4.639$ ,  $p= 0.0128$ ), más no en el grupo catecol ( $F_{3,20}= 2.511$ ,  $p= 0.3390$ ) (Figura 16) .

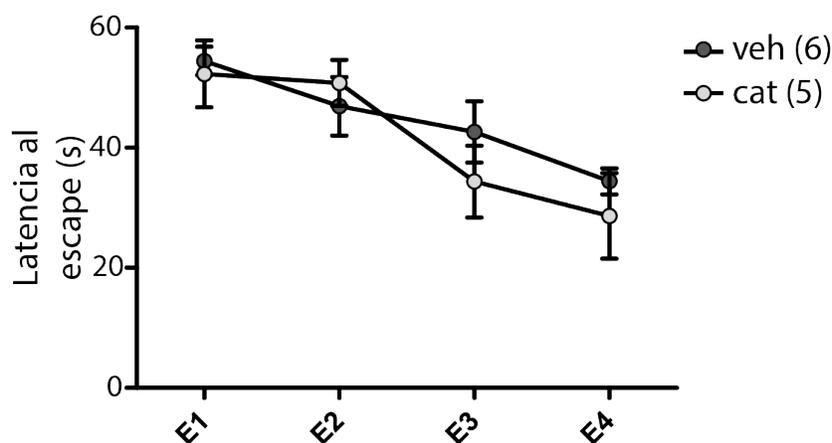


Fig 16. **Ensayos en el laberinto acuático de Morris (MWM)**. Se muestra el promedio de la latencia al escape en s de 4 ensayos por día del grupo vehículo (veh) ( $n=6$ ) y el grupo catecol (cat) ( $n=5$ ). ANOVA de medias repetidas de dos vías por tratamiento  $F_{1,27}= 0.6915$ ,  $P= 0.4272$ ; por tiempo  $F_{3,27}= 9.269$ ,  $P= 0.0002$ .

A los 5 días del último ensayo del WMM se realizó la prueba de memoria a largo plazo de dicha tarea conductual, que coincide con el último día de administración, y tiene una duración de 60 s. Las variables evaluadas fueron el número de cruces (Figura 17A), la latencia al primer cruce (Figura 17B), el tiempo de permanencia en el cuadrante de la plataforma (Figura 17C) y el tiempo en el cuadrante opuesto de la plataforma (Figura 17D). No se encontraron diferencias significativas en el número de cruces ( $t_9 =2.021$ ,  $p=0.0740$ ) de acuerdo con una prueba t de Student independiente. Lo mismo sucede para la latencia al primer cruce ( $t_9 =0.06031$ ,  $p=0.9532$ ), para el tiempo de permanencia en el cuadrante blanco ( $t_9 =0.9779$ ,  $p =0.3537$ ) y para el tiempo de permanencia en el cuadrante opuesto a la plataforma ( $t_9 =1.012$ ,  $p = 0.3380$ ).

En la Figura 18 se muestran las gráficas obtenidas mediante Image J (NIH) de la velocidad de nado y distancia recorrida durante la prueba de memoria a largo plazo del MWM. No se encontraron diferencias significativas acorde a pruebas de t de Student independientes (velocidad de nado  $t_9=1.575$ ,  $p= 0.1496$  y distancia  $t_9=1.187$ ,  $p= 0.2657$ ), lo que descarta problemas motores preexistentes o generados por la administración del fármaco.

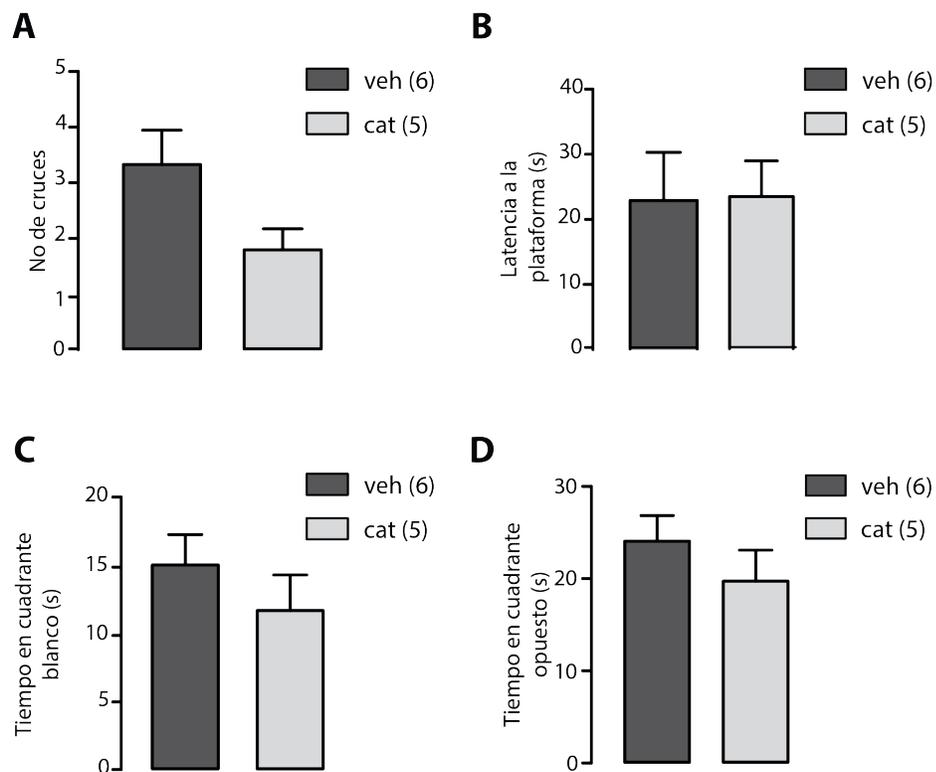


Fig 17. **Resultados de diferentes mediciones del análisis del laberinto acuático de Morris (MWM).** **A)** Número de cruces obtenidos durante la prueba de memoria a largo plazo (MLP) del MWM ( $t_9=2.021$ ;  $p= 0.0740$ ). **B)** La latencia al primer cruce durante la MLP del MWM ( $t_9=0.06031$ ;  $p= 0.9532$ ). **C)** Tiempo de permanencia en el cuadrante blanco durante la MLP del MWM ( $t_9=0.9779$ ;  $p= 0.3537$ ). **D)** Tiempo de permanencia en el cuadrante opuesto a la plataforma durante la MLP del MWM ( $t_9=1.012$ ;  $p= 0.3380$ ). Grupos vehículo (veh) (n=6) y catecol (cat) (n=5).

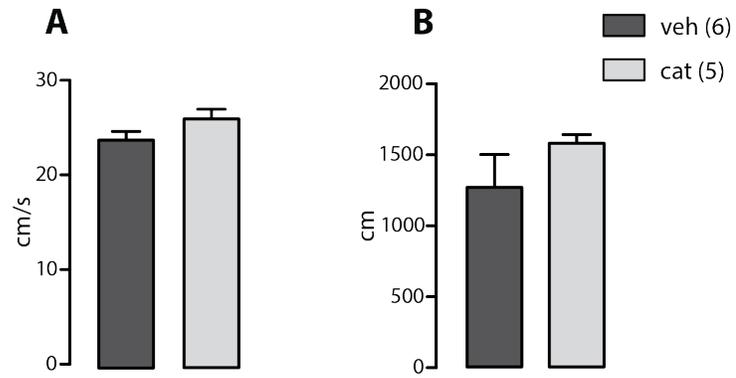


Fig 18. **Velocidad de nado y distancia recorrida durante la prueba de memoria del laberinto acuático de Morris (MWM).** veh (n=6) y cat (n=5). A) velocidad de nado en cm/s. t de Student ( $t_9=1.575$ ,  $p= 0.1496$ ). B) distancia recorrida en cm. t de Student ( $t_9=1.187$ ,  $p= 0.2657$ )

## 7. Discusión

### 7.1 Disminución de señal positiva a Beta Amiloide en cerebro de ratón 3xTg AD de 12 meses tras administración subaguda de catecol

Los resultados muestran que existe una disminución de la señal positiva al  $\beta$ A tras la administración vía i.p. de una dosis diaria por 16 días de catecol 10 mg/kg en la corteza de los sujetos, más no en hipocampo y amígdala (Figuras 11-13). Esto concuerda con experimentos *in vitro* de incubación de  $\beta$ A en condiciones fisiológicas que indican que el catecol, o moléculas con un grupo catecol, disminuyen la fibrilación del  $\beta$ A (Huong et al., 2010; Li et al., 2004; Ono et al., 2006; Sato et al., 2013).

Los datos obtenidos son relevantes debido a que refuerzan las evidencias de que es el grupo catecol, presente en las catecolaminas, el que interactúa con el péptido  $\beta$ A promoviendo su disgregación y a la vez impidiendo su agregación. Aunque no se observó un efecto en el hipocampo y en la amígdala, puede ser que la dosis o los días de administración no fueran suficientes para observar un decremento significativo en estas estructuras. Sin embargo, dosis mayores podrían ser peligrosas pues la dosis convulsiva evocada por ruidos fuertes es de 31.2 mg/kg (Angel et al., 1977) y las administraciones prolongadas pueden generar hiperplasias (Kogevinas, 2000).

Esta tesis no descarta que existan otros mecanismos mediante los cuales las catecolaminas disgregan el péptido  $\beta$ A, como ejemplo Himeno et al, 2011, proponen que la disminución de la acumulación del  $\beta$ A tras un tratamiento con un agonista dopaminérgico probablemente se deba a que estos fármacos promueven la actividad de los receptores dopaminérgicos. Esto a su vez, desencadena cascadas de eventos que derivan en el aumento de la actividad de enzimas degradadoras de  $\beta$ A. Por lo que, fármacos que promueven óptimos niveles de DA pueden resultar en tratamientos que no solo alivien los síntomas de la EA, sino también detengan su progreso.

Aunque los alcances de este trabajo no permiten identificar como es que el grupo catecol interactúa con el  $\beta$ A, este aspecto está siendo explorado por diferentes grupos de investigación a nivel mundial, por las implicaciones que dicha interacción puede tener en el desarrollo de fármacos contra la EA (Bu et al., 2015; Sato et al., 2013). Hasta ahora se propone que la interacción del grupo catecol con el  $\beta$ A sea a través de la formación de una o-quinona, producto de oxidación del catecol, con los residuos de lisina presentes en el péptido (Sato et al., 2013). Los residuos 16-28 presentes en la estructura del  $\beta$ A<sub>42</sub>, tienen un papel importante en la oligomerización de dicho péptido. De estos residuos el 16 y el 28 son lisinas, por lo que al formarse un aducto o-quinona- $\beta$ A se disminuiría el plegamiento del  $\beta$ A impidiendo así su agregación (Sato et al., 2013).

## **7.2. Efecto de la administración de catecol sobre memoria de reconocimiento de objetos**

Los sistemas catecolaminérgicos, que como se mencionó anteriormente presentan alteraciones notorias en la EA, participan durante el proceso de aprendizaje. Entre éstos, el sistema dopaminérgico es particularmente importante para la adquisición y almacenamiento de la información aprendida (Guzmán-Ramos et al., 2010; de Lima et al., 2011).

El protocolo empleado para la evaluación de ORM muestra que los ratones 3xTg AD tratados con catecol no son capaces de reconocer el objeto familiar del novedoso, comportándose así igual que los ratones administrados con vehículo. Esto concuerda con que este modelo transgénico tiene problemas en el desempeño de la tarea de ORM a partir de los 10 meses de edad, debido a que presentan una deficiencia en la liberación de DA, que disminuye al ser administrados con nomifensina (Guzmán-Ramos et al., 2012).

Aunque los ratones 3xTg AD tratados con catecol pudieron haber presentado una disminución en la cantidad del  $\beta$ A en la corteza cerebral a los 4 días de iniciado el tratamiento, al tener un déficit en la liberación de DA durante

la fase de adquisición de la tarea de ORM, no fueron capaces de desempeñarse adecuadamente. Existen reportes que indican que el catecol no tiene efecto sobre la concentración cerebral de DA y NE (Angel et al., 1977). El tratamiento de ratones transgénicos para la EA con fármacos que restablecen los niveles de DA, como la nomifensina (Guzmán-Ramos et al., 2012) o L-DOPA (Ambrée et al., 2009; Moreno-Castilla et al., 2014) atenúa los déficits cognitivos presentes en estos animales.

Por otra parte, la prueba de memoria a largo plazo de la tarea de OLM señala que los ratones tratados con catecol son capaces de detectar el cambio en posición de un objeto dentro de un contexto, mientras que los sujetos administrados con vehículos no. Aunque encontramos que el hipocampo no muestra una disminución significativa del péptido  $\beta A$ , las regiones corticales cuantificadas para este trabajo sí. Por lo que el buen desempeño de los sujetos en esta conducta puede deberse a que regiones cerebrales como la corteza cingulada (CC) parecen estar implicadas en esta tarea, puesto que cuando se lesiona la CC y otras regiones de la corteza prefrontal se reporta un mal desempeño en la tarea de OLM, no así en la de ORM (Ennaceur, et al., 1997; Zhou et al., 2015).

Sin embargo la participación de la corteza prefrontal en la tarea de OLM se mantiene en controversia debido a reportes que indican que esta región no está implicada en el procesamiento del componente contextual de la memoria de reconocimiento como tal, sino en la asociación del objeto con el contexto y el lugar que ocupa dentro de éste. Lesiones a la corteza prefrontal medial han resultado en un mal desempeño en tareas como la memoria de objetos en lugares, en la cual el componente de familiaridad y el componente contextual juegan un papel importante; más no en la tarea de OLM que solo evalúa el componente contextual (Barker et al., 2007). Aunque cabe señalar, que protocolos conductuales que integran diferentes componentes de la memoria de

reconocimiento indican que esta corteza es importante para la identificación del componente contextual (DeVito et al., 2010).

Aunque el desempeño en tareas de memoria espacial típicamente se ha adjudicado al hipocampo, este tipo de memorias también dependen de la integridad de los circuitos como el que va del hipocampo al tálamo anterior o el que va del cíngulo a la corteza entorinal. Cuando estos circuitos son lesionados se observa un desempeño pobre en tareas de carácter espacial (Ennaceur et al., 1997; Neave et al., 1996).

A estas evidencias se suman las alteraciones sinápticas presentes en la EA y en modelos transgénicos como los ratones 3xTg AD (Chakroborty et al., 2012; Chapman et al., 1999; Peng et al., 2012; Selkoe, 2002). Dichas alteraciones suelen estar enmascaradas por mecanismos compensatorios que tratan de restablecer la homeostasis, pero que a largo plazo terminan por comprometer la función neuronal. Uno de estos reportes señala que este modelo presenta desregulaciones en la homeóstasis del metabolismo del calcio, la cual en un estado prepatológico (antes de la acumulación del  $\beta$ A en placas o tau hiperfosforilada en marañas neurofibrilares) es compensada con éxito (Chakroborty et al., 2012). Sin embargo, como se mencionó en la introducción, también existe evidencia de que los oligómeros del  $\beta$ A afectan la transmisión y plasticidad sináptica de manera importante (Selkoe, 2002; Shankar et al., 2007). Por lo que es posible que los ratones 3xTg AD de 12 meses, presenten alteraciones sinápticas que se ven agravadas por la acumulación de  $\beta$ A. Así el tratamiento con catecol, al disminuir el  $\beta$ A en la corteza, puede haber mejorado la comunicación sináptica permitiendo que los animales identificaran al objeto en una localización novedosa. Esto apoyado en datos que reportan una mejora cognitiva tras un tratamiento con el fármaco bexaroteno, que al incrementar la expresión de apoE, facilita la correcta degradación de placas del  $\beta$ A y probablemente promueve una mejora en la comunicación sináptica en el modelo transgénico APPswe/PS1 (Cramer et al., 2012).

### **7.3. Efecto de la administración de catecol sobre la tarea de Laberinto acuático de Morris**

Existen numerosas evidencias que señalan que la integridad del hipocampo es necesaria para el correcto desempeño de las tareas de memoria espacial, como lo es el MWM. Aunque no es la única estructura implicada en la resolución de la tarea, parece tener un papel extremadamente relevante dado que las lesiones en esta estructura cerebral impiden a diferentes grupos de animales un buen desempeño en ésta tarea (von Bohlen und Halbach et al., 2006; Cho et al., 1998; Morris et al., 1982).

En el caso del modelo transgénico empleado en este trabajo, se sabe que el desarrollo de esta tarea se encuentra alterada desde los 4 meses de edad en ratones homocigotos, presentándose como un déficit de retención de la información aprendida, más que una inhabilidad para aprender. Estos déficits de retención de la información aprendida coinciden con la acumulación del  $\beta$ A intracelular (Billings et al., 2005).

Durante los 4 días de entrenamiento de la tarea de MWM los ratones en ambos grupos se comportaron de la misma manera, tendiendo a encontrar cada vez más rápido la plataforma oculta en uno de los cuadrantes como se muestra la Figura 16. Tras cuatro días de descanso, se llevó a cabo la prueba de memoria a largo plazo, en la cual no se observan diferencias significativas entre grupos. Estos resultados concuerdan con el hecho de que tanto los ratones tratados con catecol como los tratados vehículo, presentan una deposición importante del  $\beta$ A intracelular después de 16 días de tratamiento en el hipocampo (Figura 12).

Aunque existe evidencia de que la CC anterior participa en el desempeño de la tarea de MWM, y en este trabajo encontramos una disminución del  $\beta$ A en la corteza cerebral en los ratones tratados con catecol, la participación de la CC anterior en el desempeño de esta tarea parece restringirse únicamente a la

evaluación de esta de manera remota. Es decir, que la CC anterior participa en memorias de carácter espacial que se formaron en un pasado distante y que se encuentran asociadas a circuitos entre esta estructura y el hipocampo (Wartman et al., 2013). Con el tiempo estas memorias se vuelven menos dependientes del hipocampo y más dependientes de la CC (Squire et al., 2007). Como ejemplo de esto, se ha visto que la inactivación de la CC anterior en ratas con un agonista de los receptores GABA<sub>A</sub> impide a estos animales recordar la ubicación de la plataforma durante una prueba de memoria a largo plazo realizada 37 días después de terminado el entrenamiento, más no así cuando la prueba es realizada 8 días después del término de dicho entrenamiento (Wartman et al., 2014). Además el mismo grupo de investigación reporta que existe un incremento significativo en la expresión de c-Fos, un marcador de actividad neuronal, en la CC anterior cuando la evaluación de memoria a largo plazo del MWM se realiza de manera remota, mas no cuando se realiza de manera reciente (Wartman et al., 2013).

Así bien, el desempeño en esta tarea de los ratones 3xTg AD administrados con catecol y vehículo, parece estar acorde con la literatura, ya que aunque se encontró una disminución en la acumulación del  $\beta$ A en la CC, el hipocampo no presenta disminución significativa del péptido, por lo cual probablemente no hubo una la retención adecuada de la información aprendida durante los días de entrenamiento del MWM.

## **8. Conclusiones**

Los experimentos realizados en esta tesis, permiten concluir que el grupo catecol es capaz de disminuir la acumulación del  $\beta$ A intracelular en la corteza cerebral de un modelo transgénico para la EA que presenta patología avanzada, lo que se relaciona con una mejora en el desempeño cognitivo de los ratones tratados con catecol en la tarea de OLM.

## **9. Perspectivas**

Con base en los datos obtenidos durante la realización de esta tesis, sería interesante evaluar la acumulación de  $\beta$ A en las cortezas perirral e insular después del tratamiento con catecol, esto debido a la importancia que tienen estas estructuras en la tarea de ORM (Balderas et al., 2008; Guzmán-Ramos et al., 2012). También sería interesante evaluar la memoria a largo plazo de la tarea de MWM a las 24 h y de manera remota, para tener un protocolo semejante al de otros autores que han trabajado con el 3xTg AD (Billings et al., 2005).

Este trabajo contribuye a la búsqueda de nuevos y mejores tratamientos para la EA, pues aunque el catecol es un compuesto considerado tóxico y que puede generar convulsiones en dosis medias (Angel et al., 1977; Kogevinas, 2000), los resultados aquí expuestos apuntan a que el diseño de moléculas que tengan como base la estructura del catecol y sean no presenten toxicidad pueden resultar en buenos tratamientos contra la EA.

Los tratamientos que permiten mantener una función normal de las catecolaminas en el cerebro, pueden ayudar que la patología de la EA se vea mermada. Además de restablecer funciones cognitivas y de memoria, como lo demuestran los tratamientos con apomorfina, L-DOPA (Himeno et al., 2011; Moreno-Castilla et al., 2014) y este trabajo. La disminución en la acumulación del  $\beta$ A y el mejoramiento conductual generado por la restauración de la función

de los sistemas catecolaminérgicos representan una opción interesante a explorar para generar nuevos tratamientos para la EA.

## 10. Referencias

- Ambrée, O., Richter, H., Sachser, N., Lewejohann, L., Dere, E., de Souza Silva, M. A., Herring, A., et al. (2009). Levodopa ameliorates learning and memory deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *30*, 1192–1204.
- Angel, A., Clarke, K. A., & Dewhurst, D. G. (1977). A Pharmacological Study of the Spontaneous Convulsive Activity Induced By 1,2-Dihydroxybenzene (Catechol) in the Anaesthetized Mouse. *British Journal of Pharmacology*, *61*(3), 433–439. Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.1977.tb08437.x>
- Armstrong, R. A. (2014). A critical analysis of the “amyloid cascade hypothesis.” *Folia Neuropathologica*, *3*(3), 211–225. Retrieved November 15, 2014, from <http://www.termedia.pl/doi/10.5114/fn.2014.45562>
- Atlas, A. M. B. (2009). Allen Brain Atlas. *Allen Mouse Brain Atlas*. Retrieved from <http://mouse.brain-map.org>
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *15*(9), 618–24. Retrieved January 27, 2015, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2632790&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Barker, G. R. I., Bird, F., Alexander, V., & Warburton, E. C. (2007). Recognition Memory for Objects, Place, and Temporal Order: A Disconnection Analysis of the Role of the Medial Prefrontal Cortex and Perirhinal Cortex. *Journal of Neuroscience*, *27*(11), 2948–2957. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5289-06.2007>
- Bekris, L. M., Yu, C.-E., Bird, T. D., & Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, *23*(4), 213–27. Retrieved November 22, 2014, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3044597&tool=pm>

centrez&rendertype=abstract

Benseny-Cases, N., Cócera, M., & Cladera, J. (2007). Conversion of non-fibrillar beta-sheet oligomers into amyloid fibrils in Alzheimer's disease amyloid peptide aggregation. *Biochemical and biophysical research communications*, 361(4), 916–21. Retrieved December 3, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17679138>

Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2005). Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, 45(5), 675–88. Retrieved October 23, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15748844>

Bioscience, M. (n.d.). The Optical Fractionator. 2015. Retrieved December 15, 2015, from <http://www.stereology.info/the-optical-fractionator/>

von Bohlen und Halbach, O., Zacher, C., Gass, P., & Unsicker, K. (2006). Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice. *Journal of neuroscience research*, 83(4), 525–31. Retrieved February 2, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16447268>

Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40), 14515–20. Retrieved December 8, 2015, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=521976&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>

Bromley-Brits, K., Deng, Y., & Song, W. (2011). Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (53). Retrieved February 9, 2016, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3347885&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>

Bu, X.-L., Rao, P. P. N., & Wang, Y.-J. (2015). Anti-amyloid Aggregation Activity of Natural Compounds: Implications for Alzheimer's Drug Discovery. *Molecular neurobiology*. Retrieved January 6, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26099310>

- Castellani, R. J., Rolston, R. K., & Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease. *Disease-a-month : DM*, 56(9), 484–546. Retrieved January 1, 2015, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2941917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Castillo, G. M., Lukito, W., Wight, T. N., & Snow, A. D. (1999). The sulfate moieties of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of beta amyloid protein fibril formation. *Journal of Neurochemistry*, 72(4), 1681–1687.
- Chakroborty, S., Kim, J., Schneider, C., Jacobson, C., Molgo, J., & Stutzmann, G. E. (2012). Early Presynaptic and Postsynaptic Calcium Signaling Abnormalities Mask Underlying Synaptic Depression in Presymptomatic Alzheimer's Disease Mice. *Journal of Neuroscience*, 32(24), 8341–8353. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0936-12.2012>
- Chapman, P. F., White, G. L., Jones, M. W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V. J., Irizarry, M., Younkin, L., et al. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature neuroscience*, 2(3), 271–6. Retrieved February 9, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195221>
- Cho, Y. H., Friedman, E., & Silva, A. J. (1998). Ibotenate lesions of the hippocampus impair spatial learning but not contextual fear conditioning in mice. *Behavioural Brain Research*, 98(1), 77–87.
- Cortés, R., Probst, A., & Palacios, J. (1988). Decreased densities of dopamine D1 receptors in the putamen and hippocampus in senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Research*, 475(1), 164–167. Retrieved February 17, 2015, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899388902120>
- Cramer, P. E., Cirrito, J. R., Wesson, D. W., Lee, C. Y. D., Karlo, J. C., Zinn, A. E., Casali, B. T., et al. (2012). ApoE-directed therapeutics rapidly clear  $\beta$ -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6075), 1503–6. American Association for the Advancement of

Science. Retrieved May 1, 2016, from <http://science.sciencemag.org/content/early/2012/02/08/science.1217697.abstract>

- D'Hooge, R., & De Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain research. Brain research reviews*, 36(1), 60–90. Retrieved January 8, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11516773>
- Daubner, S. C., Le, T., & Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 508(1), 1–12. Retrieved January 7, 2015, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3065393&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Davies, P., & Maloney, A. J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, 2(8000), 1403. Retrieved January 11, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/63862>
- De-paula, V. J., Radanovic, M., & Diniz, B. S. (2012). Alzheimer's Disease. In J. R. Harris (Ed.), *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease*, Subcellular Biochemistry (Vol. 65, pp. 329–352). Dordrecht: Springer Netherlands. Retrieved October 13, 2014, from <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-5416-4>
- DeVito, L. M., & Eichenbaum, H. (2010). Distinct contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to the “what-where-when” components of episodic-like memory in mice. *Behavioural brain research*, 215(2), 318–25. Retrieved January 8, 2016, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2891645&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Díaz-Nido, J., Wandosell, F., & Avila, J. (2002). Glycosaminoglycans and  $\beta$ -amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases. *Peptides*, 23(7), 1323–1332.
- Dickson, T., & King, C. (1999). Neurochemical diversity of dystrophic neurites in the early and late stages of Alzheimer's disease. *Experimental neurology*,

- 110(1), 100–110. Retrieved December 2, 2014, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488698970108>
- Diez, M., Danner, S., Frey, P., Sommer, B., Staufenbiel, M., Wiederhold, K.-H., & Hökfelt, T. (2003). Neuropeptide alterations in the hippocampal formation and cortex of transgenic mice overexpressing  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) with the Swedish double mutation (APP23). *Neurobiology of Disease*, 14(3), 579–594. Retrieved February 18, 2015, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096999610300158X>
- Ennaceur, A., Neave, N., & Aggleton, J. P. (1997). Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Experimental brain research*, 113(3), 509–19. Retrieved January 7, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108217>
- Fargo, K. (2014). Alzheimer's Association Report: 2014 Alzheimers disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, 10(2), e47–e92. Elsevier. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2014.02.001>
- Galimberti, D., Ghezzi, L., & Scarpini, E. (2013). Immunotherapy against amyloid pathology in Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences*, 333(1-2), 50–4. Retrieved January 27, 2015, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022510X12006375>
- Gibb, W. R., Mountjoy, C. Q., Mann, D. M., & Lees, A. J. (1989). The substantia nigra and ventral tegmental area in Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 52(2), 193–200. Retrieved January 28, 2015, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1032505&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Guzmán-Ramos, K., Moreno-Castilla, P., Castro-Cruz, M., McGaugh, J. L., Martínez-Coria, H., LaFerla, F. M., & Bermúdez-Rattoni, F. (2012). Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*,

- 19(10), 453–60. Retrieved October 17, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22984283>
- 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), 226–36. Retrieved January 13, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20412388>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5054), 184–5. Retrieved January 17, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1566067>
- Himeno, E., Ohyagi, Y., Ma, L., Nakamura, N., Miyoshi, K., Sakae, N., Motomura, K., et al. (2011). Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid-beta degradation. *Annals of Neurology*, 69(2), 248–256. Retrieved December 2, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21387370>
- Holmes, C., Smith, H., Ganderton, R., Arranz, M., Collier, D., Powell, J., & Lovestone, S. (2001). Psychosis and aggression in Alzheimer's disease: the effect of dopamine receptor gene variation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 71(6), 777–9. Retrieved May 5, 2016, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1737623&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Holtzman, D. M., Morris, J. C., & Goate, A. M. (2011). STATE OF THE ART REVIEW Alzheimer's Disease : The Challenge of the Second Century. *Science Translational Medicine*, 3(77).
- Huong, V. T., Shimanouchi, T., Shimauchi, N., Yagi, H., Umakoshi, H., Goto, Y., & Kuboi, R. (2010). Catechol derivatives inhibit the fibril formation of amyloid-beta peptides. *Journal of bioscience and bioengineering*, 109(6), 629–34. The Society for Biotechnology, Japan. Retrieved November 24, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20471605>
- Inbar, P., Bautista, M. R., Takayama, S. a., & Yang, J. (2008). Assay to screen for molecules that associate with Alzheimer's related ??-amyloid fibrils. *Analytical Chemistry*, 80(9), 3502–3506.

- Iversen, L. L., Rossor, M. N., Reynolds, G. P., Hills, R., Roth, M., Mountjoy, C. Q., Foote, S. L., et al. (1983). Loss of pigmented dopamine-beta-hydroxylase positive cells from locus coeruleus in senile dementia of Alzheimer's type. *Neuroscience letters*, 39(1), 95–100. Retrieved May 4, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6633940>
- Kalaria, R. N., & Andorn, A. C. (1991). Adrenergic receptors in aging and Alzheimer's disease: decreased alpha 2-receptors demonstrated by [3H]p-aminoclonidine binding in prefrontal cortex. *Neurobiology of aging*, 12(2), 131–6. Retrieved May 4, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1646966>
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., et al. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106), 733–6. Retrieved January 24, 2015, from <http://dx.doi.org/10.1038/325733a0>
- Kempainen, N., Laine, M., Laakso, M. P., Kaasinen, V., Någren, K., Vahlberg, T., Kurki, T., et al. (2003). Hippocampal dopamine D2 receptors correlate with memory functions in Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, 18(April), 149–154.
- Kim, J., Basak, J., & Holtzman, D. (2009). The role of lipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63(3), 287–303. Retrieved December 3, 2014, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627309005492>
- Klingner, M., Apelt, J., Kumar, A., Sorger, D., Sabri, O., Steinbach, J., Scheunemann, M., et al. (2003). Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with  $\beta$ -amyloid plaque pathology. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 21(7), 357–369. Retrieved February 17, 2015, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0736574803001072>
- Koch, G., Di Lorenzo, F., Bonni, S., Giacobbe, V., Bozzali, M., Caltagirone, C., & Martorana, A. (2014). Dopaminergic Modulation of Cortical Plasticity in Alzheimer's Disease Patients. *Neuropsychopharmacology : official*

- publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 2654–2661. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24859851>
- Kogevinas, M. (2000). Studies of cancer in humans. *Food Additives & Contaminants*, 7(1977). Retrieved December 2, 2014, from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/026520300283388>
- Laatikainen, L., Sharp, T., Bannerman, D., Harrison, P., & Tunbridge, E. (2012). Modulation of hippocampal dopamine metabolism and hippocampal-dependent cognitive function by catechol-O-methyltransferase inhibition. *Journal of Psychopharmacology*, 26(12), 1561–1568. Retrieved January 11, 2016, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3546629&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Li, J., Zhu, M., Manning-Bog, A., Monte, D. Di, & Fink, A. (2004). Dopamine and L-dopa disaggregate amyloid fibrils: implications for Parkinson's and Alzheimer's disease. *The FASEB journal*, 22, 1–22. Retrieved December 2, 2014, from <http://www.fasebj.org/content/18/9/962.short>
- de Lima, M. N. M., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Siciliani Scalco, F., Roesler, R., Garcia, V. A., & Schröder, N. (2011). Modulatory influence of dopamine receptors on consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(3), 305–310.
- Liu, Y., Yoo, M.-J., Savonenko, A., Stirling, W., Price, D. L., Borchelt, D. R., Mamounas, L., et al. (2008). Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(51), 13805–13814.
- Mann, D. M., Yates, P. O., & Hawkes, J. (1982). The noradrenergic system in Alzheimer and multi-infarct dementias. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 45(2), 113–9. Retrieved May 4, 2016, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1083037&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Martorana, A., Mori, F., Esposito, Z., Kusayanagi, H., Monteleone, F., Codecà,

- C., Sancesario, G., et al. (2009). Dopamine modulates cholinergic cortical excitability in Alzheimer's disease patients. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 34, 2323–2328.
- Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L. a., McKeel, D. W., & Morris, J. C. (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*, 56(1), 127–129. Retrieved from <http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.56.1.127>
- 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, 81.
- Mattson, M. P., Cheng, B., Culwell, A. R., Esch, F. S., Lieberburg, I., & Rydel, R. E. (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron*, 10(2), 243–54. Retrieved January 8, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8094963>
- Michałowicz, J., & Duda, W. (2007). Phenols—sources and toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(3). Retrieved December 2, 2014, from <http://www.pjoes.com/pdf/16.3/347-362.pdf>
- Moreno-Castilla, P., López-Gutiérrez, M. F., Landa-Navarro, L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2014). *Levodopa treatment in Alzheimer mice restores dopaminergic neurotransmission and memory function*. presented in Society for Neuroscience 44th Annual Meeting 2014 Washington DC, EUA.
- Moreno-Castilla, P., Rodríguez-Duran, L. F., Guzmán-Ramos, K., Bárcenas-Femat, A., Escobar, M. L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2016). Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by  $\beta$ -amyloid transforms cortical LTP into LTD and produces memory impairment. *Neurobiology of aging*.
- Moreno-Castilla, P., & Tovar y Romo, L. B. (2012). Enfermedad de Alzheimer. In E. López Muñoz & N. Torres Carrillo (Eds.), *Aspectos Moleculares del Envejecimiento* (1era Edici., pp. 125–138). México: Instituto de Geriatria.
- Morris, R. (2008). Morris water maze. *Scholarpedia*, 3(8), 6315. Retrieved May

- 10, 2016, from [http://www.scholarpedia.org/article/Morris\\_water\\_maze](http://www.scholarpedia.org/article/Morris_water_maze)
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*.
- Mucke, L., & Selkoe, D. J. (2012). Neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(7), a006338. Retrieved October 30, 2014, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3385944&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Murayama, O., Tomita, T., Nihonmatsu, N., Murayama, M., Sun, X., Honda, T., Iwatsubo, T., et al. (1999). Enhancement of amyloid beta 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 265(1), 61–3. Retrieved May 8, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10327206>
- Murphy, M. P., & LeVine III, H. (2010). Alzheimer's Disease and the Beta amyloid Peptide. *J Alzheimers Dis*, 19(1), 1–17.
- Naghdi, N., Majlessi, N., & Bozorgmehr, T. (2003). The effects of anisomycin (a protein synthesis inhibitor) on spatial learning and memory in CA1 region of rats hippocampus. *Behavioural brain research*, 139(1-2), 69–73. Retrieved December 19, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12642177>
- Neave, N., Nagle, S., Sahgal, A., & Aggleton, J. P. (1996). The effects of discrete cingulum bundle lesions in the rat on the acquisition and performance of two tests of spatial working memory. *Behavioural brain research*, 80(1-2), 75–85. Retrieved February 3, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8905131>
- Nieoullon, A. (2002). Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Progress in neurobiology*, 67(1), 53–83. Retrieved March 15, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12126656>
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P., & LaFerla, F. M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(8), 1063–1070.
- Oddo, S., Caccamo, A., & Shepherd, J. (2003). Triple-transgenic model of

- Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39, 409–421. Retrieved December 2, 2014, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627303004343>
- Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., & Yamada, M. (2006). Anti-Parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Neurochemistry international*, 48(4), 275–85. Retrieved January 27, 2015, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019701860500255X>
- Ono, K., Takasaki, J.-I., Takahashi, R., Ikeda, T., & Yamada, M. (2013). Effects of antiparkinsonian agents on  $\beta$ -amyloid and  $\alpha$ -synuclein oligomer formation in vitro. *Journal of neuroscience research*, 91(10), 1371–81. Retrieved November 24, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23913715>
- Pascual, J., Grijalba, B., García-Sevilla, J. A., Zarranz, J. J., & Pazos, A. (1992). Loss of high-affinity alpha 2-adrenoceptors in Alzheimer's disease: an autoradiographic study in frontal cortex and hippocampus. *Neuroscience letters*, 142(1), 36–40. Retrieved May 4, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1357610>
- Peng, J., Liang, G., Inan, S., Wu, Z., Joseph, D. J., Meng, Q., Peng, Y., et al. (2012). Dantrolene ameliorates cognitive decline and neuropathology in Alzheimer triple transgenic mice. *Neuroscience letters*, 516(2), 274–9. Retrieved January 29, 2016, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3351794&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Perez, R. G., Zheng, H., Van der Ploeg, L. H., & Koo, E. H. (1997). The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(24), 9407–14. Retrieved January 25, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390996>
- Perry, E. K., Gibson, P. H., Blessed, G., Perry, R. H., & Tomlinson, B. E. (1977). Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy

- brain tissue. *Journal of the neurological sciences*, 34(2), 247–65. Retrieved January 27, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/144789>
- Preda, S., Govoni, S., Lanni, C., Racchi, M., Mura, E., Grilli, M., & Marchi, M. (2008). Acute beta-amyloid administration disrupts the cholinergic control of dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(5), 1062–70. American College of Neuropsychopharmacology. Retrieved February 18, 2015, from <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1301485>
- Purves, D., Augustine, G. I., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & White, L. E. (2008). *Neuroscience* (4th ed.). Sunderland: Sinauer Associates.
- Qiu, W. Q., Ferreira, A., Miller, C., Koo, E. H., & Selkoe, D. J. (1995). Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(3 Pt 2), 2157–67. Retrieved January 25, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7891158>
- Reinke, A., & Gestwicki, J. (2011). Insight into Amyloid Structure Using Chemical Probes. *Chemical biology & drug design*, 77(6), 399–411. Retrieved December 3, 2014, from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1747-0285.2011.01110.x/full>
- Ridge, P., Ebbert, M., & Kauwe, J. (2013). Genetics of Alzheimer disease. *Biomed Research International*, 2013, 13. Retrieved December 3, 2014, from <http://jgp.sagepub.com/content/23/4/213.short>
- 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), 588–90, 592. Retrieved December 19, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9793639>
- Sato, M., Murakami, K., Uno, M., Nakagawa, Y., Katayama, S., Akagi, K., Masuda, Y., et al. (2013). Site-specific inhibitory mechanism for amyloid  $\beta$ 42 aggregation by catechol-type flavonoids targeting the Lys residues. *The*

- Journal of biological chemistry*, 288(32), 23212–24. Retrieved January 6, 2016, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3743493&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schubert, D., Jin, L. W., Saitoh, T., & Cole, G. (1989). The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron*, 3(6), 689–94. Retrieved January 25, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2518372>
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews*, 81(2), 741–766. Retrieved December 3, 2014, from <http://physrev.physiology.org/content/81/2/741.short>
- Selkoe, D. J. (2001). Clearing the Brain's Amyloid Cobwebs. *Neuron*, 32(2), 177–180. Retrieved January 27, 2015, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627301004755>
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5594), 789–91. Retrieved July 15, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399581>
- Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., & Sabatini, B. L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(11), 2866–2875.
- Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K., & Uhler, M. D. (2012). *Basic Neurochemistry: PRINCIPLES OF MOLECULAR, CELLULAR AND MEDICAL NEUROBIOLOGY* (8th ed.). China: Elsevier. Retrieved February 6, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20385/>
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Kamphorst, W., Heutink, P., & van Swieten, J. C. (1998). Tau pathology in two Dutch families with mutations in the microtubule-binding region of tau. *The American journal of pathology*, 153(5), 1359–63. Retrieved May 8, 2016, from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1853390&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Squire, L. R., & Bayley, P. J. (2007). The neuroscience of remote memory. *Current opinion in neurobiology*, 17(2), 185–96. Retrieved May 11, 2016, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2277361&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Squire, L. R., Bloom, F. E., Spitzer, N. C., Du Lac, S., Glosch, A., & Berg, D. (2008). *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, Elsevier. Academic Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22092534>

van Stegeren, A. H. (2008). The role of the noradrenergic system in emotional memory. *Acta psychologica*, 127(3), 532–41. Retrieved February 16, 2015, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001691807001278>

Storga, D., Vrecko, K., Birkmayer, J. G., & Reibnegger, G. (1996). Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients. *Neuroscience letters*, 203(1), 29–32. Retrieved January 28, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8742039>

Trillo, L., Das, D., Hsieh, W., Medina, B., Moghadam, S., Lin, B., Dang, V., et al. (2013). Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. translating basic science into clinical care. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 37(8), 1363–79. Retrieved February 16, 2015, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763413001449>

Vicens, P., Redolat, R., & Del Carmen Carrasco, M. (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: Metodología y aplicaciones. *Psicothema*, 15(4), 539–544.

Violante Soria, V. (2014). *Descripción de la actividad neuroquímica del hipocampo durante la evocación de la memoria de reconocimiento*. Facultad de Psicología. Universidad Nacional Autónoma de México. Retrieved from <http://132.248.9.195/ptd2014/mayo/304145562/Index.html>

Vogel-Ciernia, A., & Wood, M. A. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Current protocols in neuroscience / editorial*

- board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.], 69, 8.31.1–8.31.17. Retrieved September 21, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25297693>
- Wartman, B. C., Gabel, J., & Holahan, M. R. (2014). Inactivation of the anterior cingulate reveals enhanced reliance on cortical networks for remote spatial memory retrieval after sequential memory processing. *PLoS one*, 9(10), e108711.
- Wartman, B. C., & Holahan, M. R. (2013). The use of sequential hippocampal-dependent and -non-dependent tasks to study the activation profile of the anterior cingulate cortex during recent and remote memory tests. *Neurobiology of Learning and Memory*, 106(February 2016), 334–342.
- West, M. J. (2012). Introduction to stereology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 7, 843–851.
- Yu, J.-T., Tan, L., Ou, J.-R., Zhu, J.-X., Liu, K., Song, J.-H., & Sun, Y.-P. (2008). Polymorphisms at the beta2-adrenergic receptor gene influence Alzheimer's disease susceptibility. *Brain research*, 1210, 216–22. Retrieved February 17, 2015, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899308006677>
- Zhou, L. Y. Y., Wright, T. E., & Clarkson, A. N. (2015). Prefrontal cortex stroke induces delayed impairment in spatial memory. *Behavioural brain research*, 296, 373–8. Retrieved October 19, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26306825>

## 11. Anexos

### Anexo 1

#### Efecto de la administración de catecol sobre el peso de los ratones a lo largo del tratamiento

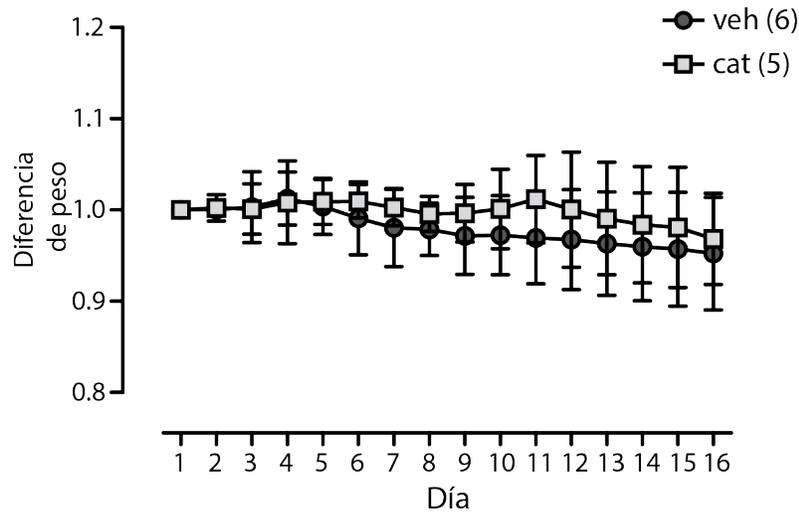


Fig 19 **Peso de los ratones por día a lo largo del tratamiento.** Se muestra el promedio del peso normalizado por día del grupo vehículo (veh) (n=6) y el grupo catecol (cat) (n=5). ANOVA de dos vías por tratamiento  $F_{1,150} = 0.8466$ ,  $P = 0.3792$ ; por tiempo  $F_{15,150} = 2.909$ ,  $P = 0.0005$ .

Se realizó un ANOVA de dos vías considerando al tratamiento y al tiempo como factores para determinar si la administración de catecol (10mg/kg) diaria tenía un efecto sobre el peso de los sujetos experimentales. No se encontró ninguna diferencia significativa con respecto al tratamiento, pero si respecto al los diferentes días de tratamiento (tratamiento  $F_{1,150} = 0.8466$ ,  $P = 0.3792$ ; tiempo  $F_{15,150} = 2.909$ ,  $P = 0.0005$ ). La diferencia de peso de los ratones con respecto al tiempo puede ser debido al estrés provocado por la administración.

## Anexo 2

### Genotipificación

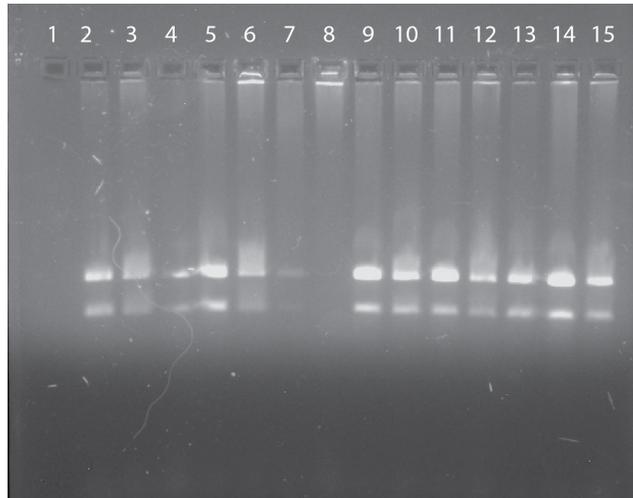


Fig 20 **Gel de agarosa 2% de APP/tau**. Se muestran las bandas de 500 y 530 pb del producto de PCR de APP/tau. El carril 1 es agua, los carriles 2-6, 9-15 contienen DNA de ratones 3xTg AD y los carriles 7 y 8 ratones Wt.

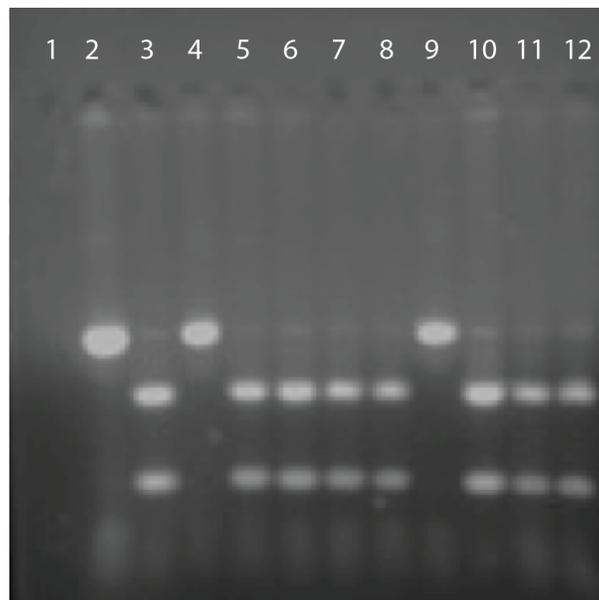


Fig 19 **Gel de agarosa 2% de PS1**. Se muestran las bandas de 550 pb en el caso de los ratones WT, carriles 2, 4 y 9; y las bandas de 300 y 250 pb en el caso de los ratones 3xTg AD tras la digestión del producto de PCR de PS1, carriles 3, 5-8, 10-12. El carril 1 fue agua.